# DESCRIÇÃO

# DA

# PATENTE DE INVENÇÃO

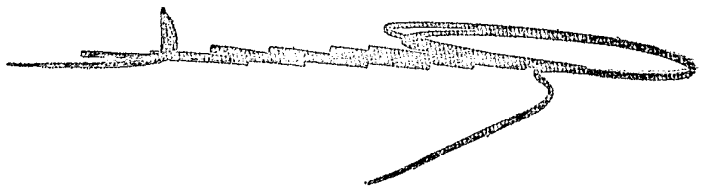
**N.º** 96 623

REQUERENTE: BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, com sede em D-3550 Marburg, República Federal Alemã.

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PRECURSORES DE FÁRMACOS DE ANTRACICLINA-GLICOSILO"

INVENTORES: Manfred Gerken, Manfred Krause, Jörg Czech, Klaus Bosslet, Gerhard Seemann, Dieter Hoffmann e Hans-Harald Sedlacek

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.
República Federal Alemã, apresentado em 1 de Fevereiro de 1990, sob o Nº. P 40 02 888.7.

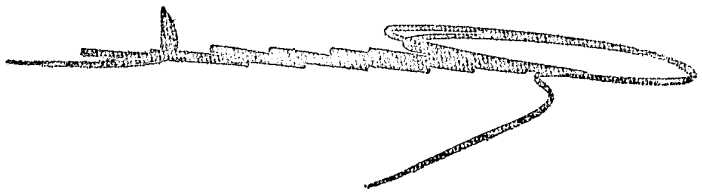


Descrição referente à patente de invenção de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-3550 Marburg, República Federal Alemã, (inventores: Manfred Gerken, Manfred Krause, Jörg Czech, Klaus Bosslet, Gerhard Seemann, Dieter Hoffmann e Hans-Harald Sedlacek, residentes na República Federal Alemã), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PRECURSORES DE FÁRMACOS DE ANTRACICLINA-GLICOSILO".

## DESCRIÇÃO

A presente invenção refere-se a precursores de fármacos de antraciclina-glicosilo, ao processo para a sua preparação e à sua utilização, em combinação com conjugados enzimáticos funcionalisados específicos de tumores, para o tratamento de doenças do foro cancerígeno; neste caso referem-se especialmente as 14-0-glicosil-antraciclinas como precursores de fármacos que, por acção de conjugados enzimáticos específicos de tumores, podem ser desdobrados em substâncias activas citotóxicas, sendo a substância activa libertada, devido à sua eficácia citotóxica, apropriada para o tratamento de doenças cancerígenas.

Um modelo no qual podem ser ensaiados como agentes terapeuticos combinações de precursores de fármacos e conjugados anticorpo-enzima específicos de tumores, está



descrito na literatura da especialidade. No presente caso injectaram-se anticorpos dirigidos contra determinados tecidos, aos quais estava ligado por covalência um enzima que dissocia o precursor do fármaco, a um animal no qual estavam transplantados estes tecidos. Depois da localização do conjugado MAK-enzima no tecido visado, administra-se um composto precursor activável pelo enzima. Sob a acção do conjugado anticorpo-enzima fixado ao tecido o precursor é transformado num veneno celular que desenvolve uma acção citotóxica contra o tecido transplantado.

Na especificação WO 88/07378 descreve-se um sistema terapêutico contendo 2 componentes, constituído por um componente anticorpo-enzima e um componente de precursor activável pelo enzima. Para a preparação do conjugado anticorpo-enzima utilisam-se neste caso enzimas não provenientes de mamíferos e exclui-se a utilização de enzimas endógenos, devido à possível libertação de substância activa não específica. Como os enzimas exógenos são reconhecidos pelo organismo como antigenes estranhos, a sua utilização está associada ao inconveniente de uma resposta imune relativamente a estas substâncias que não são próprias do corpo, devido à qual o enzima imobilizado no anticorpo é desactivado e eventualmente é eliminado todo o conjugado. Além disso utilizam-se no presente caso o ácido p-bis-N--(2-cloroetil)-aminobenzil-glutâmico e os seus derivados como precursores, cuja semi-vida química é relativamente curta e se situa preferivelmente no intervalo compreendido entre 5,0 e 17,0 horas. A instabilidade química de um precursor é desvantajosa devido às acções secundárias esperadas.

Na especificação EP A 0 302 473 A2 é descrito igualmente um sistema terapêutico de 2 componentes no qual o conjugado anticorpo-enzima, localizado no tecido do tumor, dissocia um composto precursor a uma substância activa citotóxica.

A utilização combinada, aqui descrita entre outras, de um derivado de N-fenoxiacetilo da adriamicina como precursor e de L6-penicilina V-amidase imobilizada no anticorpo para libertação da adriamicina, apresenta inconvenientes devido à imunogenidade do enzima bacteriano. Um outro inconveniente deste precursor é a alta lipofilia do precursor derivada

da acilação do grupo amino da adriamicina, diminuindo a solubilidade no plasma e podendo ter lugar a adsorção não específica do precursor nas membranas celulares.

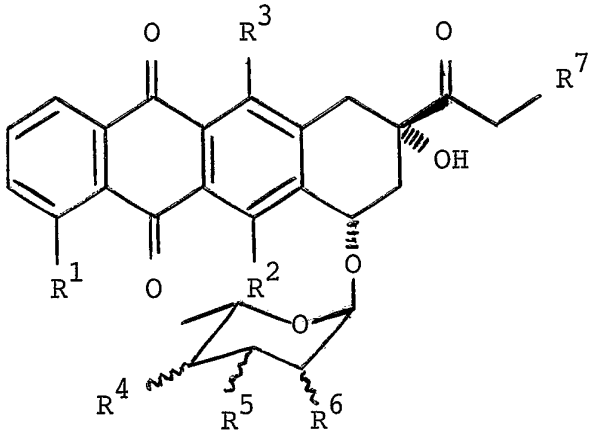
A síntese das 14-O-glicosil-antraciclinas é descrita há muito tempo apenas como uma reacção secundária indesejável da glicosidação de adriamicinona com 2-desoxi--L-fucose (Horton et al, Carbohydrate Research 94, 11-25, 1981).

Surpreendentemente, prova-se que é possível realizar uma glicosidação de antraciclinas na posição 14, tendo em consideração determinados padrões de grupos de bloqueio na antraciclina, como também nos dadores de glicosilo.

Partindo-se deste conhecimento, bem como tendo em consideração os inconvenientes anteriormente descritos das combinações conhecidas até ao presente de precursores e conjugados anticorpo-enzima, punha-se à presente invenção o problema de se prepararem 14-O-glicosil-antraciclinas sintéticas, dissociáveis enzimaticamente, assim como enzimas funcionalizados específicos de tumores, isto é, enzimas que estão modificados de modo que se liguem a células de tumores, que sejam apropriados para a terapia de doenças cancerígenas.

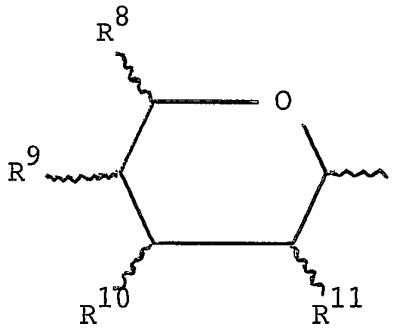
Este problema foi solucionado através da preparação dos compostos de fórmula I, assim como de enzimas funcionalisados específicos de tumores, que na sua utilização combinada se mostram activos no ensaio da actividade citoestática.

O objecto da invenção são pois 14-O-glicosil-antraciclinas de fórmula I, assim como dos seus sais com ácidos orgânicos ou inorgânicos.




I

na qual
$R^1$, $R^2$ e $R^3$, independentemente uns dos outros, representam hidrogénio, hidroxi, metoxi,
$R^4$, $R^5$ e $R^6$, independentemente uns dos outros, representam hidrogénio, hidroxi, halogéneo, aciloxi alifático com 1 a 8 átomos de carbono, benzoiloxi ou benzoiloxi substituído como por exemplo para-nitrobenzoiloxi, alquiloxi com 1 a 8 átomos de carbono, aliloxi, benziloxi ou benziloxi substituído, tetrahidropiraniloxi, amino, NH-acilo com 1 a 8 átomos de carbono, NH-(9-fluorenilmetoxicarbonilo), morfolino ou morfolino substituído, de preferência 3-0-metil-morfolino ou 2-ciano-morfolino,
$R^7$ representa um hidrato de carbono de fórmula II



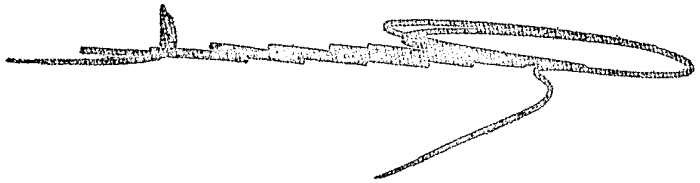
II

na qual
$R^8$ representa metilo, hidroximetilo, aciloximetilo com 1 a 8 átomos de carbono na parte acilo, alquiloximetilo com 1 a 8 átomos de carbono na parte alquilo, benziloximetilo, aliloximetilo, carboxi, carboximetilo ou carboxialilo,
$R^9$, $R^{10}$ e $R^{11}$, independentemente uns dos outros, representam hidrogénio, hidroxi, aciloxi com 1 a 8 átomos de carbono, benzoiloxi ou benzoiloxi substituído, tal como para-nitrobenzoiloxi, alquiloxi com 1 a 8 átomos de carbono, aliloxi, benziloxi ou benziloxi substituído, amino, NH-acilo com 1 a 8 átomos de carbono ou NH-(9-fluorenilmetoxicarbonilo).

Exceptuam-se os compostos nos quais $R^4=R^5=R^9=R^{11}$=0-acetilo e $R^6=R^{11}$=hidrogénio, na conformação ∝-L--desoxifucose.

Por grupo acilo entende-se também um grupo mono, di ou trihalogenoacetilo, tendo como átomos de halogéneo de preferência fluor ou cloro.

Preferivelmente entende-se por benzilo-



xi substituído um grupo benziloxi substituído por um ou dois grupos metoxi.

Por um enzima específico de tumor funcionalizado entende-se, no âmbito da invenção, um enzima de fórmula III

A - Sp - E III

na qual

A representa um anticorpo ou um seu fragmento que apresentam especificidade a um antigene associado a tumor, ou uma biomolécula que se acumula num tumor, como por exemplo EGF (Epidermal Growth Factor), TGF-$\alpha$ (Transforming Growth Factor $\alpha$), PDGF (Platelet derived Growth Factor), IGF I+II (Insulin-like Growth Factor I+II) ou a+b FGF (acidic + basic Fibroblast Growth Factor)

E representa uma glicosidase não imunogénea ou pouco imunogénea, de preferência uma glicosidase de mamífero, tal como $\alpha$ ou $\beta$-glucosidase, $\alpha$-galactosidase, $\alpha$ ou $\beta$-manosidase, $\alpha$-fucosidase, N-acetil-$\alpha$-galactosaminidase, N-acetil-$\beta$-/N-acetil-$\alpha$-glucosaminidase ou $\beta$-glucuronidase, e

Sp (Spacer) representa um grupo contendo sulfureto ou dissulfureto bifuncional, de fórmula IV

$$X(S)_nY \quad IV \quad \text{ou} \quad (S)_n$$

na qual

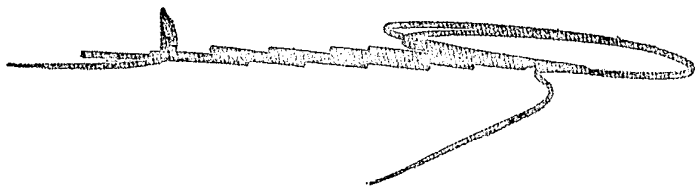
X ou Y representam -CO-$R^{12}$-(N-succinimido)- ou -C(=$R^{13}$)-$CH_2$--$CH_2$- em que $R^{12}$ representa -$CH_2$-$CH_2$-, 1,4-ciclohexilideno, 1,3- ou 1,4-fenileno ou metoxicarbonil- ou clorofeno-1,4--ileno e $R^{13}$ representa O ou NH,

Y representa -C(=$R^{13}$)-$CH_2$-$CH_2$-, em que $R^{13}$ tem o significado indicado, e

n tem os valores 1 ou 2,

ou um "spacer" polipeptídico.

Como exemplo, um enzima funcionalizado específico de tumor que representa um gene de fusão de VH, CH1, Hinge e gene enzimático, pode ser clonado num plasmídeo de expressão que é apropriado para a expressão em células eucariônticas e que transporta um marcador de selecção. O plasmídeo de expressão com o gene de fusão é transfectado em células de expres



são eucariônticas, conjuntamente com um plasmídeo de expressão que contém o gene de cadeia leve pertencente ao anticorpo. Depois da selecção com um antibiótico apropriado, são identificados os clones do transfectoma que contêm o plasmídeo de expressão.

Por meio de métodos de comprovação apropriados (BioDot, ELISA) são identificados os clones do transfectoma que decompõem a proteína de fusão de fórmula III constituída por anticorpo e enzima.

São preferidos no âmbito da invenção os compostos de fórmula I na qual os radicais

$R^1$ representa hidroxi ou metoxi,

$R^2$ e $R^3$ representam hidroxi,

$R^4$ representa hidrogénio, hidroxi, tetrahidropiraniloxi, amino ou aciloxi possuindo 1 a 8 átomos de carbono,

$R^5$ representa hidroxi, aciloxi possuindo 1 a 8 átomos de carbono amino, NH-acilo com 1 a 8 átomos de carbono ou NH-(9--fluorenilmetoxicarbonilo)

$R^6$ representa hidrogénio, hidroxi, halogéneo ou aciloxi,

$R^7$ representa um hidrato de carbono de fórmula II em que

$R^8$ representa metilo, hidroximetilo, aciloximetilo com 1 a 8 átomos de carbono na parte acilo, alquiloximetilo, carboxi, carboximetilo, carboxibenzilo ou carboxialilo, e

$R^9$, $R^{10}$, $R^{11}$, independentemente uns dos outros, representam hidrogénio, hidroxi, aciloxi com 1 a 8 átomos de carbono ou alquiloxi,

excluindo-se os compostos nos quais $R^4=R^5=R^9=R^{10}$=0-acetilo e $R^6=R^{11}$=hidrogénio estão na configuração $\alpha$-L-desoxifucose.

É ainda preferido um enzima específico de tumor funcionalizado de fórmula III, na qual

A representa um anticorpo ou um seu fragmento que possuem especificidade relativamente a um antigene associado a um tumor, ou uma biomolécula que se acumula no tumor ou junto deste, como por exemplo EGF (Epidermal Growth Factor), TGF--$\alpha$ (Transforming Growth Factor $\alpha$), PDGF (Platelet derived Growth Factor), IGF I+II (Insulin like Growth Factor I+II) ou a+b FGF (acidic + basic Fibroblast Growth Factor)

E representa uma glicosidase não imunogénea ou pouco imunogé-

nea, de preferência uma glicosidase de mamífero, especialmente uma α- ou β-glucosidase, α-galactosidase, α- ou β--manosidase, α-fucosidase, N-acetil-α-galactosaminidase, N-acetil-β-/N-acetil-α-glucosaminidase ou β-glucuronidase,

Sp representa um grupo de fórmula IV contendo um dissulfureto bifuncional ou $(S)_n$

em que

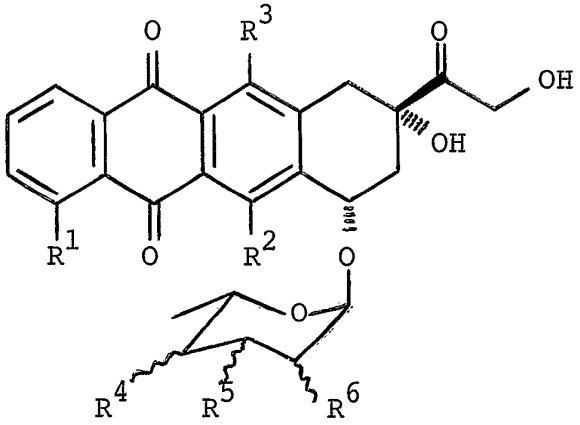
X ou Y representam $-CO-R^{12}-$(N-succinimido)- ou $-C(=R^{13})-CH_2-CH_2-$ em que $R^{12}$ representa $-CH_2-CH_2-$ ou 1,4-fenileno e $R^{13}$ representa O ou NH,

Y representa $-C(=R^{13})-CH_2-CH_2-$, em que $R^{13}$ tem o significado indicado, e

n tem os valores 1 ou 2, ou

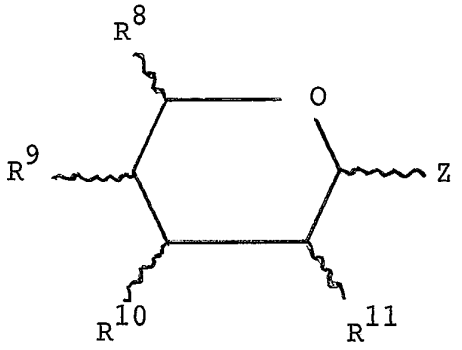
Sp representa um polipeptídeo espaçador apropriado.

É também um objectivo da invenção um processo para a preparação de um composto de fórmula I com as definições indicadas anteriormente, o qual consiste em se fazer reagir uma antraciclina de fórmula V

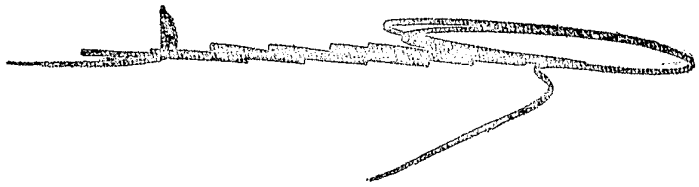


V

na qual $R^1$, $R^2$, $R^3$, $R^4$, $R^5$ e $R^6$ têm os significados indicados acima, com um componente hidrato de carbono de fórmula VI



VI



na qual

$R^8$ representa metilo, aciloximetileno com 1 a 8 átomos de carbono na parte acilo, alquiloximetileno com 1 a 8 átomos de carbono na parte alquilo, benziloximetileno, aliloximetileno, carboximetilo, carboxibenzilo ou carboxialquilo,

$R^9$, $R^{10}$ e $R^{11}$ independentemente uns dos outros representam aciloxi com 1 a 8 átomos de carbono, benzoiloxi ou benzoiloxi substituído, como por exemplo para-nitrobenzoiloxi, alquiloxi com 1 a 8 átomos de carbono, aliloxi, benziloxi, benziloxi substituído, NH-acilo ou NH-(9-fluorenilmetoxicarbonilo) e

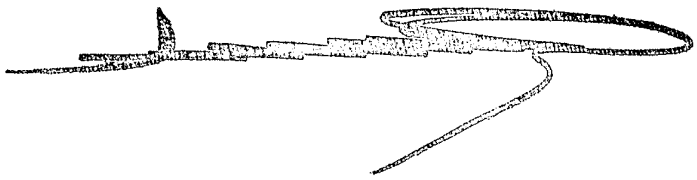
Z representa um grupo dissociável como por exemplo um átomo de halogéneo, um grupo hidroxi, um grupo tri-alquilsililoxi com 1 a 4 átomos de carbono na parte alquilo, um grupo de bloqueio de acilo ligado através de um átomo de oxigénio, ou um tricloroacetimidato ligado através de um átomo de oxigénio,

na presença de um promotor e eventualmente de um agente de fixação de ácidos e/ou de um agente desidratante, num dissolvente, a uma temperatura compreendida entre -50º até +80ºC, com obtenção de um derivado de 14-0-glicosil-antraciclina de fórmula I na qual todos os radicais $R^1$ até $R^{11}$ mantêm os seus significados anteriormente definidos, e em eventualmente se dissociarem nestes compostos os grupos de bloqueio existentes, ou alguns dos grupos de bloqueio, hidroliticamente ou com auxílio de um catalizador apropriado.

Em particular procede-se no presente caso do seguinte modo:

uma antraciclina de fórmula V, se transportar uma função amino como um dos radicais $R^4$, $R^5$ ou $R^6$, tem primeiramente que ser bloqueada neste grupo, por exemplo como NH-trifluoracetato ou NH-(9-fluorenilmetoxicarbonilo).

Para a glicozidação na posição 14 da antraciclina utilizam-se componentes hidrato de carbono funcionalizados de fórmula VI que contêm tipicamente como radicais $R^9$, $R^{10}$ e $R^{11}$ grupos 0-acilo, 0-alquilo ou 0-alilo, se transportarem radicais ligados através de um átomo de oxigénio. O radical $R^8$ é igualmente bloqueado como aciloximetileno, alquiloximetile



no ou carboxialquilo.

No centro anomérico os derivados de hidrato de carbono têm que ter grupos dissociáveis Z apropriados. Os halogenetos de glicosilo, como por exemplo o fluoreto, o cloreto ou o brometo, são preparados por exemplo a partir de derivados de 1-O-acilo por meio de HF, HCl, HBr ou $TiBr_4$. Outros compostos com grupos dissociáveis, tais como tricloroacetimidato, bem como com diversas configurações de grupos de bloqueio para $R^8$ a $R^{11}$, são preparados de acordo com métodos correntes na química dos hidratos de carbono.

Para a glicozidação da antraciclina apta ao acoplamento com um dador de glicozilo é necessário um promotor. No caso da utilização de fluoreto de glicozilo, de 1-hidroxi-glicósidos-1-aciloxiglicózidos ou de 1-tricloroacetimidatos de hidratos de carbono são utilizados ácidos de Lewis, como por exemplo $BF_3$ x éter ou triflato de trimetilsililo, enquanto que no caso de cloretos e de brometos de glicozilo são utilizados sais de prata ou de mercúrio.

A glicozidação tem lugar num dissolvente orgânico aprótico ou numa mistura de dissolventes, como por exemplo acetona, acetato de etilo, éter, tolueno, diclorometano, dicloroetano, acetonitrilo, nitrometano. Eventualmente com utilização de um agente de fixação de ácidos ou de um desidratante por exemplo um crivo molecular, a reacção, consoante a reactividade do dador de glicozilo, é realizada a temperaturas compreendidas entre -50º e +80ºC. A dissociação subsequente dos grupos de bloqueio é realizada com os métodos correntes na química dos hidratos de carbono.

Para a preparação de A-Sp-E pode ser acoplado ou o espaçador (Sp) através de um grupo amino a um enzima e ao anticorpo, ou a biomolécula através de um grupo HS introduzido ou produzido por dissociação de uma ponte dissulfureto, ou são acopladas por covalência sequências de aminoácidos que codificam as partes A, Sp e E, por meio de métodos de biologia molecular, formando-se um gene de fusão, e prepara-se o composto A-Sp-E por processos de tecnologia genética.

Este processo pode realizar-se de diversos modos:



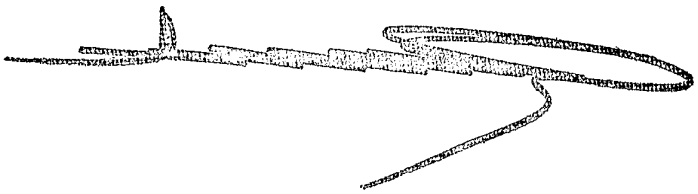
A) um sítio de corte de restrição A é introduzido na extremidade de 3' do exão CH1 no gene da cadeia pesada da imunoglobulina com a auxílio de mutagénese específica. É gerado o mesmo sítio de corte de restrição A na extremidade 5' do oligonucleótido que codifica o oligopeptídeo que funciona como espaçador. Ambos os sítios de corte de restrição A são então ligados de modo que o gene de imunoglobulina possa ser acoplado com o oligonucleótido através do sítio de corte de restrição A, sem perturbar a sequência de leitura.

Na extremidade 3' do oligonucleótido é criado um sítio de corte de restrição B. Este sítio de corte de restrição B é introduzido no gene que codifica o enzima, no sítio em que começa a sequência de ácidos nucleicos codificantes da proteína madura. Em seguida o gene do enzima é acoplado através do sítio de corte de restrição B com o construído "linker" do gene de imunoglobulina. Os sítios de corte de restrição B são ligados de modo que não seja perturbada a sequência de leitura no acoplamento. O gene de fusão obtido do enzima de ligação para as cadeias pesadas da imunoglobulina VH e CH1, é clonado num plasmídeo de expressão que é apropriado para a expressão em células eucarionticas e transporta um marcador de selecção.

O plasmídeo de expressão com o gene de fusão, conjuntamente com um outro plasmídeo de expressão que transporta o gene para a cadeia leve pertencente ao anticorpo, é transfectado em células eucarionticas (por exemplo células de mieloma). Por selecção com antibióticos apropriados isolam-se clones de células que contêm os plasmídeos com o gene de fusão e o gene da cadeia leve (transfectomas).

Por métodos de comprovação apropriados (BioDot; ELISA) identificam-se os transfectomas que seccionam a proteína de fusão de fórmula A-Sp-E constituída por uma parte MAK-Fab, polipeptídeo ligante e enzima.

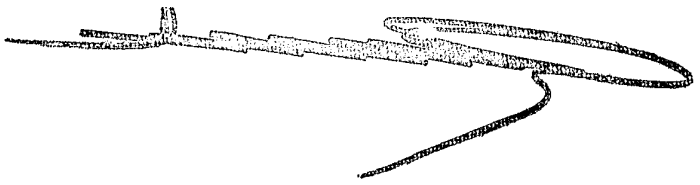
B) um sítio de corte de restrição A é introduzido na extremidade de 3' do exão Hinge do gene para a cadeia pesada da imunoglobulina. O sítio de corte de restrição A é introduzido no ponto do gene do enzima no qual começa a sequência de nucleótidos codificante para a proteína madura. O fragmento



de gene da cadeia pesada da imunoglobulina com os exões VH, CH1 e Hinge é acoplado com o gene do enzima através do sítio de corte de restrição A.

Os sítios de corte de restrição A são então posicionados de modo que no acoplamento não seja perturbada a sequência de leitura. A parte Hinge do anticorpo tem nesta construção a função de espaçador polipeptídico. O gene de fusão de VH, CH1-Hinge e do gene do enzima é clonado num plasmídeo de expressão que é apropriado para a expressão em células eucationticas e que transporta um marcador de selecção. O plasmídeo de expressão com o gene de fusão é transfectado em células de expressão eucatiônticas, conjuntamente com um outro plasmídeo de expressão que contém o gene da cadeia leve pertencente ao anticorpo. Depois da selecção com um antibiótico apropriado identificam-se os clones de transfectoma que contêm o plasmídeo de expressão. Por métodos de comprovação apropriados (BioDot, ELISA) são identificados os clones de transfectomas que seccionam a proteína de fusão de fórmula III que consiste no anticorpo e no enzima.

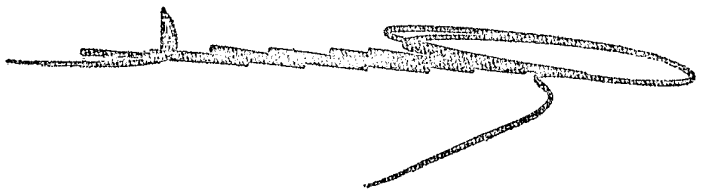
O acoplamento entre o enzima e o anticorpo, dos seus fragmentos ou de uma biomolécula é realizado de acordo com processos descritos na literatura (A. H. Blair e T. I. Ghose, I. Immunolog. Methods 59 (1983) 129-143; T. I. Ghose et al. Methods in Enzymology Vol. 93 (1983) 280-333). Neste caso funcionaliza-se primeiro o enzima através do seu grupo amino por meio de um 1-carboxilato de succinimidil-N-maleimido-alquilideno, de cicloalquilideno ou de arileno, ocorrendo a reacção da dupla ligação da função maleimido numa reacção com o grupo HS do anticorpo funcionalizado, do seu fragmento ou da biomolécula, com formação de uma função tioéter. Para a preparação do conjugado anticorpo-enzima podem ser utilizados anticorpos monoclonais, por exemplo os que são descritos na Especificação EP-A0 141 079, de preferência os anticorpos 431/26, 250/183, 704/152 e 494/32. A especificidade destes anticorpos relativamente a antigenes associados ao tumor foi já comprovada no homem e nos animais por meio de imunocintilografia e imunohistoquímica. A sequência de nucleósidos do gene V destes anticorpos monoclo-



nais está descrita no Pedido de Patente Alemã DE-A-3 909 799.4.

Para a preparação dos conjugados de enzima específicos de tumor, os enzimas citados adiante podem ser preparados a partir das fontes indicadas de harmonia com os processos da literatura também referidos:

- α-galactosidade A a partir de placenta humana: Bishop, D. F. (1981), J. Biol. Chem. 256, 1307-1316, ou de células de mamífero transfectadas (Tsuji, S. (1987) Eur. J. Biochem. 165, 275-280.
- β-glucuronidase a partir de placenta humana: Brot, F. E. (1978) Biochemistry 17, 385-391.
- β-glucuronidase humana a partir de células de mamífero transfectadas: Oshima, A. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 685-689.
- α-L-fucosidase a partir de fígado humano: Dawson, G., Tsay, G. (1877) Arch. Biochem. Biophys. 184, 12-23.
- α-manosidase a partir de fígado humano: Grabowski, G. A., Ikonne, J. U., Desnick, R. J. (1980) Enzyme 25, 13-25.
- α-manosidase a partir de placenta humana: Noeske, C., Mersmann, G. (1983) Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 364, 1645--1651.
- β-glucosidase a partir de mucosa de estômago e intestino humano: Asp, N.-G., Gudmand-Hoeyer, E., Christiansen, P.M., Dahlquist, A. (1974) Scand. J. Clin. Lab Invest. 33. 15, 239-245.
- α-glucosidase a partir de fígado humano: Daniels, L. B., Coyle, P. J., Chiao, Y.-B., Glew, R. H. (1981) J. Biol. Chem. 256, 13004-13013.
- β-glucocerebrosidase a partir de placenta humana: Furbish, F. S., Blair, H. E., Shiloach, J., Pentcheu, P. G., Brady, R. O. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci, USA 74, 3560-3563.
- β-N-acetilglucosaminidase a partir de placenta humana: Roehrborn, W., Von Figura, K. (1978) Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 359, 1353-1362.
- α-N-acetilglucosaminidase a partir de membrana amniótica humana: Orlacchio, A., Amiliani, C., Di Renzo, G. C., Cosmi, E. V. (1986) Clin. Chim. Acta 159, 279-289.
- β-N-acetilgalactosaminidase: de acordo com Salvayre, R. Ne-



gre, A., Marest, A., Douste-Blazy, L. (1984) Pathol. Biol. (Paris) 32, 269-284.

A actividade glicolítica dos enzimas específicos de tumor funcionalizados foi determinada em ensaios comparativos com p-nitrofenilglicósidos, em pH óptimo em cada caso.

É ainda um objectivo da invenção uma embalagem contendo uma 14-0-glicosil-antraciclina de acordo com a invenção e um conjugado de enzima específico de tumor funcionalizado.

Para o ensaio da eficácia de uma utilização combinada desfazada em tempo administrou-se a ratos transplantados o enzima funcionalizado, esperou-se até ao dia em que o nível no plasma do enzima praticamente tinha vindo a zero, administrou-se a 14-0-glicosil-antraciclina e observou-se se tinha ocorrido uma paragem de crescimento e uma regressão nos tecidos transplantados.

Exemplos:

Os exemplos que se seguem elucidam a invenção em pormenor sem contudo a limitarem:

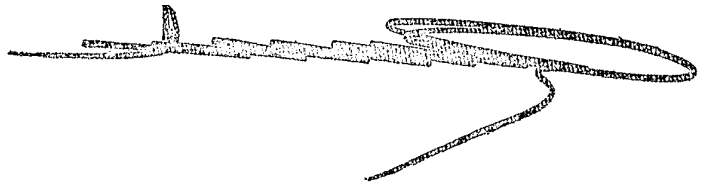
A Síntese dos precursores de fármacos:

As estruturas dos compostos preparados foram determinadas por meio de espectroscopia de RMN de $^{1}H$ e de $^{13}C$, com recurso a métodos de RMN bidimensionais e outras técnicas de RMN de impulsos múltiplos, bem como espectroscopia de massa, de UV e de IR. A evolução das reacções, assim como os compostos resultantes, foram ensaiados cromatograficamente em camada delgada ou por meio da técnica HPLC.

Exemplo 1:

2-0-alil-1,3,4,6-tetra-0-acetil-$\alpha$-D-galacto-hexo-piranose (1)

Uma solução de 1,3,4,6-tetra-0-acetil-



- -D-galactopiranose (3,48 g = 10 mmol) e de tricloroacetimidato de alilo (14 ml de uma solução a 30% em hexano) em diclorometano (15 ml) foi misturada com ácido trifluorametanossulfónico (0,25 ml) e agitou-se 4 horas, aquecendo-se a mistura a 40ºC. Depois do arrefecimento filtrou-se e o filtrado foi extraído com solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio.

A fase orgânica foi separada cromatograficamente em coluna (eluente: acetato de etilo/éter de petróleo = 1:4).

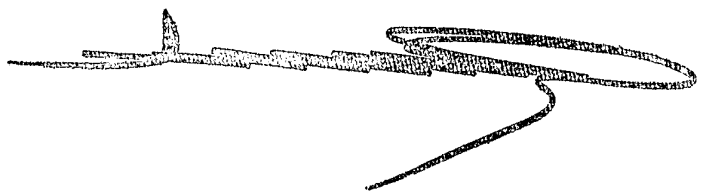
Rendimento: 1.52 g (3.9 mmol = 39%), mp 133ºC,
$[\alpha]_D^{25}$ + 68.6 (c = 1.0 in Diclorometano).
$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) $\delta$ 6.40 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 3.6 Hz, H-1), 5.83 (dddd, 1H, Alilo), 5.47 (dd, 1H, $J_{3,4}$ = 3.3 Hz, $J_{4,5}$ = 1.2 Hz, H-4), 5.32-5.17 (m, 3H, Alilo, H-3), 4.30 (dt, $J_{4,5}$ = 1.2 Hz, $J_{5,6a}$ = $J_{5,6b}$ = 6.6 Hz, H-5), 4.16-4.06 (m, 4H, H-6a, H-6b, Alilo), 3.88 (dd, 1H, $J_{1,2}$ = 3.6 Hz, $J_{2,3}$ = 10.5 Hz, H-2), 2.17 (s, 3H, OAc), 2.15 (s, 3H, OAc), 2.04 (s, 3H, OAc), 2.03 (s, 3H, OAc). $^{13}$C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) $\delta$ 117.4 (Alilo), 93.5 (Alilo), 89.7 (C-1), 71.8 (Alilo), 71.7 (C-2), 69.0 (C-3), 68.2 (C-5), 67.4 (C-4), 61.0 (C-6), 20.6 (OAc), 20.4 (OAc), 20.3 (OAc), 20.1 (OAc).

Exemplo 2:

brometo de 2-0-alil-3,4,6-tri-0-acetil-$\alpha$D-galacto-hexo-piranosilo (2)

O composto 1 (940 mg = 2,42 mmol) foi dissolvido em diclorometano (2 ml), misturou-se a 0ºC com ácido bromídrico em ácido acético (11 ml; solução a 33% de HBr) e agitou-se 2 horas a esta temperatura. A mistura reactiva foi vertida sobre gelo e foi extraída com diclorometano. A fase orgânica foi extraída com solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio até reacção levemente básica, secou-se com sulfato de sódio e extraiu-se várias vezes com tolueno.

Rendimento: 930 mg (2.27 mmol = 94%), Xarope.
$^1$H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) $\delta$ 6.58 (d, 1H, $H_{1,2}$ = 3.8 Hz, H-1), 5.90

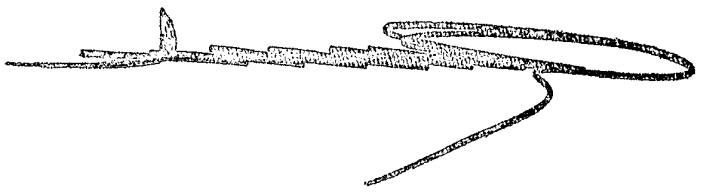


(dddd, 1H, Alilo), 5.49 (dd, 1H, $J_{3,4}$ = 3.4 Hz, $J_{4,5}$ = 1.3 Hz, H-4), 5.38-5.20 (m, 3H, H-3, Alilo), 4.48 (dt, 1H, $J_{4,5}$ = 1.3 Hz, $J_{5,6a}$ = $J_{5,6b}$ = 6.3 Hz, H-5), 4.23-4.04 (m, 4H, Alilo, H-6a, H-6b), 3.77 (dd, 1H, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz, $J_{2,3}$ = 10.3 Hz, H-2), 2.17 (s, 3H, OAc), 2.08 (s, 3H, =Ac), 2.03 (s, 3H, OAc).
$^{13}C$ NMR (50 MHz, $CDCl_3$) $\delta$ 170.2 (OAc), 169.7 (OAc), 169.6 (OAc), 133.7 (Alilo), 117.9 (Alilo), 90.6 (C-1), 72.8 (C-2), 71.7 (Alilo), 70,9 (C-5), 69.9 (C-3), 67.2 (C-4), 60.8 (C-6), 20.6 (OAc), 20.5 (OAc), 20.4 (OAc).

Exemplo 3:

N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-doxorrubicina (3)

A uma suspensão de cloridrato de doxorrubicina (107 mg = 0,184 mmol) em metanol absoluto (10 ml) adicionou-se uma solução de metanolato de sódio (a 30% em metanol) até se verificar uma reacção levemente alcalina, dissolvendo-se assim a substância. Depois da adição de carbonato de sódio (anidro) (98 mg = 0,92 mmol) e de cloreto de 9-fluorenilmetoxicarbonilo (142 mg = 0,552 mmol) agitou-se 1 hora à temperatura ambiente. Depois da filtração e concentração separou-se cromatograficamente em coluna (eluente: diclorometano/metanol/ácido fórmico = 20:1:0,1).
Rendimento: 139 mg (0.181 mmol = 98%), mp 165-166ºC,
$[\alpha]_D^{25}$ + 156º (C = 0.02 em Clorofórmio).
$^1H$ NMR (200 MHz, $CDCl_3$) $\delta$ 13.86 (s, 1H, OH-6), 13.09 (s, 1H, OH--11), 7.98-6.70 (m, 11H, H-1, H-2, H-3, 8 Fmoc- H aromático), 5.39 (bs, 1H, H-1'), 5.14 (m, 2H, NH, H-7), 4.71 (s, 2H, H-14), 4.48 (s, 2H, Fmoc-CH), 4.25 (s, 1H, Fmoc-CH), 4.07 (q, 1H, H-5'), 3.99 (s, 3H, OMe), 3.80 (m, 2H, H-3', H-4'), 3.55 (bs, 1H, OH), 3.15 (d, 1H, $J_{10a,10b}$ = 18.7 Hz, H-10a), 2.99 (bs, 1H, OH), 2.82 (d, 1H, $H_{10a,10b}$ = 18.7 Hz, H-10b), 2.48-2.03 (m, 4H, H-8a, H--8b, H-2a', H-2e'), 1.23 (d, 3H, $J_{5',6'}$ = 6.5 Hz, $CH_3$-6').
FAB-MS, m/z = 766 (M+H).

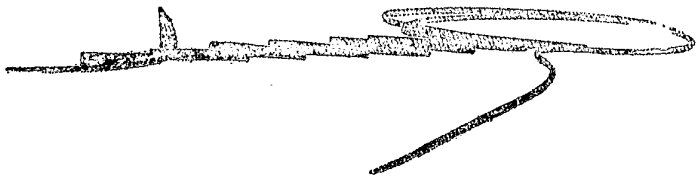


Exemplo 4:

14-O-(2-O-alil-3,4,6-tri-O-acetil-∝-D-galacto-hexo-piranosil)--N-trifluoracetil-doxorrubicina (4)

A uma solução de N-trifluoracetil-doxorrubicina (70 mg = 0,11 mmol) numa mistura de dissolventes formada por tolueno absoluto e nitrometano absoluto (7 ml; 1:1) com crivo molecular (4 A) adicionou-se carbonato de prata (90 mg = 0,33 mmol) e perclorato de prata (23 mg = 0,11 mmol) e agitou-se 1 hora à temperatura ambiente. A esta mistura adicionou-se uma solução do composto 2 (134 mg = 0,33 mmol) em tolueno absoluto (1 ml) e agitou-se 22 horas à temperatura ambiente. Depois da filtração e lavagem repetida com tolueno e adição de diclorometano, extraiu-se com solução de hidrogenocarbonato de sódio e seguidamente com água, e a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio. Por cromatografia em coluna (eluente diclorometano/metanol/ácido fórmico = 20:1:0,1) obteve-se o produto em forma cristalina.

Rendimento: 48 mg (0.05 mmol = 45%), mp 131-132ºC,
$[\alpha]_D^{25}$ + 220 (c = 0.02 em Clorofórmio).
$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) $\delta$ 14.01 (s, 1H, OH-6), 13.23 (s, 1H, OH--11), 8.04 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 8.7 Hz, H-1), 7.79 (t, 1H, $J_{1,2}$ = $J_{2,3}$ = 8.5 Hz, H-2), 7.40 (d, 1H, $J_{2,3}$ = 8.3 Hz, H-3), 6.72 (d, 1H, $J_{3,NH}$ = 8.2 Hz, NH'), 5.93 (dddd, 1H, Alilo), 5.54 (d, 1H, $J_{3",4"}$ = 3.4 Hz, H-4"), 5.50 (d, 1H, $J_{1',2a'}$ = 2.9 Hz, H-1'), 5.44-5.17 (m, 4H, H-7, H-3', 2 x Alilo), 5.15 (d, 1H, $J_{1",2"}$ = 3.6 Hz, H-1"), 5.00 (d, 1H, $J_{14a,14b}$ = 19.5 Hz, H-14a), 4.86 (d, 1H, $J_{14a,14b}$ = 19.5 Hz, H-14b), 4.49 (t, 1H, $J_{5",6a"}$ = $J_{5",6b"}$ = 6.5 Hz, H-5"), 4.18 (m, 6H, 2 x Alilo, H-3', H-5', H--6a", H-6b"), 4.09 (s, 3H, OMe), 3.87 (dd, 1H, $J_{1",2"}$ = 3.5 Hz, $J_{2",3"}$ = 10.5 Hz, H-2"), 3.67 (d, 1H, $J_{3',4'}$ = 3.7 Hz, H-4'), 3.27 (d, 1H, $J_{10a,10b}$ = 19.0 Hz, H-10a), 2.98 (d, 1H, $J_{10a,10b}$ = 19.0 Hz, H-10b), 2.36-1.7 (m, 4H, H-8a, H-8b, H-2a', H-2e'), 2.16 (s, 3H, OAc), 2.07 (s, 3H, OAc), 2.04 (s, 3H, OAc), 1.33 (d, 3H, $J_{5',6'}$ = 6.5 Hz, $CH_3$-6).
FAB-MS, m/z = 990 (M + Na).



Exemplo 5:

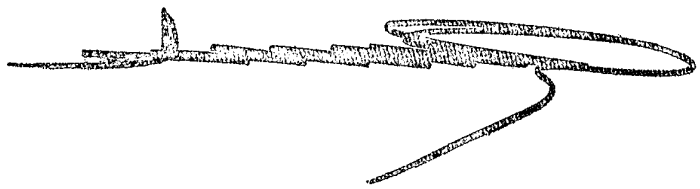
14-O-(2-O-alil-3,4,6-tri-O-acetil-∝-D-galacto-hexo-piranosil)--N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-doxorrubicina (5)

O composto 3 (93 mg = 0,122 mmol) foi submetido a reacção, nas condições descritas no Exemplo 4, com carbonato de prata (111 mg = 0,366 mmol), com perclorato de prata (25 mg = 0,122 mmol) e com o composto 2 (150 mg = 0,366 mmol) e procedeu-se ao tratamento pós-reactivo.
Rendimento: 65 mg (0.66 mmol = 49%), mp 148-149ºC,
$[\alpha]_D^{25}$ + 170º (c = 0.02 em Clorofórmio).
$^1$H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) 13.97 (s, 1H, OH-6), 13.20 (s, 1H, OH--11), 8.08-7.01 (m, 11H, H-1, H-2, H-3, 8 x Fmoc H-aromático), 5.95 (dddd, 1H, Alilo), 5.52 (d, 1H, $J_{3",4"}$ = 3.0 Hz, H-4"), 5.45 (d, 1H, $J_{1',2'a}$ = 2.8 Hz, H-1'), 5.43-5.11 (m, 5H, 2 x Alilo, H-7, H-1", H-3"), 4.94 (m, 2H, H-14a, H-14b), 4.57-4.03 (m, 13H, OMe, 2 x Alilo, 3 x Fmoc, H-6a", H-6b", H-3', H-5', H5"), 3.87 (dd, 1H, $J_{1",2"}$ = 3.3 Hz, $J_{2",3"}$ = 10.4 Hz, 2"-H), 3.67 (m, 1H, H-4'), 3.25 (d, 1H, $J_{14a,14b}$ = 19.0 Hz, H-14a), 2.93 (d, 1H, $J_{14a,14b}$ = 19.0 Hz, H-14b, 2.15 (s, 3H, OAc), 2.06 (s, 3H, OAc), 2.03 (s, 3H, OAc), 1.31 (d, 3H, $J_{5',6'}$ = 6.3 Hz, $CH_3$--6').
FAB-MS, m/z = 1116 (M + Na).

Exemplo 6:

14-O-(3,4,6-tri-O-acetil-∝-D-galacto-hexo-piranosil)-N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-doxorrubicina (6)

Uma solução de hexafluorfosfato de 1,5--ciclooctadieno-bis[metildifenilfosfina]-irídio (5 mg) em tetrahidrofurano absoluto (5 ml) foi hidrogenada até à descoloração à pressão atmosférica e foi misturada e agitada duas horas com uma solução do composto 5 (44 mg = 0,04 mmol) em tetrahidrofurano absoluto. Em seguida adicionou-se água (1 ml) e íodo e agitou-se por mais 30 minutos. A mistura reactiva foi misturada



com diclorometano e foi extraída primeiro com solução aquosa de tiossulfato de sódio e em seguida com solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio. Depois da secagem com sulfato de sódio e concentração purificou-se cromatograficamente em coluna (eluente: diclorometano/metanol/ácido fórmico = 20:1:0,1). Rendimento: 15 mg (0,014 mmol = 35%).

Exemplo 7:

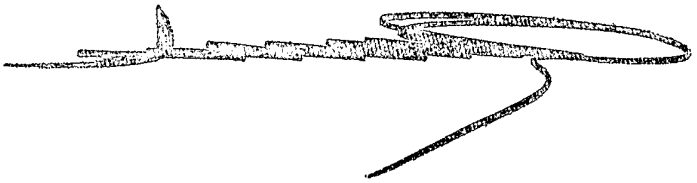
14-O-(3,4,6-tri-O-acetil-α-D-galacto-hexo-piranosil)-doxorrubicina (7)

Uma solução do composto 6 (12 mg = 0,011 mmol) em morfolina (2 ml) foi agitada 3 horas à temperatura ambiente e em seguida foi extraída duas vezes com tolueno. Depois de se tomar o resíduo com diclorometano extraiu-se com tampão de acetato aquoso (pH 5).
Rendimento: 9 mg (0.0103 mmol = 94%).
$^1$H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) $\delta$ 8.03 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 7.7 Hz, H-1), 7.79 (t, 1H, $J_{1,2} = J_{2,3}$ = 8.0 Hz, H-2), 7.39 (d, 1H, $J_{2,3}$ = 8.2 Hz, H-3), 5.52 (m, 1H, H-4"), 5.46 (d, 1H, $J_{1',2a'}$ = 3.3 Hz, H-1'), 5.34 (m, 1H, H-7), 5.26 (dd, 1H, $H_{2",3"}$ = 10.5 Hz, $J_{3",4"}$ = 3.2 Hz, H-3"), 4.98 (d, 1H, $J_{1",2"}$ = 3.8 Hz, H-1"), 4.92 (m, 2H, H-14a, H-14b), 4.39 (t, 1H, $J_{5",6a"} = J_{5",6b"}$ = 6.5 Hz, H-5"), 4.14-3.97 (m, 6H, OMe, H-5', H-6a", H-6b"), 3.49 (s, 1H, H-4'), 3.27 (d, 1H, $J_{10a,10b}$ = 19.0 Hz, H-10a), 2.99 (d, 1H, $J_{10a,10b}$ = 19.0 Hz, H-10b), 2.15 (s, 3H, OAc), 2.07 (s, 6H, 2 x OAc), 1.36 (d, 3H, $J_{5',6'}$ = 6.6 Hz, $CH_3$-6).

Exemplo 8:

14-O-(3,4,6-tri-O-acetil-α-D-galacto-hexo-piranosil)-N-trifluoracetil-doxorrubicina (8)

O composto 4 foi submetido à reacção nas condições indicadas no Exemplo 7.



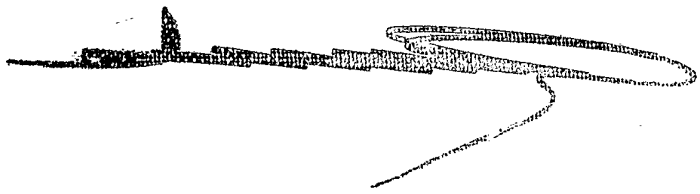
$^1$H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) $\delta$ 14.05 (s, 1H, OH-6), 13.28 (s, 1H, OH-11), 8.06 (dd, 1H, $J_{1,2}$ = 7.8 Hz, $J_{1,3}$ = 0.8 Hz, H-1), 7.80 (t, 1H, $J_{1,2} = J_{2,3}$ = 8.0 Hz, H-2), 7.40 (dd, 1H, $J_{2,3}$ = 8.7 Hz, $J_{1,3}$ = 0.8 Hz, H-3), 6.67 (d, 1H, $J_{3',NH}$ = 8.5 Hz, NH), 5.57 (d, 1H, $J_{3",4"}$ = 2.8 Hz, H-4"), 5.45 (d, 1H, $J_{1',2a'}$ = 3.6 Hz, H-1'), 5.33 (m, 1H, H-7), 5.23 (dd, 1H, $J_{2",3"}$ = 10.5 Hz, $J_{3",4"}$ = 2.9 Hz, H-3"), 5.02 (d, 1H, $J_{1",2"}$ = 3.8 Hz, H-1"), 4.87 (m, 2H, H-14a, H-14b), 4.37 (t, 1H, $J_{5",6a"} = J_{5",6b"}$ = 6.5 Hz, H-5"), 4.20 (q, 1H, $J_{5',6'}$ = 6,3 Hz, H-5'), 4.09 (s, 3H, OMe), 3.65 (m, 1H, H-4'), 3.33 (d, 1H, $J_{10a,10b}$ = 18.5 Hz, H-10a), 2.98 (d, 1H, $J_{10a,10b}$ = 18.5 Hz, H-10b), 2.15 (s, 3H, OAc), 2.08 (s, 3H, OAc), 2.04 (s, 3H, OAc), 1.32 (d, 3H, $J_{5',6'}$ = 6.5 Hz, $CH_3$-6').

Exemplo 9:

14-O-(2-O-alil-$\alpha$-D-galacto-hexo-piranosil)-N-trifluoracetil-doxorrubicina (9)

Uma solução do composto 4 (15 mg = 0,015 mmol) em metanol (2 ml) foi misturada com uma quantidade catalítica de metanolato de sódio e agitou-se 1 hora à temperatura ambiente. Com uma resina permutadora de iões ácida (Dowex WX 50) neutralizou-se em seguida e concentrou-se depois da filtração. Rendimento: 12 mg (0.014 mmol = 93%)

$^1$H NMR (400 MHz, $CDCl_3$ + $CD_3OD$) $\delta$ 14.02 (s, 1H, OH-6), 13.28 (s, 1H, OH-11), 8.03 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 7.8 Hz, H-1), 7.80 (t, 1H, $J_{1,2} = J_{2,3}$ = 8.0 Hz, H-2), 7.40 (d, 1H, $J_{2,3}$ = 8.5 Hz, H-3), 6.01 (m, 1H, Alilo), 5.55 (m, 1H, H-1'), 5.26 (m, 1H, H-7), 5.17 (d, 1H, $J_{1",2"}$ = 3.5 Hz, H-1"), 4.94 (d, 1H, $J_{14a,14b}$ = 19.0 Hz, H-14a), 4.85 (d, 1H, $J_{14a,14b}$ = 19.0 Hz, H-14b), 4.08 (s, 3H, OMe), 3.28 (d, 1H, $J_{10a,10b}$ = 18.5 Hz, H-10a), 3.02 (d, 1H, $J_{10a,10b}$ = 18.5 Hz, H-10b), 1.32 (d, 3H, $J_{5',6'}$ = 6.5 Hz, $CH_3$-6').



Exemplo 10:

14-0-∝-D-galacto-hexopiranosil-doxorrubicina (10)

a) o composto 7 (4 mg = 0,005 mmol) foi submetido à reacção nas condições descritas no Exemplo 9.
Rendimento: 2,8 mg (0,004 mmol = 80%).

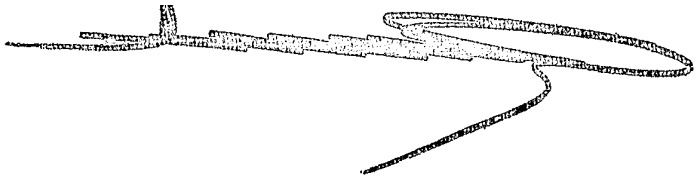
b) Uma solução do composto 8 (11 mg = 0,012 mmol) em metanol (1 ml) e soda cáustica 0,5 N (0,5 ml) foi agitada 90 minutos à temperatura ambiente. Depois da neutralização com ácido clorídrico diluído extraiu-se várias vezes com tolueno, seguidamente tomou-se com metanol, filtrou-se através de celite e concentrou-se. A purificação foi realizada por meio de HPLC (eluente: tampão de fosfato/acetonitrilo/tetrahidrofurano = 30:60:10).
$^1$H NMR (200 MHz, $CDCl_3$ + $CD_3OD$) $\delta$ 7.90 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 7.6 Hz, H-1), 7.73 (t, 1H, $J_{1,2} = J_{2,3}$ = 8 Hz, H-2), 7.22 )d, 1H, $J_{2,3}$ = 8.4 Hz, H-3), 5.37 (s, 1H, H-1'), 5.12 (s, 1H, H-7), 4.85 (s, 2H, H-14a, H-14b), 4.75 (m, 1H, H-1"), 3.98 (s, 3H, OMe), 2.29 (d, 1H, $J_{10a,10b}$ = 15.5 Hz, H-10a), 2.06 (d, 1H, $J_{10a,10b}$ = 15.5 Hz, H-10b), 1.21 (d, 3H, $J_{4',5'}$ = 6.6 Hz, $CH_3$-6).

B. Dissociação do precursor do fármaco por enzimas:

Exemplo 11:

Dissociação de 14-0-∝-D-galacto-hexo--piranosil-doxorrubicina (composto 10) por ∝-galactosidase A de placenta humana

0,5 mg do composto de partida foram dissolvidos em 0,5 ml de tampão de fosfato, pH 5, contendo 0,03 U/ml de ∝-galactosidase A isolada da placenta humana e incubou-se a 37ºC no escuro. Depois de diversos períodos de incubação retiraram-se amostras do preparado de incubação e analizaram-se directamente por meio de cromatografia líquida de alta pressão (coluna: Nucleosil 100 (RP 18, 5 µm de diâmetro de partículas, 125 x 4,6 mm; fase móvel: gradiente de solução A e B:



0 min - 20% A, 10 min - 30% A, 15 min - 30% A, solução A = 100% acetonitrilo, solução B = tampão de fosfato 0,02 M pH 3,0: débito: 1 ml/min; detecção:; fluorescência, ex. 495 nm, em. 560 nm). O tempo de retenção do composto de partida nestas condições de cromatografia é de 9,0 minutos. O composto formado durante a incubação possui um tempo de retenção de 12,6 minutos, idêntico ao da adriamicina.

O tempo de semi-período da dissociação nas condições descritas foi de cerca de 54 horas (valor extrapolado). Na incubação do composto de partida em solução tampão isenta de enzima o composto permaneceu estável durante este período de tempo.

Exemplo 12:

Dissociação de 14-0-$\alpha$-D-galacto-hexo-piranosil-doxorrubicina (composto 10) por $\alpha$-galactosidase de grãos de café

O composto de partida foi incubado, nas mesmas condições descritas para o Exemplo 11, na presença de 0,03 U/ml de $\alpha$-galactosidase de grãos de café (Sigma). O semi-período da dissociação na presença do enzima foi de cerca de 20 minutos.

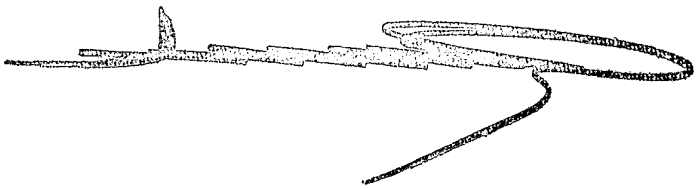
C. Determinação da actividade enzimática dos conjugados de enzima:

Exemplo 13:

Determinação da actividade enzimática de conjugados de $\beta$-glucuronidase

A $\beta$-glucuronidase purificada de harmonia com o processo descrito acima foi acoplada ao anticorpo/biomolécula e determinou-se a actividade do enzima, assim como do conjugado, do seguinte modo:

a 500 µl de uma solução de 2,5 mM de $\beta$-D-glucuronido de p-nitrofenilo em 100 mM de HEPES (ácido N-2-hidroxietil-piperazino-N'-



-2-etanossulfónico) pH 5, adicionaram-se 500 µl da solução de conjugado de enzima a determinar. O preparado de ensaio foi incubado a 37ºC e passados 6 minutos parou-se a incubação com 500 µl de uma solução 0,4 M de glicina, pH 10,8. Em seguida realizou-se a determinação do p-nitrofenol libertado por medição da extinção a 405 nm.

Resultados:

O conjugado mostrou uma actividade enzimática apenas insignificantemente diminuida.

Exemplo 14:

Determinação da actividade enzimática de conjugados de α-D-galactosidase A

A α-galactosidase A purificada de acordo com o processo descrito acima foi acoplada ao anticorpo/biomolécula e determinou-se a actividade do enzima, assim como do conjugado, do seguinte modo:

a 500 µl de uma solução de 2,5 mM de α-D-galactopiranósido de p-nitrofenilo em 100 mM HEPES (ácido N-2-hidroxietil-piperazino-N'-2-etano-sulfónico) pH 5, adicionaram-se 500 µl da solução do conjugado do enzima a determinar. O preparado de ensaio foi incubado a 37ºC e passados 6 minutos a reacção foi parada com 500 µl de uma solução 0,4 M de glicina, pH 10,8. Em seguida realizou-se a determinação do p-nitrofenol libertado por medição da extinção a 405 nm.

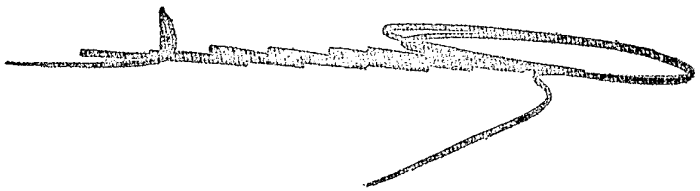
Resultados:

O conjugado apresentou uma actividade enzimática apenas insignificantemente reduzida.

D Presença do enzima em plasma humano:

Exemplo 15:

Presença de β-D-glucuronidase em plasma humano



A 500 µl de uma solução 2,5 mM de β-D--glucuronido de p-nitrofenilo em 100 mM HEPES (ácido N-2-hidroxietil-piperazino-N'-2-etanosulfónico), pH 7,4, adicionaram-se 500 µl de plasma humano. O preparado de ensaio foi incubado a 30ºC e passados 30 min. parou-se a reacção com 500 µl de uma solução 0,4 M de glicina, pH 10.8. Em seguida realizou-se a determinação do p-nitrofenol libertado por medição da extinção a 405 nm.

Resultados:

Nas condições do ensaio não pôde determinar-se qualquer actividade enzimática para β-D-glucuronidase.

Exemplo 16:

Presença de α-D-glactosidase em plasma humano

A 500 µl de uma solução 2,5 mM de α-D--galactopiranósido de p-nitrofenilo em 100 mM HEPES (ácido N-2--hidroxietil-piperazino-N'-2-etanosulfónico) pH 7,4, adicionaram-se 500 µl de plasma humano. O preparado de ensaio foi incubado a 30ºC e decorridos 30 min. parou-se a reacção com 500 µl de uma solução 0,4 M de glicina, pH 10,8. Em seguida realizou--se a determinação do p-nitrofenol libertado por medição da extinção a 405 nm.

Resultados:

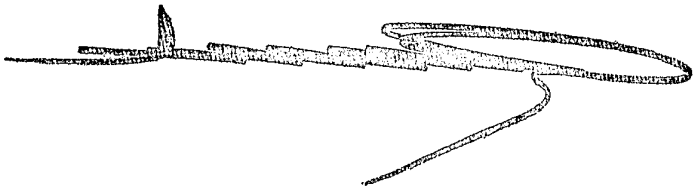
Nas condições do ensaio não pôde determinar-se qualquer actividade enzimática para α-D-galactosidase.

D Efeito antitumórico in vivo:

Exemplo 17:

Efeito antitumórico in vivo do sistema precursor de fármaco 14--O-glicosilantraciclina

30 ratos NMRI nu/nu receberam no dia 0, por cada animal, uma inoculação subcutânea de pedaços de tumor



humano CoCa 4 com cerca de 5 mm de tamanho. Depois do crescimento do tecido do tumor humano nos ratos (dia 7-14) cada 6 animais dos grupos a,b,c receberam 5 x 500 µg de conjugado Mak BW 494/ /32-galactosidade,
do grupo d receberam 5 x 500 µg de MAk BW 494/32,
do grupo e receberam 5 x 500 µg de galactosidade
e injectaram-se 5 x 500 µl de PBS em 5 dias consecutivos por via intravenosa.

Nos 5º, 6º e 7º dias depois do termo das injecções de MAk BW 494/32-galactosidade, MAk BW 494/32, de galactosidase ou de PBS, os ratos dos grupos a, d e e receberam por animal um terço da dose tolerável máxima (MTD) de 14-0-glicosil-antraciclina por dia, por injecção intravenosa. Os ratos do grupo b receberam cada um 1/10 da MTD, e os do grupo c receberam 1/20 da MTD nos mesmos dias.

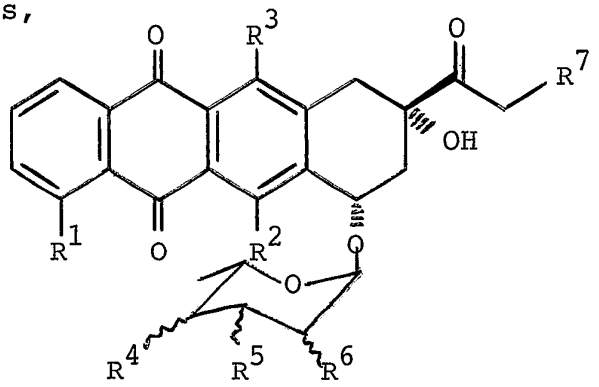
Resultados:

Nos grupos d e e verificou-se um crescimento do tumor, que não se distingue significativamente do do grupo f. Os grupos a, b e c apresentaram uma inibição nítida do crescimento do tumor, tendo sido mais nítidos os efeitos no grupo a.

Foram obtidos resultados comparáveis com os MAk BW 431/26, BW 250/183 no sistema "Xenograft" CoCa4, assim como com os MAk BW 704 no sistema "Xenograft" M21.

# R E I V I N D I C A Ç Ã O

Processo para a preparação de um composto de fórmula I, assim como dos seus sais com ácidos orgânicos ou inorgânicos,



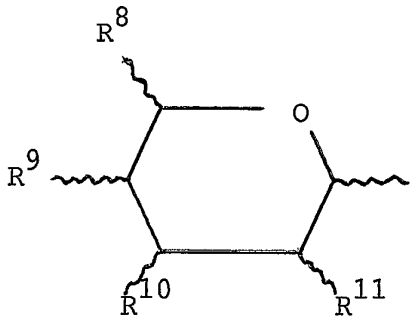
I

na qual

$R^1$, $R^2$ e $R^3$, independentemente uns dos outros, representam hidrogénio, hidroxi, metoxi,

$R^4$, $R^5$ e $R^6$, independentemente uns dos outros, representam hidrogénio, hidroxi, halogéneo, aciloxi alifático com 1 a 8 átomos de carbono, benzoiloxi ou benzoiloxi substituído como por exemplo para-nitrobenzoiloxi, alquiloxi com 1 a 8 átomos de carbono, aliloxi, benziloxi ou benziloxi substituído, tetrahidropiraniloxi, amino, NH-acilo com 1 a 8 átomos de carbono, NH-(9-fluorenilmetoxicarbonilo), morfolino ou morfolino substituído, de preferência 3-0-metil-morfolino ou 2-ciano-morfolino,

$R^7$ representa um hidrato de carbono de fórmula II



II

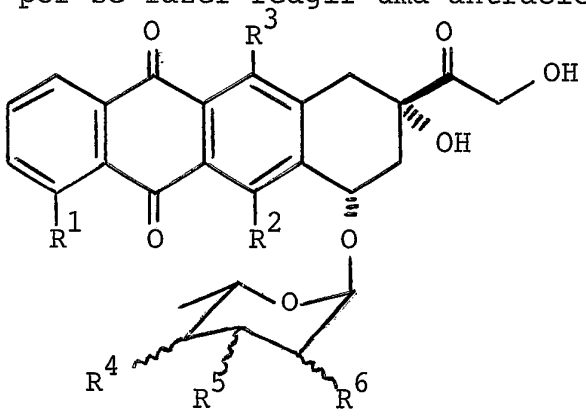
na qual

$R^8$ representa metilo, hidroximetilo, aciloximetilo com 1 a 8 átomos de carbono na parte acilo, alquiloximetilo com 1 a 8 átomos de carbono na parte alquilo, benziloximetilo, aliloximetilo, carboxi, carboximetilo ou carboxialilo,

$R^9$, $R^{10}$ e $R^{11}$, independentemente uns dos outros, representam hidrogénio, hidroxi, aciloxi com 1 a 8 átomos de carbono, benzoiloxi ou benzoiloxi substituído, tal como para-nitrobenzoiloxi, alquiloxi com 1 a 8 átomos de carbono, aliloxi, benziloxi ou benziloxi substituído, amino, NH-acilo com 1 a 8 átomos de carbono ou NH-(9-fluorenilmetoxicarbonilo),

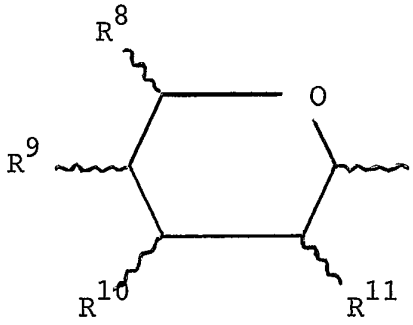
na qual um grupo acilo é um grupo mono, di ou trihalogenoacetilo, de preferência tendo como átomos de halogéneo fluor ou cloro, exceptuando-se os compostos nos quais $R^4$=$R^5$=$R^9$=$R^{11}$=0-acetilo e $R^6$=$R^{11}$=hidrogénio na conformação ∝-L-desoxifucose,

caracterizado por se fazer reagir uma antraciclina de fórmula V



V

na qual $R^1$, $R^2$, $R^3$, $R^4$, $R^5$ e $R^6$ têm os significados indicados acima, com um componente hidrato de carbono de fórmula VI



VI

na qual

$R^8$ representa metilo, aciloximetileno com 1 a 8 átomos de carbono na parte acilo, alquiloximetileno com 1 a 8 átomos de carbono na parte alquilo, benziloximetileno, aliloximetileno, carboximetilo, carboxibenzilo ou carboxialquilo,

$R^9$, $R^{10}$ e $R^{11}$ independentemente uns dos outros representam aciloxi com 1 a 8 átomos de carbono, benzoiloxi ou benzoiloxi substituído como por exemplo para-nitrobenzoiloxi, alquilo-

xi com 1 a 8 átomos de carbono, aliloxi, benziloxi, benziloxi substituído, NH-acilo ou NH-(9-fluorenilmetoxicarbonilo) e

Z representa um grupo dissociável como por exemplo um átomo de halogéneo, um grupo hidroxi, um grupo tri-alquilsililoxi com 1 a 4 átomos de carbono na parte alquilo, um grupo de bloqueio de acilo ligado através de um átomo de oxigénio, ou um tricloroacetimidato ligado através de um átomo de oxigénio,

na presença de um promotor e eventualmente de um agente de fixação de ácidos e/ou de um agente desidratante, num dissolvente, a uma temperatura compreendida entre -50º até +80ºC, com obtenção de um derivado de 14-0-glicosil-antraciclina de fórmula I na qual todos os radicais $R^1$ até $R^{11}$ mantêm os seus significados anteriormente definidos, e por eventualmente se dissociarem nestes compostos os grupos de bloqueio existentes, ou alguns dos grupos de bloqueio, hidroliticamente ou com auxílio de um catalisador apropriado.

A requerente reivindica a prioridade do pedido de patente alemão apresentado em 1 de Fevereiro de 1990, sob o Nº. P 40 02 888.7.

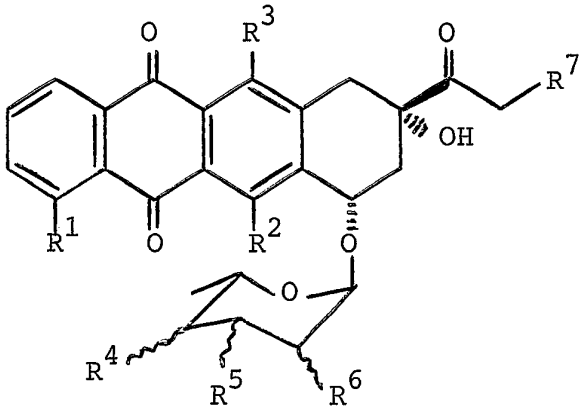
Lisboa, 31 de Janeiro de 1991.

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

RESUMO

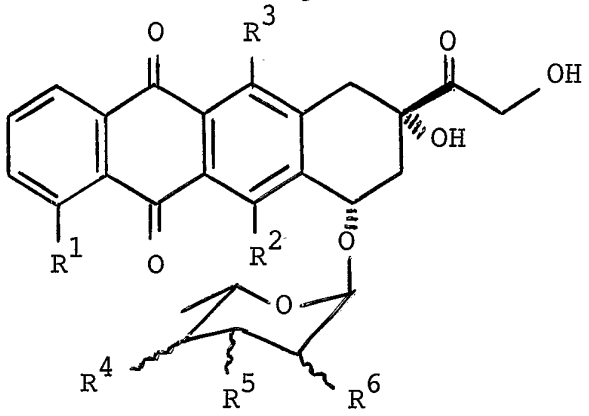
"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PRECURSORES DE FÁRMACOS DE ANTRACICLINA-GLICOSILO"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de um composto de fórmula I, assim como dos seus sais com ácidos orgânicos ou inorgânicos.



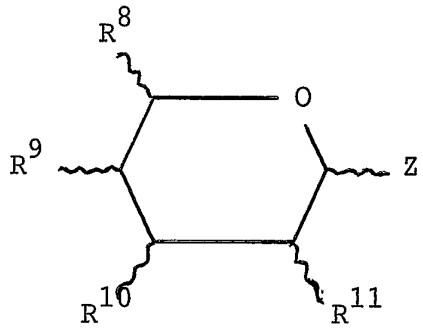
I

que compreende fazer-se reagir uma antraciclina de fórmula V



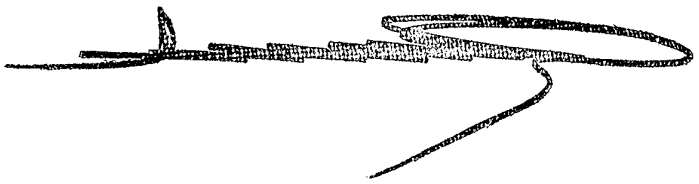
V

com um componente hidrato de carbono de fórmula VI



VI

na presença de um promotor e eventualmente de um agente de fixa



ção de ácidos e/ou de um agente desidratante, num dissolvente, a uma temperatura compreendida entre -50º até +80ºC, com obtenção de um derivado de 14-0-glicosil-antraciclina de fórmula I e por eventualmente se dissociarem nestes compostos os grupos de bloqueio existentes, ou alguns dos grupos de bloqueio, hidroliticamente ou com auxílio de um catalisador apropriado.