



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) Número de Publicação: PT 101702 B

(51) Classificação Internacional: (Ed. 7)

A61K031/70 A A61K047/48 B
C07H015/252 B A61P035/00 B

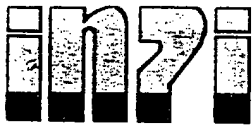
(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de depósito: 1995.05.12	(73) Titular(es): BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY 345 PARK AVENUE NEW YORK, N. Y. 10154 US
(30) Prioridade: 1987.08.04 US 081382 1988.02.26 US 161068 1988.06.29 US 211301	
(43) Data de publicação do pedido: 1996.01.31	(72) Inventor(es): MARK G. SAULNIER US PETER D. SENTER US DAVID E. KERR US JOSEPH PATRIC BROWN AU
(45) Data e BPI da concessão: 08/99 1999.08.02	(74) Mandatário(s): ANTÓNIO LUÍS LOPES VIEIRA DE SAMPAIO RUA DE MIGUEL LUIPI 16 R/C 1200 LISBOA PT

(54) Epígrafe: PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PROFÁRMACOS ANTRACICLÍNICOS E DE COMPOSIÇÕES E DE ASSOCIAÇÕES FARMACÊUTICAS QUE OS CONTÊM LIGADOS A CONJUGADOS ANTICORPO-BENZIMA

(57) Resumo:

ANTRACICLÍNICOS; ANTICORPO; ENZIMA; TUMOR; CITOTÓXICO;
ADRIAMICINA



Modalidade e n.º (11)	T D	Data do pedido: (22)	Classificação Internacional (51)
101702			

Requerente (71): BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, uma sociedade organizada e existindo segundo as leis do Estado de Delaware, Estados Unidos da América, norte-americana, industrial, com sede em 345 Park Avenue, New York, New York 10154, Estados Unidos da América

Inventores (72):
PETER D. SENTER, MARK G. SAULNIER, JOSEPH P. BROWN e DAVID E. KERR

Reivindicação de prioridade(s) (30)

Data do pedido	Pais de Origem	N.º de pedido
04.08.1987	US	081.382
26.02.1988	US	161.068
29.06.1988	US	211.301

Figura (para interpretação do resumo)

Epigrafe: (54)

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PROFÁRMACOS ANTRACICLÍNICOS E DE COMPOSIÇÕES E DE ASSOCIAÇÕES FARMACÊUTICAS QUE OS CONTÊM LIGADOS A CONJUGADOS ANTICORPO-ENZIMA"

Resumo: (máx. 150 palavras) (57)

A presente invenção descreve profármacos antraciclínicos que possibilitam a libertação de fármacos citotóxicos em células tumorais mediante a administração de um conjugado anticorpo-enzima específico do tumor e que se liga às células tumorais, e a administração adicional do profármaco que é convertido no local do tumor, na presença da enzima ligada ao anticorpo, em um fármaco citotóxico activo. A presente invenção descreve também um método para a preparação destes profármacos

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBREADAS



Modalidade e n.º (11)	T D	Data do pedido (22)	Classificação Internacional (51)
-----------------------	-----	---------------------	----------------------------------

Resumo (continuação) (57)

2

que consiste em fazer reagir, nomeadamente, o grupo amina do fármaco original tal como a adriamicina e outras antraciclinas com o grupo carboxilo do ácido fenoxiacético, do ácido fenilacético ou de outros ácidos relacionados. De acordo com uma variante da presente invenção, tem-se utilizado um conjugado anticorpo-enzima contendo a enzima penicilina V-amidase ("PVA") em associação com um profármaco novo, a N-(p-hidroxifenoxiacetil)-adriamicina para assassinar células tumorais. Os produtos de acordo com a presente invenção asseguram o assassinio de células tumorais e são assim úteis no tratamento de cancro e de outros tumores.

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBREADAS

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

ANTÓNIO L. DE SAMPAIO

A. O. P. I.

Rua de Miguel Lupi, 16, r/c

1200 LISBOA

117

DESCRIÇÃO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PROFÁRMACOS
ANTRACICLÍNICOS E DE COMPOSIÇÕES E DE
ASSOCIAÇÕES FARMACÊUTICAS QUE OS CONTÊM
LIGADOS A CONJUGADOS ANTICORPO-ENZIMA"

Este pedido de patente de invenção é uma continuação em parte de um pedido de patente de invenção norte-americana N° 161068, depositado em 26 de Fevereiro de 1988 na Repartição de Patentes e Marcas dos Estados Unidos da América, pedido esse que é uma continuação em parte do pedido de patente de invenção norte-americana N°081382, depositado em 4 de Agosto de 1987.

A presente invenção descreve novos profármacos de antraciclina, um método para a preparação destes profármacos e a sua utilização no tratamento de cancro. Mais especialmente, a presente invenção permite a libertação de fármacos citotóxicos no local de um tumor mediante a administração de um conjugado anticorpo-enzima específico desse tumor e que se liga às células tumorais e a administração adicional de um novo profármaco que é convertido no local do tumor, na presença da enzima ligada ao anticorpo, em um fármaco

17

citotóxico activo.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A utilização de imunoconjugados para a libertação selectiva de agentes citotóxicos em células tumorais no tratamento de cancro é conhecida na técnica. A libertação de agentes citotóxicos no local das células tumorais é muito pretendida porque a administração destes agentes origina frequentemente o assassinio de células normais no interior do corpo além do das células tumorais que se deseja eliminar. Assim, de acordo com os sistemas de libertação de fármacos antitumor actualmente utilizados, conjuga-se um agente citotóxico a um anticorpo específico do tumor para se obter um imunoconjugado que se liga às células tumorais e deste modo "liberta" o agente citotóxico no local do tumor. Os imunoconjugados utilizados nestes sistemas de condução até ao alvo incluem conjugados anticorpo-fármaco [veja-se, por exemplo, R. W. Baldwin et al., "Monoclonal Antibodies For Cancer Treatment", Lancet, pp. 603-05 (15 de Março de 1986)] e conjugados anticorpo-toxina [veja-se, por exemplo, P. E. Thorpe, "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review", em Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al. (ed. s), pp. 475-506 (1985)].

Nestes imunoconjugados têm sido utilizados quer anticorpos policlonais quer anticorpos monoclonais [veja-se, por exemplo, K. Ohkawa et al., "Selective In Vitro And In Vivo Growth Inhibition Against Human Yolk Sac Tumor Cell Lines By Purified Antibody Against Human α -Fetoprotein Conjugated With Mitomycin C Via Human Serum Albumin", Cancer Immunol. Immunother., 23, pp. 81-86 (1986) e G.F. Rowland et al., "Drug Localisation And Growth Inhibition Studies of Vindesine-Monoclonal Anti-CEA Conjugates In A Human Tumour Xenograft", Cancer Immunol. Immunother., 21, pp. 183-87 (1986)]. Os fármacos utilizados nestes imunoconjugados incluem a daunomicina [veja-se, por exemplo, J. Gallego et al., "Preparation Of Four Daunomycin-Monoclonal Antibody 791T/36 Conjugates With Anti-Tumour Activity, "Int. J. Cancer, 33, pp. 737-44 (1984) e R. Arnon et al., "In Vitro And In Vivo Efficacy Of Conjugates Of Daunomycin With Anti-Tumor Antibodies", Immunological Rev., 62, pp. 5-27 (1982)], metotrexato [N. Endo et al., "In Vitro Cytotoxicity Of A Human Serum Albumin-Mediated Conjugate Of Methotrexate With Anti-MM46 Monoclonal Antibody", Cancer Research, 47, pp. 1076-80 (1987)], mitomicina C [K. Ohkawa et al., supra], e vindesina [G. F. Rowland et al., supra]. As toxinas utilizadas nos

117

conjugados anticorpo-toxina incluem toxinas bacterianas tais como a toxina da difteria e toxinas de origem vegetal tais como a ricina [veja-se, por exemplo, F. L. Moolten et al., "Antibodies Conjugated To Potent Cytotoxins As Specific Antitumor Agents", Immunol. Rev., 62, pp. 47-73 (1982)].

Apesar de toda a investigação dirigida no sentido da utilização de imunoconjugados para fins terapêuticos, são evidentes algumas limitações associadas a estas tentativas de libertação [veja-se, por exemplo, M. J. Embleton, "Targeting Of Anti-Cancer Therapeutic Agents By Monoclonal Antibodies", Biochemical Society Transactions, 14, pp. 393-395 (615th Meeting, Belfast 1986)]. Em primeiro lugar, a grande quantidade de fármaco que é necessário libertar nas células tumorais alvo para assegurar o seu assassinio é frequentemente impossível de obter devido às limitações impostas pelo número de antigénos associados aos tumores existentes à superfície das células e pelo número de moléculas do fármaco que se podem ligar a uma dada molécula do anticorpo. Esta limitação tem conduzido à utilização nestes conjugados de agentes citotóxicos mais potentes tais como toxinas de origem vegetal e ao desenvolvimento de conjugados anticorpo-fármaco ligados a polímeros e possuindo taxas consideravelmente muito elevadas do fármaco [veja-se, por exemplo, P.E.

Ag

Thorpe, supra, pp. 475-506 e R. W. Baldwin et al., "Design And Therapeutic Evaluation Of Monoclonal Antibody 791T/36 - Methotrexate Conjugates", em Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, pp. 215-31 (Alan R. Liss, Inc. 1985)]. Contudo, mesmo com grandes taxas de carga de fármaco ou com a utilização de toxinas potentes, muitos imunocombinados exibem ainda uma actividade citotóxica inferior aos valores óptimos (sub-óptima) e são incapazes de assegurar o assassínio total nas doses em que todos os sítios antigénicos disponíveis estão saturados.

Em segundo lugar, confirmou-se que a actividade citotóxica de um imunocombinado depende frequentemente da sua captação, mediada pelo anticorpo componente do combinado, no interior da célula tumoral [veja-se, por exemplo, J. M. Lambert et al., "Purified Immunotoxins That Are Reactive With Human Lymphoid Cells", J. Biol. Chem., 260 (Nº 22), pp. 12035-12041 (1985)]. Esta internalização é crucial quando se utiliza um combinado anticorpo-fármaco no qual o fármaco possui um sítio de acção intracelular ou quando se utilizam combinados anticorpo-toxina. Contudo, a grande maioria dos antígenos associados ao tumor e conseqüentemente dos combinados anticorpo-fármaco ou anticorpo-toxina ligados a esses antígenos, não é internalizada. Os combinados que são internalizados são frequentemente

transportados para o lisossoma da célula onde tem lugar a degradação do fármaco ou da toxina [veja-se por exemplo, E. S. Vitetta et al., Science, 238, pp. 1098-1104 (1987)]. Consequentemente, embora um conjugado anticorpo-fármaco ou anticorpo-toxina possa exibir excelentes características de ligação ao tumor, é eventualmente possível, mesmo assim, que o conjugado possua uma utilidade citotóxica limitada devido a uma incapacidade para atingir o seu sítio de acção no interior da célula.

Adicionalmente, sabe-se perfeitamente que as populações de células tumorais são frequentemente heterogêneas no que diz respeito à expressão do antígeno [veja-se, por exemplo, A. P. Albino et al., "Heterogeneity In Surface Antigen And Glycoprotein Expression Of Cell Lines Derived From Different Melanoma Metastases Of The Same Patient", J. Exp. Med., 154, pp. 1764-78 (1981)]. Além disso, demonstrou-se que as células tumorais antigéneo-positivas podem originar uma progenitura antigene-negativa [veja-se, por exemplo, M. Yeh et al., "Clonal Variation For Expression Of A Human Melanoma Antigen Defined By A Monoclonal Antibody", J. Immunol., 126 (Nº 4), pp. 1312-17 (1981)]. Deste modo, em uma qualquer população de células tumorais, existirá um determinado número de células que não possuem o antígeno para o qual um

imunoconjugado particular é específico. Consequentemente, o imunoconjugado não será capaz de se ligar a estas células e mediar o seu assassinio.

Devido a estes inconvenientes, os sistemas de libertação de fármacos ou de toxinas antitumor actualmente utilizados têm conhecido um sucesso limitado, especialmente quando utilizados para tratamento in vivo.

Adicionalmente aos imunoconjugados discutidos antes, têm sido estudados in vitro conjugados anticorpo-enzima em associação com uma segunda enzima não conduzida até ao alvo pelo anticorpo, a fim de converter um iodeto ou a arsfenamina nas suas formas tóxicas com o objectivo de aumentar a citotoxicidade mediada pelo anticorpo [veja-se, por exemplo, C. W. Parker et al., "Enzymatic Activation And Trapping Of Luminol-Substituted Peptides And Proteins. A Possible Means Of Amplifying The Cytotoxicity Of Anti-Tumor Antibodies, "Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72 (Nº1), pp. 338-42 (1975) e G. W. Philpott et al., "Affinity Cytotoxicity Of Tumor Cells With Antibody-Glucose Oxidase Conjugates, Peroxidase, And Arsphenamine, "Cancer Research, 34, pp. 2159-64 (1974)].

De acordo com estes estudos in vitro, a enzima, glicose-oxidase, liga-se a um anticorpo e é utilizada

Ag

em associação com uma enzima peroxidase não conduzida até ao alvo pelo anticorpo para converter um iodeto ou a arsfenamina em um derivado de iodo ou de arsénio citotóxico, respectivamente. Consequentemente, esta tentativa exige não só a condução da glicose-oxidase até às células tumorais alvo pelo anticorpo, mas também a presença no local do tumor de dois outros agentes não conduzidos até ao alvo pelo anticorpo. A probabilidade de os três agentes se encontrarem todos presentes in vivo no local do tumor ao mesmo tempo é pequena pelo que esta tentativa não tem provavelmente importância terapêutica.

A patente de invenção canadiana N^o 1216791, concedida a F. Jansen et al., a 20 de Janeiro de 1987, descreve a conjugação a um anticorpo de uma enzima capaz de libertar iões amónio a partir de substratos. Nessa patente afirma-se que os iões amónio são capazes de potenciar a acção citotóxica de determinadas imunotoxinas conduzidas até ao local do tumor pelo anticorpo.

Finalmente, o pedido de patente de invenção europeia 84302218.7 descreve um método para o tratamento de uma população celular afectada por uma enfermidade de tipo tumoral em que se utiliza um anticorpo para conduzir um antigene não metabolizável até às células tumorais. O antigene acumula-se no interior

de pelo menos uma percentagem das células tumorais, que são seguidamente submetidas a lise para libertarem o antigene no interior de uma matriz ubíqua capturadora de fibronectina formada no local do tumor. Nesta fase do método da presente invenção, administra-se um ligando contendo iodo que é específico relativamente ao antigene fixado à matriz e ao qual se ligará. O iodo citotóxico actua seguidamente de modo a assassinar as células tumorais naquele local. Neste pedido de patente de invenção são divulgadas muitas variantes alternativas, uma das quais sugere a utilização de um conjugado anticorpo-enzima para conduzir a enzima até ao local de um tumor e a adição de um substrato não letal que a enzima pode converter em um material citotóxico [veja-se o pedido de patente de invenção europeia, pp. 34-35]. Contudo, em nenhuma parte desse pedido de patente de invenção existe qualquer descrição do modo de executar esta variante. De modo idêntico, Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", em Controlled Drug Delivery (2ª Ed.), Robinson e Lee (ed.s), p. 639 (1987) sugerem que "os fármacos que não forem tóxicos até serem "activados" por um agente (por exemplo, uma enzima) localizado no tumor podem considerar-se mais uma tentativa...".

Até ao momento, contudo, ninguém descreveu ou sugeriu a forma como esse tipo de abordagem ali

referenciada pode ser implementada nem ninguém planeou realmente esta tentativa de condução do fármaco até ao alvo.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se aos problemas anteriormente enunciados proporcionando um método novo para a libertação de agentes citotóxicos em células tumorais mediante a utilização conjunta de conjugados anticorpo-enzima e de profármacos. De acordo com a presente invenção, conjuga-se uma enzima capaz de converter um profármaco de fraca toxicidade ou não citotóxico em um fármaco citotóxico activo com um anticorpo específico de um tumor. Este conjugado anticorpo-enzima é administrado a um mamífero hospedeiro efectado por um tumor e liga-se, devido à especificidade do anticorpo, à superfície das células tumorais que possuem o antigene tumoral para o qual o anticorpo é específico. O profármaco é seguidamente administrado ao hospedeiro e convertido no local do tumor por acção da enzima ligada ao anticorpo em um fármaco citotóxico mais activo.

A presente invenção inclui também um método para a libertação de fármacos citotóxicos em células tumorais nas quais uma série de profármacos é activada por uma única enzima ligada a um anticorpo. Adicionalmente, de acordo com a presente invenção pode utilizar-

17

-se uma série de imunocombinados diferentes, isto é, anticorpos específicos de tumores e que possuem enzimas diferentes, para converter diversos profármacos diferentes nas suas formas mais citotóxicas para o tratamento de tumores. Alternativamente, de acordo com a presente invenção pode utilizar-se uma série de imunocombinados diferentes em que a especificidade do anticorpo componente do combinado varia, isto é, cada imunocombinado contém um anticorpo contra um sítio antigénico diferente na célula tumoral, para converter um profármaco ou diversos profármacos em uma forma citotóxica mais activa.

De acordo com aspectos preferenciais da presente invenção, têm-se utilizado combinados anticorpo-enzima contendo a enzima, uma fosfatase alcalina ("AP"), em associação com um profármaco novo, o 4'-fosfato de etoposido ou a 7-(2'-amino-etil-fosfato)-mitomicina ou uma sua associação, para assegurar o assassínio das células tumorais. De acordo com outra variante da presente invenção, utilizou-se um combinado anticorpo-enzima contendo a enzima, a penicilina V-amidase ("PVA") em associação com um profármaco novo, a N-(p-hidroxifenoxiacetil)-adriamicina, para assegurar o assassínio das células tumorais. Ainda um outro aspecto da presente invenção diz respeito à utilização de um combinado anticorpo-enzima contendo a enzima, citosina-

-desaminase ("CD"), em associação com o profármaco, a 5-fluorocitosina, para assegurar o assassínio das células tumorais.

Os imunocombinados e os profármacos de acordo com a presente invenção podem ser utilizados em composições antitumor, tais como as que incorporam uma quantidade eficaz sob o ponto de vista farmacêutico de pelo menos um imunocombinado ou de um profármaco da presente invenção e um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico. Adicionalmente, os imunocombinados e os profármacos podem ser utilizados em associações e métodos para o tratamento de tumores em mamíferos que incluem a fase de tratamento de um mamífero com uma quantidade eficaz sob o ponto de vista farmacêutico das composições de acordo com a presente invenção.

De um modo vantajoso, a utilização, imunocombinados, profármacos, composições farmacêuticas e associações de acordo com a presente invenção proporcionam um método relativamente simples e directo de libertação de fármacos citotóxicos em células tumorais, permitindo o aumento da citotoxicidade selectiva e evitando ao mesmo tempo os problemas de expressão dos antigénios heterogénios, a internalização de antigénio-anticorpo e a potência insuficiente do fármaco inerente às técnicas convencionais de imunoterapia

dirigidas para o anticorpo.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 representa a estratégia utilizada para a activação de profármacos em células tumorais que se unem aos conjugados anticorpo-enzima.

A Figura 2 representa uma análise em gel de SDS-poliacrilamida (gel em gradiente de 5-12,5%, não redutor) de: (A) imunoc conjugado 96.5-AP; (B) imunoc conjugado L6-AP; (C) AP; (D) anticorpo monoclonal 96.5; e (E) anticorpo monoclonal L6.

A Figura 3 representa a preparação e a hidrólise dos profármacos fosfato de etoposido e tiofosfato de etoposido da presente invenção.

A Figura 4 representa a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC controlada a 254 nm) de: (A) apenas o 4'-fosfato de etoposido, isto é, na ausência de AP ou do conjugado AP-L6; (B) apenas o etoposido; (C) o produto produzido 5 minutos após a reacção do profármaco 4'-fosfato de etoposido com AP; e (D) o produto produzido 5 minutos após a reacção do profármaco 4'-fosfato de etoposido com o conjugado L-6-AP da presente invenção.

A Figura 5 é uma representação gráfica comparativa da percentagem de libertação do etoposido ao longo do tempo por exposição do 4'-fosfato de etoposido ou do 4'-tiofosfato de etoposido à fosfatase alcalina.

A Figura 6 representa a ligação comparativa às células tumorais H3347 dos anticorpos monoclonais L6 e 96.5 e dos conjugados L6-AP e 96.5-AP da presente invenção.

A Figura 7 representa a ligação comparativa às células tumorais H3347 dos anticorpos monoclonais L6 e 1F5 e dos conjugados L6-AP e 1F5-AP da presente invenção.

A Figura 8 é uma representação gráfica comparativa do valor percentual das células tumorais assassiadas em função da concentração molar de etoposido ou do profármaco fosfato de etoposido. O gráfico revela o valor percentual aumentado do assassínio que resulta da reacção do profármaco relativamente não citotóxico quer com o conjugado L6-AP quer com o conjugado 96.5-AP da presente invenção.

A Figura 9 é uma representação gráfica comparativa do valor percentual da inibição da incorporação de ³H-timidina no ADN das células tumorais H3347 tratadas com ●: etoposido, ○: EP, □: L6-AP+EP ou ■: 1F5-AP+EP. O gráfico revela o acréscimo de actividade citotóxica observado quando as células tumorais foram tratadas com L6-AP e EP comparativamente com a actividade que se observa ao fazer-se o tratamento apenas com EP.

A Figura 10 apresenta análises da actividade da fosfatase em tumores que não foram tratados ou que

117

foram tratados com os conjugados da presente invenção. A Figura 10A revela a actividade total da fosfatase em tumores H3347 ao longo do tempo em murganhos não tratados comparativamente com murganhos tratados 24 horas antes com o conjugado L6-AP da presente invenção. A Figura 10B mostra secções transversais de tumores provenientes de murganhos não tratados ou de murganhos pré-tratados com L6-AP ou com 1F5-AP coradas com hematoxilina e eosina ou com um substrato de AP. As áreas escuras indicam uma actividade elevada da fosfatase.

A Figura 11 é uma representação gráfica comparativa do volume tumoral ao longo do tempo em murganhos ●: não tratados ou tratados com O: etoposido, ■: EP □: 1F5-AP+EP ou ▲ : L6-AP+EP. As setas indicam o início do tratamento com o fármaco e, sempre que aplicável, os conjugados foram administrados 18 a 24 horas mais cedo. O gráfico revela o efeito antitumor pronunciado observado sob a acção do tratamento com L6-AP e EP.

A Figura 12 revela as estruturas químicas dos derivados de mitomicina utilizados em conformidade com a presente invenção, incluindo o novo profármaco, o 7-(2'-aminoetilfosfato) de mitomicina ("MOP").

A Figura 13 revela a reacção do MOP com a enzima fosfatase alcalina ao longo do tempo. A evolução da reacção foi controlada por HPLC para a libertação de

7

MOH que é o derivado alcoólico mitomicínico do MOP.

A Figura 14 revela a ligação comparativa às células tumorais H2981 dos anticorpos monoclonais L6 e 1F5 e dos conjugados L6-AP e 1F5-AP da presente invenção.

A Figura 15 é uma representação gráfica comparativa do valor percentual da inibição da incorporação de ^3H -timidina no interior do ADN das células tumorais H2981 tratadas com \blacktriangle : etoposido, \blacksquare : EP, \square : AP+EP, \bullet : L6-AP+EP ou \circ : 1F5-AP+EP. O gráfico revela o aumento da actividade citotóxica relativamente à utilização de apenas o EP observado quando as células tumorais foram pré-tratadas com o conjugado L6-AP da presente invenção.

A Figura 16 é uma representação gráfica comparativa do valor percentual da inibição da incorporação de ^3H -timidina no interior do ADN das células tumorais H2981 tratadas com \square : mitomicina C (MMC), \triangle : MOH, \blacksquare : MOP, \triangle : MOP+AP, \bullet : L6-AP+MOP ou \circ : 1F5-AP+MOP. O gráfico revela o aumento da actividade citotóxica observado quando as células tumorais foram pré-tratadas com o conjugado L6-AP da presente invenção seguindo-se o tratamento com o MOP, comparativamente com a actividade observada quando se faz o tratamento apenas com o MOP.

A Figura 17 é uma representação gráfica compa-

117

rativa do valor percentual da inibição da incorporação de ^3H -timidina no interior do ADN de células CEM tratadas com \blacktriangle : MMC, \square : MOH, \blacksquare : MOP, \bullet : L6-AP+MOP ou \circ : 1F5-AP+MOP. Este gráfico demonstra a especificidade da citotoxicidade aumentada observada na Figura 16 anterior devido ao facto de não se observar um aumento significativo nas células CEM a que falta o antigene L6.

A Figura 18 é uma representação gráfica comparativa do volume tumoral ao longo do tempo em murganhos \bullet : não tratados (controlo) ou tratados com \blacksquare : MOH, \circ : MOP, \blacktriangle : 1F5-AP+MOP ou \blacksquare : L6-AP+MOP. As setas indicam os tratamentos espaçados com fármaco e, sempre que aplicável, os conjugados foram administrados 18 a 24 horas mais cedo do que cada um dos tratamentos com o fármaco. O gráfico revela o efeito anti-tumor acentuado observado no tratamento dos tumores com L6-AP+MOP.

A Figura 19 é uma representação gráfica comparativa do volume tumoral ao longo do tempo em murganhos \blacksquare : não tratados (controlo) ou tratados com \square : MOP/EP, \circ : 1F5-AP+MOP/EP ou \bullet : L6-AP-MOP/EP. As setas indicam os tratamentos espaçados com o fármaco e, sempre que aplicável, os conjugados foram administrados 18 a 24 horas mais cedo do que cada um dos tratamentos com o fármaco. O gráfico demonstra o efeito antitumor acentuado observado no tratamento dos tumores com o

7

conjugado L6-AP da presente invenção e com uma associação dos profármacos, MOP e EP.

A Figura 20 representa a estrutura química de um profármaco da adriamicina da presente invenção ("APO") e a sua preparação a partir da adriamicina.

A Figura 21 é uma representação gráfica comparativa do valor percentual da adriamicina libertada ao longo do tempo na reacção do APO com Δ : enzima livre penicilina V-amidase ou O e \square : o conjugado L6-PVA da presente invenção entre 10 e 100 μg de proteína total/ml, respectivamente. A evolução da reacção foi controlada por HPLC.

A Figura 22 revela a ligação comparativa às células tumorais H2981 do anticorpo monoclonal L6 e dos conjugados L6-PVA e 1F5-PVA da presente invenção.

A Figura 23 é uma representação gráfica comparativa do valor percentual da inibição da incorporação de ^3H -timidina no interior do ADN das células tumorais H2981 tratadas com O: adriamicina (ADM), \bullet : APO, Δ : L6-PVA+APO ou \blacktriangle : 1F5-PVA+APO. O gráfico representa o aumento da actividade citotóxica observada quando as células tumorais foram pré-tratadas com o conjugado L6-PVA seguindo-se o tratamento com APO comparativamente com a actividade observada quando se efectua o tratamento apenas com APO.

A Figura 24 revela a ligação comparativa às

células do linfoma de Daudi dos anticorpos monoclonais L6 e 1F5 e dos conjugados L6-PVA e 1F5-PVA da presente invenção.

A Figura 25 é uma representação gráfica comparativa do valor percentual da inibição da incorporação de ^3H -timidina no interior do ADN das células do linfoma de Daudi tratadas com ●: ADM, ○: APO, ■: L6-PVA+APO ou □: 1F5-PVA+APO. O gráfico revela o aumento da actividade citotóxica observada quando as células tumorais foram pré-tratadas com o conjugado 1F5-PVA seguindo-se o tratamento com APO comparativamente com o efeito citotóxico observado quando se efectua o tratamento das células apenas com o APO.

A Figura 26 revela as estruturas químicas da 5-fluorocitosina ("5-FC") e do 5-fluorouracilo ("5-FU"). O composto 5-FC é um profármaco que é convertido em 5-FU de acordo com os métodos da presente invenção.

A Figura 27 é uma representação gráfica comparativa da quantidade de produto formado ao longo do tempo durante a reacção da citosina (cito) com ●: CD, ○: L6-CD ou ■: 1F5-CD ou durante a reacção do 5-FC com □: CD, ▲: L6-CD ou △: 1F5-CD. O produto formado quando se utilizou a citosina como substrato foi o uracilo e o produto que se formou quando se utilizou o

117

composto 5-FC como substrato foi o composto 5-FU. A evolução da reacção foi controlada por espectrofotometria.

A Figura 28 revela a ligação comparativa às células tumorais H2981 do anticorpo monoclonal L6 e dos conjugados L6-CD e 1F5-CD da presente invenção.

A Figura 29 é uma representação gráfica comparativa do valor percentual da inibição da incorporação de ^3H -leucina no interior da proteína das células tumorais H2981 tratadas com ●: 5-FU, □: 5-FC, ○: L6-CD+5-FC ou ■: 1F5-CD+5-FC. O gráfico revela o aumento da actividade citotóxica observado quando as células tumorais foram pré-tratadas com o conjugado L6-CD seguindo-se o tratamento com o composto 5-FC comparativamente com a actividade observada quando se efectua o tratamento apenas com o composto 5-FC.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a um método novo para a libertação de agentes citotóxicos em células tumorais e proporciona o assassínio selectivo reforçado destas células no tratamento de cancros, tais como carcinomas e melanomas, bem como de outros tumores.

De acordo com o método da presente invenção, administra-se um conjugado anticorpo-enzima a um mamífero hospedeiro afectado por um tumor. Este conjugado

anticorpo-enzima consiste em um anticorpo específico do tumor unido a uma enzima que é capaz de converter um profármaco, o qual é menos citotóxico para as células tumorais do que o fármaco inicial, no fármaco inicial mais activo. Quando introduzido no hospedeiro, o anticorpo componente do conjugado, o qual reage com um antigene encontrado nas células tumorais, dirige o conjugado para o local do tumor e liga-se às células tumorais. Consequentemente, pode considerar-se que o anticorpo liberta a enzima no local do tumor. Introduz-se depois no hospedeiro um profármaco que é um substrato da enzima que o converte, no local do tumor, em um fármaco citotóxico activo. O fármaco é assim activado extracelularmente e pode difundir-se no interior de todas as células tumorais existentes naquele local, isto é, nas células que possuem o antigene particular do tumor para as quais o anticorpo do conjugado é específico e às quais o anticorpo se liga bem como nas células que são negativas para aquele antigénio mas que apesar de tudo existem no local do tumor (ver a Figura 1). Consequentemente o método da presente invenção vem resolver os problemas actuais da heterogeneidade antigénica tumoral e a necessidade de internalização de antigénio/conjugado associada às técnicas convencionais de libertação de um fármaco imunoconjugado.

Por outro lado, uma vez que a presente invenção não exige que o fármaco esteja ligado directamente ao anticorpo e consequentemente limite a quantidade de fármaco que pode ser libertada, não se coloca o problema comum da potência do fármaco no local do tumor. De facto, o método presente amplifica o número de moléculas activas do fármaco existente no local do tumor porque a enzima do conjugado ligada ao anticorpo pode sofrer diversas modificações do substrato, convertendo repetidamente o profármaco em fármaco activo. Por outro lado, o método presente é capaz de libertar o fármaco activo especificamente no local do tumor sem libertação noutros tecidos. Isto é assim porque a concentração da enzima no local do tumor é superior à sua concentração noutros tecidos devido ao revestimento das células tumorais com o conjugado anticorpo-enzima.

O anticorpo componente do imunoconjugado da presente invenção inclui qualquer anticorpo que se liga especificamente a um antigene associado ao tumor. Exemplos de tais anticorpos incluem, sem que isso constitua qualquer limitação, aqueles que se ligam especificamente aos antigénios encontrados em carcinomas, melanomas, linfomas e sarcomas dos ossos e de tecidos moles bem como em outros tumores. Preferem-se os anticorpos que permanecem ligados à superfície celular durante períodos prolongados ou que são

internalizados muito lentamente. Estes anticorpos podem ser policlonais ou preferivelmente, monoclonais, podem ser moléculas intactas de anticorpos ou fragmentos contendo a região de ligação activa do anticorpo, por exemplo, Fab ou F (ab')₂, e podem produzir-se utilizando técnicas bem conhecidas na especialidade. [veja-se, por exemplo, R.A. DeWeger et al., "Eradication Of Murine Lymphoma And Melanoma Cells By Chlorambucil-Antibody Complexes, Immunological Rev., 62, pp. 29-45 (1982) (anticorpos policlonais específicos do tumor produzidos e utilizados em conjugados); M. Yeh et al., "Cell Surface Antigens Of Human Melanoma Identified By Monoclonal Antibodies", Proc. Natl. Acad. Sci., 76, p. 2927 (1979); J. P. Brown et al., "Structural Characterization Of Human Melanoma - Associated Antigen p97 With Monoclonal Antibodies", J. Immunol., 127 (Nº 2), pp. 539-546 (1981) (anticorpos monoclonais específicos do tumor produzidos); e J. P. Mach et al., "Improvement Of Colon Carcinoma Imaging: From Polyclonal Anti-CEA Antibodies And Static Photoscanning To Monoclonal Fab Fragments And ECT", em Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, R. W. Baldwin et al., (ed.s), pp. 53-64 (Academic Press 1985) (fragmentos de anticorpos produzidos e utilizados para localizar as células tumorais)]. Adicionalmente, quando se utilizam anticorpos monoclonais, os anticorpos podem

119

ser murinos ou humanos ou anticorpos quiméricos [veja-se, por exemplo, V. T. Oi, "Chimeric Antibodies", BioTechniques, 4 (Nº 3), pp. 214-221 (1986)].

O componente enzimático do imunoconjugado da presente invenção inclui uma enzima qualquer capaz de actuar sobre um profármaco de modo a convertê-lo na sua forma citotóxica mais activa. O termo "profármaco" quando utilizado neste pedido de patente de invenção refere-se a um precursor ou a uma forma derivada de uma substância activa sob o ponto de vista farmacêutico que é menos citotóxica para as células tumorais comparativamente com o fármaco original e é capaz de ser activado enzimaticamente ou convertido na forma original mais activa [veja-se, por exemplo, D.E.V. Wilman, "Prodrugs In Cancer Chemotherapy", Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382 (615th Meeting, Belfast 1986) e V. J. Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach To Targeted Drug Delivery", Directed Drug Delivery, R. Borhardt et al. (ed.), pp. 247-267 (Humana Press 1985)].

As enzimas que são úteis no método da presente invenção incluem, sem que isso constitua qualquer limitação, uma fosfatase alcalina útil para converter profármacos contendo fosfatos em fármacos livres, a aril-sulfatase útil para converter profármacos contendo sulfatos em fármacos livres, a citosina-desaminase útil

para converter a 5-fluorocitosina não tóxica no fármaco anti-cancro, o 5-fluorouracilo, proteases, tais como a serratia-protease, a termolisina, a subtilisina, carboxipeptidases e catepsinas (tais como as catepsinas B e L), que são úteis para converter profármacos contendo péptidos em fármacos livres, D-alanil-carboxipeptidases, úteis para converter profármacos que contêm substituintes de D-aminoácidos, enzimas capazes de cindirem hidratos de carbono tais como a β -galactosidase e a neuraminidase úteis para converter profármacos glicosilados em fármacos livres, a β -lactamase útil para converter fármacos derivados de β -lactamas em fármacos livres e penicilina-amidases, tais como a penicilina V-amidase ou a penicilina G-amidase, úteis para converter fármacos obtidos a partir da reacção de átomos de azoto de aminas com grupos fenoxiacetilo ou grupos fenilacetilo, respectivamente, em fármacos livres. Alternativamente, podem utilizar-se anticorpos com actividade enzimática, também conhecidos na especialidade como abzimas, para converter os profármacos de acordo com a presente invenção em fármacos activos livres [veja-se, por exemplo, R. J. Massey, Nature, 328, pp. 457-458 (1987)]. De acordo com a técnica descrita na presente invenção podem preparar-se conjugados anticorpo-abzima para libertação da abzima na população de células tumorais.

119

De um modo similar, os profármacos de acordo com a presente invenção incluem, sem que isso constitua qualquer limitação, os profármacos anteriormente citados, por exemplo, profármacos contendo fosfatos, profármacos contendo tiofosfatos, profármacos contendo sulfatos, profármacos contendo péptidos, profármacos D-aminoácidos modificados, profármacos glicosilados, profármacos contendo β -lactama, profármacos contendo fenoxiacetamida eventualmente substituída ou profármacos contendo fenilacetamida eventualmente substituída, a 5-fluorocitosina e outros profármacos derivados da 5-fluorouridina que podem ser convertidos pela enzima do conjugado no fármaco livre citotóxico mais activo. Exemplos de fármacos citotóxicos que é possível transformar em um profármaco para utilização na presente invenção incluem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, o etoposido, o teniposido, a adriamicina, a daunomicina, a carminomicina, a aminopterina, a dactinomicina, mitomicinas, a cis-platina e análogos da cis-platina, bleomicinas, esperamicinas [veja-se a patente de invenção norte-americana N^o 4675187], o 5-fluorouracilo, o melfalano e outras mostardas azotadas afins.

As enzimas da presente invenção podem ligar-se de um modo covalente aos anticorpos da mesma invenção por técnicas bem conhecidas na especialidade tais como

119

a utilização dos reagentes de reticulação heterobifuncionais, o SPDP [propionato de N-succinimidil-3-(2-piridil-di-tio)] ou o SMCC [ciclo-hexano-1-carboxilato de (succinimidil-4-(N-maleimidometilo)] [veja-se, por exemplo, P.E. Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunological Rev., 62, pp. 119-58 (1982); J. M. Lambert et al., supra na p. 12038; G. F. Rowland et al., supra, nas pp. 183-84 e J. Gallego et al., supra nas pp. 737-38]. Alternativamente, é possível construir proteínas de fusão contendo pelo menos a região de ligação ao antigene de um anticorpo da presente invenção ligado a pelo menos uma porção activa sob o ponto de vista funcional de uma enzima da presente invenção utilizando técnicas de ADN recombinantes bem conhecidas na especialidade [veja-se por exemplo, M. S. Neuberger et al., Nature, 312, pp. 604-608 (1984)]. Estas proteínas de fusão actuam essencialmente de forma idêntica à dos conjugados anticorpo-enzima descritos na presente memória descritiva.

De acordo com um aspecto preferencial da presente invenção, conjugou-se um anticorpo específico de um antigene de um cancro humano com a enzima, uma fosfatase alcalina, e utilizou-se em conformidade com o método da presente invenção para converter um derivado 4'-fosfato dos glicosidos da epipodofilotoxina em um

fármaco anticâncro activo. Esses derivados englobam os compostos 4'-fosfato de etoposido, 4'-tiofosfato de etoposido e 4'-fosfato de teniposido (ver as estruturas desses derivados na Figura 3; o derivado teniposido possui um grupo 2-tienilo em vez do grupo metilo no radical açúcar das estruturas representadas). Outros aspectos da presente invenção podem incluir derivados de fosfatos desses glicosidos em que o radical fosfato é colocado nos glicosidos em outros grupos hidroxil. Contudo, de acordo com um aspecto mais preferencial, o derivado do fosfato utilizado como profármaco na presente invenção é o 4'-fosfato de etoposido ou o 4'-tiofosfato de etoposido.

De acordo com a presente invenção, uniu-se de um modo covalente uma fosfatase alcalina, AP, ao anticorpo monoclonal, L6, um anticorpo IgG2a que se liga a um antigene glicoproteico em células de carcinoma de pulmão humano [I. Hellstrom et al., "Antitumor Effects Of L6, An IgG2a Antibody That Reacts With Most Human Carcinomas", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, pp. 7059-63 (1986)]. O imunoconjugado resultante não mostrou qualquer perda de actividade enzimática comparativamente com a da enzima não conjugada. Adicionalmente, a maior parte da actividade ligante do anticorpo L6 foi conservada no imunoconjugado.

Realizando ensaios de citotoxicidade in-vitro, demonstrou-se que o tratamento de células de uma linha de células de um carcinoma humano com o imunoconjugado L6-AP seguido por exposição das células a um profármaco, um fosfato de etoposido, originou uma citotoxicidade comparável à utilização de apenas o etoposido naquelas células cancerosas. Pelo contrário, o fosfato de etoposido utilizado individualmente demonstrou fraca citotoxicidade.

Além disso, estudos realizados in vivo em murganhos nus demonstraram que o imunoconjugado L6-AP se localiza em xenotransplantes de tumores L6-positivos. A avaliação histológica daqueles tumores indicou que a fosfatase alcalina conduzida até ao alvo pelo anticorpo se distribuiu por toda a massa tumoral.

Adicionalmente, o imunoconjugado L6-AP demonstrou in vivo uma actividade poderosa antitumor em experiências terapêuticas em que o conjugado foi administrado a murganhos nus afectados por tumores subcutâneos L6-positivos seguindo-se o tratamento com o profármaco fosfato de etoposido. O efeito antitumor deste tratamento incluiu a regressão completa de alguns tumores e foi superior ao efeito do tratamento com o profármaco ou apenas com o fármaco original.

De acordo com um outro aspecto preferencial da presente invenção, utilizou-se o imunoconjugado L6-AP

119

para converter um novo profármaco, um fosfato de mitomicina, em um fármaco activo derivado da mitomicina. Tal como sucede no caso do profármaco fosfato de etoposido, a enzima AP do conjugado remove o grupo fosfato do profármaco, libertando o agente antitumor activo. O profármaco fosfato de mitomicina desta variante pode ser um derivado de N⁷-alquil(C₁-C₈)-fosfato de mitomicina C ou de porfiromicina ou um seu sal aceitável sob o ponto de vista farmacêutico. O símbolo N⁷ representa o átomo de azoto que ocupa a posição 7 do núcleo mitosano do fármaco original. De acordo com uma variante mais vantajosa, o derivado utilizado é a 7-(2'-aminoetil-fosfato) de mitomicina ("MOP") (ver na Figura 12 as estruturas da mitomicina C e do MOP sob a forma de um sal dissódico; o derivado da porfiromicina correspondente ao composto MOP possui um grupo metilo no átomo de azoto da aziridina da mitomicina C). Alternativamente, pode designar-se o composto MOP por sal dissódico do 9a-metoxi-7-[[fosfono-oxi)-etil]-amino]-mitosano. Outras variantes da presente invenção podem incluir a utilização de fosforotioatos de N⁷-alquil-mitomicina como profármacos.

Estudos in vitro indicaram que o tratamento de células de uma linha de um tumor de pulmão humano com o imunoconjugado L6-AP seguido por exposição das células ao composto MOP teve como consequência uma citotoxici-

cidade comparável à da utilização em células tumorais de apenas o agente antitumor comprovado, a mitomicina. Da utilização de apenas o profármaco fosfato de mitomicina em células tumorais resultou uma fraca citotoxicidade. De um modo similar, o imunoconjugado L6-AP demonstrou in vivo um efeito antitumor pronunciado em experiências terapêuticas em que o conjugado foi administrado a murganhos nus afectados por tumores de pulmão humano seguindo-se o tratamento com o profármaco fosfato de mitomicina. Este efeito antitumor foi superior ao que se observa utilizando apenas o profármaco, apenas o fármaco original ou um dado profármaco conjuntamente com um conjugado anticorpo-AP não ligante.

Ainda de acordo com um outro aspecto da presente invenção, ligou-se de um modo covalente uma enzima, a penicilina-amidase, ao anticorpo monoclonal L6 e utilizou-se o imunoconjugado resultante para converter um profármaco novo da adriamicina no fármaco antitumor activo, a adriamicina. A amidase específica utilizada foi a penicilina V-amidase ("PVA") isolada a partir de Fusarium oxysporum que hidrolisa as ligações fenoxiacetil-amida. Assim, o profármaco específico utilizado foi a N-(p-hidroxifenoxiacetil)-adriamicina ("APO"), o qual foi hidrolisado pela amidase para libertar o agente antitumor potente, a adriamicina. O

imunoconjugado L6-PVA não demonstrou perda de actividade enzimática comparativamente com a enzima não conjugada e a maior parte da actividade de ligação do anticorpo L6 foi preservada no conjugado.

De acordo com estudos realizados in vitro, o tratamento de células de tumores de pulmão humano com o conjugado L6-PVA seguido por exposição das células ao profármaco APO teve como consequência uma citotoxicidade comparável à que se observa no tratamento das células com apenas adriamicina. É importante salientar que o profármaco APO demonstrou individualmente muito menor citotoxicidade relativamente às células tumorais.

Realizaram-se também estudos in vitro similares utilizando um conjugado 1F5-PVA no qual a enzima PVA foi conjugada com o componente 1F5, um anticorpo monoclonal reactivo com um antigene existente nas células de linfomas. O tratamento de células do linfoma de Daudi com o conjugado 1F5-PVA seguido por exposição das células ao profármaco APO teve como consequência uma citotoxicidade comparável à observada no tratamento com apenas adriamicina, enquanto o tratamento das células com apenas o profármaco APO teve como consequência uma citotoxicidade muito fraca.

Embora a síntese e a utilização do novo profármaco da adriamicina, a N-(p-hidroxifenoxiacetil)-adriamicina, seja descrita na presente memória descritiva, deve ter-se em atenção que a presente invenção inclui a síntese e a utilização de outros profármacos da adriamicina relacionados que se podem obter por um processo praticamente idêntico. Por exemplo, o profármaco N-(fenoxiacetil)-adriamicina está também englobado no âmbito da presente invenção na medida em que esse profármaco pode ser sintetizado utilizando o protocolo descrito na presente memória descritiva mas substituindo o ácido p-hidroxifenoxiacético pelo ácido fenoxiacético (ver o Exemplo 4, infra). Adicionalmente, deve ter-se em atenção que os profármacos da adriamicina da presente invenção incluem outros derivados N-hidroxifenoxiacetilo de adriamicina, por exemplo, substituídos em diferentes posições do anel fenilo, bem como derivados N-fenoxiacetilo contendo substituintes no anel fenilo diferentes do grupo hidroxil descrito na presente memória descritiva.

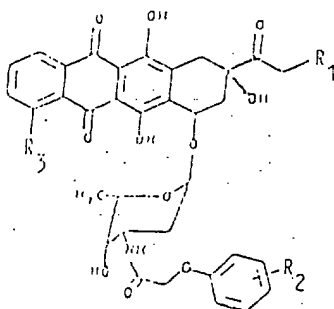
Além do mais a presente variante engloba a utilização de outras amidases, tais como a penicilina G-amidase, como o componente enzimático do imunocombinado bem como outros profármacos correspondentemente derivados de tal modo que a amidase específica possa hidrolisar aquele profármaco originando uma forma

antitumor activa. Por exemplo, quando se utiliza a penicilina G-amidase como enzima, o profármaco deve conter um grupo fenilacetilamida (contrariamente ao grupo fenoxiacetilamida do composto APO) porque as penicilina G-amidases hidrolisam este tipo de ligação amida [veja-se, por exemplo, A. L. Margolin et al., Biochim. Biophys. Acta, 616, pp. 283-89, (1980)]. Assim, outros profármacos da presente invenção incluem a N-(p-hidroxifenilacetil)-adriamicina, a N-(fenilacetil)-adriamicina e outros derivados N-fenilacetílicos eventualmente substituídos da adriamicina.

Também se deve ter em atenção que a presente invenção inclui qualquer profármaco obtido por reacção do grupo amina do fármaco original com o grupo carboxilo do ácido fenoxiacético, do ácido fenilacético ou de outros ácidos relacionados. Assim, os profármacos de antraciclinas diferentes da adriamicina que podem preparar-se e que actuam praticamente do mesmo modo que os profármacos da adriamicina descritos na presente memória descritiva estão englobados no âmbito da presente invenção. Por exemplo, outros profármacos que podem preparar-se e utilizar-se de acordo com a presente invenção incluem derivados de hidroxifenoxiacetilamida, derivados de hidroxifenilacetilamida, derivados de fenoxiacetilamida e derivados de fenilacetilamida de antraciclinas tais como a daunomicina e

a carminomicina. Também se podem modificar conforme descrito na presente memória descritiva outros fármacos contendo um grupo amina tais como o melfalano, a mitomicina, a aminopterina, a bleomicina e a dactinomicina, para se obterem profármacos de acordo com a presente invenção.

Conseqüentemente é evidente que a presente invenção engloba compostos de fórmulas gerais (I) e (II)



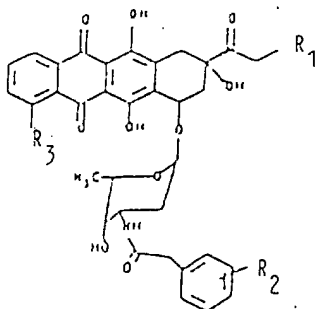
(Fórmula I)

na qual:

R₁ representa um átomo de hidrogénio e R₃ representa um grupo OH ou OCH₃; ou

R₁ representa um grupo OH e R₃ representa um grupo OCH₃; e

R₂ representa um átomo de hidrogénio ou um grupo OH; e



(Fórmula II)

na qual:

R_1 representa um átomo de hidrogénio e R_3 representa um grupo OH ou OCH_3 ; ou

R_1 representa um grupo OH e R_3 representa um grupo OCH_3 ; e

R_2 representa um átomo de hidrogénio ou um grupo OH.

Ainda um outro aspecto preferencial da presente invenção implica a conjugação da enzima, a citosina-desaminase ("CD"), com o anticorpo monoclonal L6. A enzima desaminase catalisa a conversão da 5-fluorocitosina ("5-FC"), um composto destituído de actividade antineoplástica, em um potente fármaco antitumor, o 5-fluorouracilo ("5-FU") (ver a Figura 24). Assim, utilizou-se o imunoconjugado L6-CD da presente invenção para converter o profármaco, 5-FC, no composto 5-FU, daí resultando um efeito citotóxico significativo sobre as células tumorais in vitro.

Tal como sucedia com os imunocombinados da presente invenção anteriormente descritos, o combinado L6-CD não demonstrou qualquer perda significativa de actividade enzimática ou de ligação devida à conjugação. Além disso, os estudos in vitro realizados demonstraram que o tratamento de células de tumor do pulmão humano com o combinado L6-CD seguido por exposição das células ao profármaco, o composto 5-FC, teve como consequência um efeito citotóxico igual ao observado no tratamento das células com o potente fármaco antitumor 5-FU, isoladamente. O tratamento daquelas células tumorais apenas com o profármaco teve como consequência um efeito citotóxico insignificante.

A partir dos resultados exaustivos descritos na presente memória descritiva é evidente que a associação imunocombinado/profármaco de acordo com a presente invenção proporciona um mecanismo selectivo para assassinar células tumorais em que se administra um profármaco com reduzida actividade citotóxica, convertendo-se esse profármaco em um derivado altamente citotóxico no local das células tumorais, devido à presença nesse local da enzima conduzida até ao alvo pelo anticorpo. Além do mais, a citotoxicidade conseguida por este método é aumentada durante a aplicação de técnicas convencionais de condução de anticorpos até ao alvo uma vez que a libertação do

7

fármaco activo no local do tumor não é obstruída pelas limitações físicas que acompanham os sistemas de libertação de conjugados anticorpo-fármaco, conforme descrito antes. Consequentemente, é evidente, que o método de acordo com a presente invenção proporciona um meio para reforçar a citotoxicidade selectiva no que diz respeito às células tumorais no tratamento de cancros e de outros tumores.

Outra variante do método de acordo com a presente invenção proporciona um método de quimioterapia de associação utilizando vários profármacos e apenas um único conjugado anticorpo-enzima. De acordo com esta variante, utilizam-se diversos profármacos os quais são todos substratos da mesma enzima em um imunoconjugado. Assim, um determinado conjugado anticorpo-enzima converte diversos profármacos na forma citotóxica, daí resultando no local do tumor uma actividade antitumor acrescida. Por exemplo, obteve-se um efeito antitumor acentuado em estudos in vivo em que se administrou o imunoconjugado L6-AP da presente invenção a murganhos nus afectados por tumores de pulmão humano, seguindo-se o tratamento com uma associação de profármacos novos, isto é, o profármaco fosfato de etoposido e o profármaco fosfato de mitomicina, administrados conjuntamente. De modo similar, a administração de fosfato de etoposido, fosfato de adriamicina (ver a

AG

patente de invenção norte-americana N° 4185111) e monofosfato de 5-fluorouridina [ver, por exemplo, C. Heidelberger et al., "Fluorinated Pyrimidines And Their Nucleosides", em Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 54, pp. 57-119 (1983)], após tratamento com um conjugado anticorpo-AP antitumor tem como consequência a formação de uma associação de potentes fármacos anti-tumor no local do tumor, isto é, a formação dos fármacos etoposido, adriamicina e 5-fluorouridina.

De acordo com uma outra variante, utilizam-se diversos imunoconjugados diferentes, em que a enzima componente do conjugado varia. Cada imunoconjugado pode ser utilizado para converter o(s) seu(s) profármaco(s) respectivo(s) na forma citotóxica no local do tumor. Por exemplo, pode ligar-se um anticorpo antitumor à enzima AP para formar um conjugado e à enzima citosina-desaminase para formar um outro conjugado. Adminis-tram-se depois ambos os imunoconjugados a um hospedeiro afectado por um tumor os quais ligar-se-ão ao antigene tumoral no local do tumor via a especificidade do anticorpo. A administração dos profármacos, fosfato de etoposido e 5-fluorocitosina, terá como consequência a formação dos compostos etoposido de 5-fluorouracilo no local do tumor, sendo ambos os compostos agentes anti-tumor potentes.

Ainda uma outra variante da presente invenção

implica a utilização de diversos imunoconjugados em que a especificidade do componente anticorpo do conjugado varia, isto é, utilizam-se diversos imunoconjugados, possuindo cada um deles um anticorpo que se liga especificamente a um antigene diferente no tumor em causa. A enzima componente desses imunoconjugados pode ser a mesma ou diferente. Esta variante pode ser especialmente útil em situações em que as quantidades dos diversos antigénios à superfície de um tumor são desconhecidas e sempre que se pretenda garantir que uma quantidade suficiente de enzima foi conduzida pelo anticorpo até ao local do tumor. A utilização de diversos conjugados possuindo especificidades antigénicas diferentes para o tumor aumenta a possibilidade de se obter a enzima suficiente no local do tumor para converter um profármaco ou uma série de profármacos. Adicionalmente, esta variante é importante para se conseguir um grau de especificidade elevado para o tumor uma vez que é pequena a possibilidade de o tecido normal possuir todos os antigénios associados ao tumor [veja-se I. Hellstrom et al., "Monoclonal Antibodies To Two Determinants Of Melanoma-Antigen p97 Act Synergistically In Complement-Dependent Cytotoxicity", J. Immunol., 127 (Nº 1), pp 157-180 (1981)].

A presente invenção engloba também composições farmacêuticas, associações e métodos para o tratamento

de cancos e de outros tumores. Mais especialmente, a presente invenção inclui associações constituídas por conjugados anticorpo-enzima de acordo com a presente invenção e o(s) profármacos correspondente(s) para utilizar em um método para o tratamento de tumores segundo o qual se trata um mamífero hospedeiro de uma forma aceitável sob o ponto de vista farmacêutico com uma quantidade eficaz sob o ponto de vista farmacêutico de um ou mais conjugado(s) anticorpo-enzima e de um ou mais profármaco(s). A associação e os métodos da presente invenção são úteis para o tratamento de qualquer mamífero incluindo o homem, cães, gatos e equídeos.

De acordo com uma variante preferencial, administra-se o conjugado anticorpo-enzima antes da introdução do profármaco no hospedeiro. É necessário deixar decorrer um intervalo de tempo suficiente entre a administração do conjugado e do profármaco de modo a permitir que o anticorpo do conjugado conduza a enzima até ao local do tumor e a localize. Esse intervalo de tempo suficiente pode variar entre 12 horas e uma semana consoante o tipo de conjugado utilizado.

Os conjugados e os profármacos de acordo com a presente invenção podem administrar-se de modos convencionais incluindo, sem que isso constitua qualquer limitação, as vias endovenosa, intraperitoneal, oral,

intralinfática, ou ainda a administração directa no tumor. Considera-se preferencial a administração endovenosa.

As composições de acordo com a presente invenção - constituídas por imunocombinados ou profármacos - podem ser concebidas de acordo com um grande número de formas de dosagem as quais englobam, sem que isso constitua qualquer limitação, soluções ou suspensões líquidas, comprimidos, pílulas, pós, supositórios, microcápsulas ou microampolas poliméricas, lipossomas e soluções injectáveis ou para administração por perfusão. A forma preferida depende do modo de administração e da aplicação terapêutica. Por exemplo, a administração oral do combinado anticorpo-enzima pode ser desfavorável uma vez que as proteínas combinadas tendem a degradar-se no estômago quando ingeridas, por exemplo, sob a forma de comprimidos.

As composições contendo combinados ou profármacos incluem também de preferência veículos e adjuvantes convencionais aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico e conhecidos na especialidade tais como a albumina sérica humana, permutadores de iões, a alumina, a lecitina, substâncias tampão tais como fosfatos, a glicina, o ácido sórbico, o sorbato de potássio, e sais ou electrólitos tais como o sulfato de protamina.

A7

O modo de administração e o regime de dosagem mais eficazes para as composições de acordo com a presente invenção dependem da gravidade e da evolução da doença, da situação e da resposta do doente ao tratamento e ainda da opinião do médico especialista responsável pelo tratamento. Em consequência, as doses dos imunocombinados e dos profármacos devem ser doseadas em função de cada doente.

Todavia, uma dose eficaz de um combinado anti-corpo-enzima de acordo com a presente invenção pode estar compreendida entre aproximadamente 1,0 e aproximadamente 100 mg/m². Uma dose eficaz do profármaco de acordo com a presente invenção dependerá do profármaco específico utilizado e do fármaco original do qual derivou. Uma vez que o profármaco é menos tóxico do que o fármaco original, é possível utilizarem-se doses que excedam as quantidades cientificamente recomendadas para o fármaco original. Por exemplo, uma dose eficaz de profármacos do etoposido pode estar compreendida entre aproximadamente 75-500 mg/m². Uma dose eficaz de profármacos de fosfato de mitomicina pode estar compreendida entre aproximadamente 50-1000 mg/m². Uma dose eficaz de profármacos de adriamicina pode estar compreendida entre aproximadamente 15-150 mg/m². E, uma dose eficaz de 5-fluorocitosina e de outros profármacos de 5-fluorouridina pode estar compreendida entre aproxi-

madamente 600-2000 mg/m².

Para que a presente invenção agora descrita possa ser totalmente compreendida, apresentam-se os exemplos seguintes. Deve ter-se em atenção que estes exemplos têm apenas objectivos ilustrativos, não se pretendendo com os mesmos limitar de forma alguma o âmbito da presente invenção.

EXEMPLO 1

O exemplo seguinte demonstra a utilização dos imunocombinados e dos métodos da presente invenção para a conversão do profármaco e fosfato de etoposido no etoposido através de uma fosfatase alcalina ligada ao anticorpo e a citotoxicidade resultante in vitro para as células tumorais e os efeitos antitumor in-vivo demonstrados pela utilização dos métodos de acordo com a presente invenção.

Preparação de Combinados Anticorpo-Fosfatase Alcalina De Acordo Com A Presente Invenção

Neste exemplo, prepararam-se e estudaram-se três imunocombinados, constituídos pelo anticorpo monoclonal L6, 96.5 ou 1F5 combinado com a enzima, uma fosfatase alcalina (AP). L6 é um anticorpo monoclonal da subclasse IgG2a que é específico de um antigene glicoproteico ao qual se liga em células de carcinoma de pulmão humano [veja-se I. Hellstrom et al., (1986), supra]. O componente 96.5 é um anticorpo monoclonal da

subclasse IgG2a que é específico para o p97, um antígeno associado ao melanoma [veja-se J. P. Brown et al., "Structural Characterization Of Human Melanoma-Associated Antigen p97 With Monoclonal Antibodies", J. Immunol., 127 (Nº 2), pp. 539-46 (1981)]. O componente 1F5 é um anticorpo monoclonal da subclasse IgG2a que é específico para o antígeno CD-20 em células B normais e neoplásticas [veja-se, E.A. Clark et al., "Role Of The Bp35 Cell Surface Polypeptide In Human B-Cell Activation", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, pp 1766-70 (1985)]. O hibridoma L6 que produz o anticorpo monoclonal L6 foi depositado na Coleção Americana de Culturas Tipo (ATCC) com o número de aceitação HB8677 em conexão com a apresentação do pedido de patente de invenção europeia Nº 207963, publicado em 14 de Janeiro de 1987. O hibridoma 1F5 que produz o anticorpo monoclonal 1F5 foi depositado na ATCC em 12 de Fevereiro de 1988 sob o número de aceitação HB9645. O anticorpo monoclonal 96.5 pode adquirir-se no comércio.

Os conjugados anticorpo-enzima prepararam-se ligando de um modo covalente o componente AP aos anticorpos monoclonais L6, 96.5 ou 1F5 através de uma ligação tioéter utilizando um método similar ao descrito por J. M. Lambert et al., "Purified Immunotoxins That Are Reactive With Human Lymphoid Cells", J. Biol. Chem., 260 (Nº 22), pp. 12035-12041

7

(1985). De acordo com um protocolo experimental, os conjugados, L6-AP e 96.5-AP, prepararam-se do modo seguinte: adicionou-se 2-iminotiolano (50 mM em cloridrato de trietanolamina 0,5 M com 10 mM de EDTA a pH 8,0) a uma solução de anticorpo L6 ou 96.5 na concentração de 8,0 mg/ml (em 50 mM de cloridrato de trietanolamina e 1 mM de EDTA a pH 8,0) de tal modo que se obteve uma concentração final do 2-iminotiolano de 1,3 mM. Decorridos 90 minutos à temperatura de 0°C, interrompeu-se a reacção por filtração em gel Sephadex G-25 utilizando como eluente uma solução de cloreto de sódio tamponada com fosfato (PBS) a pH 7,2. A reacção dos anticorpos com o 2-iminotiolano introduziu grupos sulfidrilo, tendo-se estabelecido que o seu número seria 1,9-3,5 utilizando o reagente de Ellman [veja-se P.W. Riddles et al., "Ellman's Reagent: 5,5-Dithiobis(2-nitrobenzoic Acid)-A Reexamination", Analytical Biochemistry, 94, pp. 75-81, (1979)].

Tratou-se a fosfatase alcalina (intestino de vitela, Boehringer Mannheim, 10 mg/ml) em um tampão de fosfato 100 mM a pH 7,0 com 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de sulfossuccinimidilo (sulfo-SMCC) [Pierce Chemical Co., 20 mM em dimetilformamida (DMF)] de tal modo que a concentração final do sulfo-SMCC foi 2,4 mM. Decorridos 30 minutos à temperatura

de 30°C purificou-se a enzima modificada por filtração em gel G-25 Sephadex e eluiu-se com PBS.

Adicionou-se depois o componente AP modificado ao anticorpo tiolado em uma proporção molar de 2:1. A reacção do componente AP com o sulfo-SMCC introduziu grupos maleimido na enzima que ao reagirem com os grupos sulfidrilo de cada anticorpo modificado originou a formação de uma ligação tioéter entre o anticorpo e a enzima AP. Adicionou-se iodoacetamida (concentração final 1 mM) à solução de proteínas 1 hora após a reacção com o objectivo de bloquear qualquer grupo tiol remanescente que não tivesse reagido, e purificaram-se os conjugados em uma coluna Sephacryl S-300 utilizando PBS como eluente. Controlaram-se as fracções a 280 nm e determinou-se a actividade da enzima AP de cada fracção (diluída 64000 vezes) a pH 9,5 utilizando fosfato de p-nitrofenilo como substrato [P. Tijssen, Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology, pp. 366-67, (Elsevier Press 1985)]. Por SDS-PAGE em um gel de gradiente 5-12% (ver a Figura 2) determinaram-se as fracções que continham conjugados com níveis apropriados de taxas de AP-anticorpo, depois do que se reuniram. Determinou-se a concentração de proteína a 280 nm, comprimento de onda a que uma solução a 0,1% dos anticorpos e da enzima AP exhibe densidades ópticas de 1,4 e 0,76, respectivamente. A análise dos conjugados em

137

gel indicou que estes eram constituídos essencialmente por proporções de 1:1 de anticorpo relativamente à enzima. Sob condições de desnaturação utilizadas para o gel, a enzima AP, que existe na natureza sob a forma de um homodímero de peso molecular 140 kd, migra como uma banda única de 70 kd. Esta banda proteica de 70 kd foi observada sobre o gel nas colunas que continham também as bandas dos conjugados de peso molecular superior porque uma das sub-unidades da enzima dissociou-se do conjugado anticorpo-enzima ligado de um modo covalente (ver a Figura 2, traços A e B). Uma filtração em gel utilizando uma coluna Sephacryl S-300 indicou a ausência de qualquer enzima livre presente na preparação do conjugado.

Utilizou-se também um segundo protocolo experimental idêntico para preparar os conjugados L6-AP e 1F5-AP da presente invenção, em que se modificou o anticorpo com iminotiolano (0,5 mM) para introduzir um único grupo tiol livre e se modificou a enzima AP com 4-(N-maleimidometil)-ciclo-hexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC) (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) de tal modo que a concentração final do SMCC foi 1,0 mM. Reuniram-se depois as proteínas modificadas e purificaram-se os conjugados resultantes por filtração em gel sobre Sephacryl S-300. Análises SDS-PAGE posteriores indicaram que estas preparações de conjugados

estavam isentas de agregados e de proteínas não conjugadas. Conforme descrito antes, determinaram-se as concentrações em proteínas das preparações por absorvância a 280 nm comprimento de onda a que soluções a 1 mg/ml do anticorpo (peso molecular: 160 kd) e da enzima AP (peso molecular 140 kd) exibem densidades ópticas de 1,4 e 0,76 unidades, respectivamente.

Preparação Dos Prófarmacos, Fosfato de Etoposido e Tiofosfato de Etoposido

De acordo com a fase seguinte do método da presente invenção, fez-se reagir cada um dos conjugados anticorpo-enzima com um profármaco novo o fosfato de etoposido ou o tiofosfate de etoposido. Mais especialmente, utilizaram-se como profármacos o éster 4'-di-sódio-fosfato de etoposido e o éster 4'-di-sódio-tiofosfato de etoposido, respectivamente, exibindo as fórmulas representadas na Figura 3.

O fosfato de etoposido e o tiofosfato de etoposido sintetizaram-se fazendo reagir o etoposido com oxiclureto de fósforo ou com cloreto de tiofosforilo, respectivamente, para se obter ou um diclorofosfato ou um diclorotiofosfato intermédio. A reacção de fosforilação realizou-se no seio de um solvente orgânico anidro apropriado, por exemplo, o acetonitrilo e de preferência na presença de uma base amina terciária,

17

por exemplo, a N,N-di-isopropiletilamina. A evolução da reacção controla-se por cromatografia em camada fina (CCF), a qual permite avaliar o tempo reaccional óptimo pelo aspecto do produto, pelo consumo do material inicial ou por ambos os factores. De acordo com a nossa experiência, a reacção pode durar entre aproximadamente 4 horas e aproximadamente 72 horas, dependendo da qualidade dos reagentes fosforosos utilizados. A hidrólise do composto diclorofosfato ou diclorotiofosfato intermédio originando o profármaco fosfato ou tiofosfato dissódico, respectivamente, realizou-se adicionando uma solução de carbonato de hidrogénio e sódio (20 a 50 vezes em excesso) em água directamente à mistura reaccional e deixando a mesma sob agitação, à temperatura ambiente, durante 1,5 ou 3 horas, respectivamente. A partilha entre acetato de etilo e água seguida por uma cromatografia de fase inversa da camada aquosa utilizando uma mistura de água/metanol, originou os profármacos pretendidos após liofilização ou evaporação do meio aquoso sob vazio.

Seguidamente descreve-se mais pormenorizada-mente a preparação do derivado 4'-di-sódio-fosfato de etoposido o qual foi utilizado como profármaco no método de acordo com a presente invenção:

Aqueceu-se uma suspensão de 2,30 g (3,91 mmoles) de etoposido agitada magneticamente (Bristol-

-Myers Co.) em 210 ml de acetonitrilo anidro até à dissolução quase total, arrefeceu-se até à temperatura ambiente e tratou-se com 2,36 ml (13,5 mmoles) de N,N-diisopropiletilamina. Arrefeceu-se depois a mistura até à temperatura de 0°C e tratou-se durante 30 segundos utilizando uma seringa, com 666 mg (4,34 mmoles) de cloreto de fosforilo, POCL₃. Deixou-se a mistura atingir lentamente a temperatura ambiente durante 2-3 horas e agitou-se durante 63 horas à temperatura ambiente. No final deste período, tratou-se a mistura reaccional com uma solução de 6,0 g (71,4 mmoles) de carbonato de hidrogénio e sódio em 110 ml de água desionizada, agitou-se a mistura durante 80 minutos à temperatura ambiente e partilhou-se então entre 20 ml de uma solução aquosa saturada de carbonato de hidrogénio e sódio, 125 ml de água desionizada e 350 ml de acetato de etilo. Extraiu-se ainda a camada orgânica com 1x50 ml de água desionizada e lavaram-se as camadas aquosas reunidas com 250 ml de acetato de etilo e submeteram-se depois a vazio de 0,5 mm Hg à temperatura ambiente durante 1 hora para eliminar os solventes dissolvidos. Colocou-se depois a porção aquosa em uma coluna com 4 cm de diâmetro contendo 15 cm de octadecil-silano (C-18) ligado a gel de sílica compactado com metanol e equilibrou-se depois com água. Após a aplicação de toda a porção aquosa, eluiu-se a

11
7

de clorofosfato de difenilo e manteve-se a uma temperatura compreendida entre 40 e 45°C durante 22 horas. Adicionaram-se depois 20 ml de isopropanol, evaporou-se o solvente sob vazio e dissolveu-se o resíduo sólido em 500 ml de CH₂Cl₂, e partilhou-se com 400 ml de água. Extraíu-se ainda a camada aquosa com 100 ml de CH₂Cl₂ e lavaram-se depois os extractos orgânicos reunidos com 250 ml de uma solução saturada de cloreto de sódio e secaram-se sobre Na₂SO₄/MgSO₄. Uma evaporação rotativa seguida por uma cromatografia rápida sobre gel de sílica utilizando como eluente 2-3% de CH₃OH em CH₂Cl₂ forneceram 12,50 g (rendimento 85%) de 4'-difetil-fosfato de etoposido sob a forma de um sólido incolor.

Seguidamente, adicionou-se 0,198 g (0,87 mmole) de óxido de platina proveniente de uma embalagem recentemente aberta (Aldrich Chemical Co.) a uma solução de 0,79 g (0,962 mmole) de 4'-difetil-fosfato de etoposido em 95 ml de etanol absoluto. Hidrogenou-se a solução utilizando um dispositivo de Parr a uma pressão de 310,3-344,8 KPa (45-50 psi) durante 4 horas à temperatura ambiente. Filtrou-se a mistura reaccional através de uma camada de celite utilizando etanol como eluente. A concentração sob vazio e a secagem sobre P₂O₅ durante 14 horas sob vazio forneceram 0,627 g (rendimento 94%) do 4'-fosfato de etoposido sob a forma de um sólido branco:

19

EM FAB: m/e 669 (M+H)⁺

IV (KBr) 3440, 2930, 1778, 1604, 1498 cm⁻¹.

RMN ¹H (DMSO-d₆) δ 6,93 (s, 1H), 6,46 (s, 1H), 6,12 (s, 2H), 5,94 (m, 2H), 5,17 (bs, 1H), 4,86 (d, J=3,93Hz, 1H), 4,64 (q, J=7,5,5,8Hz, 1H), 4,51-4,42 (m, 2H), 4,20 (d, J=10,7Hz, 1H), 4,01 (dd, J=12,1,5,3Hz, 1H), 3,51 (s, 6H), 3,51-2,75 (m, 7H), 2,83 (m, 1H), 1,16 (d, J=5,1Hz).

RMN ¹³C (DMSO-d₆) δ 174,5, 151,2, 151,1, 147,7, 146,2, 126,1, 132,3, 128,8, 109,8, 109,7, 107,9, 101,5, 101,2, 98,5, 80,0, 74,3, 72,7, 71,7, 67,6, 67,2, 65,7, 55,8, 43,0, 37,1, 20,2, 18,5.

Análise elementar para C₂₉H₃₃O₁₆P. 0,85% H₂O:

Calculado: C, 50,95; H, 5,11;

Encontrado: C, 51,42; H, 4,97.

Converteu-se depois o 4'-fosfato de etoposido no seu sal dissódico adicionando 50 ml de água desionizada e 3,00 g (35,7 mmoles) de carbonato de hidrogénio e sódio a 2,90 g (4,34 mmoles) de 4'-fosfato de etoposido. Agitou-se a mistura durante 0,5 hora à temperatura ambiente, tempo ao fim do qual cessou a libertação de CO₂. Aplicou-se depois esta mistura directamente a uma coluna C-18 conforme descrito na variante anterior. Eluiu-se primeiro a coluna com 300 ml de água desionizada para remoção dos sais em excesso e eluiu-se depois

17

com H_2O/CH_3OH (4:1) para se obterem 1,90 g (rendimento 61%) do sal dissódico do 4'-fosfato de etoposido puro sob a forma de um sólido branco e pulveriforme após liofilização.

Os derivados fosfato ou tiofosfato 4'-dissódicos de etoposido representam profármacos do etoposido muito hidrossolúveis com actividade citotóxica reduzida. Contudo, a reacção destes compostos com uma fosfatase alcalina remove o radical fosfato ou tiofosfato, respectivamente, libertando o potente fármaco anticancer, o etoposido (ver a Figura 3).

Uma experiência em que cada um dos compostos 4'-fosfato de etoposido e 4'-tiofosfato de etoposido reagiu com uma fosfatase alcalina indicou que ambos os profármacos são substratos da enzima. Conforme a Figura 5 demonstra, o fosfato de etoposido é hidrolisado pela enzima mais rapidamente do que o profármaco tiofosfato de etoposido. Todavia, sob determinadas condições, o tiofosfato de etoposido pode, eventualmente, possuir uma utilidade especial devido à sua estabilidade aumentada quando sofre hidrólise.

Reacção Dos Conjugados Anticorpo-Fosfatase Alcalina

Com Um Profármaco Fosfato De Etoposido

Os conjugados da presente invenção não exibem qualquer perda aparente de actividade enzimática devida à ligação da enzima ao anticorpo conforme é evidenciado

117

pelo facto de os conjugados e a enzima livre exibirem actividades iguais nos substratos, fosfato de p-nitro-fenilo (veja-se P. Tijssen, supra) ou fosfato de etoposido.

Por exemplo, adicionou-se ou apenas a enzima AP ou o conjugado anticorpo-enzima, L6-AP, produzido conforme descrito antes (concentração final de AP 5 $\mu\text{g/ml}$) a uma solução de 4'-fosfato de etoposido (0,1 mM) em tampão Tris (100 mM) contendo MgCl_2 (1 mM) e ZnCl_2 (0,1mM) a pH 7,0. Controlou-se a reacção por HPLC utilizando uma coluna C-18 IBM (3 μ , 4,5x100 mm) e como agente de eluição uma solução aquosa de metanol a 50% (0,5 ml/minuto, controlada a 254 nm). Observou-se que os primeiros 5 minutos após o início da reacção, a enzima AP, quer na sua forma de enzima livre quer como parte do conjugado anticorpo L6-enzima, tinha efectuado a hidrólise de pelo menos 85% do 4'-fosfato de etoposido em etoposido (ver as Figuras 4C e 4D). Tal como essas figuras indicam, não houve perda de actividade da enzima AP devido à sua ligação ao anticorpo no conjugado. Na ausência da enzima, não ocorreu a hidrólise do fosfato (ver a Figura 4A). As soluções aquosas de fosfato de etoposido ou de tiofosfato de etoposido mostraram-se estáveis durante pelo menos 8 horas à temperatura ambiente e durante vários dias à temperatura de 4°C.

Ligação Dos Conjugados Anticorpo-Fosfatase Alcalina
Às Células Tumerais H3347

A Figura 6 revela os resultados de um ensaio de ligação de um conjugado realizado para avaliar a capacidade dos conjugados L6-AP e 96.5-AP e também dos anticorpos L6 e 96.5 livres para se ligarem a células tumorais da linha celular de carcinoma metastásico do cólon humano, H3347 (fornecida por Judy Anderson, Oncogen).

O ensaio de ligação realizou-se do modo seguinte: diluíram-se em série os imunocombinados ou os anticorpos livres em meio de Delbecco modificado e incompleto (IMDM, Gibco) e incubaram-se alíquotas de 100 μ l à temperatura de 4°C com 10^6 células durante 30 minutos. Lavaram-se as células e incubaram-se com 50 μ l de anticorpo anti-murganho de FITC-cabra (Tago, diluição a 1:12,5) durante mais 30 minutos à temperatura de 4°C. Lavaram-se as células e analisaram-se utilizando um aparelho de análise celular por fluorescência Coulter Epics-C. Procedeu-se à remoção das células mortas e obteve-se para cada uma das amostras o logaritmo do valor médio da intensidade da fluorescência na banda do verde. Este número foi transformado para uma escala linear e calcularam-se as razões entre o control negativo (células + anticorpo antimurganho de FITC-cabra) e todas as amostras em ensaio.

A Figura 6 demonstra que nos conjugados foi preservada a maior parte da capacidade de ligação dos anticorpos, isto é, a conjugação não afectou a capacidade de ligação dos anticorpos. Por outro lado, a figura mostra a especificidade de ligação dos anticorpos, isto é, que ambos, o anticorpo livre 96.5 e o conjugado 96.5-AP, se ligam muito mais fracamente às células tumorais do que o anticorpo L6 e o conjugado L6-AP. Este resultado era previsível visto que se deve ter em atenção que as células tumorais H3347 são provenientes de um carcinoma humano e que o anticorpo L6 é específico de um antigene de carcinoma enquanto o anticorpo 96.5 é específico de um antigene de melanoma.

Experiências de ligação similares utilizando L6, L6-AP, 1F5 e 1F5-AP demonstraram também que L6 e L6-AP se ligam à linha celular de carcinoma H3347 (saturação a 10 μ g/ml de anticorpo) enquanto apenas se observou uma ligação muito fraca ou mesmo ausência de ligação no que diz respeito a 1F5 ou a 1F5-AP (ver a Figura 7). Este resultado demonstrou mais uma vez a especificidade de ligação dos conjugados, com o conjugado L6-AP ligando-se à linha de células tumorais L6-positivas e o conjugado 1F5-AP, com especificidade para as células de linfoma B, exibindo ausência de ligação.

Citotoxicidade In Vitro De Uma Associação
Conjugado/Profármaco Da Presente Invenção

Seguidamente, demonstrou-se in vitro o efeito citotóxico das associações conjugado/profármaco da presente invenção utilizando ou um ensaio de citotoxicidade clonogénica ou um ensaio de captação de ³H-timidina.

O ensaio de citotoxicidade clonogénica utilizado foi o ensaio de inibição de colónias descrito por I. Hellstrom et al., "Colony Inhibition And Citotoxicity Assays", em In Vitro Methods In Cell-Mediated Immunity, Bloom and Glade (ed.s), pp. 409-14 (1971). As células utilizadas para detectar a citotoxicidade foram as células tumorais H3347 descritas antes. Ambos os conjugados L6-AP e 96.5-AP foram avaliados relativamente à sua capacidade para converterem o profármaco no fármaco livre.

Resumidamente, suspenderam-se células H3347 (10^6 /ml) em meio de crescimento IMDM (contendo 10 µg/ml de cada um dos imunocombinados com base na concentração do anticorpo) e incubaram-se durante 30 minutos à temperatura de 37°C. Lavaram-se as células duas vezes, suspenderam-se novamente em IMDM e adicionou-se ao meio o fármaco ou o profármaco. A incubação à temperatura de 37°C prosseguiu durante 15 horas. Após duas lavagens, plaquearam-se as células e contou-se o número de colónias (> 8 células/colónia) decorridos 7-10 dias.

Os resultados do ensaio estão indicados na Figura 8 (o valor percentual da inibição é a média de seis amostras). Conforme se mostra na figura, o etoposido ($CI_{50} = 0,20 \mu M$) foi muito mais citotóxico do que o 4'-fosfato de etoposido (EP) ($CI_{50} = 5,8 \mu M$). O profármaco individualmente exibiu uma actividade citotóxica muito fraca. O tratamento das células H3347 com o conjugado L6-AP, seguido por exposição ao fosfato de etoposido, teve como consequência um aumento muito elevado da actividade citotóxica comparativamente com a observada quando se administra apenas o profármaco, sendo a actividade citotóxica aumentada comparável à actividade citotóxica observada quando se administra apenas o etoposido. O tratamento das células com o conjugado 96.5-AP e o fosfato de etoposido demonstrou um aumento muito menor da actividade citotóxica comparativamente com a observada quando se administra apenas o profármaco. Este resultado pode atribuir-se à pequena quantidade de conjugado 96.5-AP que se liga às células H3347 conforme descrito antes (ver a Figura 6). Os conjugados não são eles mesmos citotóxicos uma vez que o tratamento das células apenas com conjugados não provocou a morte de nenhuma célula.

Estudou-se também o efeito citotóxico dos conjugados da presente invenção utilizando um ensaio de captação de 3H -timidina. Em conformidade com este

ensaio, incubou-se uma suspensão de 10^6 células tumorais H3347 em 0,1 ml de IMDM com 10% de soro fetal de vitela durante 1 hora à temperatura de 4°C na presença de $5 \mu\text{g/ml}$ de conjugado. Lavaram-se as células duas vezes com um meio contendo 10% de soro fetal de vitela, suspenderam-se novamente (em 1 ml) e plaquearam-se em placas de microtitulação com 96 cavidades (10000 células/cavidade). Adicionou-se depois o fármaco ou o profármaco em IMDM e iniciou-se a incubação à temperatura de 37°C durante 6 horas. Lavaram-se as células duas vezes e a incubação prosseguiu durante mais 12 horas, seguindo-se um período de marcação de 6 horas com ^3H -timidina ($1,0 \mu\text{Ci/cavidade}$). Congelaram-se as placas à temperatura de -20°C para separar as células que se recolheram seguidamente sobre discos de fibra de vidro. Procedeu-se à contagem dos filtros em um contador por cintilação Beckman 3801.

Utilizando este ensaio, mediu-se a inibição da incorporação de ^3H -timidina no ADN das células tumorais e, conseqüentemente, o efeito citotóxico do etoposido ou do profármaco, EP, sobre as células na ausência ou na presença dos conjugados L6-AP ou 1F5-AP. Como se mostra na Figura 9, o etoposido ($\text{CI}_{50} = 1 \mu\text{M}$) foi 100 vezes mais tóxico do que o composto EP (35% de inibição a $100 \mu\text{M}$). O pré-tratamento das células com 1F5-AP antes da exposição ao EP não reforçou a citotoxicidade.

Contudo, observou-se um aumento dramático da actividade citotóxica quando as células foram expostas primeiro ao L6-AP e depois ao EP. Assim, nos dois ensaios utilizados para determinar a citotoxicidade in vitro, o efeito citotóxico da associação conjugado/profármaco de acordo com a presente invenção foi comparável ao do etoposido individualmente, e este efeito foi específico do antigene, conforme indicado pelo facto de a citotoxicidade do EP não ter sido reforçada de um modo idêntico mediante tratamento das células H3347 com os conjugados de controlo, 96.5-AP e 1F5-AP, respectivamente.

Localização Dos Conjugados Em Xenotransplantes

Tumorais Em Murganhos

Seguidamente empreenderam-se estudos de localização in vivo para descobrir com que rapidez e com que intensidade os conjugados da presente invenção se acumulavam em um tumor. Esta informação demonstrou ser útil na determinação de um intervalo de tempo adequado entre a administração do conjugado anticorpo-enzima e o profármaco nos estudos de terapia tumoral.

Em primeiro lugar, injectaram-se subcutaneamente (s.c.) 10^7 células tumorais H3347 nos flancos posteriores esquerdo e direito de fêmeas de murganho Balb/C nu/nu (4-6 semanas de idade) (provenientes de Life Sciences, St. Petersburg, Florida). Obtiveram-se

17

as células tumorais a partir de culturas in vitro que haviam sido suspensas mediante tratamento durante 2 minutos com tripsina (0,5 g/l) e EDTA (0,2 g/l). Lavaram-se as células duas vezes com IMDM e incubaram-se durante 1 hora à temperatura de 37°C em IMDM com 10% de soro fetal de vitela. Lavaram-se as células, suspenderam-se em PBS, e conservaram-se à temperatura de 4°C antes da injeção. Tanto os estudos de localização como de terapia descritos na presente memória descritiva se iniciaram quando os tumores atingiram uma dimensão média de 225 mm³.

Nos estudos de localização realizados, procedeu-se à marcação do anticorpo L6 e do conjugado L6-AP com ¹²⁵I e do anticorpo 1F5 e do conjugado 1F5-AP com ¹³¹I, utilizando o método do iodogéneo [veja-se P.J. Fraker et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 80, pp. 849-857 (1978)]. Dois dias antes das experiências de localização, aplicou-se aos animais uma solução de iodo de Lugol a 0,5% (v/v). Cada murgancho foi injectado por via i.p. com 100 µg (tomando por base cada um dos anticorpos monoclonais) de uma qualquer das soluções seguintes: L6-AP (5 µCi) e 1F5-AP (2,5 µCi) em 0,2 ml de PBS a pH 7,2 ou uma associação de L6 (5 µCi) e 1F5 (2,5 µCi) em 0,2 ml de PBS. A intervalos periódicos, anestesiaram-se os murganchos, sangraram-se através do plexo orbital e sacrificaram-se. Pesaram-se os tecidos

7

e procedeu-se depois à contagem em um contador de raios gama. Determinou-se a localização mediante comparação da localização do $^{125}\text{I-L6}$ com a do $^{131}\text{I-1F5}$, isto é, mediante determinação das taxas de captação específica (^{125}I) e não específica (^{131}I) das contagens nos diversos tecidos. No Quadro 1 seguinte encontram-se resumidos os resultados da captação hepática e tumoral.

Quadro 1

DOSE PERCENTUAL INJECTADA POR GRAMA DE PESO TECIDUAL DE PROTEÍNAS ADMINISTRADAS				
	L6		L6-AP	
	tumor	fígado	tumor	fígado
2 horas	1,6 (8,0)	4,9 (2,0)	1,5 (7,5)	5,2 (0,7)
24 horas	3,6 (12,0)	2,3 (1,4)	1,0 (10,0)	1,3 (1,3)
48 horas	4,0 (8,0)	2,5 (1,3)	0,5 (5,0)	0,8 (1,0)

Os números entre parênteses representam os quocientes L6/1F5 ou L6-AP/1F5-AP.

Tal como o quadro indica, o anticorpo L6 não conjugado localizou-se eficazmente no tumor no intervalo de 24 horas e ali se manteve durante pelo menos 48 horas. Durante este período, a proporção entre L6 e 1F5 no tumor variou entre 8 e 12, ao passo que a proporção no fígado foi bastante baixa (1,3-1,4). O nível máximo da captação específica no tumor relativamente ao conjugado L6-AP ocorreu em aproximadamente 24 horas, altura em que a proporção entre L6-AP e 1F5-AP era 10,0. Estes resultados indicam que o conjugado L6-AP se localizou no interior do tumor bastante melhor do que o 1F5-AP,

11
7

mas não tão bem como o anticorpo L6 não modificado.

Seguidamente, determinou-se a quantidade de actividade natural da fosfatase no tumor e o grau para o qual esta actividade podia ser aumentada conduzindo a AP até ao tumor utilizando os conjugados da presente invenção. Excisaram-se tumores de murganhos que tinham sido tratados durante 24 horas com 100 μ g (com base no anticorpo L6) do conjugado L6-AP e mediu-se a actividade total da fosfatase, utilizando o fosfato de p-nitrofenilo como substrato tal como se descreve seguidamente: lavou-se o tumor excisado e agitou-se depois suavemente à temperatura de 23^oC com fosfato de p-nitrofenilo (1 mg/ml) em Tris (100 mM) pH 9,5 contendo NaCl (100 mM) e MgCl₂ (5 mM). Controlou-se a evolução da reacção medindo a quantidade de p-nitrofenilo libertada a 410 nm e corrigiram-se os resultados em função da massa tumoral. Descobriu-se que os tumores de murganhos que tinham sido tratados com o conjugado L6-AP ostentavam um nível de actividade da fosfatase da ordem de dez vezes superior ao observado nos tumores de murganhos não tratados (ver a Figura 10A).

Empreendeu-se uma análise histológica mais pormenorizada da actividade da fosfatase do tumor em secções transversais de tumores obtidos a partir de murganhos não tratados ou previamente tratados 24 horas antes com 300 μ g (com base no anticorpo) ou de L6-AP ou

de 1F5-AP. Avaliou-se a actividade da fosfatase por imuno-histologia, utilizando um substrato de fosfatase que depositou um precipitado negro no local da actividade enzimática conforme se descreve seguidamente: congelaram-se rapidamente os tumores excisados à temperatura de -28°C e obtiveram-se secções transversais e sequenciais dos mesmos com uma espessura de $8\ \mu\text{m}$ utilizando o micrótomo de Reichert-Jung. Mediu-se a actividade da fosfatase com um conjunto de substrato de AP proveniente de Vector Laboratories (Burlingame, CA) e compararam-se os resultados com secções coradas com hematoxilina e eosina (H. e E., ver a Figura 10B).

Tal como a Figura 10B demonstra, detectou-se fraca actividade enzimática em tumores de murganhos não tratados ou tratados com o conjugado 1F5-AP. Contudo, nos murganhos tratados com o conjugado L6-AP, a actividade da fosfatase foi bastante elevada e foi possível observá-la distribuída pelo tumor. A avaliação microscópica revelou que a maior parte das células tumorais nos murganhos tratados com o conjugado L6-AP exibiam uma coloração altamente positiva relativamente à actividade da fosfatase.

Efeito Anti-Tumor In Vivo De Uma Associação Conjugado/
Prófármaco Fosfato De Etoposido Da Presente Invenção

Em murganhos nus que possuíam tumores subcutâneos com o volume aproximado de $225\ \text{mm}^3$ realizaram-se

7

experiências terapêuticas. Dezoito a 24 horas antes do tratamento com EP, administraram-se por via i.p. os conjugados, L6-AP e 1F5-AP. Comparou-se o crescimento tumoral ao observado em murganhos não tratados e em murganhos tratados com as doses máximas toleradas de etoposido ou de apenas o composto EP.

Mais especialmente, tratou-se um grupo de 8 murganhos nus com tumores H3347 bilaterais com ou o etoposido (0,2 ml contendo 1,2 mg de etoposido em DMSO: H₂O a 2:3) ou apenas o composto EP (0,2 ml contendo 2 mg de EP em água) ou com L6-AP (0,1 ml contendo 300 µg de anticorpo em PBS) ou com 1F5-AP (0,1 ml contendo 300 µg de anticorpo em PBS) seguindo-se o tratamento com o composto EP. Cada experiência continha um grupo de murganhos de controlo que não foram tratados. Avaliaram-se os volumes dos tumores em diversos dias após a implantação do tumor, utilizando a fórmula:

$[(\text{largura na perpendicular})^2/2] \times \text{o maior comprimento}$

Os resultados destas experiências estão expostos na Figura 11. O etoposido exibiu um efeito muito pequeno sobre o crescimento tumoral na dose utilizada e as doses mais elevadas não foram bem toleradas. O profármaco, EP, foi menos tóxico para os animais, e a dose mais elevada que consequentemente foi possível administrar originou um efeito antitumor

superior àquele que foi observado com o próprio etoposido. Observou-se um grau idêntico de actividade antitumor em murganhos tratados com o conjugado de controlo, 1F5-AP, antes do tratamento com o composto EP. Todavia, quando se trataram os murganhos com o conjugado L6-AP e depois com o composto EP observou-se um efeito anti-tumor muito mais pronunciado. O conjugado L6-AP individualmente não exibiu qualquer efeito sobre o crescimento tumoral (dados não apresentados).

O Quadro 2 seguinte mostra um sumário das respostas de cada tumor individualmente à terapia. Entre os 16 tumores de 8 murganhos tratados com L6-AP e EP, 6 deles sofreram uma regressão completa e outros 2 ficaram menores do que no início do tratamento. Não se observaram quaisquer respostas completas ou parciais em nenhum dos outros protocolos de tratamento.

Quadro 2

EFEITOS DE DIVERSOS TRATAMENTOS SOBRE O CRESCIMENTO TUMORAL				
Agente	RESPOSTA*			
	progressão	estável	parcial	completa
Nenhum	16	0	0	0
Etoposido	12	4	0	0
EP	6	10	0	0
1F5-AP+EP	9	7	0	0
L6AP+EP	3	5	2	6

Os dados representam as respostas de 16 tumores em cada grupo 23 dias após a implantação do tumor.

* Resposta: progressão - desenvolvimento tumoral contínuo; estável - ausência de crescimento adicional do tumor; parcial - diminuição de volume; completa - regressão que conduz à ausência de tumor

O presente exemplo demonstra claramente a aplicabilidade do método de acordo com a presente invenção de libertação de um fármaco antitumor citotóxico em células tumorais utilizando um conjugado anticorpo-enzima específico do tumor e um profármaco capaz de ser convertido pela enzima passando de uma forma relativamente não citotóxica para uma forma citotóxica potente.

EXEMPLO 2

Este exemplo demonstra a utilização dos imunocombinados e dos métodos da presente invenção para converter um profármaco fosfato de mitomicina relativamente não citotóxico no fármaco mitomicina activo, conduzindo a uma citotoxicidade in vitro sobre as células tumorais. Além do mais, tal como se demonstrou no Exemplo 1 anterior, o exemplo seguinte demonstra a

7

aplicabilidade dos imunocombinados, profármacos e métodos da presente invenção para a libertação de um fármaco antitumor citotóxico em células tumorais in vivo.

Este exemplo utiliza os imunocombinados L6-AP e 1F5-AP preparados conforme descrito no Exemplo 1 anterior. Em conformidade com esta variante da presente invenção, fez-se reagir cada um desses combinados anticorpo-enzima com um profármaco novo fosfato de mitomicina. Mais especialmente, o profármaco utilizado foi o sal dissódico de um N⁷-alquil(C₁-C₈)-fosfato de mitomicina C. O agente antitumor libertado em consequência desta reacção foi um derivado alcoólico de mitomicina. A associação combinado L6-AP/profármaco fosfato de mitomicina de acordo com a presente invenção teve como consequência uma citotoxicidade em relação às células tumorais in vitro e um efeito antitumor acentuado in vivo em murganhos.

Preparação De Um Novo Profármaco Fosfato

De Mitomicina

O novo profármaco fosfato de mitomicina, o 7-(2'-aminoetil-fosfato) de mitomicina (designado na presente memória descritiva por "MOP") é o derivado 2-amino-etil-fosfato de mitomicina C ("MMC") e preparou-se do modo seguinte:

Adicionou-se uma solução de 56 mg (0,4 mmole)

7

de di-hidrogeno-fosfato de 2-aminoetilo em 0,35 ml de água e 0,3 ml (2 mmoles) de trietilamina a 140 mg (0,4 mmole) de mitomicina A (composto identificado na presente memória descritiva por "MMA") em 6 ml de metanol e deixou-se a reacção prosseguir à temperatura ambiente durante a noite. Adicionaram-se depois 1,4 ml de uma solução aquosa saturada de carbonato de hidrogénio e sódio e partilhou-se a solução entre água e cloreto de metileno. Concentrou-se a fase aquosa até à secura e adicionaram-se diversas porções de metanol que se evaporaram. Retomou-se o resíduo com metanol, filtrou-se e colocou-se em uma coluna de sílica C-18 (fase inversa) com 2 x 10 cm. Eluiu-se o produto com água e evaporou-se todo o material volátil. Adicionou-se metanol e evaporou-se conforme descrito antes e secou-se o resíduo durante 24 horas sob alto vazio em um exsiccador com pentóxido de fósforo. Obtiveram-se 190 mg (rendimento 97%) do derivado fosfato de mitomicina, MOP, com aspecto de um pó azul fino.

360 MHz RMN-¹H (D₂O) δ 1,94 (s, 3H, CH₃), 2,9-3,1 (m, 4H), 3,20 (s, OCH₃), 3,28 (s, 1H), 3,36 (s, 1H), 3,5-3,65 (m, 4H), 4,1-4,25 (m, 2H), 4,50-4,57 (dd, 1H, 10-H).

Deste modo, preparou-se o MOP por deslocamento do grupo 7-metoxi do composto MMA com ácido 2-aminoetil-fosfórico (ver a Figura 12). Converteu-se o

A7

produto no sal dissódico hidrossolúvel mediante tratamento com carbonato de hidrogénio e sódio.

Preparou-se o derivado alcoólico de mitomicina conhecido e correspondente, o 7-[(2-hidroxi-etil)-amino]-9a-metoximitosano (designado na presente memória descritiva por "MOH") fazendo reagir 100 mg (0,286 mmole) de MMA com 26 mg (0,429 mmole) de etanolamina em conformidade com o método de B.S. Iyengar et al., "Mitomycin C and Forfiromycin Analogues With Substituted Ethylamines At Position 7", J. Med. Chem., 26, pp. 16-20 (1983). Obtiveram-se 58 mg (rendimento 54%) do produto com o aspecto de um pó azul fino.

Reactividade E Estabilidade Do Profármaco

Fosfato De Mitomicina

Analisou-se depois a reactividade do profármaco MOP com AP. A uma solução de MOP (1 mM) em tampão Tris (100 mM) pH 7,2 e à temperatura ambiente adicionou-se ou AP proveniente do intestino de vitela ou AP proveniente da placenta humana (concentração final 1 µg/ml). Controlou-se a evolução da reacção por HPLC utilizando uma coluna C-18 (4,6 x 150 mm) e as condições seguintes: detecção a 280 nm; 30-95% de metanol em tampão de acetato (100 mM; pH 5,2) durante 8 minutos, re-equilíbrio após 15 minutos; débito de 0,8 ml/minuto. Nestas condições, o MMC eluiu aos 7,0 minutos, o MOH aos 8,5 minutos e o MOP aos 4,0 minutos. Conforme se demonstra

7

na Figura 13, o grupo fosfato do profármaco MOP foi rapidamente cindido com a enzima AP. A HPLC serviu para confirmar que se formou o álcool correspondente, o MOH. Nas condições reaccionais utilizadas o tempo de semi-vida da hidrólise do MOP foi aproximadamente 10 minutos e a reacção ficou completa decorridos 40 minutos.

Determinou-se a estabilidade do MOP e do EP no soro humano por HPLC medindo a velocidade de desaparecimento dos profármacos e a velocidade de formação do MOH e do etoposido. Assim, por exemplo, adicionou-se uma solução de MOP (1 mM em 100 mM de Tris, pH 7,2) a soro humano recente de tal modo que a concentração final do fármaco foi 0,1 mM. Diluíram-se alíquotas de 0,25 ml com 0,25 ml de metanol e com EDTA (50 µl a 100 mM) para precipitar as proteínas séricas e para interromper a reacção. Centrifugaram-se as amostras e analisaram-se por HPLC tal como se descreveu imediatamente antes. Observou-se que a hidrólise de 50% do composto EP teve lugar decorrida uma hora, mas que apenas 25% do composto MOP se hidrolisou decorridas 4 horas. É possível conseguir rapidamente a hidrólise total adicionando a enzima AP ao soro.

Ligação De Conjugados Anticorpo-Fosfatase Alcalina
A Células Tumerais H2981

Seguidamente mediu-se a capacidade dos conju-

7

gados anticorpo-enzima L6-AP e 1F5-AP de acordo com a presente invenção se ligarem a células tumorais H2981. A linha celular H2981 foi definida a partir de um adenocarcinoma humano primário do pulmão [veja-se I. Hellstrom et al., "Monoclonal Mouse Antibodies Raised Against Human Lung Carcinomas", Cancer Res., 46 (Nº 8), pp. 3917-23 (1986)]. Sabe-se que o anticorpo L6 se liga fortemente a células H2981 (saturação a 10 µg/ml) enquanto o 1F5 exibe uma ligação muito fraca a essas células.

O ensaio de ligação realizou-se conforme descrito no Exemplo 1. A análise por FACS indicou que o anticorpo L6 e o conjugado L6-AP se ligavam fortemente às células, enquanto o anticorpo 1F5 e o conjugado 1F5-AP (ver a Figura 14) revelavam uma ligação muito mais fraca.

Citotoxicidade In Vitro da Associação Conjugado/
/Profármaco da Presente Invenção Em Células Tumorais
H2981

Demonstrou-se in vitro o efeito citotóxico das associações conjugado/profármaco de acordo com a presente invenção via o ensaio de captação de ³H-timidina descrito no Exemplo 1; utilizando neste caso células tumorais H2981 para avaliar a citotoxicidade in vitro e células CEM como controlo. Obteve-se a linha celular ALL de células T, designada por CEM, na ATCC e não se

117

liga aos anticorpos monoclonais L6 ou 1F5. Analisaram-se os efeitos citotóxicos dos profármacos, EP e MOP, em células tumorais na ausência ou na presença dos imunoconjugados L6-AP ou 1F5-AP. Os efeitos citotóxicos destas associações foram também comparados ao efeito citotóxico de cada um dos fármacos originais individualmente.

Resumidamente, incubou-se uma suspensão de 10^6 células H2981 ou CEM em 0,1 ml de IMDM contendo 10% de soro fetal de vitela durante 1 hora à temperatura de 4°C na presença de $10\ \mu\text{g/ml}$ de conjugado. Lavaram-se as células duas vezes com o meio contendo 10% de soro fetal de vitela, suspenderam-se novamente em 1 ml de uma solução de soro fisiológico tamponada com fosfato, pH 7,2 (PBS) e plaquearam-se em placas de microtitulação com 96 cavidades (10000 células/cavidade). Adicionou-se depois o profármaco em PBS e iniciou-se a incubação à temperatura de 37°C durante 1 hora (para o MOP) ou 5 horas (para o EP). Lavaram-se depois as células 2 vezes e manteve-se a incubação durante um total de 24 horas (incluindo a marcação de 6 horas com ^3H -timidina, $1,0\ \mu\text{Ci/cavidade}$). Congelaram-se as placas à temperatura de -70°C para separar as células e após descongelação procedeu-se à recolha das mesmas sobre discos de fibra de vidro. Utilizando um contador de cintilação Beckman 3801 contaram-se os filtros e

compararam-se os efeitos citotóxicos das associações conjugado/profármaco com a citotoxicidade observada após tratamento das células com apenas o profármaco ou o fármaco original. Os resultados obtidos estão indicados nas Figuras 15-17.

Conforme se mostra na Figura 15, o etoposido (CI_{50} de 2 μM) foi significativamente mais tóxico para as células H2981 do que o EP (20% do assassinio a 30 μM). O pré-tratamento das células com 1F5-AP antes da exposição ao profármaco originou um aumento muito ligeiro da citotoxicidade. Contudo, observou-se um acréscimo dramático da actividade citotóxica quando as células foram expostas primeiro ao L6-AP e depois ao EP. O efeito citotóxico foi comparável ao do etoposido por si só.

Utilizando derivados de mitomicina observou-se um resultado semelhante. Conforme se indica na Figura 16, os compostos MMC e MOH foram igualmente citotóxicos em relação às células H2981 e apresentaram valores de CI_{50} de aproximadamente 1 μM . O profármaco fosfato, MOP, foi muito menos citotóxico (5% de células assassinadas a 10 μM), provavelmente devido à sua incapacidade para penetrar na célula. Contudo, a actividade do MOP foi comparável à do MOH e MMC quando as células tumorais foram pré-expostas ao conjugado L6-AP de acordo com a presente invenção. Este aumento é específico do

17

antigene, uma vez que o conjugado que não se liga, o 1F5-AP, não afectou significativamente a actividade citotóxica do profármaco. Nem o conjugado L6-AP nem o conjugado 1F5-AP aumentaram dramaticamente o efeito citotóxico do MOP contra células CEM, o que é consistente com o facto de esses conjugados não se ligarem a esta linha celular (ver a Figura 17). Assim, estes resultados indicam que o grupo fosfato de cada um dos profármacos ensaiados inactiva o fármaco e que após hidrólise do grupo fosfato por um conjugado anticorpo-enzima ligado à superfície das células tumorais, qualquer dos profármacos, EP e MOP, produz fármacos citotóxicos activos.

Efeito Anti-Tumor In Vivo Da Associação Conjugado/
Profármaco Da Mitomicina Da Presente Invenção

Antes de se investigar a actividade anti-tumor in vivo do composto MOP em associação com o conjugado L6-AP da presente invenção, determinaram-se as toxicidades relativas do profármaco e do seu derivado activo libertado, o composto MOH, em murganhos Balb C nu/nu. Quando se administraram os fármacos (i.p.) em duas doses iguais espaçadas por 4 dias, obtiveram-se valores de DL_{50} de 45 e 90 mg de fármaco/kg de massa corporal para os compostos MOH e MOP, respectivamente. Observou-se também que utilizando doses mais pequenas durante um intervalo de tempo mais longo se poderia

117

administrar consideravelmente mais composto. Quantidades totais de até 40 mg/kg de composto MOH e 100 mg/kg de composto MOP foram bem toleradas quando administradas em 4 doses iguais durante um período de 25 dias. Estes estudos indicaram que foi tolerada significativamente mais quantidade de profármaco de mitomicina devido à sua reduzida toxicidade.

Realizaram-se depois estudos terapêuticos utilizando fêmeas de murganho Balb C nu/nu (6 murganhos por cada grupo de tratamento) (4-6 semanas de idade) provenientes de Life Sciences (St. Petersburg, Fla.) nas quais tinha sido implantado (s.c., flanco posterior direito) um tumor H2981 obtido in vivo. Estas experiências realizaram-se quando os tumores atingiram aproximadamente o volume de 100 mm³. Por via intraperitoneal administrou-se cada um dos conjugados L6-AP e 1F5-AP (0,1 ml contendo 250 µg de anticorpo em PBS) 18 a 24 horas antes do tratamento com o composto MOP (0,2 ml contendo 0,6 mg de composto MOP em água). Comparou-se o crescimento tumoral com o observado em murganhos não tratados e em murganhos tratados apenas com as doses máximas toleradas do composto MOP (0,2 ml contendo 0,6 mg do composto MOP em água) ou do composto MOH (0,2 ml contendo 0,2 mg do composto MOH em água).

Como se mostra na Figura 18, tanto o MOH como o MOP exibiram in vivo actividades antitumor signifi-

cativas. O tempo necessário para atingir um volume tumoral médio de 750 mm³ foi de 45 dias em murganhos tratados com o MOH, 63 dias em murganhos tratados com o profármaco MOP e 27 dias no grupo de controlo. Conforme relatado antes, o profármaco MOP foi menos tóxico para os animais e conseqentemente a dose mais elevada que foi possível administrar originou um efeito antitumor superior ao observado com o derivado MOH. Embora o conjugado não ligante, 1F5-AP, aumentasse um pouco a actividade do MOP, observou-se um efeito muito mais acentuado no grupo tratado com L6-AP antes do tratamento com MOP. Tal como a figura indica, ao 70º dia, os tumores que tinham sido pré-tratados com o conjugado L6-AP (seguindo-se o tratamento com MOP) apresentavam aproximadamente um terço da dimensão dos tumores pré-tratados com o conjugado 1F5-AP. Além do mais, conforme indica o Quadro 3 a seguir, por volta do 63º dias pós-implantação, 3 dos 6 tumores dos murganhos tratados com L6-AP + MOP sofreram uma regressão completa e os 3 tumores restantes não aumentaram de tamanho desde o início do tratamento. Pelo contrário, o tamanho de 3 dos 5 tumores do grupo tratado com 1F5-AP + MOP efectivamente progrediu, 2 dos 5 tumores permaneceram estáveis, não se tendo verificado regressões parciais ou totais.

117

Quadro 3

RESPOSTA DE TUMORES (AO 63º DIA) AO TRATAMENTO COM CONJUGADOS ANTICORPO-AP E DERIVADOS DE MITOMICINA				
Grupo	RESPOSTAS DE TUMORES			
	progressão	estável	regressão parcial	regressão completa
Controlo	6/6			
MCH	6/6			
MOP	4/5	1/5		
1F5-AP + MOP	3/5	2/5		
L6-AP + MOP		3/6		3/6

Estas experiências demonstram claramente a especificidade e o efeito antitumor aumentado in vivo da associação enzima/MOP de acordo com a presente invenção, conduzida até ao alvo.

EXEMPLO 3

Este exemplo demonstra a aplicabilidade dos imunoconjugados, profármacos e métodos de acordo com a presente invenção para a libertação de uma série de fármacos diferentes em células tumorais. Utilizando o conjugado anticorpo-fosfatase alcalina, L6-AP, em associação com os profármacos, EP e MOP, aumentou-se a actividade antitumor in vivo. Assim, a presente invenção proporciona a utilização de uma única enzima conduzida pelo anticorpo até ao alvo com um painel de profármacos em uma quimioterapia associada contra tumores.

Os profármacos, EP e MOP, prepararam-se conforme descrito nos Exemplos 1 e 2, respectivamente. A preparação dos imunocombinados L6-AP e 1F5-AP encontra-se descrita no Exemplo 1. Os estudos in vivo com murganhos nus realizaram-se conforme descrito nos Exemplos 1 e 2 anteriores. Assim, os murganhos nus nos quais tinha sido implantado um tumor H2981 foram pré-expostos ao combinado L6-AP ou 1F5-AP 18-24 horas antes do tratamento com uma associação de MOP/EP (0,2 ml contendo 1 mg de EP e 0,3 mg de MOP em água). Comparou-se o crescimento tumoral ao observado em murganhos não tratados e em murganhos tratados apenas com a associação MOP/EP.

Conforme se mostra na Figura 19, as actividades antitumor da associação MOP/EP por si só e da associação MOP/EP mais o tratamento com 1F5-AP foram aproximadamente iguais. E, como indica o Quadro 4 seguinte, todos os tumores destes dois grupos bem como os tumores dos murganhos de controlo não tratados aumentaram de volume. Todavia, o pré-tratamento dos murganhos afectados por tumores com o combinado L6-AP seguido pelo tratamento com a associação MOP/EP, teve como consequência uma resposta antitumor acentuada. Tal como a figura 19 indica, ao 70º dia, os tumores que tinham sido pré-tratados com L6-AP (seguinte-se o tratamento com a associação MOP/EP) apresentavam aproximadamente

um terço da dimensão dos tumores pré-tratados com o conjugado 1F5-AP. Além do mais, o Quadro 4 mostra que no 63º dia pós-implantação, um dos 6 tumores do grupo dos murganhos pré-tratados com L6-AP tinha sofrido uma regressão completa, 3 dos 6 tumores tinham cessado de crescer e apenas 2 dos 6 tumores tinham aumentado de volume.

Quadro 4

RESPOSTA DE TUMORES (AO 63º DIA) AO TRATAMENTO COM CONJUGADOS ANTICORPO-AP E ASSOCIAÇÕES DE MITOMICINA/ETOPOSIDO				
Grupo	RESPOSTAS DOS TUMORES			
	progressão	estável	regressão parcial	regressão completa
Controlo	6/6			
NOH/EP	5/5			
1F5-AP + NOP/EP	6/6			
L6-AP + NOP/EP	2/6	3/6		1/6

Assim, estes estudos in vivo indicam a aplicabilidade dos conjugados, profármacos e métodos de acordo com a presente invenção para uma terapia associada contra tumores.

Alternativamente, os conjugados da presente invenção tais como o L6-AP podem utilizar-se com outras associações de profármacos, tais como o EP, o 14-fosfato de adriamicina e o monofosfato de 5-fluorouridina para libertar uma série de agentes citotóxicos diferen-

7

tes nas células tumorais.

Mais uma vez, a preparação do conjugado anti-corpo-enzima, L6-AP e do profármaco, 4'-fosfato de etoposido, realiza-se conforme descrito no Exemplo 1. Prepara-se o 14-fosfato de adriamicina conforme descrito na patente de invenção norte-americana nº 4 185 111 concedida em 22 de Janeiro de 1980 a J. B. Ducep. Prepara-se o monofosfato de 5-fluorouridina conforme descrito por M. J. Robins et al., Can. J. Chem., 53, pp. 1302-1306 (1975).

A reacção do L6-AP com os três profármacos referidos antes realizou-se do seguinte modo: adicionou-se ou apenas a enzima AP ou o conjugado L6-AP (concentração final de AP 5 µg/ml) a soluções de 4'-fosfato de etoposido ou 14-fosfato de adriamicina (0,1 mM) em tampão Tris (100 mM) contendo MgCl² (1 mM) e ZnCl₂ (0,1 mM) a pH 7,0. Para o profármaco 5-fluorouridina, as condições reaccionais exigem uma solução de 5-fluorouridina (3 µM) em tampão de fosfato (100 mM) a pH 8,0. A reacção do L6-AP com ou o fosfato de etoposido ou o profármaco 5-fluorouridina controla-se conforme descrito no Exemplo 1. A reacção do L6-AP com 14-fosfato de adriamicina controla-se por HPLC utilizando uma coluna C-18 IBM (3 µ, 4,5x100 mm) e como eluente metanol a 65% em água contendo 3% de acetato de amónio (0,5 ml/min, controlado a 495 mm).

7

A reacção do conjugado anticorpo-AP com cada um dos profármacos origina a eliminação por hidrólise dos radicais fosfato para libertar os fármacos livres [veja-se, por exemplo, R.B. McComb et al., Alkaline Phosphatase, Plenum Press (New York 1979)].

A citotoxicidade para as células tumorais de cada um dos três profármacos na presença do conjugado L6-AP da presente invenção pode demonstrar-se utilizando o ensaio de inibição das colónias como descrito no Exemplo 1 anterior. Após a remoção do radical fosfato de cada um dos profármacos efectuada pelo conjugado, libertam-se o etoposido, a adriamicina e a 5-fluorouridina. Tem-se demonstrado que cada um destes fármacos é um agente antitumor potente [veja-se, por exemplo, P. J. O'Dwyer et al., "Etoposide: Current Status Of An Active Anticancer Drug", New England Journal Of Medicine, 312, pp. 692-700 (1985); M.J. Embleton et al., "Antibody Targeting Of Anti-Cancer Agents", em Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, R. W. Baldwin e V.S. Byers (ed.s), pp. 321-22 (Academic Press 1985); patente de invenção norte-americana n.º. 4 185 111, supra; S.T. Crooke e S.D. Reich (ed.s), Anthracyclines: Current Status And New Developments, Academic Press (New York 1980); e C. Heidelberger et al., "Fluorinated Pyrimidines And Their

19

Nucleosides" em Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 54, pp. 57-119 (1983)].

Consequentemente os profármacos de etoposido, adriamicina e 5-fluorouridina podem utilizar-se conjunta ou sequencialmente para a libertação dos agentes antitumor conhecidos correspondentes no local do tumor pelos conjugados anticorpo-fosfatase alcalina da presente invenção. Demonstrou-se, por exemplo, que os agentes antitumor administrados em associação uns com os outros podem actuar por sinergia [veja-se, por exemplo, S. Monfardini et al., Manual Of Cancer Chemotherapy, UICC Technical Report Series, 56 (1981)]. Este aspecto da invenção proporciona consequentemente um método para uma quimioterapia associada contra tumores.

Exemplo 4

O exemplo seguinte demonstra a utilização de ainda outros imunoconjugados e profármacos da presente invenção para a conversão de um profármaco relativamente não citotóxico em um agente antitumor activo que exhibe citotoxicidade in vitro contra células tumorais. De acordo com este exemplo, utiliza-se um imunoconjugado L6-penicilina V-amidase (identificada na presente memória descritiva por "PVA") para converter um derivado N-fenoxiacético da adriamicina em um agente antitumor conhecido, a adriamicina.

Preparação De Conjugados Anticorpo-Penicilina V-
-Amidase Da Presente Invenção

Neste exemplo, preparou-se um imunoconjugado L6-PVA e um conjugado 1F5-PVA. Os anticorpos L6 e 1F5 e a sua proveniência já se descreveram antes. A enzima amidase utilizada foi uma penicilina V-amidase isolada a partir de uma cultura fúngica de Fusarium oxysporum de acordo com os métodos descritos por D.A. Lowe et al., "Enzimatic Hidrolysis Of Penicilin V to 6-Aminopenicillanic Acid By Fusarium Oxysporum", Biotechnonology Letters, 8 (3), pp. 151-56 (1986). As estirpes de Fusarium oxysporum a partir das quais é possível isolar esta enzima encontram-se depositadas na ATCC. Assim, a enzima PVA é uma enzima de obtenção fácil que converte a penicilina-V em ácido penicilânico. Mais especificamente, a PVA hidrolisa a ligação fenoxiacetil-amida da penicilina-V para produzir o ácido penicilânico. Consequentemente, a enzima, que reage com fenoxiacetamidas, pode utilizar-se eventualmente para cindir profármacos de agentes citotóxicos conhecidos que tenham sido derivados do ácido fenoxiacético ou p-hidroxifenoxiacético.

Os conjugados anticorpo-PVA desta variante da presente invenção prepararam-se essencialmente do mesmo modo que os conjugados com AP do Exemplo 1. Os anticorpos, L6 e 1F5, reagiram com o iminotiolano tal como

descrito e determinou-se que o número de grupos sulfidrilo introduzidos em cada um dos anticorpos estava compreendido entre 1-2.

Dissolveu-se depois a enzima PVA a 9 mg/ml em PBS e tratou-se com SMCC (Pierce Chemical Co., 100 mM em DMF) de tal modo que a concentração final foi de 5 mM. O tratamento com SMCC introduziu grupos maleimido na enzima. Decorridos 30 minutos à temperatura de 30°C, purificou-se a enzima modificada por filtração em gel sobre G-25 PD-10 Sephadex (Farmacia, Upsalla, Suécia) e eluiu-se com PBS. Adicionou-se depois a enzima PVA modificada a uma solução de cada um dos anticorpos tiolados na proporção molar de 3:1. Saturou-se cada uma das misturas reaccionais com azoto e deixou-se em repouso à temperatura ambiente durante 3 horas e incubou-se depois à temperatura de 4°C durante mais 18 horas. Nesta altura, adicionou-se a cada uma das soluções 2-aminoetanotiol (concentração final 1 mM) para bloquear quaisquer outros grupos maleimidados que não tivessem reagido.

Seguidamente fez-se passar cada uma das misturas reaccionais através de uma coluna de filtração em gel (G-25), utilizando como eluente Tris 20 mM, pH 7,2 com NaCl 50 mM. Purificaram-se as misturas resultantes em colunas DEAE Sephadex (2,5x10 cm). Controlaram-se as fracções a 280 nm. O anticorpo de cada uma das misturas

que não reagiu não se ligou à coluna e eluíram-se o conjugado e a enzima PVA que não reagiu com Tris 20 mM, pH 7,2 com NaCl 0,5 M. Concentraram-se depois as fracções que continham a enzima PVA e o conjugado utilizando um filtro de ultrafiltração Amicon YM-30 e purificaram-se em uma coluna de Sephacryl S-300 (2,5x95 cm) utilizando PBS como eluente. Controlaram-se as fracções a 280 nm e reuniram-se as que continham o conjugado puro, tal como determinado por SDS-PAGE (gel em gradiente 4-12%).

Preparação De Um Novo Profármaco de Adriamicina

Fez-se reagir depois cada um dos conjugados anticorpo-PVA preparados antes com um novo profármaco de adriamicina. Mais especialmente, utilizou-se o profármaco N-(p-hidroxifenoxiacetil)-adriamicina (designado na presente memória descritiva por "APO"), em que a adriamicina é acilada na posição amino-açúcar com o ácido p-hidroxifenoxiacético conforme representado na Figura 20.

Este profármaco de adriamicina foi sintetizado do seguinte modo:

A 10 ml de tetra-hidrofurano adicionaram-se 84 mg (0,5 mmole) de ácido p-hidroxifenoxiacético, 57 mg (0,5 mmole) de N-hidroxi-succinimida e 100 mg (0,49 mmole) de diciclo-hexil-carbodiimida. Agitou-se esta mistura durante 2 horas e filtrou-se depois a solução e

7

adicionou-se o filtrado a 200 mg (0,35 mmole) de cloridrato de adriamicina. Adicionou-se 0,1 ml de trietilamina à mistura reaccional e a agitação prosseguiu durante 4 horas. Filtrou-se depois a mistura reaccional através de lã de vidro e evaporou-se sob alto vazio até à obtenção de um resíduo. Purificou-se a mistura resultante em uma coluna de gel de sílica 60 (2,5 x 20 cm) e eluiu-se com diclorometano: metanol (95:5). Purificaram-se novamente as fracções reunidas utilizando uma coluna do mesmo tipo para se obterem 70 mg (0,1 mmole, rendimento 30%) de N-p-hidroxifenoxi-acetil)-adriamicina pura.

EM FAB m/e 694,2125 (M+H)⁺. Calculado C₃₅H₃₆NO₁₄, 694,2136, 360 MHz RMN¹H (CDCl₃) δ 1,06 (d, 3H, CH₃ do açúcar), 1,5-2,2 (m, 6H, H do açúcar), 3,0 (q, 2H) 4,0 (s, 3H, OCH₃), 4,35 (s, 2H, COCH₂O), 4,8-5,0 (m, 3H), 5,2 e 5,4 (s, 1H), 6,6-6,8 (dd, 4H, ArH do fenoxi), 7,4-7,9 (m, 3H, 2,3,4-H), 9,0 (s, 1H, Ar'OH), 11,61 e 12,39 (s, 1H, ArOH).

Deve ter-se em atenção que se podem sintetizar outros derivados fenoxiacetilamida de adriamicina utilizando essencialmente a mesma técnica descrita antes. Por exemplo, pode sintetizar-se a N-(fenoxi-acetil)-adriamicina tal como descrito nesta secção em que o ácido p-hidroxifenoxiacético é substituído por 0,5 mmole (76 mg) de ácido fenoxiacético. De um modo

7

idêntico, podem sintetizar-se o N-(p-hidroxifeno-
xiacetil)-melfalano ou profármacos de daunomicina ou o
N-(fenoxiacetil)-melfalano ou profármacos de
daunomicina utilizando este protocolo de síntese em que
se utilizam 100 mg de melfalano ou 200 mg de daunomicina
(0,35 mmole).

Reacção De Um Conjugado Anticorpo-Penicilina V-Amidase
Com Um Profármaco de Adriamicina

A capacidade do conjugado anticorpo-PVA,
L6-PVA, para converter o novo profármaco, APO, em
adriamicina avaliou-se do seguinte modo: a uma solução
de APO (0,1 mM em PBS adicionaram-se ou a) apenas PVA
(concentração final: 50 $\mu\text{g/ml}$), b) 100 $\mu\text{g/ml}$ do conju-
gado L6-PVA (concentração final de PVA: 25 $\mu\text{g/ml}$) ou c)
10 $\mu\text{g/ml}$ de L6-PVA (concentração final de PVA: 2,5
 $\mu\text{g/ml}$). Controlou-se cada uma das reacções por HPLC
utilizando uma coluna C-18 Phenomenex (3 μm ; 4,5 x 100
mm) e uma eluição em gradiente de 20-60% de tetra-hi-
drofurano em água contendo 0,1% de H_3PO_4 (1,0 ml/minu-
to, controlada a 495 nm). Nestas condições, a
adriamicina eluiu ao fim de 8,9 minutos e o APO ao fim
de 12,2 minutos. Os resultados estão indicados na
Figura 21.

Tal como a figura demonstra, o grupo amida do
composto APO foi realmente hidrolisado pela PVA
conforme indicado pela formação de adriamicina. Nas

17

condições utilizadas, a semi-vida da hidrólise do APO pela PVA foi de aproximadamente 20 minutos. Além disso, observou-se que nos 40 minutos que se seguem ao início da reacção, quer a enzima individualmente quer o conjugado anticorpo-PVA foram capazes de realizar a hidrólise de pelo menos 80% de APO em adriamicina. O conjugado a 10 $\mu\text{g/ml}$ (2,5 $\mu\text{g/ml}$ de PVA) foi capaz de alcançar este nível de hidrólise em 120 minutos. Finalmente, é evidente a partir destes estudos que o conjugado anticorpo-PVA da presente invenção não exibiu qualquer perda aparente de actividade enzimática devido à ligação da enzima ao anticorpo como é evidenciado pelo facto de o conjugado e a enzima livre exibirem capacidades semelhantes para hidrolisar o composto APO em adriamicina.

Estabilidade Sérica Do Novo Profármaco De Adriamicina
Da Presente Invenção

Determinou-se a estabilidade do composto APO no soro humano por HPLC e medindo a velocidade de desaparecimento do composto APO e a velocidade de formação da adriamicina. Assim, adicionou-se uma solução de APO (10 mM em dimetilformamida) a soro humano recente de tal modo que a concentração final foi de 0,1 mM. Diluíram-se alíquotas (50 μl) com metanol (50 μl) para precipitar as proteínas séricas. Centrifugaram-se depois estas amostras e analisaram-se por HPLC tal como descrito

imediatamente antes. Em duas horas não ocorreu qualquer hidrólise do APO em adriamicina.

Ligação Dos Conjugados Anticorpo-PVA

A Células Tumorais H2981

Determinou-se a capacidade dos conjugados L6-PVA e 1F5-PVA da presente invenção para se ligarem a células tumorais H2981 conforme descrito nos Exemplos 1 e 2. Os resultados do ensaio de ligação estão representados na Figura 22.

Uma análise FACS indicou que tanto o anticorpo L6 como o conjugado L6-PVA se ligam fortemente às células tumorais ao passo que o conjugado 1F5-PVA não exhibe qualquer capacidade significativa de ligação. Este estudo de ligação indica em primeiro lugar que a ligação à enzima não afectou substancialmente a capacidade de ligação do componente anticorpo dos imunocombinados da presente invenção. Em segundo lugar, este ensaio demonstra novamente a especificidade de ligação dos conjugados; o conjugado L6-PVA liga-se às células tumorais H2981 L6-positivas e o conjugado 1F5-PVA, devido à falta de especificidade dos anticorpos 1F5 para as células tumorais, demonstra essencialmente ausência de ligação.

117

Citotoxicidade In Vitro Da Associação Conjugado
Anticorpo-PVA/Profármaco De Adriamicina Da
Presente Invenção Em Células Tumerais H2981

Mediu-se o efeito citotóxico in vitro da associação anticorpo-PVA/profármaco de adriamicina de acordo com a presente invenção relativamente a células tumorais H2981 utilizando o ensaio de captação de ³H-timidina descrito nos Exemplos 1 e 2 anteriores. Resumidamente, plaquearam-se as células tumorais H2981 para placas de microtitulação com 96 cavidades em IMDM (10000 células/cavidade) e permitiu-se a sua ligação durante 18 horas à temperatura de 37°C. Adicionaram-se então os conjugados anticorpo-PVA, L6-PVA ou 1F5-PVA em uma concentração de 10 µg/ml de anticorpo e incubaram-se as placas durante 30 minutos à temperatura de 4°C. Lavaram-se depois as cavidades 4 vezes com IMDM e adicionou-se o APO em concentrações variáveis em meio IMDM. Decorridas 2 horas, lavaram-se novamente as cavidades, adicionou-se IMDM e conservaram-se as células durante 18 horas à temperatura de 37°C. Nesta altura, adicionou-se ³H-timidina (1 µCi por cavidade), e, decorridas 6 horas, congelaram-se as placas a -70°C para separar as células. Após a descongelação, recolheram-se as células em filtros de fibra de vidro. Mediu-se a incorporação de ³H-timidina em um contador de cintilação Beckman 3801 e comparou-se a das células

117

tratadas com APO com a das tratadas apenas com adriamicina (ADM).

Utilizando este ensaio, mediu-se a inibição da incorporação de ^3H -timidina no ADN das células tumorais e assim, o efeito citotóxico do profármaco, APO, sobre as células na presença ou na ausência de pré-tratamento das mesmas com os conjugados L6-PVA ou 1F5-PVA. Compararam-se os efeitos citotóxicos destas associações com a citotoxicidade observada no tratamento das células apenas com o fármaco original, a adriamicina. Como se mostra na Figura 23, em células tumorais não tratadas com nenhum conjugado, a adriamicina com uma CI_{50} de 38 μM , foi significativamente mais tóxica do que o composto APO com uma CI_{50} de 2 μM . Isto era previsível tomando como base relatórios anteriores demonstrando que as amidas de adriamicina são menos tóxicas do que a adriamicina [veja-se, por exemplo, Y. Levin e B.A. Sela, FEBS Letters, 98, p. 119 (1979) e R. Baurain et al., J. Med. Chem., 23, p. 1171 (1980)]. O pré-tratamento das células com o conjugado L6-PVA aumentou 20 vezes a citotoxicidade do composto APO até um nível comparável ao observado com apenas adriamicina. O pré-tratamento das células com 1F5-PVA não afectou de forma alguma a toxicidade do composto APO. Estes resultados indicam que o conjugado L6-PVA é capaz de hidrolisar o profármaco relativamente não citotóxico,

APO, para assassinar as células tumorais numa dimensão comparável à que se observa utilizando apenas adriamicina e que esta citotoxicidade é específica do antigene conforme indica o facto do conjugado 1F5-PVA, que não se liga significativamente a esta linha especial de células tumorais, não exibir tal citotoxicidade.

Ligação Dos Conjugados Anticorpo-PVA Às Células Do Linfoma De Daudi

Avaliou-se também a capacidade dos conjugados L6-PVA e 1F5-PVA da presente invenção se ligarem à conhecida linha de células de Daudi. Esta linha de células é uma linha celular do linfoma de Burkitt, depositada na ATCC (ATCC # CCL 213), que expressa o antigene CD-20 ao qual se liga o anticorpo 1F5. O ensaio de ligação realizou-se conforme descrito no Exemplo 1, com a excepção de se terem utilizado células de Daudi, encontrando-se os resultados indicados na Figura 24.

Neste caso, o anticorpo monoclonal 1F5 e o conjugado 1F5-PVA ligaram-se ambos fortemente às células do linfoma. Assim, este estudo indica novamente que a capacidade de ligação dos conjugados não foi significativamente afectada pela técnica de conjugação.

Além do mais, conforme a Figura indica, o anticorpo L6 e o conjugado L6-PVA não exibiram ligação apreciável às células de Daudi. Este facto era previsí-

119

vel porque as células tumorais de Daudi não possuem o antigene com o qual reage o anticorpo L6. Assim este estudo considerado em associação com os estudos de ligação prévia descritos na presente memória descritiva, demonstra claramente a especificidade de ligação dos conjugados da presente invenção, isto é, os conjugados que contêm o anticorpo L6 ligam-se especificamente a células tumorais L6-positivas e os conjugados que contêm o anticorpo 1F5 ligam-se especificamente a células tumorais CD-20-positivas.

Citotoxicidade In Vitro Da Associação Conjugado
Anticorpo-PVA/Profármaco Da Adriamicina Da
Presente Invenção Nas Células De Daudi

Analizou-se depois o efeito citotóxico in vitro dos conjugados L6-PVA ou 1F5-PVA em associação com o profármaco APO sobre células de Daudi.

O ensaio da ³H-timidina realizou-se essencialmente conforme descrito nos exemplos anteriores com modificações ligeiras devido ao facto das células de Daudi não serem aderentes. Assim, plaquearam-se aproximadamente 250000 células de Daudi em meio IMDM em cada uma das cavidades de uma placa de microtitulação com 96 cavidades e adicionou-se o conjugado anticorpo-enzima. Incubou-se a mistura reaccional à temperatura de 4°C durante 30 minutos. Eliminou-se o conjugado anticorpo-enzima não ligado por centrifugação a 500 x g durante

5 minutos e remoção do sobrenadante. Suspenderam-se novamente as células em meio IMDM e repetiu-se a técnica de lavagem 3 vezes até à eliminação de todo o conjugado não ligado. Acicionou-se depois o profármaco APO em meio IMDM durante 2 horas e lavou-se uma vez conforme descrito antes. A parte restante do ensaio foi realizada conforme descrito nos exemplos anteriores.

Utilizando este ensaio, mediu-se a inibição da incorporação de ^3H -timidina no ADN das células de Daudi e assim, o efeito citotóxico do profármaco APO sobre as células com ou sem tratamento prévio das mesmas com o conjugado L6-PVA ou 1F5-PVA. Compararam-se os efeitos citotóxicos dessas associações à toxicidade observada no tratamento das células apenas com adriamicina. Conforme se mostra na Figura 25, nas células de Daudi não tratadas com qualquer conjugado, a adriamicina foi significativamente mais tóxica do que o profármaco APO. O pré-tratamento das células com o conjugado 1F5-PVA aumentou significativamente a citotoxicidade do profármaco APO até um nível comparável ao que se observa com a adriamicina utilizada individualmente, ao passo que o pré-tratamento com o conjugado L6-PVA não originou qualquer aumento.

Deve ter-se em atenção que os resultados obtidos nestes estudos de ligação e de citotoxicidade estão em oposição com os obtidos com estes conjugados nos

117

estudos descritos anteriormente neste exemplo utilizando células tumorais H2981 onde a associação do L6-PVA com o APO mostrou efeitos citotóxicos aumentados facto que não sucedeu com a associação 1F5-PVA com o APO. Este facto que era aguardado devido às especificidades diferentes dos anticorpos L6 e 1F5 dos conjugados demonstra claramente a especificidade dos efeitos citotóxicos obtidos com as associações conjugado/profármaco da presente invenção.

Além do mais, este estudo indica a utilidade da associação do conjugado 1F5-PVA com o composto APO para a obtenção de efeitos citotóxicos em células tumorais in vitro. Assim, os estudos de citotoxicidade in vitro deste exemplo demonstram a aplicabilidade da presente invenção a qualquer conjugado que contenha um anticorpo capaz de reagir com um antigene associado a um tumor para o tratamento de tumores com os quais o anticorpo reage.

EXEMPLO 5

Este exemplo refere-se à utilização dos imunoconjugados e dos métodos da presente invenção na conversão do profármaco, a 5-fluorocitosina, (designado na presente memória descritiva por "5-FC"), no fármaco antitumor, o 5-fluorouracilo, (designado na presente memória descritiva por "5-FU"), através da citosina-desaminase (CD) ligada ao anticorpo (ver a Figura 26).

117

A associação conjugado anticorpo-CD/profármaco 5-FC desta variante demonstrou um significativo efeito citotóxico sobre células tumorais in vitro.

Preparação Dos Conjugados Anticorpo-Citosina-
-Desaminase Da Presente Invenção

Prepararam-se os imunoconjugados L6-CD e 1F5-CD utilizando os anticorpos monoclonais L6 e 1F5 referenciados nos exemplos anteriores e uma enzima citosina-desaminase. Embora as enzimas CD tenham sido detectadas e isoladas a partir de uma multiplicidade de microrganismos [veja-se, por exemplo, West et al., Biochem. Biophys. Acta., 719, pp. 251-58 (1982)], purificou-se a CD especial utilizada neste exemplo a partir de levedura de padeiro comprimida, por um processo idêntico ao descrito por P.L. Ipata et al., "Baker's Yeast Cytosine Deaminase. Some Enzymatic Properties And Allosteric Inhibition By Nucleosides And Nucleotides", Biochemistry, 10, pp. 4270-76 (1971).

Resumidamente, submeteram-se a plasmólise 2,0 kg de células de levedura (Saccharomyces cerevisiae) com acetato de etilo e precipitaram-se duas vezes com sulfato de amónio (50-73%) para se obter uma preparação enzimática bruta. Submeteu-se a diálise o granulado ("pellet") de sulfato de amónio contra tampão Tris-Cl 10 mM, pH 8,0, aplicado a uma coluna de permuta aniónica Q-Sepharose (Pharmacia) e eluiu-se com um

Handwritten mark resembling a stylized 'A' or '7'.

gradiente de KCl (0-0,3 M).

Para determinar a actividade da CD analisaram-se fracções utilizando como substrato citosina 3 mM (ou 5-FC) em PBS à temperatura de 27°C em conformidade com a técnica de T. Nishiyama et al., "Antineoplastic Effects In Rats Of 5-Fluorocytosine In Combination With Cytosine Deaminase Capsules", Cancer Research, 45, pp. 1753-61 (1985). Assim, de acordo com esta técnica, adicionou-se uma pequena quantidade da preparação enzimática ao substrato, citosina (ou 5-FC), e controlou-se a evolução da reacção por espectrofotometria no UV para a formação de uracilo (ou 5-FU) em alíquotas nas quais se interrompeu a reacção com HCl 0,1 N. Utilizaram-se taxas de 250/280 (para a citosina) e de 255/290 (para o composto 5-FC) para medir a quantidade formada de uracilo ou de 5-FU. Esta técnica para determinar a actividade da CD foi utilizada em cada uma das fases de purificação dessa enzima bem como durante a purificação dos conjugados que a contém de acordo com a presente invenção e descritos antes.

Assim, reuniram-se as fracções activas do gradiente de KCl, concentraram-se e purificaram-se em uma coluna G-75 Sephadex. Nesta fase, um ensaio SDS-PAGE (14%, não redutor) indicou que a fracção que continha a actividade da enzima CD era constituída por uma proteína principal com 18 kd de peso molecular e

117

por quantidades menores de proteínas de 20 e 30 kd. A actividade da CD desta fracção foi 10 U/mg de proteína (utilizando citosina como substrato). Outras preparações produziram material com uma actividade tão elevada como 17 U/mg de proteína. Todos os ensaios de proteínas foram realizados utilizando o reagente de ensaio de proteínas BCA fornecido por Pierce (Rockford, IL).

Conjugou-se depois a CD purificada com os anticorpos monoclonais L6 ou 1F5 essencialmente do mesmo modo que o descrito para os conjugados AP do Exemplo 1. Purificaram-se os conjugados brutos (não tratados com iodoacetamida) por filtração de gel em Sepharose S-200 utilizando PBS como eluente. Controlaram-se as fracções a 280 nm e determinou-se a actividade da CD de cada uma das fracções conforme descrito imediatamente antes. Reuniram-se as fracções que continham conjugados com níveis apropriados de taxas CD-anticorpo e analisaram-se por SDS-PAGE em um gel não redutor de gradiente 4-12% para produzir preparações purificadas dos conjugados L6-CD e 1F5-CD.

Reacção Dos Conjugados Anticorpo-Citosina-Desaminase
Com O Profármaco, 5-Fluorocitosina

A capacidade dos conjugados L6-CD e 1F5-CD da presente invenção para converterem o profármaco, 5-FC, em 5-FU ou para converterem a citosina como substrato em uracilo mediu-se do modo seguinte: a uma solução de

3 mM de a) citosina ou b) 5-FC em PBS adicionou-se à temperatura de 27°C ou CD livre (concentração final: 5 µg/ml), o conjugado L6-CD (concentração final da CD: 5 µg/ml) ou o conjugado 1F5-CD (concentração final da CD: 5 µg/ml) e avaliou-se a quantidade de produto formado ao longo do tempo por espectrofotometria conforme descrito no exemplo anterior. Os resultados estão apresentados na Figura 27.

Tal como a figura indica, o composto 5-FU foi produzido a partir do profármaco, 5-FC, pela enzima CD livre e pelos conjugados anticorpo-CD de acordo com a presente invenção. A figura mostra também que não houve qualquer perda significativa da actividade da enzima CD devido à ligação da enzima ao anticorpo de qualquer conjugado conforme é evidenciado pelo facto de esses conjugados exibirem actividades iguais às observadas com apenas a enzima CD. A actividade específica da enzima livre e dos conjugados foi aproximadamente 4 U/mg de enzima.

Para comparação, analisou-se a reactividade dos conjugados utilizando citosina como substrato, em vez de 5-FC. Tal como a figura indica, com citosina como substrato, os conjugados exibiram também actividades da CD praticamente iguais às observadas com apenas enzima CD livre. A actividade específica dos conjugados - 10 U/mg de enzima ligada - indica também que a actividade

enzimática inicial da CD foi preservada no conjugado. Este nível de actividade manteve-se durante várias semanas quando se armazenaram os conjugados em PBS à temperatura de 4°C.

Ligação Dos Conjugados Anticorpo-CD

Às Células Tumorais H2981

Avaliou-se a capacidade dos conjugados L6-CD e 1F5-CD da presente invenção para se ligarem às células tumorais H2981 conforme descrito nos Exemplos 1 e 2. Os resultados do ensaio de ligação estão descritos na figura 28.

A análise por FACS indicou que tanto o L6 como o L6-CD se ligam fortemente às células tumorais enquanto o conjugado 1F5-CD não exhibe qualquer ligação às células. Tal como sucedia nos estudos de ligação anteriores descritos na presente memória descritiva, este ensaio indica a preservação da actividade de ligação destes conjugados apesar da conjugação do anticorpo à enzima, bem como da especificidade de ligação dos conjugados.

Citotoxicidade In Vitro Da Associação Conjugado

Anticorpo-CD/Profármaco 5-FC Da Presente Invenção

Sobre Células Tumorais H2981

Avaliou-se a citotoxicidade in vitro da associação conjugado anticorpo-CD/profármaco 5-FC da presente invenção sobre células tumorais H2981 utilizando

17

um ensaio de captação de ^3H -leucina semelhante ao ensaio de captação de 3 -timidina descrito nos Exemplos 1 e 2.

De acordo com este ensaio, plaqueou-se uma suspensão de 10^4 células H2981 em 0,1 ml de meio IMDM com 10% (vol/vol) de soro fetal de vitela em placas de microtitulação com 96 cavidades e aguardou-se que ocorresse a aderência durante a noite à temperatura de 37°C . Lavaram-se depois as placas e adicionou-se o conjugado L6-CD ou 1F5-CD (10 μg de proteína total/ml contendo 10 U/mg de actividade da enzima CD ligada, utilizando citosina como substrato) em 0,1 ml de meio IMDM. Decorridos 30 minutos à temperatura de 4°C , lavaram-se as placas 4 vezes e adicionou-se às cavidades 0,15 ml de meio RPMI isento de leucina e contendo concentrações variáveis dos fármacos, 5-FC ou 5-FU. Incubaram-se as células durante 18 horas à temperatura de 37°C depois do que se marcaram durante 6 horas com ^3H -leucina (1 μCi /cavidade) em 0,05 ml de meio RPMI isento de leucina. Trataram-se depois as placas conforme descrito nos Exemplos 1 e 2 no ensaio de captação da ^3H -timidina.

Utilizando este ensaio, mediu-se a inibição da ^3H -leucina no interior da proteína das células tumorais e assim, o efeito citotóxico do profármaco, 5-FC, sobre as células com ou sem pré-tratamento das mesmas com os

conjugados L6-CD ou 1F5-CD. Compararam-se os efeitos citotóxicos dessas associações com a citotoxicidade observada no tratamento das células apenas com o fármaco original, 5-FU. Conforme se mostra na Figura 29, sobre as células tumorais não tratadas com qualquer conjugado, o 5-FC exibiu uma actividade citotóxica muito pequena enquanto o 5-FU inibiu o crescimento celular com uma CI_{50} de 20 μ M. Todavia, o pré-tratamento das células com o conjugado L6-CD aumentou a citotoxicidade do 5-FC até um nível igual ao que se observa quando se utiliza apenas o composto 5-FU. Este resultado é consistente com o facto de o L6-CD ligado ao antigene ser capaz de converter o profármaco não tóxico, 5-FC, no composto 5-FU. O conjugado não ligante, 1F5-CD, não exibiu aumento, indicando a natureza específica do antigene desta citotoxicidade aumentada.

Ainda que se tenha apresentado na presente memória descritiva uma série de variantes desta invenção, é evidente que a construção básica pode ser alterada para se obterem outras variantes que utilizem os métodos, imunocombinados e profármacos da mesma invenção. Consequentemente, compreender-se-á que as reivindicações anexas à presente memória descritiva definirão o âmbito da invenção mais do que as variantes específicas que foram apresentadas na mesma memória descritiva a título exemplificativo.

Lisboa, 11 de Maio de 1995

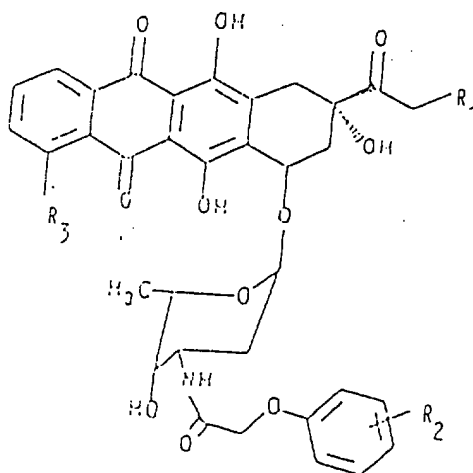
O Agente Oficial da Propriedade Industrial

António D. Fernandes

17

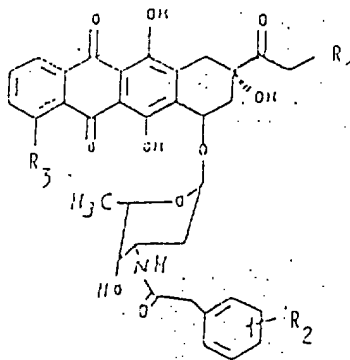
REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a preparação de compostos de fórmulas gerais



na qual

- R₁ representa um átomo de hidrogénio e R₃ representa um grupo hidroxil ou OCH₃; ou
- R₁ representa um grupo hidroxil e R₃ representa um grupo OCH₃; e
- R₂ representa um átomo de hidrogénio ou um grupo hidroxil, ou



119

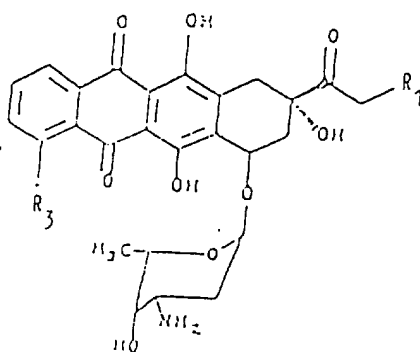
na qual

R_1 representa um átomo de hidrogénio e R_3
representa um grupo hidroxil ou OCH_3 ; ou

R_1 representa um grupo hidroxil e R_3
representa um grupo OCH_3 ; e

R_2 representa um átomo de hidrogénio ou um
grupo hidroxil,

caracterizado pelo facto de se fazer reagir um composto
de fórmula geral



na qual

R_1 e R_3 têm os significados definidos antes,

- a) com ácido p-hidroxifenoxiacético ou ácido fenoxiacético, ou derivados activados destes ácidos, de preferência activados com N-hidroxisuccinimida ou di-ciclo-hexil-carbodiimida para se obter um composto de

7

fórmula geral (I); ou

- b) com ácido fenilacético ou ácido hidroxifenilacético ou derivados activados destes ácidos, de preferência activados com N-hidroxi-succinimida ou di-ciclo-hexil-carbodiimida, para se obter um composto de fórmula geral (II).

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação da N-(p-hidroxifenoxiacetil)-adriamicina ou da N-(fenoxiacetil)-adriamicina, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

3. Processo para a preparação de composições farmacêuticas, apropriadas para o tratamento de tumores escolhidos entre carcinomas, melanomas, linfomas, ósseos e sarcomas de tecidos moles e outros tumores caracterizado pelo facto de se associar pelo menos um profármaco preparado pelo processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, que é fracamente citotóxico para as células tumorais em comparação com o fármaco original correspondente, com pelo menos um conjugado anticorpo-enzima constituído por um anticorpo capaz de reagir com um antigénio à superfície de células tumorais e ligado a uma enzima capaz de converter o

citado profármaco no fármaco original mais citotóxico.

4. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se escolher o anticorpo no grupo constituído por anticorpos policlonais, monoclonais ou quiméricos.

5. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se escolher o anticorpo no grupo constituído pelos anticorpos monoclonais L6, 96.5 e 1F5.

6. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se escolher a enzima entre penicilina-amidases.

7. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se utilizar como enzima a penicilina V-amidase ou a penicilina G-amidase.

8. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se escolher o profármaco entre a N-(p-hidroxifenoxiacetil)-adriamicina, a N-(fenoxiacetil)-adriamicina, a N-(p-hidroxifenilacetil)-adriamicina ou a N-(fenilacetil)-adriamicina.

17

9. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se utilizar como conjugado o L6-PVA ou o 1F5-PVA.

10. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se utilizar como conjugado anticorpo-enzima o L6-PVA e de se escolher o profármaco entre a N-(p-hidroxifenoxiacetil)-adriamicina e a N-(fenoxiacetil)-adriamicina.

11. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 3 a 10, caracterizado pelo facto de se utilizar mais do que um profármaco, cada um dos quais é fracamente citotóxico para as células tumorais em comparação com o fármaco original correspondente.

12. Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo facto de se escolherem os profármacos entre derivados N-fenoxiacetil de adriamicina e derivados N-fenilacetil de adriamicina.

13. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se utilizar mais do que um conjugado anticorpo-enzima em que o anticorpo de cada um dos conjugados é capaz de reagir com um antigénio igual ou diferente localizado na superfície das células

tumorais citadas, e a enzima de cada conjugado é igual ou diferente e é capaz de converter pelo menos um profármaco, que é fracamente citotóxico para as células tumorais em comparação com o fármaco original correspondente, no fármaco original mais citotóxico.

14. Processo para a preparação de composições farmacêuticas, caracterizado pelo facto de se associarem dois componentes separados úteis no tratamento de tumores um dos quais é pelo menos um profármaco preparado de acordo com a reivindicação 1 ou 2 utilizado em uma quantidade eficaz sob o ponto de vista farmacêutico.

15. Processo para a preparação de associações constituídas por dois componentes separados, caracterizado pelo facto de se associar um componente constituído por pelo menos um conjugado anticorpo-enzima com um outro componente constituído por pelo menos um profármaco que é fracamente citotóxico para células tumorais em comparação com o fármaco original correspondente, tal como definido em uma qualquer das reivindicações 1 a 13.

16. Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo facto de se utilizar como conjugado anticorpo-enzima o L6-PVA.

17. Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo facto de se escolher o profármaco no grupo constituído por derivados N-fenoxiacéticos de adriamicina e derivados N-fenilacéticos de adriamicina.

18. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo facto de se utilizar como conjugado anticorpo-enzima uma proteína de fusão comportando pelo menos a região de ligação ao antigénio de um anticorpo capaz de reagir com um antigénio associado ao tumor e ligado a pelo menos uma porção activa sob o ponto de vista funcional de uma enzima capaz de converter pelo menos um profármaco fracamente citotóxico no fármaco original mais citotóxico.

19. Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo facto de se utilizar pelo menos um profármaco preparado pelo processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2 em uma forma de dosagem apropriada.

Lisboa, 11 de Maio de 1995

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

17

RESUMO

"Processo para a preparação de profármacos antraciclínicos e de composições e de associações farmacêuticas que os contêm ligados a conjugados anticorpo-enzima"

A presente invenção descreve profármacos antraciclínicos que possibilitam a libertação de fármacos citotóxicos em células tumorais mediante a administração de um conjugado anticorpo-enzima específico do tumor e que se liga às células tumorais, e a administração adicional do profármaco que é convertido no local do tumor, na presença da enzima ligada ao anticorpo, em um fármaco citotóxico activo. A presente invenção descreve também um método para a preparação destes profármacos que consiste em fazer reagir, nomeadamente, o grupo amina do fármaco original tal como a adriamicina e outras antraciclinas com o grupo carboxilo do ácido fenoxiacético, do ácido fenilacético ou de outros ácidos relacionados. De acordo com uma variante da presente invenção, tem-se utilizado um conjugado anticorpo-enzima contendo a enzima penicilina V-amidase ("PVA") em associação com um profármaco novo, a N-(p-hidroxifenoxiacetil)-adriamicina para assassinar

células tumorais. Os produtos de acordo com a presente invenção asseguram o assassínio de células tumorais e são assim úteis no tratamento de cancros e de outros tumores.

Lisboa, 11 de Maio de 1995

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

FIG.1

ACTIVAÇÃO DE PROFÁRMACOS POR ENZIMAS
CONDUZIDAS ATÉ AO ALVO PELOS ANTICORPOS

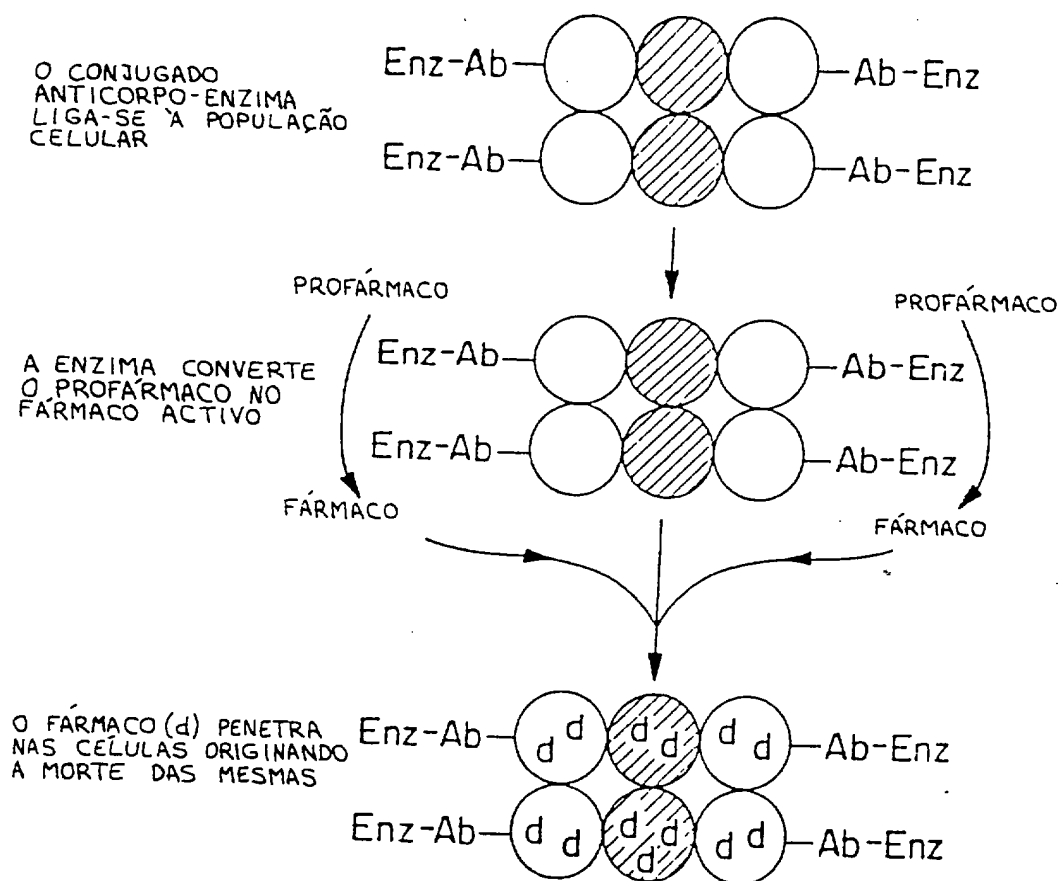


FIG. 2

A B C D E

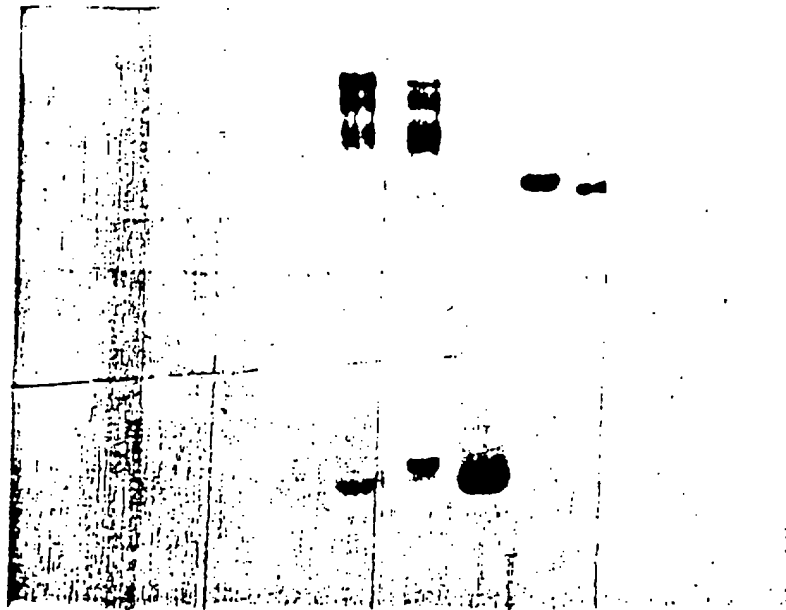
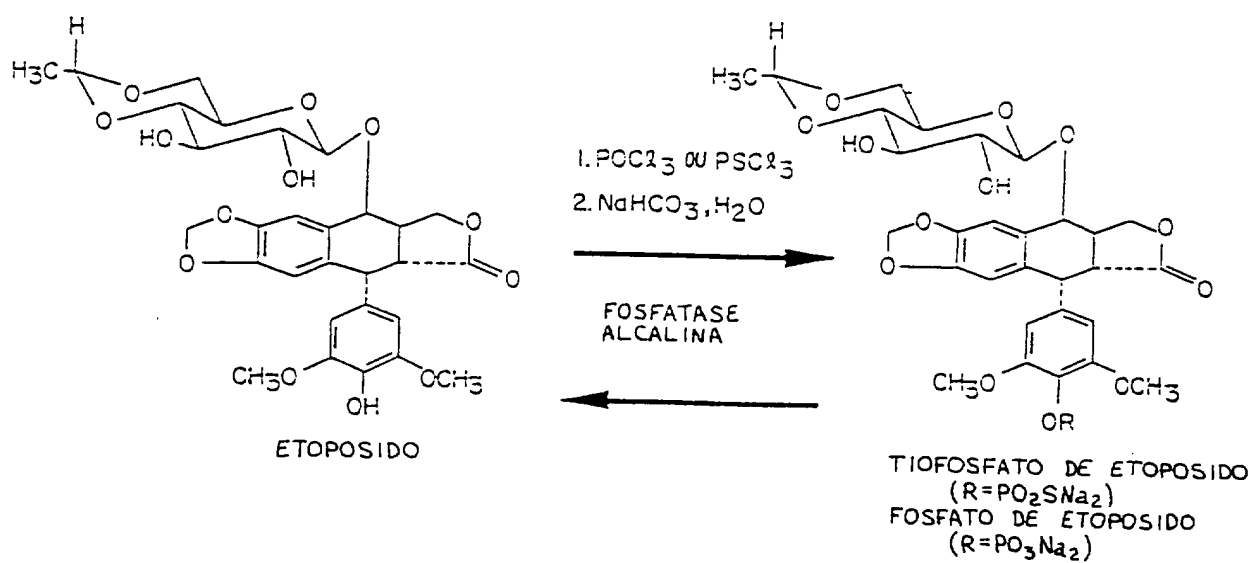
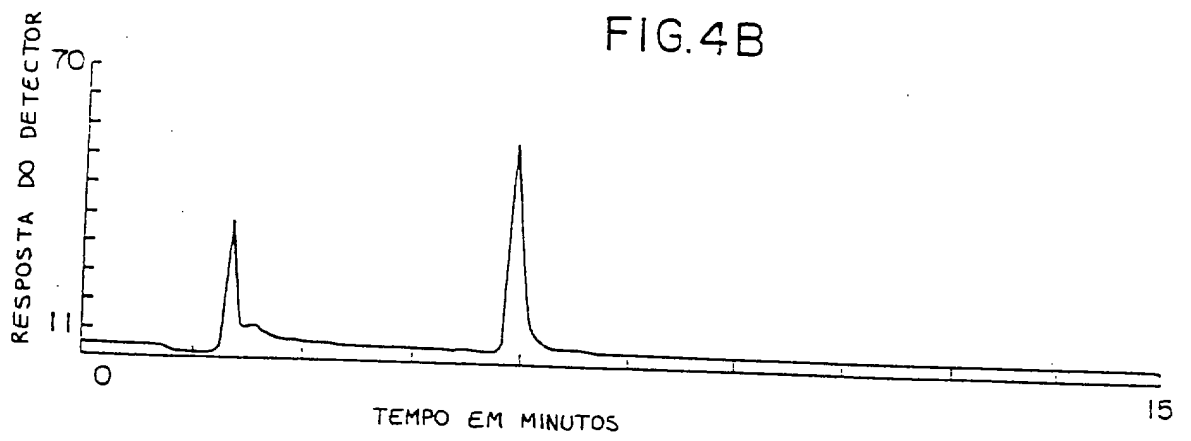
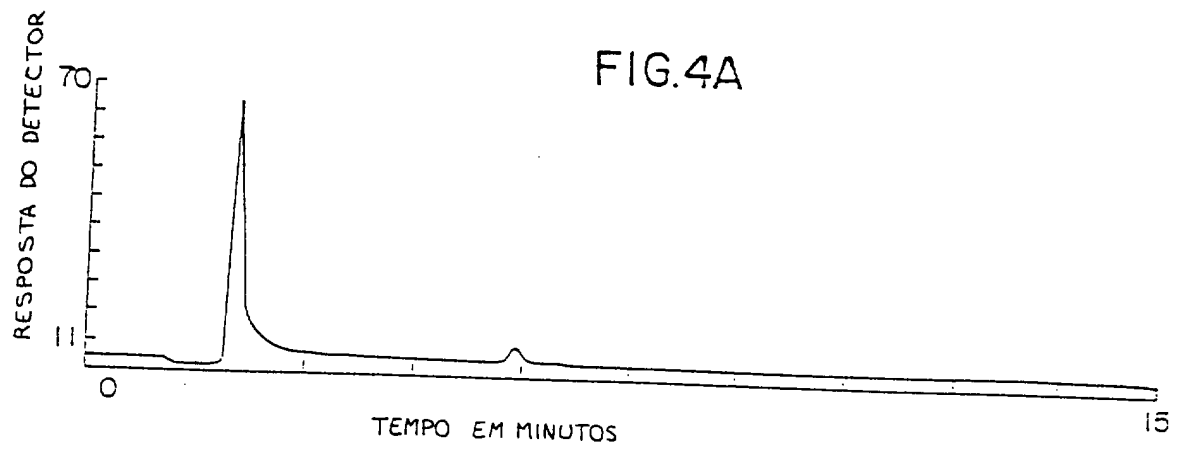


FIG. 3





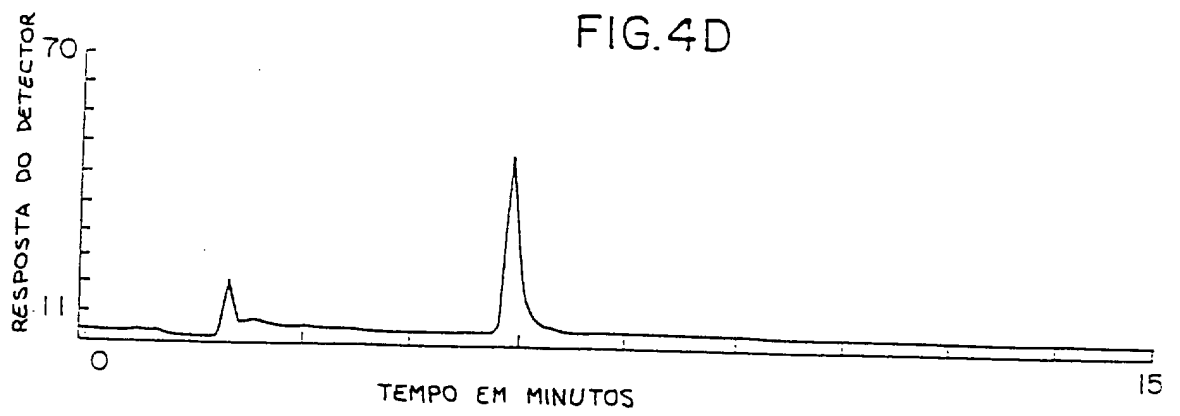
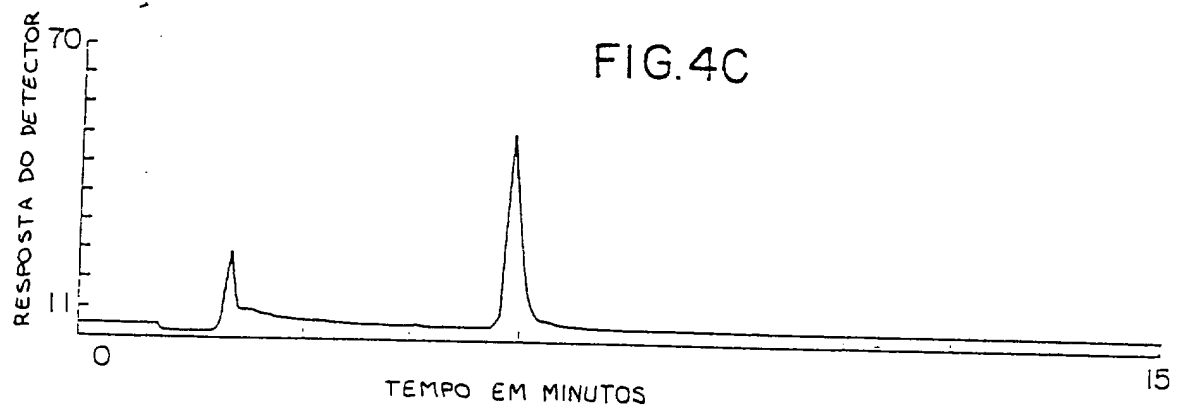


FIG. 5

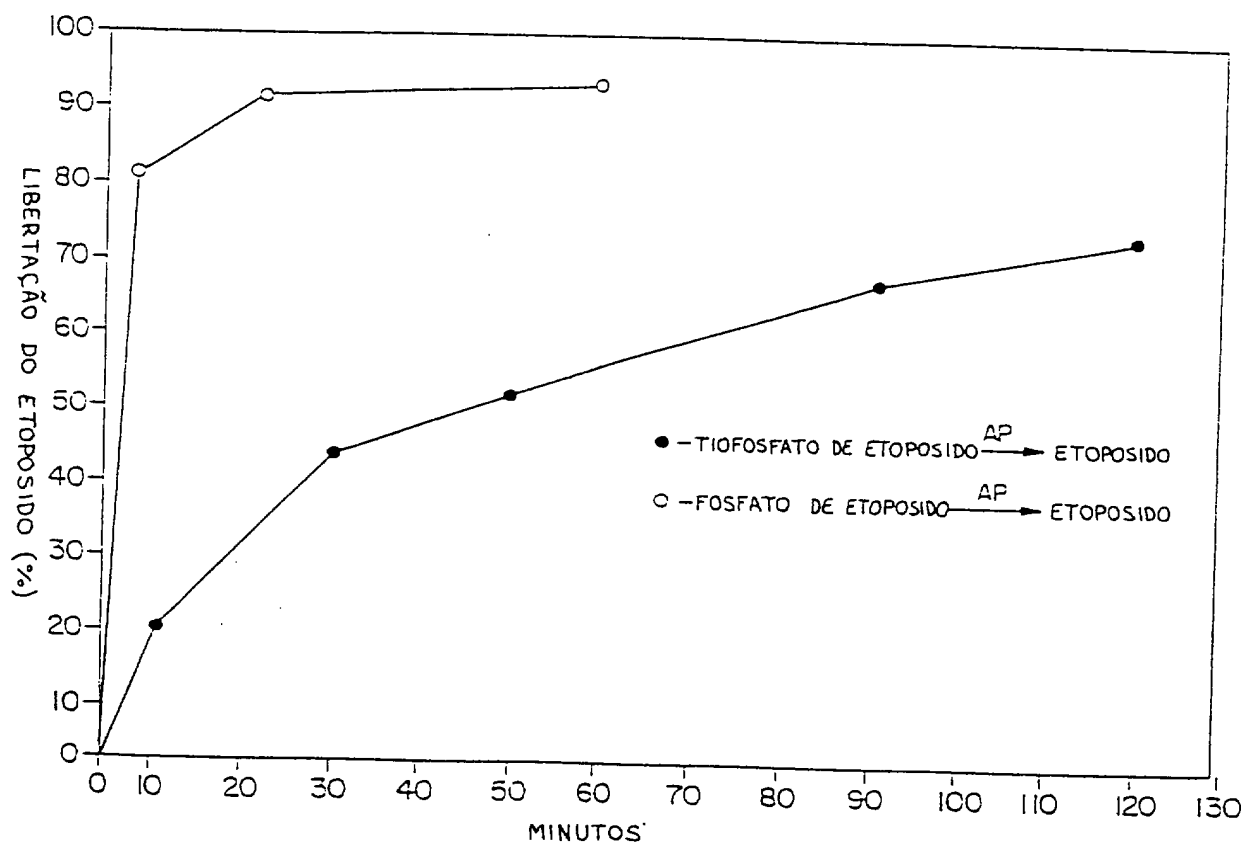


FIG.6

LIGAÇÃO DE ANTICORPOS E DE CONJUGADOS A CÉLULAS H3347

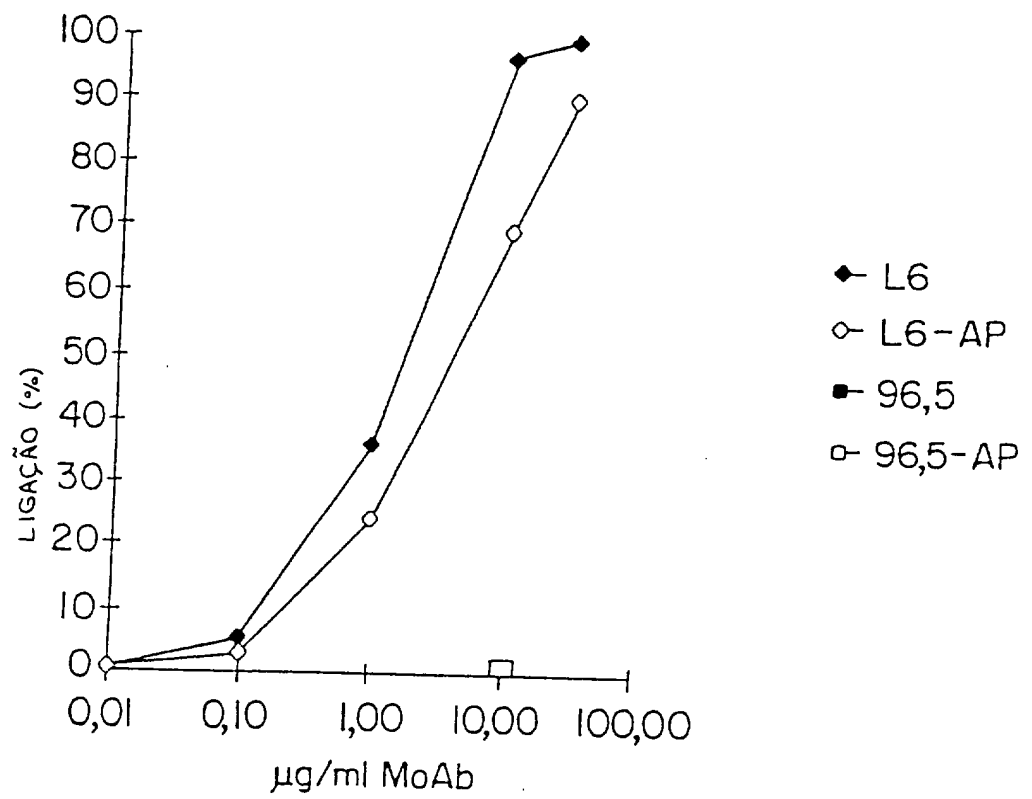


FIG. 7

ENSAIO DE LIGAÇÃO DE CONJUGADOS COM FOSFATASE ALCALINA

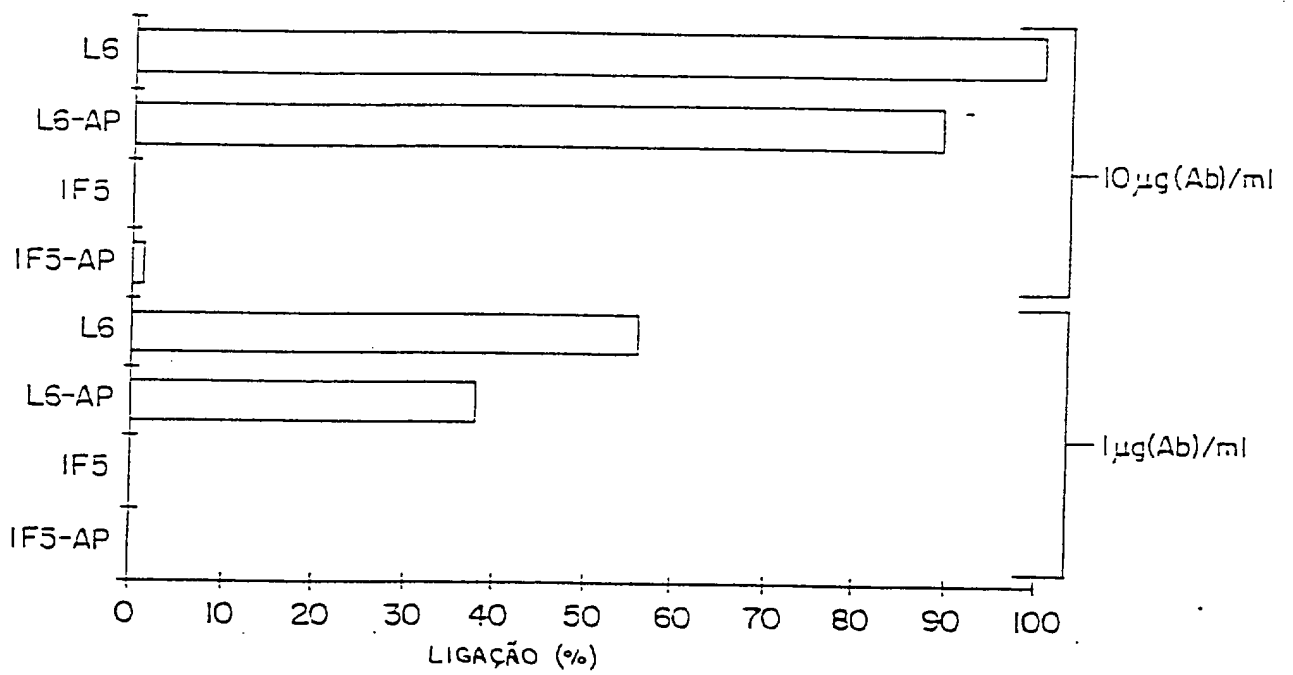


FIG. 8

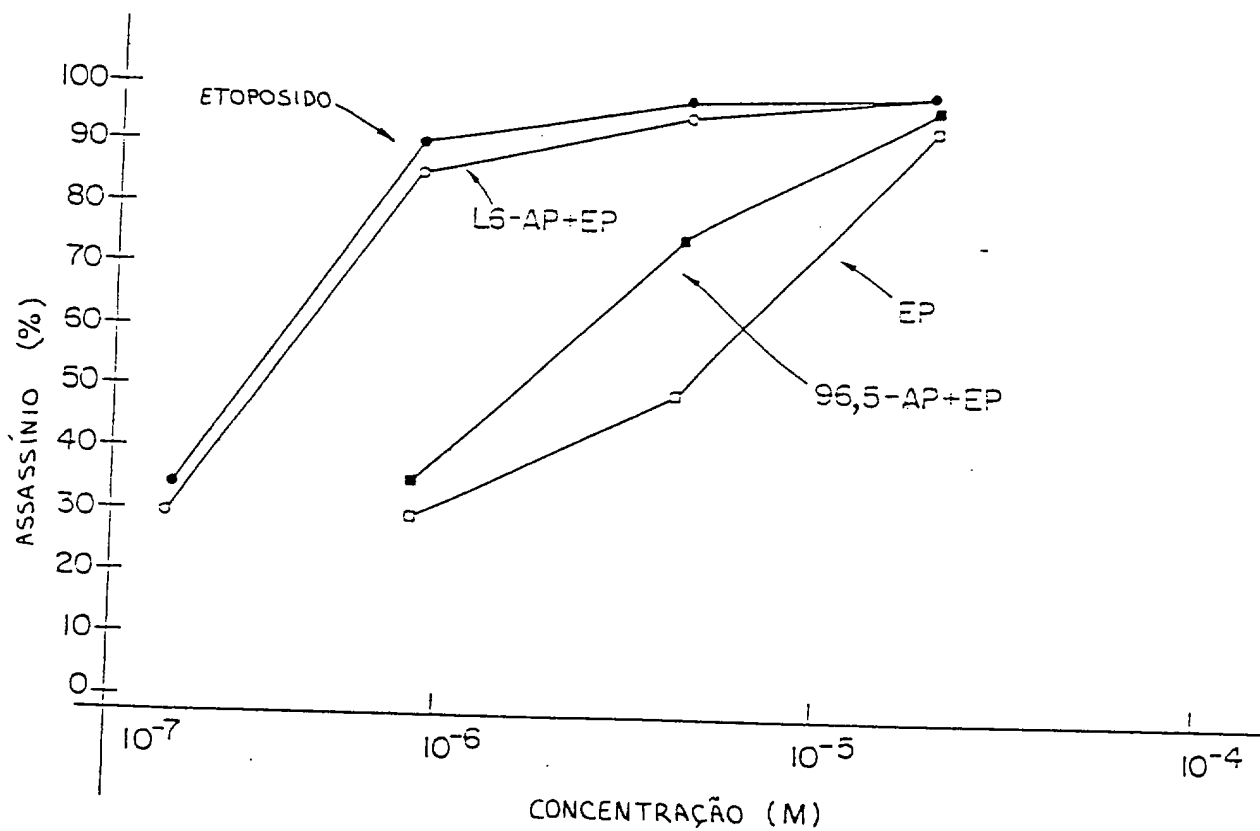


FIG. 9

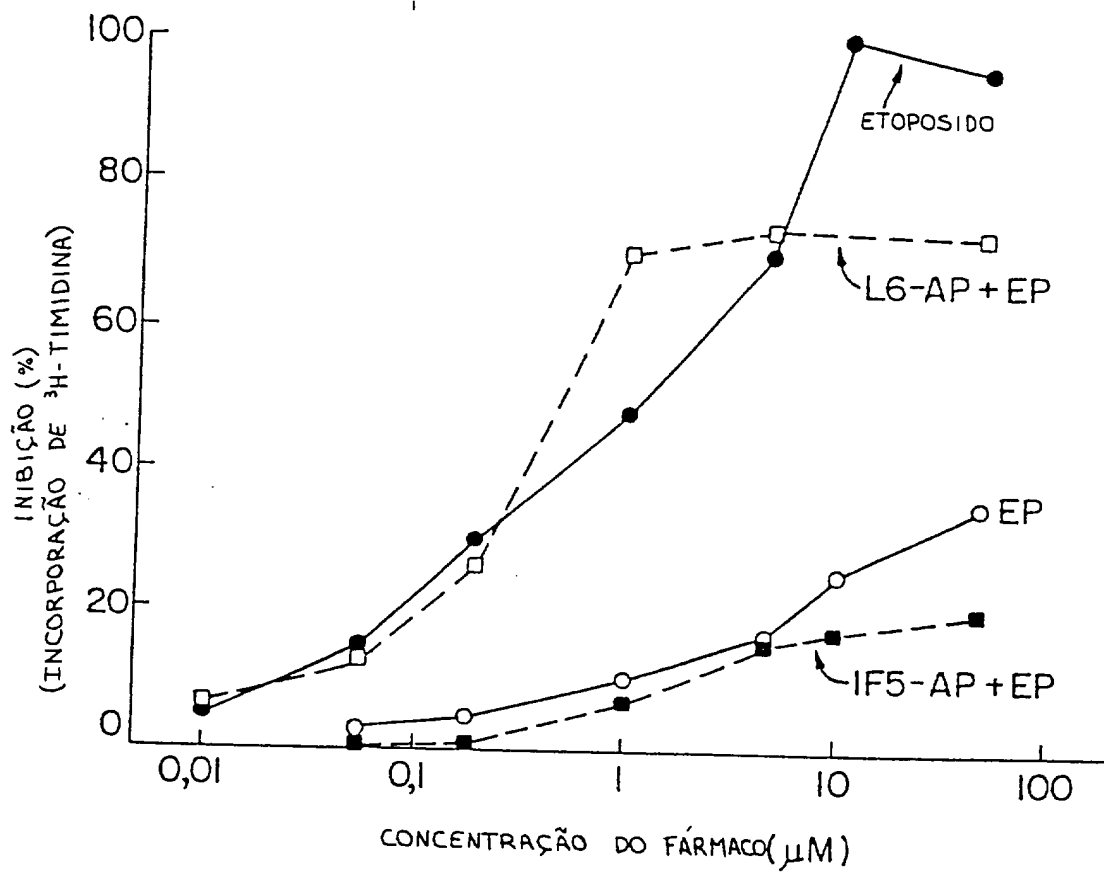
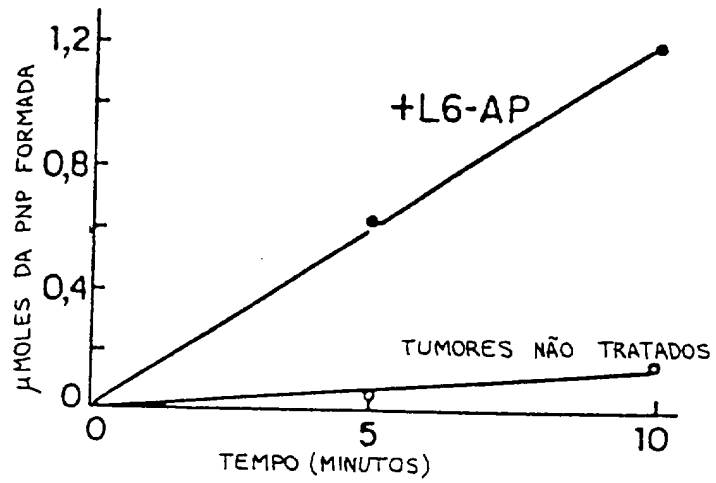


FIG. 10A



H. E. E. ACTIVIDADE DA AP

NÃO TRATADOS



PRÉ-TRATADOS COM
300 µg DE LG-AP



PRÉ-TRATADOS COM
300 µg DE LG-AP



FIG. 10B

FIG.11

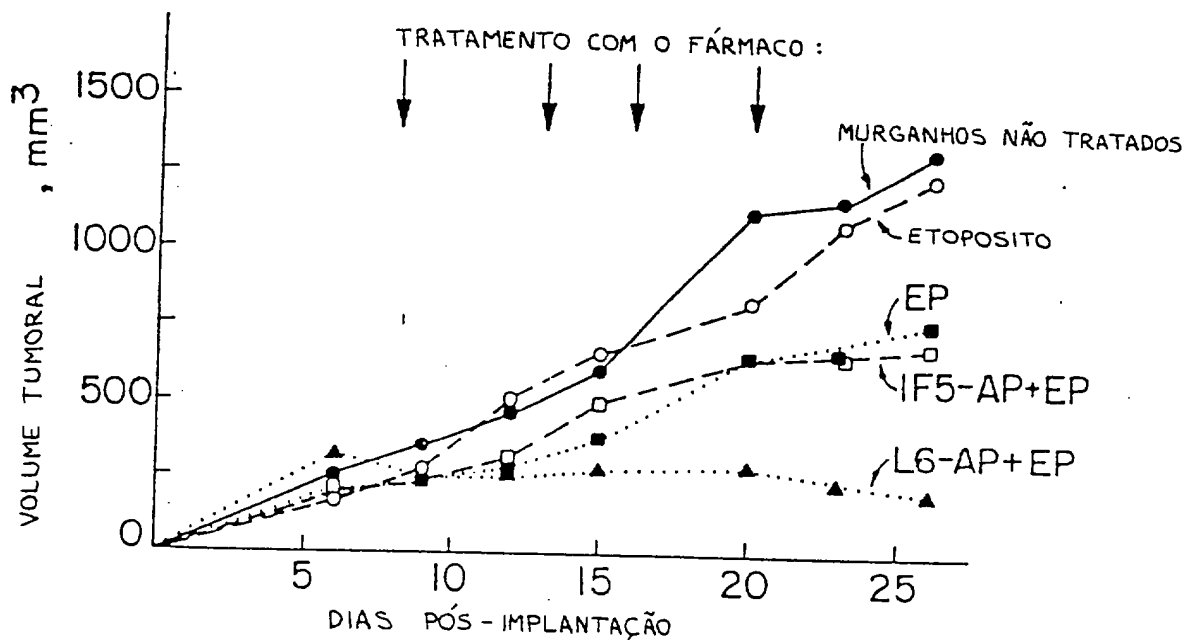
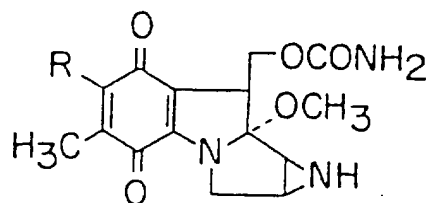


FIG.12



R = NH₂ (MMC)

R = HOCH₂CH₂NH- (MOH)

R = Na₂O₃POCH₂CH₂NH- (MOP)

FIG.13

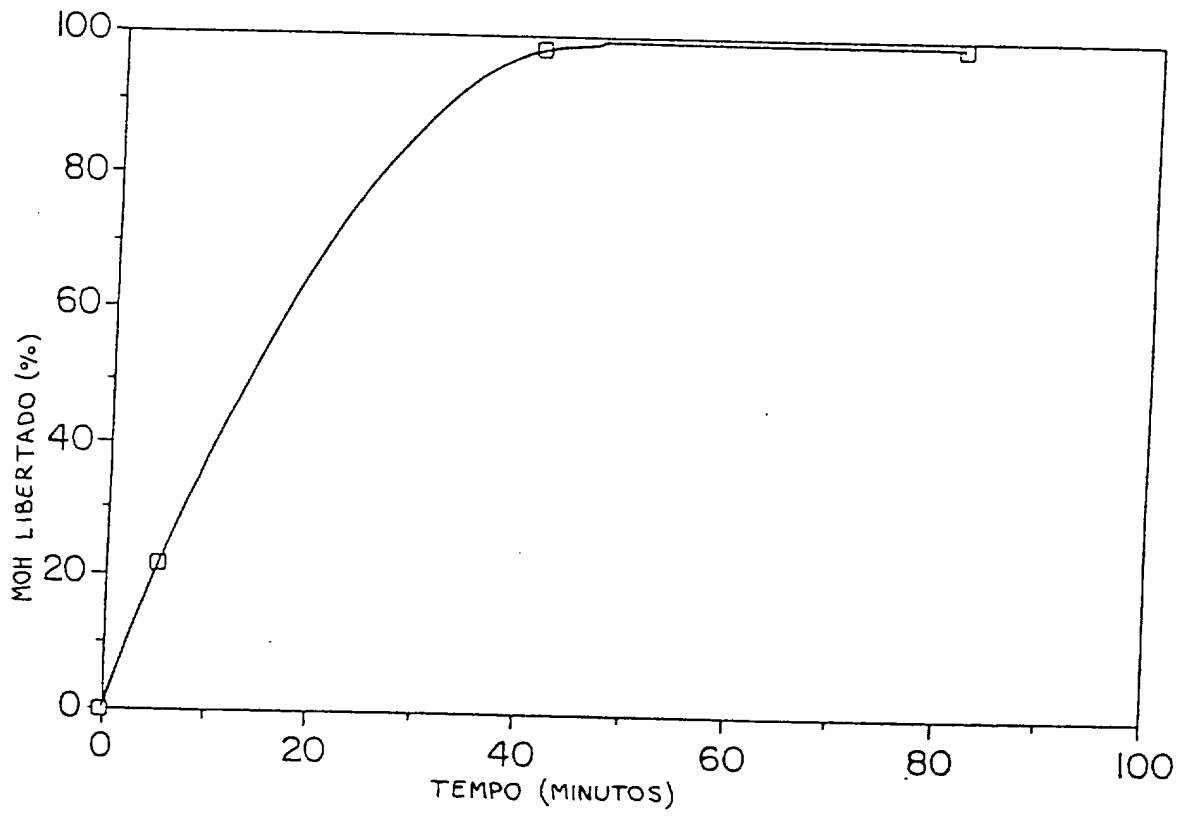


FIG. 14

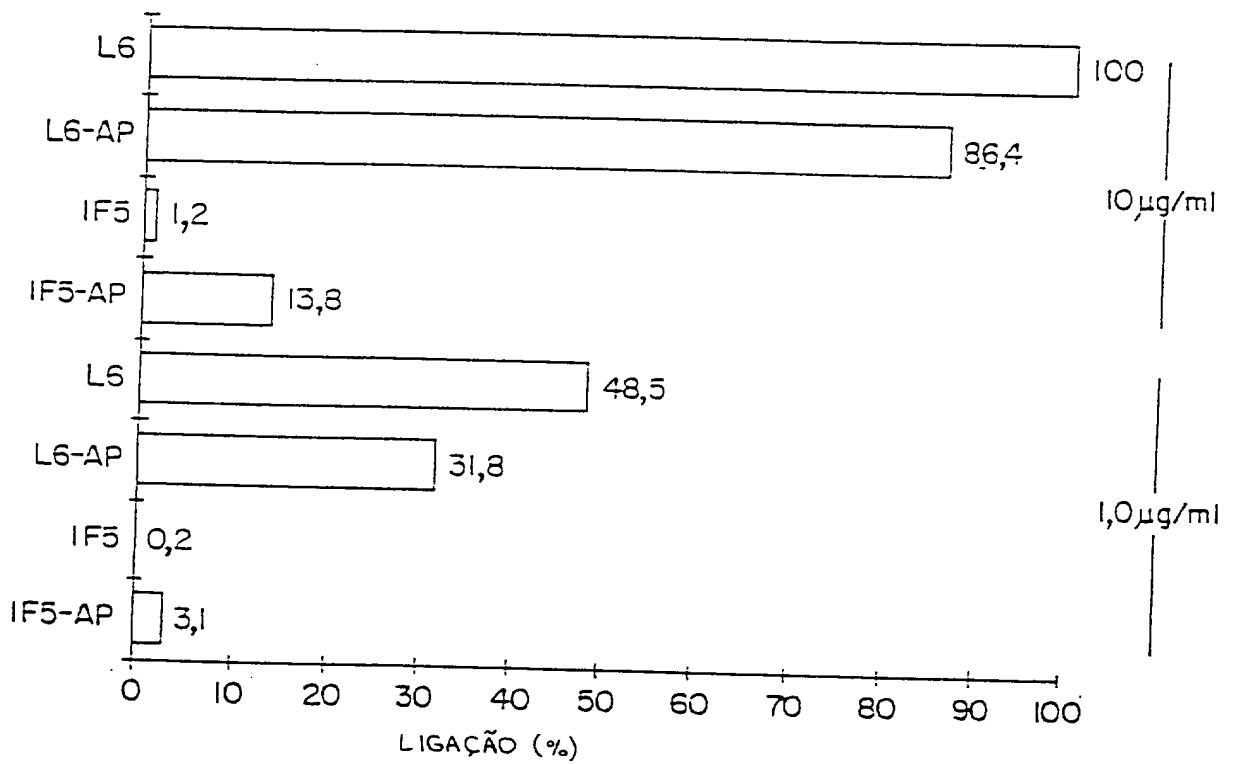


FIG. 15

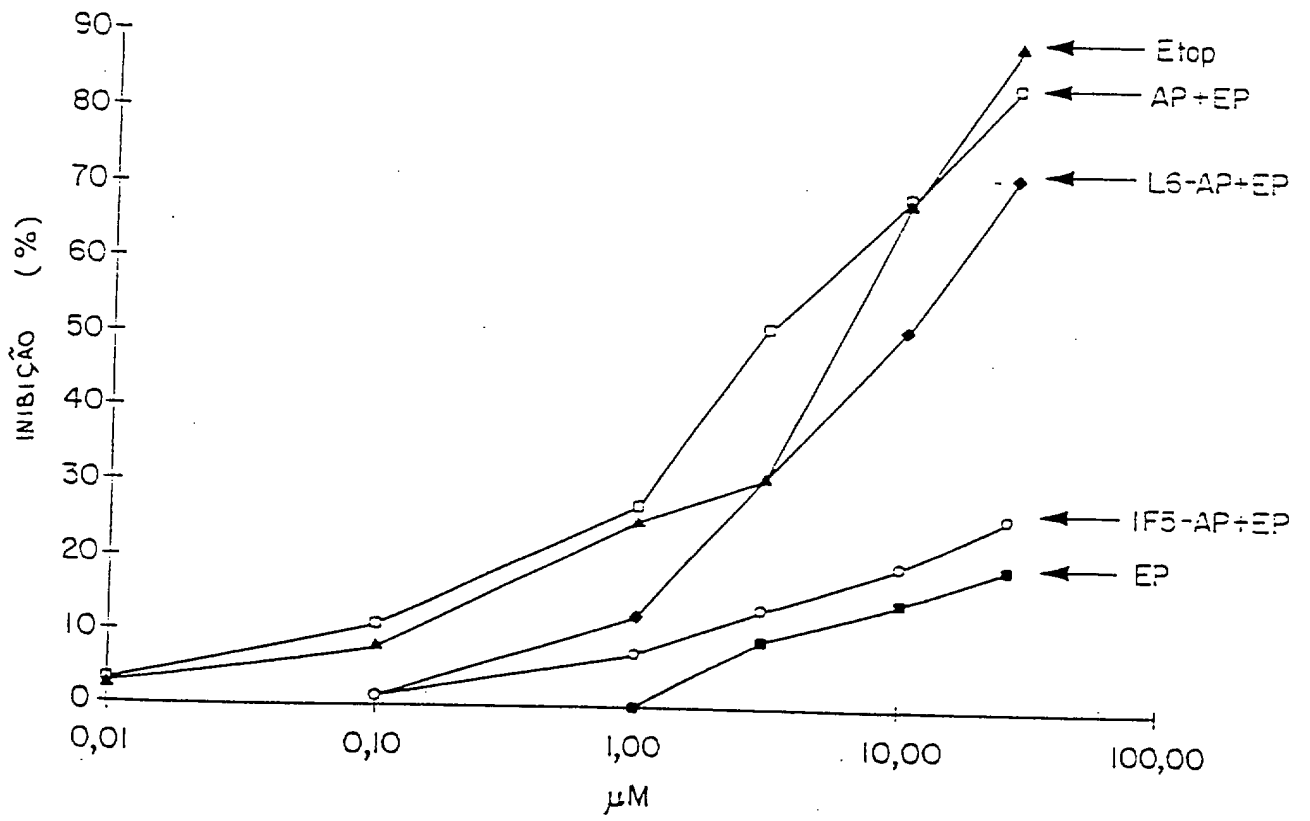


FIG. 16

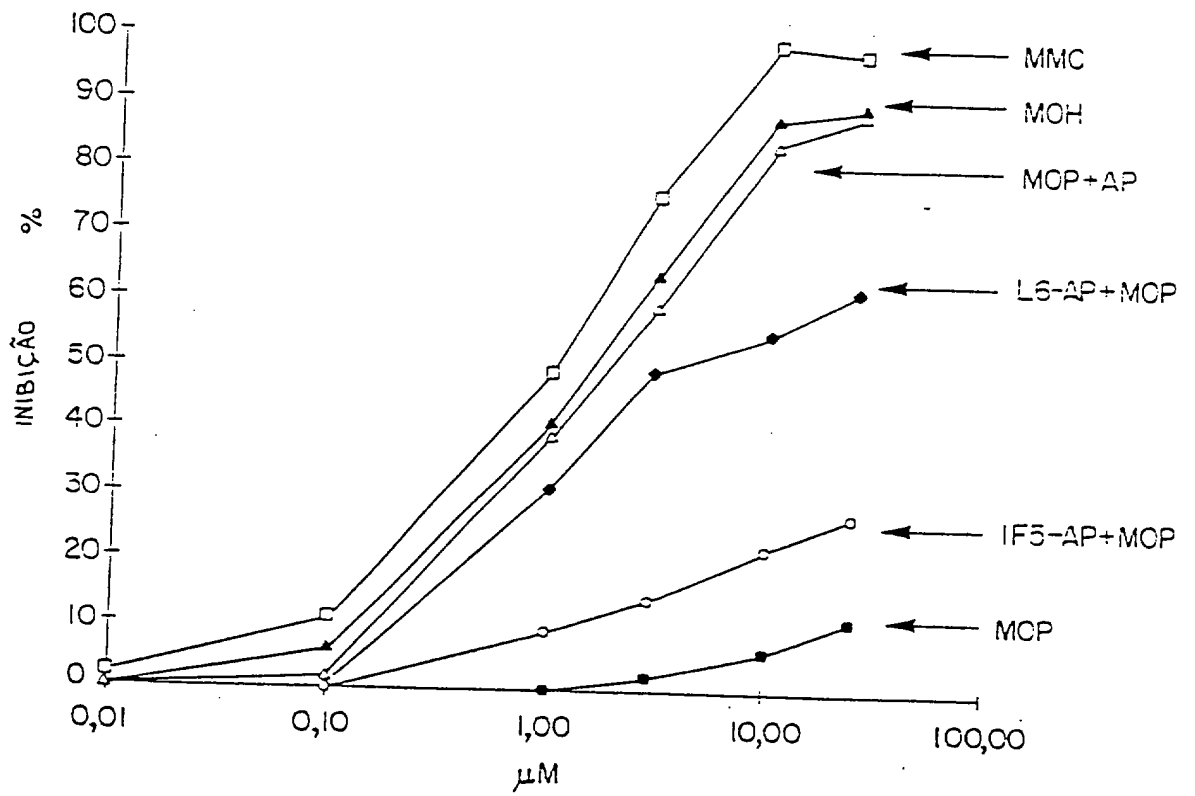


FIG.17

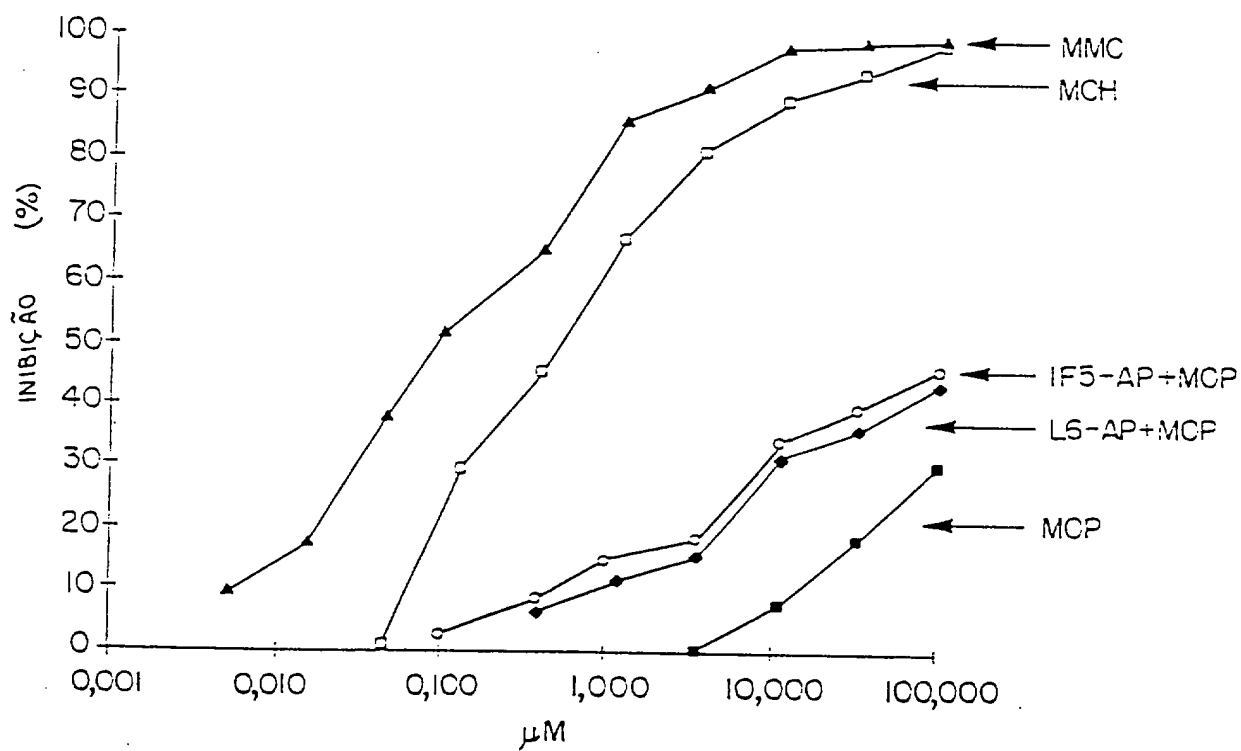


FIG.18

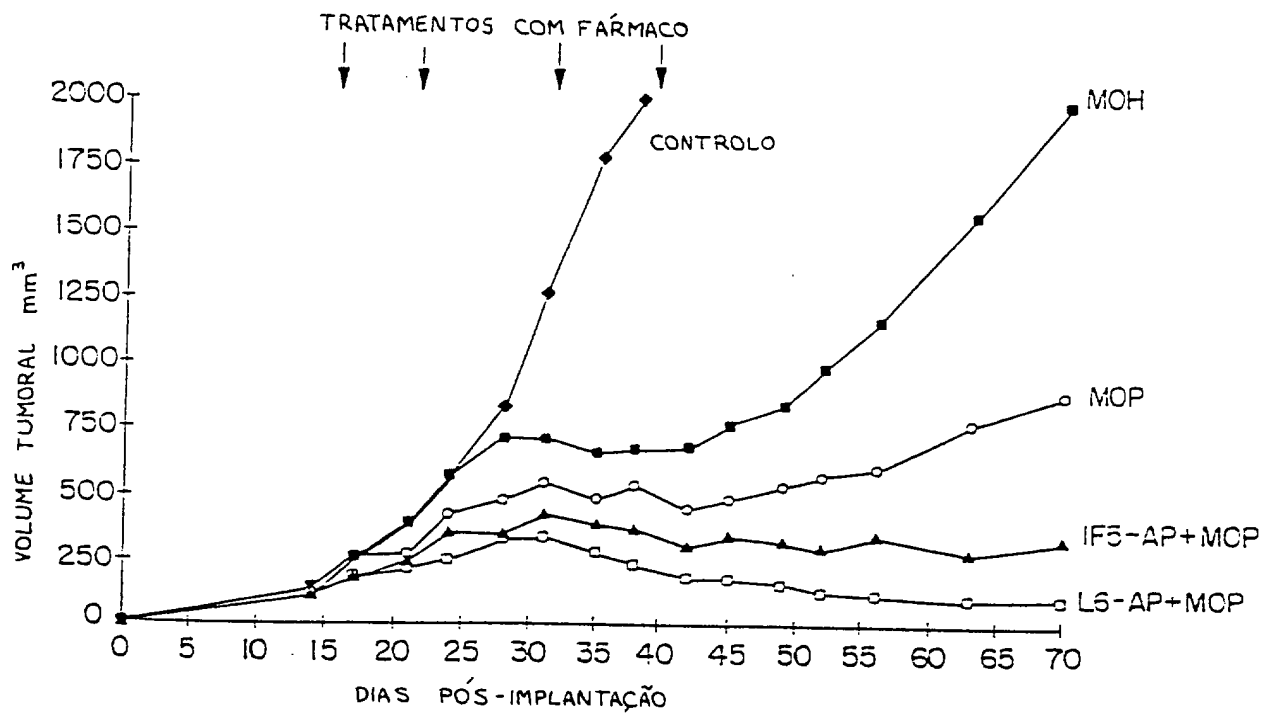


FIG.19

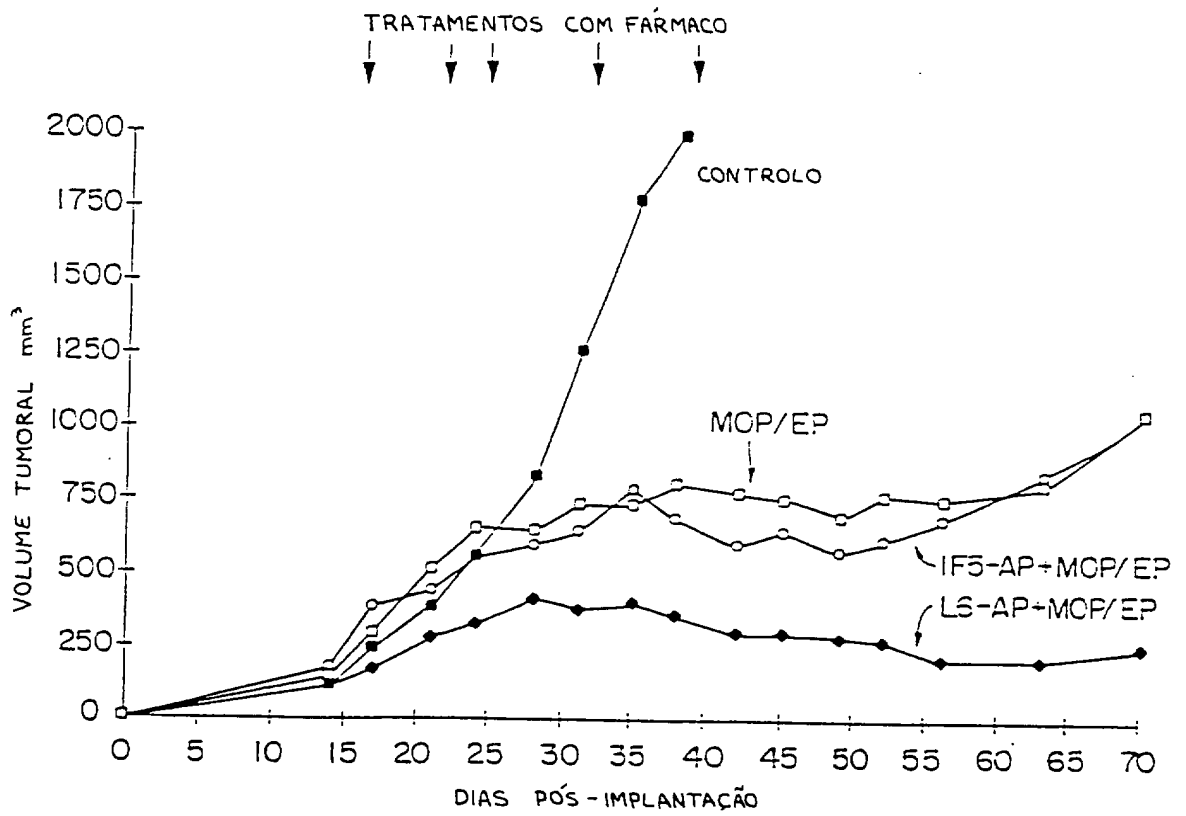


FIG.20

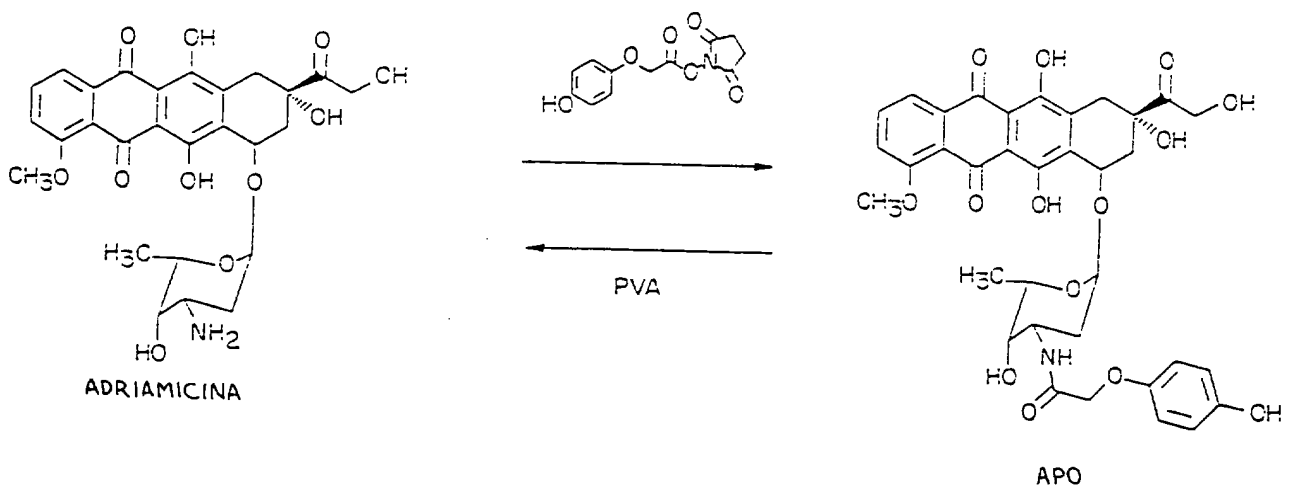


FIG. 21

REACÇÃO METABÓLICA DO APO COM O CONJUGADO L6-PVA
E COM A PVA INDIVIDUALMENTE

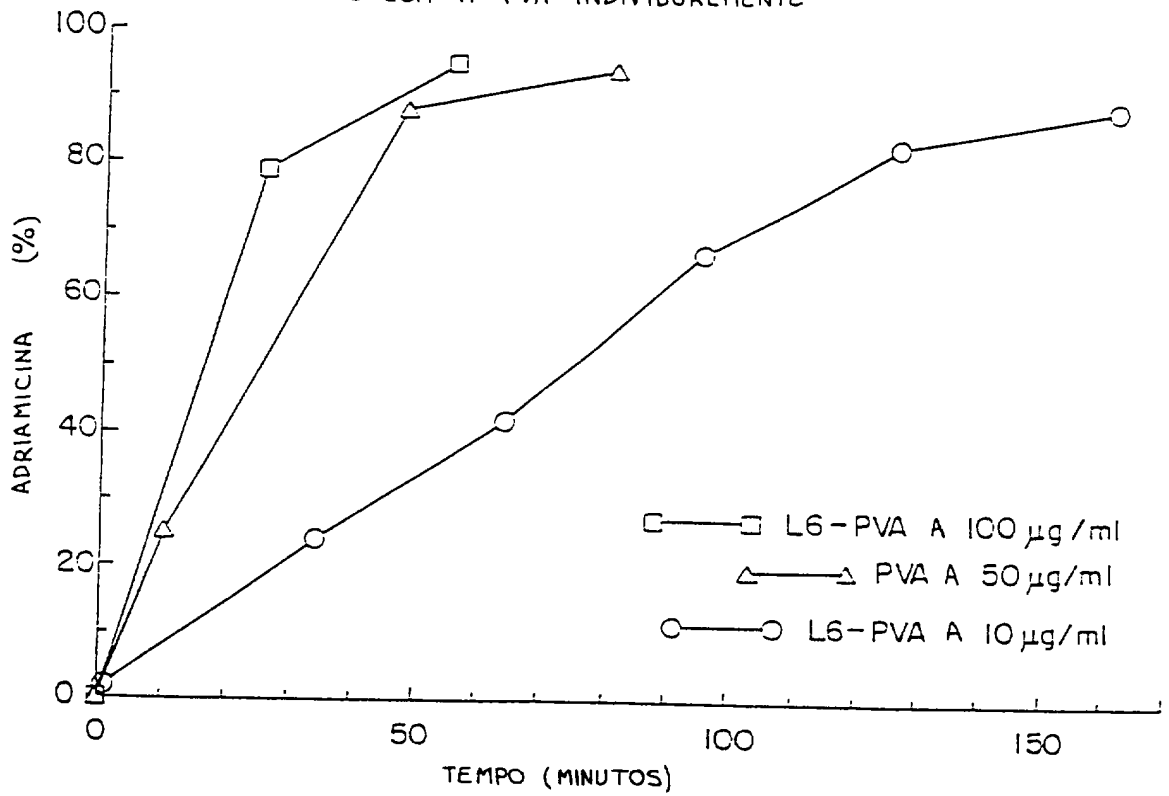


FIG. 22

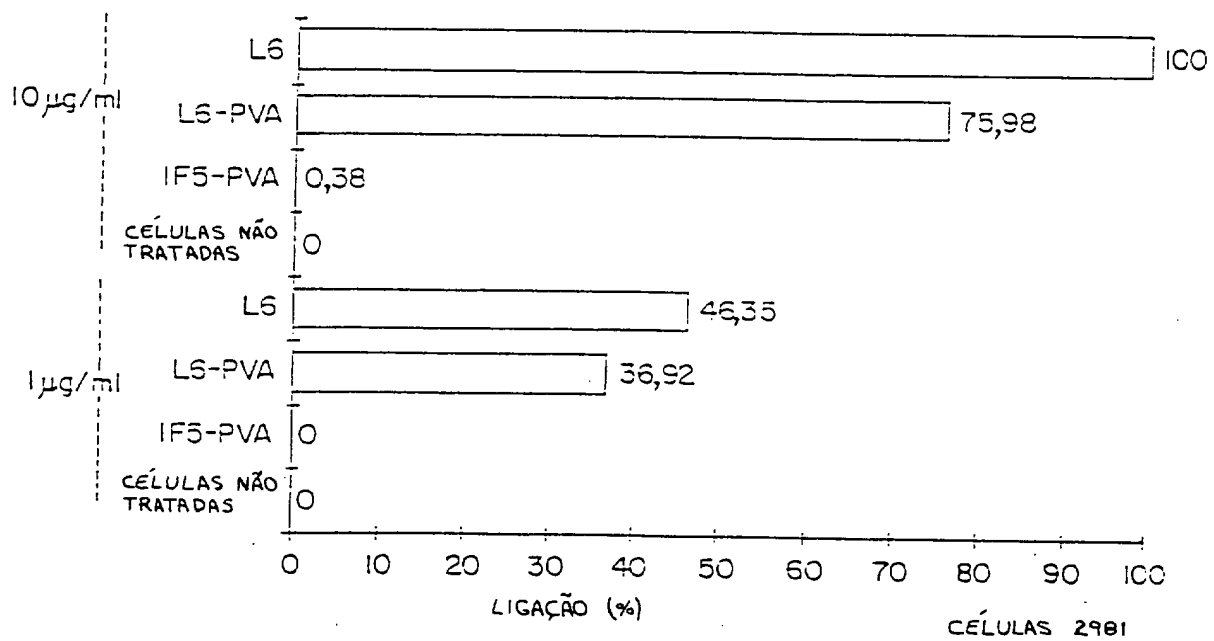


FIG. 23

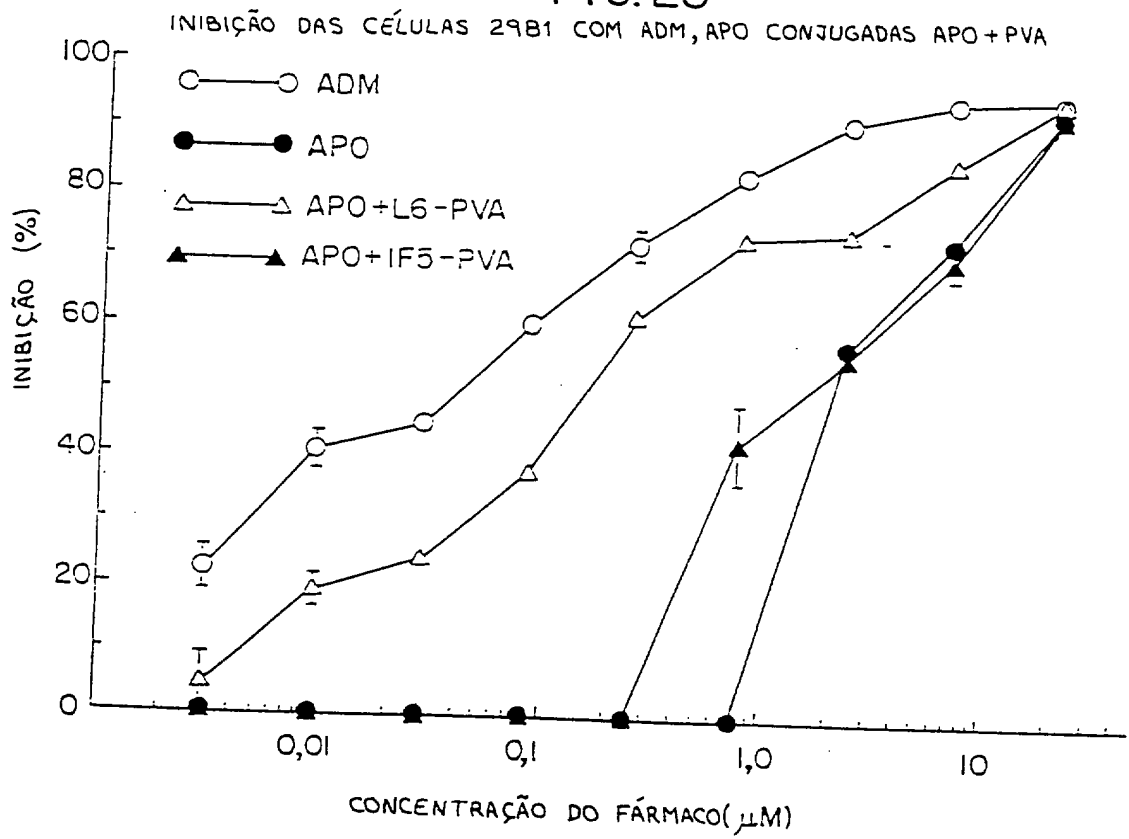


FIG.24

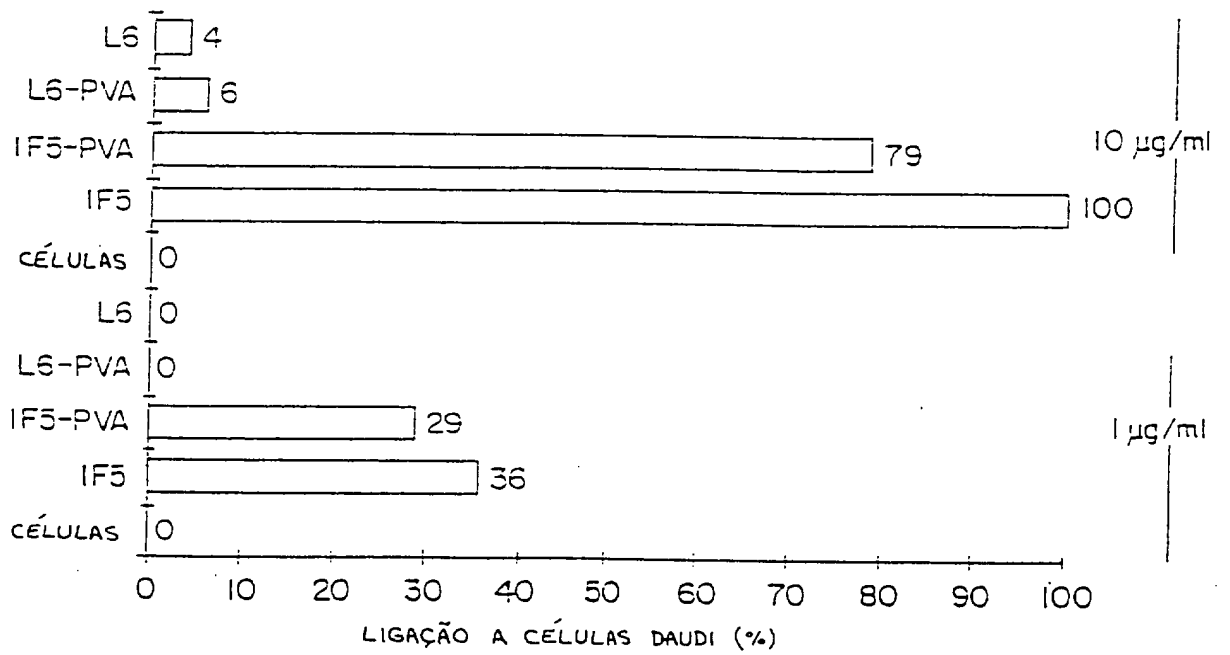


FIG. 25

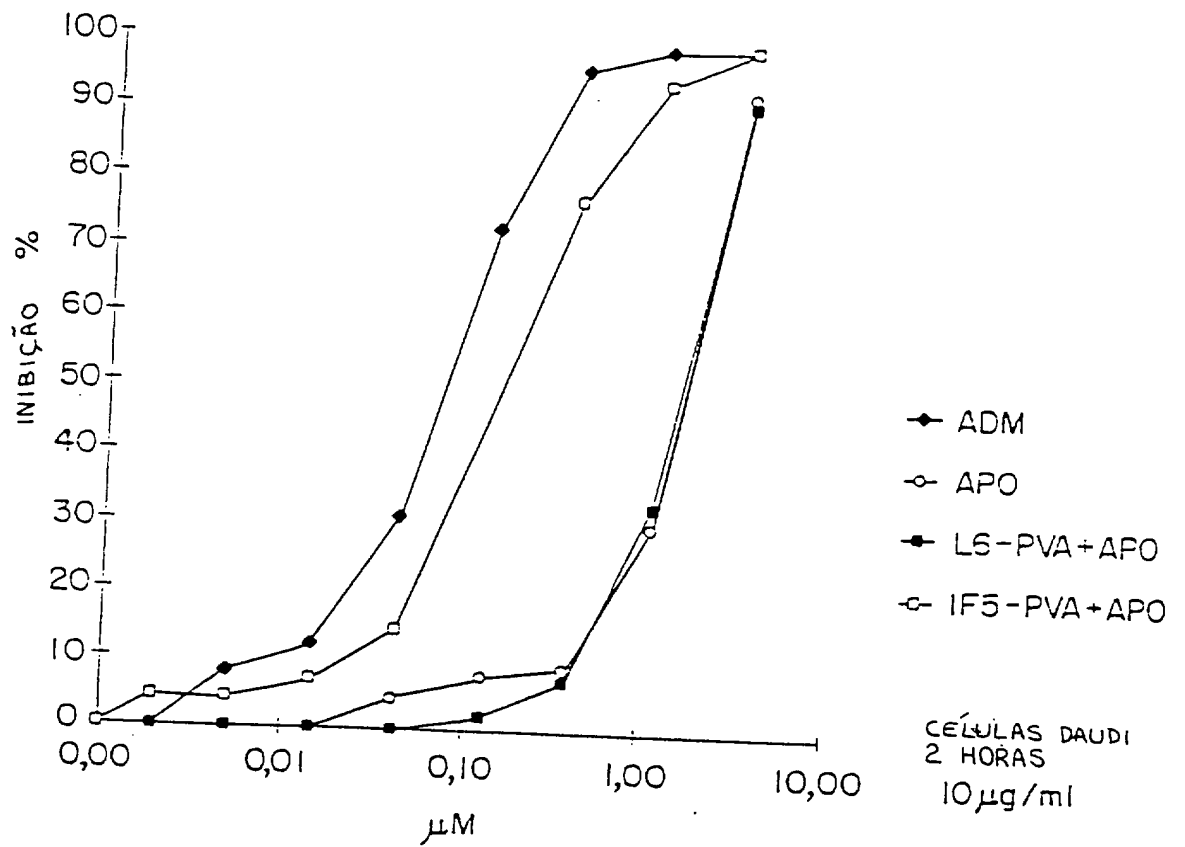


FIG. 26

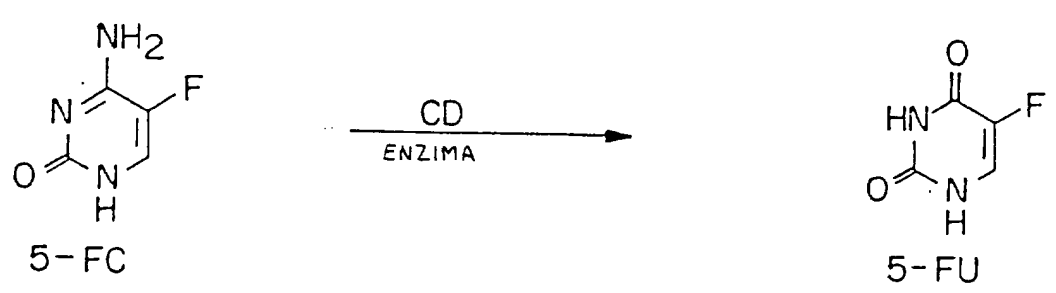


FIG. 27

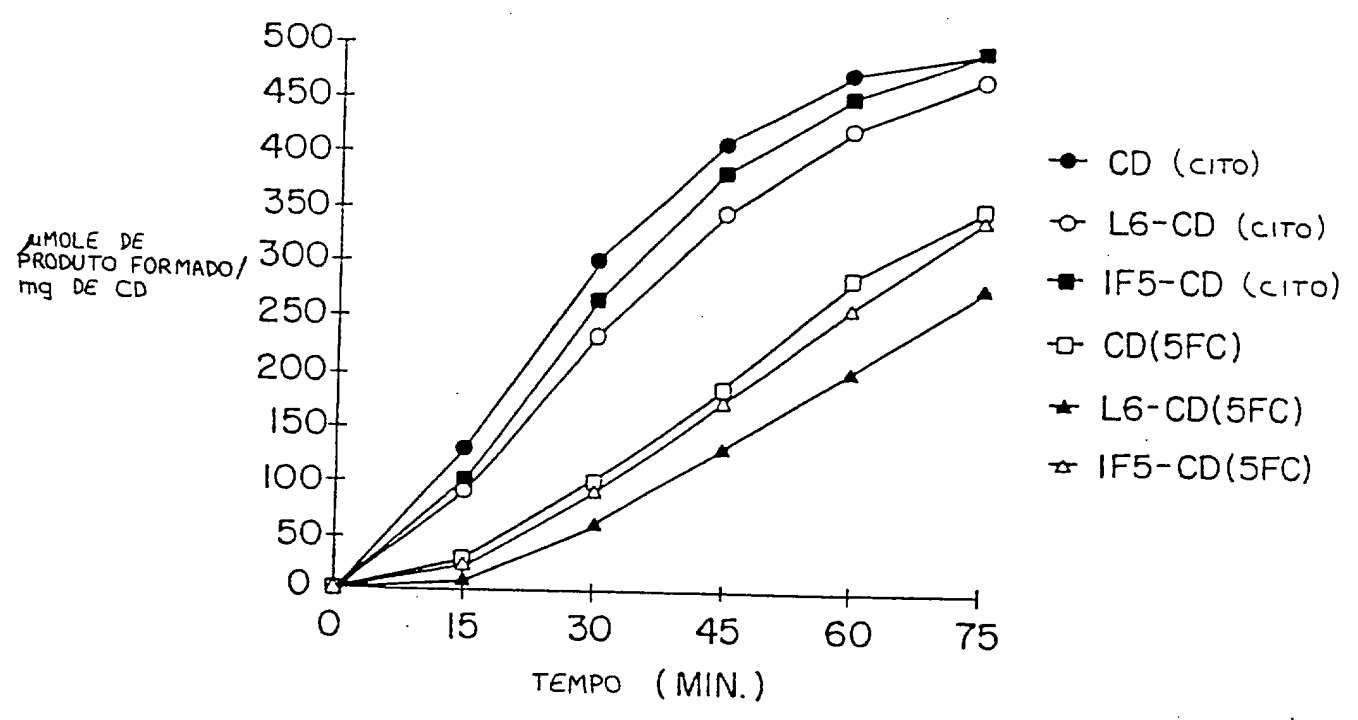


FIG.28

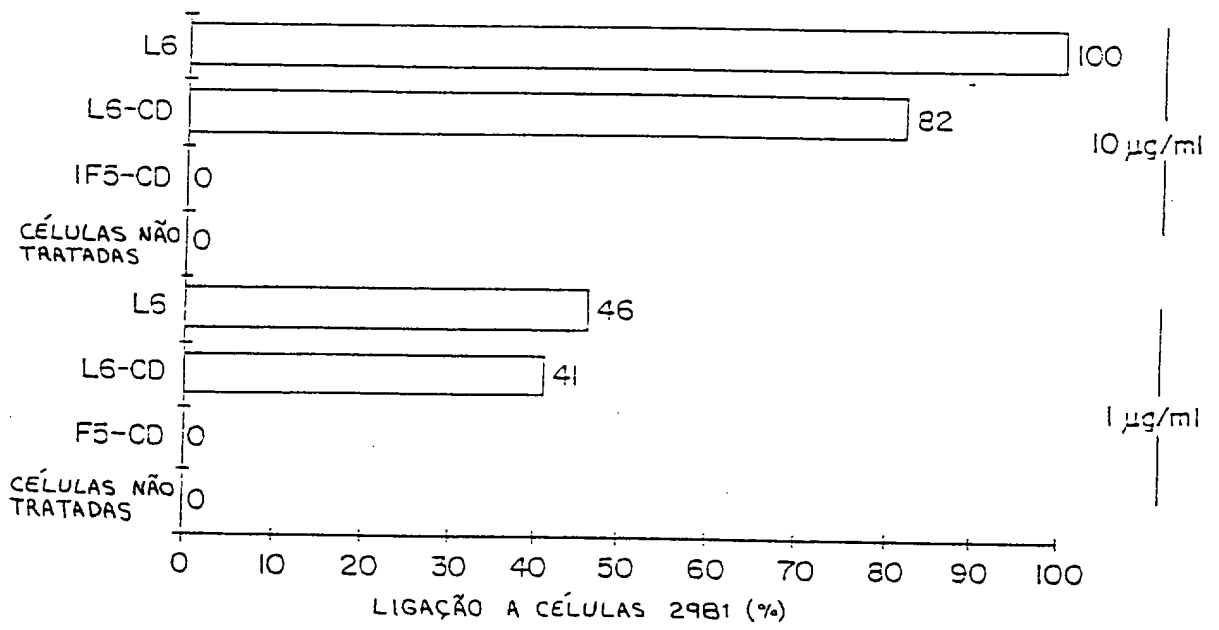
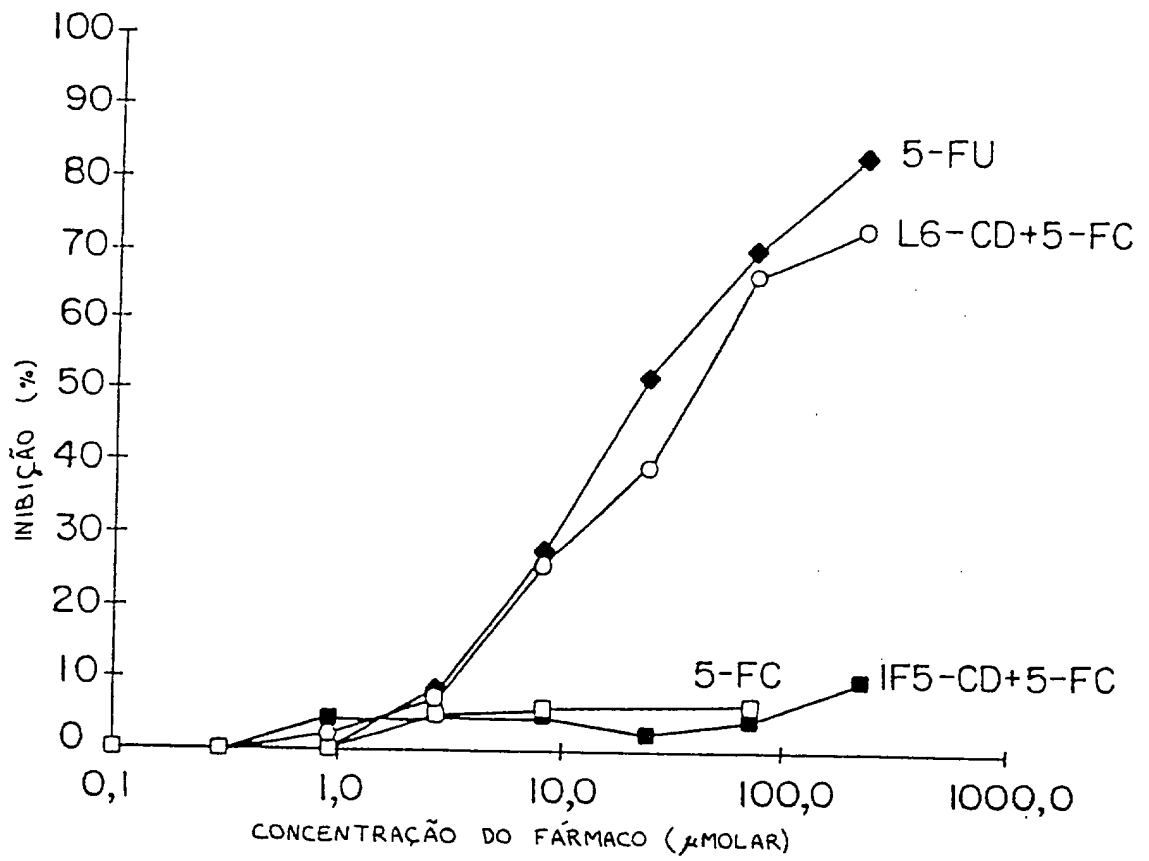


FIG. 29



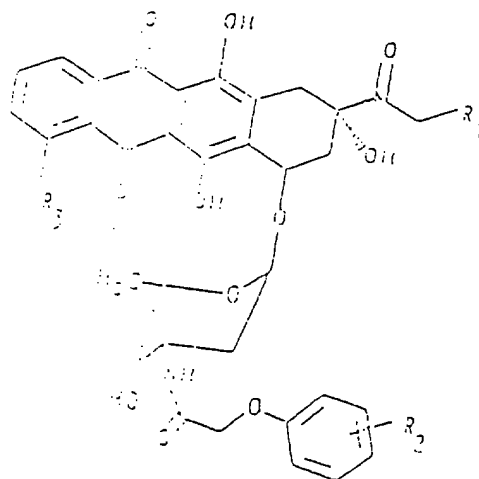
P.I. N° 101702

REF.: ON-0026B

REIVINDICAÇÕES

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PROFÁRMACOS
 ANTRACICLÍNICOS E DE COMPOSIÇÕES E DE
 ASSOCIAÇÕES FARMACÊUTICAS QUE OS CONTÊM
 LIGADOS A CONJUGADOS ANTICORPO-ENZIMA"

1.- Processo para a preparação de compostos de
 fórmulas gerais



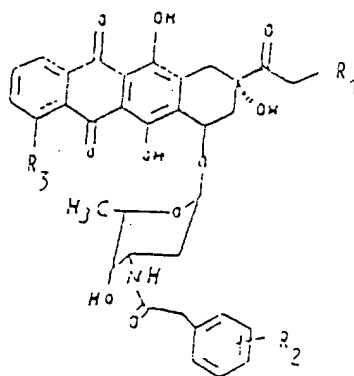
na qual

R₁ representa um átomo de hidrogénio e

R₃ representa um grupo hidroxil ou
 OCH₃; ou

R₁ representa um grupo hidroxil e R₃
 representa um grupo OCH₃; e

R_2 representa um átomo de hidrogénio ou um grupo hidroxi, ou



na qual

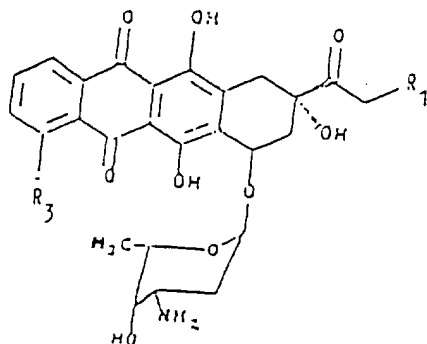
R_1 representa um átomo de hidrogénio e

R_3 representa um grupo hidroxi ou OCH_3 ; ou

R_1 representa um grupo hidroxi e R_3 representa um grupo OCH_3 ; e

R_2 representa um átomo de hidrogénio ou um grupo hidroxi,

caracterizado pelo facto de se fazer reagir um composto de fórmula geral



A/B

na qual

R_1 e R_3 têm os significados definidos antes,

- a) com ácido p-hidroxifenoxiacético ou ácido fenoxiacético, ou derivados activados destes ácidos, de preferência activados com N-hidroxisuccinimida ou di-ciclo-hexil-carbodiimida para se obter um composto de fórmula geral (I); ou
- b) com ácido fenilacético ou ácido hidroxifenilacético ou derivados activados destes ácidos, de preferência activados com N-hidroxi-succinimida ou di-ciclo-hexil-carbodiimida, para se obter um composto de fórmula geral (II).

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação da N-(p-hidroxifenoxiacetil)-adriamicina ou da N-(fenoxiacetil)-adriamicina, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

3.- Processo para a preparação de composições farmacêuticas, apropriadas para o tratamento de tumores escolhidos entre carcinomas, melanomas, linfomas, ósseos e sarcomas de tecidos moles e outros tumores, caracterizado

pelo facto de se associar pelo menos um profármaco preparado pelo processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, que é fracamente citotóxico para as células tumorais em comparação com o fármaco original correspondente, com pelo menos um conjugado anticorpo-enzima constituído por um anticorpo capaz de reagir com um antigénio à superfície de células tumorais e ligado a uma enzima capaz de converter o citado profármaco no fármaco original mais citotóxico.

4.- Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se escolher o anticorpo no grupo constituído por anticorpos policlonais, monoclonais ou quiméricos.

5.- Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se escolher o anticorpo no grupo constituído pelos anticorpos monoclonais L6, 96.5 e 1F5.

6.- Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se escolher a enzima entre penicilina-amidases.

7.- Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se utilizar como enzima a penicilina V-amidase ou a penicilina G-amidase.

8.- Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se escolher o profármaco entre a N-(p-hidroxifenoxiacetil)-adriamicina, a N-(fenoxiacetil)-adriamicina, a N-(p-hidroxifenilacetil)-adriamicina ou a N-(fenilacetil)-adriamicina.

9.- Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se utilizar como conjugado o L6-PVA ou o 1F5-PVA.

10.- Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se utilizar como conjugado anticorpo-enzima o L6-PVA e de se escolher o profármaco entre a N-(p-hidroxifenoxiacetil)-adriamicina e a N-fenoxiacetil)-adriamicina.

11.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 3 a 10, caracterizado pelo facto de se utilizar mais do que um profármaco, cada um dos quais é fracamente citotóxico para as células tumorais em comparação com o fármaco original correspondente.

12.- Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo facto de se escolherem os profármacos

entre derivados N-fenoxiacetil de adriamicina e derivados N-fenilacetil de adriamicina.

13.- Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se utilizar mais do que um conjugado anticorpo-enzima em que o anticorpo de cada um dos conjugados é capaz de reagir com um antigénio igual ou diferente localizado na superfície das células tumorais citadas, e a enzima de cada conjugado é igual ou diferente e é capaz de converter pelo menos um profármaco, que é fracamente citotóxico para as células tumorais em comparação com o fármaco original correspondente, no fármaco original mais citotóxico.

14.- Processo para a preparação de composições farmacêuticas, caracterizado pelo facto de se associarem dois componentes separados úteis no tratamento de tumores um dos quais é pelo menos um profármaco preparado de acordo com a reivindicação 1 ou 2 utilizado em uma quantidade eficaz sob o ponto de vista farmacêutico.

15.- Processo para a preparação de associações constituídas por dois componentes separados, caracterizado pelo facto de se associar um componente constituído por pelo menos um conjugado anticorpo-enzima com um outro

componente constituído por pelo menos um profármaco que é fracamente citotóxico para células tumorais em comparação com o fármaco original correspondente, tal como definido em uma qualquer das reivindicações 1 a 13.

16.- Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo facto de se utilizar como conjugado anticorpo-enzima o L6-ER.

17.- Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo facto de se escolher o profármaco no grupo constituído por derivados N-fenoxiacéticos de adriamicina e derivados N-fenilacéticos de adriamicina.

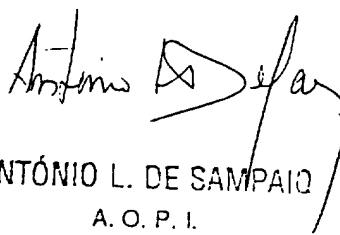
18.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo facto de se utilizar como conjugado anticorpo-enzima uma proteína de fusão comportando pelo menos a região de ligação ao antigénio de um anticorpo capaz de reagir com um antigénio associado ao tumor e ligado a pelo menos uma porção activa sob o ponto de vista funcional de uma enzima capaz de converter pelo menos um profármaco fracamente citotóxico no fármaco original mais citotóxico.

19.- Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo facto de se utilizar pelo menos um profármaco preparado pelo processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2 em uma forma de dosagem apropriada.

Lisboa, 11 de Maio de 1995

fs.

O Agente Oficial da Propriedade Industrial



ANTÓNIO L. DE SAMPAIO

A. O. P. I.

Rua de Miguel Lupi, 16, 1.ºc

1200 LISBOA

PATENTE DE INVENÇÃO

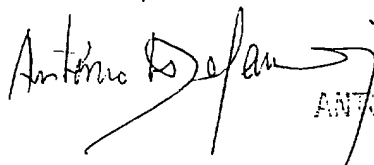
Nº

Pedido de patente divisionária do pedido da patente de invenção Nº 88.187, para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PROFÁRMACOS ANTRACICLÍNICOS E DE COMPOSIÇÕES E DE ASSOCIAÇÕES FARMACÊUTICAS QUE OS CONTÊM LIGADOS A CONJUGADOS ANTICORPO-ENZIMA", nos termos do Art. G 2) da Convenção da União de Paris de 1883, salvaguardando o benefício da prioridade.

Lisboa, 11 de Maio de 1995

fs.

O Agente Oficial da Propriedade Industrial



ANTÓNIO L. DE SAMPAIO
A. O. P. I.

Rua de Miguel Lupi, 16, nº
1200 LISBOA