

(11) *Número de Publicação:* **PT 918545 E**

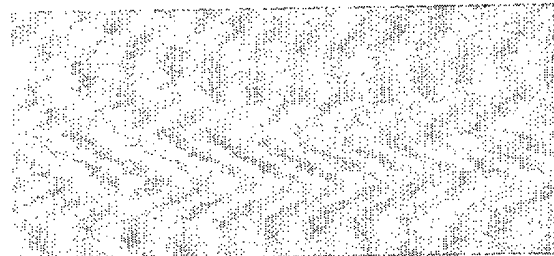
(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
A61K047/48 A

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de depósito: 1997.11.28	(73) Titular(es): ENZACTA R & D LIMITED 3RD FLOOR, 55 GOWER STREET LONDON WC1E 6HQ GB
(30) Prioridade: 1996.11.30 GB 9624993	(72) Inventor(es): KENNETH DAWSON BAGSHAWE GB
(43) Data de publicação do pedido: 1999.06.02	(74) Mandatário(s): ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2000.07.12	

(54) *Epígrafe:* TERAPIA DE TUMORES

(57) *Resumo:*



DESCRIÇÃO

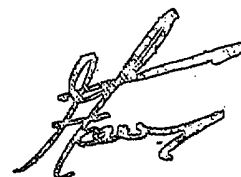
"Terapia de tumores"

Antecedentes do invento

O direccionamento para cancros, de drogas, radio-isótopos e toxinas, tem feito uso de anticorpos contra antigénios associados a tumores, ou fragmentos desses anticorpos. Em geral, os anticorpos contra antigénios associados a tumores acumulam-se nos tumores de forma mais eficaz do que qualquer outra classe de moléculas que não possuem nenhuma base conhecida para se ligarem a células de tumor. O processo de acumulação de moléculas em massas de tumor e os factores que afectam a sua distribuição foram já descritos por vários autores (Jain, 1989, Szerkerke & Driscoll, 1977). Quando expressos como uma percentagem da dose administrada por grama de tumor em ratinhos nus com xenoenxertos de cancro humano, os valores para os anticorpos estão geralmente na gama de 2-10%. Em humanos, os valores são cerca de 1000 vezes menores (Mach *et al.*, 1980, Dykes *et al.*, 1987), mas, fazendo a extrapolação da dose proporcionalmente à massa corporal, as concentrações de anticorpos no tumor atingem valores comparáveis aos obtidos no modelo de ratinho.

Foi reivindicado que os conjugados preparados por ligação de drogas a anticorpos ou fragmentos de anticorpo são mais eficazes do que a administração convencional de drogas (Garnett & Baldwin, 1986), mas nenhum obteve até agora aceitação clínica. As moléculas grandes, como os anticorpos têm tendência a fornecer menos droga do que o que pode ser fornecido por administração convencional da droga livre, porque a quantidade de droga que pode ser ligada a um anticorpo sem perda de actividade de ligação é limitada, o tamanho grande dos anticorpos limita a quantidade de anticorpo que se liga aos tumores e é muitas vezes necessário internalizar os conjugados anticorpo-droga, a fim de libertarem a droga.

A fim de ultrapassar esta limitação do fornecimento de drogas, avançou-se com a ideia de ligar uma enzima a um anticorpo, ou fragmento de anticorpo (Bagshawe, 1987, Bagshawe *et al.*, 1988, Senter *et al.*, 1988) e, após deixar passar o tempo suficiente para que a enzima se localize nos locais de tumor,



administrar uma prodroga que é um substrato para a enzima, sendo o produto final da catálise um composto citotóxico. O objectivo desta abordagem é maximizar a concentração de droga no interior dos tumores e minimizar a concentração de droga em tecidos normais. O sistema tem sido descrito como "terapia com prodrogas de enzimas dirigidas por anticorpos" ("*Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy*") (ADEPT). Era evidente, na altura do desenvolvimento da abordagem de ADEPT, que era necessário ultrapassar três problemas principais (Bagshawe, 1989). O primeiro era a necessidade de prodrogas que gerassem drogas com uma semivida curta, de modo a minimizar a quantidade de droga que se escapa dos locais do tumor, indo afectar desse modo tecidos normais vulneráveis, como a medula óssea. Em segundo lugar, era necessário assegurar que a enzima não estivesse presente em tecidos normais quando a prodroga fosse administrada, uma vez que isso iria permitir a produção da droga citotóxica em tecidos normais e seria limitante da dose. Em terceiro lugar, foi reconhecido que era vantajoso conjugar enzimas derivadas de espécies não humanas, que não possuem nenhum homólogo humano, de forma a evitar a activação por enzimas endógenas. No entanto, a especificidade de acção conferida pelas enzimas bacterianas, por exemplo, acarreta a desvantagem de uma alta imunogenicidade.

Embora inicialmente as prodrogas produzidas para a abordagem de ADEPT originassem drogas com semividas longas, foram desenvolvidas subsequentemente prodrogas que originam drogas com semividas curtas (Blakey *et al.*, 1996, Jungheim & Shepherd, 1994).

A questão de assegurar que existe pouca ou nenhuma enzima presente no sangue e tecidos normais quando a prodroga é administrada, estava aberta a uma gama de soluções possíveis (Sharma *et al.*, 1994). Um dos métodos que demonstrou ser eficaz era a administração de um anticorpo monoclonal dirigido para a enzima após o conjugado anticorpo-enzima estar localizado no tumor e antes de a prodroga ser administrada (Bagshawe, 1989; WO 89/10140; Sharma *et al.*, 1994). Verificou-se que um anticorpo que inactivasse a enzima seria extremamente eficiente. Este anticorpo poderia inactivar a enzima no sangue, em tecidos normais e em locais do tumor. A fim de acelerar a eliminação no sangue, do anticorpo que inactiva a enzima e, desse modo, minimizar a sua penetração no tumor, ligaram-se resíduos adicionais de galactose ao anticorpo. Quando o anticorpo anti-enzima galactosidado foi



fornecido, isso resultou na eliminação rápida a partir do sangue do anticorpo galactosidado e dos complexos formados entre este e o conjugado anticorpo-enzima. A evidência é consistente com o facto de o anticorpo anti-enzima e o complexo serem absorvidos pelos hepatócitos que expressam receptores de galactose. Os tumores removidos de ratinhos nus que receberam o conjugado anticorpo-enzima seguido de anticorpo anti-enzima galactosidado, não apresentaram nenhuma redução significativa na actividade da enzima, embora a actividade enzimática no sangue se tivesse reduzido rapidamente para valores abaixo do limite de sensibilidade do método espectrofotométrico utilizado. Quando utilizado clinicamente, os resultados da eliminação no sangue da actividade da enzima eram semelhantes aos obtidos no ratinho.

Têm havido várias variações à abordagem da ADEPT básica. Em WO 93/13805 (Bagshawe), a enzima em vez de converter uma prodroga menos citotóxica numa droga mais citotóxica, converteu localmente um inibidor de um composto citotóxico, fornecido sistemicamente, num composto menos inibidor. Em WO 93/13806 (Bagshawe), um inibidor de um composto citotóxico (produzido localmente pela abordagem da ADEPT) foi restringido ao compartimento vascular, de forma que o composto citotóxico era inibido ou inactivado quando deixava o local do tumor.

Em todas estas publicações do tipo ADEPT, o fornecimento de enzima ao tumor foi conseguido utilizando um anticorpo específico para tumores ou um seu fragmento.

Embora os anticorpos e os seus fragmentos dirigidos para antigénios associados a tumores se acumulem em locais de tumores que expressam o antigénio alvo em maior concentração do que qualquer outra classe de moléculas, quando medido em comparação com concentrações do mesmo anticorpo ou fragmento em tecidos normais, sabe-se desde há muito (Duran-Reynolds, 1939) que as macromoléculas se acumulam de forma não específica em tumores. Esta acumulação não específica de macromoléculas é, na realidade, um componente na distribuição favorável tumor:não tumor, de anticorpos dirigidos para antigénios associados a tumores. As macromoléculas que se sabe acumularem-se em tumores, de forma não específica, incluem a albumina, imunoglobulinas, transferrina, lipossomas, nanopartículas e polímeros biodegradáveis, incluindo dextranos, polietilenoglicol, polilisina e

hidroxipropilmetilacrilamida. As macromoléculas acumulam-se nos tumores humanos xenoenxertados em ratinhos nus até cerca de 2,0% da dose administrada, por grama de tumor. Verificou-se que as macromoléculas, como o polietilenoglicol e os dextranos, modificam a taxa de eliminação das substâncias a que estão ligados e modificam a sua concentração em tumores (Melton *et al.*, 1987, Eno-Amooquaye *et al.*, 1996). Em tumores excepcionais, uma macromolécula não específica pode-se acumular numa maior concentração do que um anticorpo dirigido para o antigénio segregado (Searle *et al.*, 1981).

A verificação de que estas moléculas se acumulam no tecido de tumor sólido tem sido designada por efeito de "permeabilidade e retenção aumentadas" (efeito EPR) e é atribuído ao vazamento dos capilares do tumor e a uma drenagem linfática deficiente (Matsumura, Y. & Macda H., 1986).

As macromoléculas têm sido utilizadas como transportadores para drogas (Blair & Ghose, 1983) e tem-se reivindicado que as drogas ligadas a macromoléculas têm uma eficácia superior, em relação às drogas livres (Duncan *et al.*, 1988). Em parte, a eficácia superior baseia-se na toxicidade reduzida da droga conjugada. A acumulação diferencial de macromoléculas entre tecidos de tumor e não de tumor, poderá não assegurar que a concentração de droga fornecida pelas macromoléculas excede a fornecida por administração da droga livre. Isto resulta do número limitado de moléculas de droga que podem ser ligadas a uma macromolécula e ao menor número de macromoléculas que podem ser fornecidas a qualquer tecido, comparativamente a uma droga de baixo peso molecular; isto é, a concentração molar de macromoléculas é mais baixa. Isto pode ser a razão porque os peritos na arte ainda não equacionaram a utilização de uma absorção não específica de macromoléculas, para fornecer a enzima, numa abordagem do tipo ADEPT.

A US 5,561,119 de Jaquesy *et al.*, refere-se a prodrogas glicosiladas e sua utilização com conjugados imunoenzimáticos específicos de tumores, para o tratamento do cancro.

Seymour (1992) *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems* 9, 135-187 discute a acumulação de macromoléculas solúveis e conjugados de drogas em tumores.

A EP O 028 917 discute a utilização de vesículas de lípidos para fornecer uma molécula ou medicamento traçador. As vesículas acumulam-se preferencialmente no sistema linfático e/ou no pulmão, baço ou fígado.

A EP O 142 905 discute as limitações do direccionamento imunitário para células de tumor, particularmente as que resultam da heterogeneidade das células de tumor e sugere um método que utiliza o direccionamento imunitário para fornecer um agente citotóxico a uma região de tumor, em que o efeito tóxico não se limita às células que possuem o antigénio adequado.

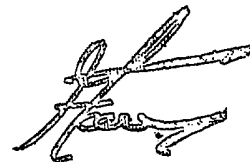
Em WO 91/08770 descreve-se a acumulação de um agente de diagnóstico ou terapêutico no local de um tumor, em que a acumulação resulta da clivagem de um complexo solúvel substrato-agente por um conjugado anticorpo-enzima imobilizado num local ao qual um anticorpo se pode ligar de forma selectiva.

A CA 1 227 427 descreve o efeito sinérgico na progressão do tumor da administração de polissulfato de condroitina, tripsina e ciclofosfamida; os três agentes não são ligados e não está descrita uma acumulação no tumor.

Pimm & Hudecz (1996) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **122**, 45-54 descreve a distribuição de macromoléculas marcadas radioactivamente em ratinhos.

Em WO 92/13570 descrevem-se complexos que facilitam a absorção de ácidos nucleicos por células eucarióticas.

Têm-se ligado macromoléculas na forma de polímeros a enzimas, incluindo a L-asparaginase (Keating *et al.* (1993) *Leukaemia Lymphoma* **10**, 153-157), uricase (Chua *et al.* (1988) *Annals Int. Med.* **109(2)**, 114-117), fenilalanina-amoniaco-ligase (Wieder *et al.* (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 12579-12587), glutaminase-asparaginase (Abuchowski *et al.* (1981) *Cancer Treat. Rep.* **65**, 1077-1081) e triptofanase (Yoshimoto *et al.* (1985) *Enzyme* **36**, 261). Em todos estes exemplos, a finalidade era a de que a enzima exercesse um efeito em substratos que ocorrem naturalmente em tecidos.



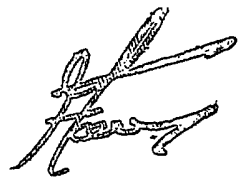
Sumário do invento

Verifiquei agora que a absorção não específica (efeito EPR) de uma macromolécula por um tumor, é suficiente para fornecer um nível apropriado da enzima num sistema do tipo ADEPT e que se pode alcançar uma razão adequada entre droga citotóxica associada ao tumor e droga não associada ao tumor, se o conjugado enzima-macromolécula for eliminado ou inibido quando longe do tumor. Esta abordagem é aplicável a qualquer sistema ADEPT descrito acima, mas deverá talvez ser designada por MDEPT ("terapia com prodrugas de enzimas dirigidas por macromoléculas"; "*Macromolecule Directed Enzyme Prodrug Therapy*").

Assim, num aspecto o invento proporciona um sistema terapêutico de três componentes que compreende (i) um primeiro composto, (ii) uma macromolécula catalítica que não se liga de forma específica a um antigénio de tumor, mas que é capaz, após administração ao compartimento vascular de um mamífero, de ser absorvida por um tumor no mamífero e é capaz de converter o primeiro composto num segundo composto, e (iii) um inibidor que, após administração ao referido compartimento vascular, reduz o nível da referida actividade de conversão catalítica no compartimento vascular e tecidos normais.

Deve entender-se que o termo "tumor" se refere a todas as formas de crescimento de células neoplásicas, incluindo tumores do pulmão, fígado, células sanguíneas, pele, pâncreas, estômago, cólon, próstata, útero, mama, glândulas linfáticas e bexiga. Os tumores sólidos são especialmente adequados.

As vantagens potenciais da utilização de macromoléculas que não são anticorpos, para este fim, são substanciais. Em primeiro lugar, pode-se seleccionar uma macromolécula não específica que não é imunogénica. Em segundo lugar, o custo da produção de uma macromolécula pode ser muito menor do que o de um anticorpo antitumoral humanizado. Em terceiro lugar, verificou-se que alguns polímeros reduzem, ou eliminam, a imunogenicidade de proteínas, incluindo enzimas, ligadas a eles (Abuchowski *et al.*, 1977, Wileman *et al.*, 1986, Mikolajczyk *et al.*, 1996). Em quarto lugar, enquanto que um anticorpo se liga apenas a uma gama limitada de cancros (apenas existem anticorpos para cerca de 60% de todas as malignidades), a absorção de



macromoléculas por tumores, parece ser uma característica comum a todos os cânceros sólidos até agora analisados.

Assim, muitos tumores, como os sarcomas, para os quais não foram referidos ainda anticorpos selectivos, podem ser tornados alvos, com base neste princípio.

A existência de um diferencial relativamente baixo entre tecidos de tumor e que não de tumor com macromoléculas não específicas apenas pode ser explorado se o nível de enzima no tecido normal for inibido, utilizando por exemplo um anticorpo anti-enzima galactosidado. De forma a obter a quantidade necessária de enzima para locais de tumor, quando a enzima é conjugada com uma macromolécula não específica, será necessário administrar uma maior quantidade de um conjugado deste tipo, do que seria o caso de um conjugado enzima-anticorpo específico, mas o menor custo do primeiro deverá compensar a sua menor eficiência.

De preferência, a macromolécula utilizada no invento é hidrófila e caracteriza-se por ser solúvel em fluidos corporais e em fluidos convencionais para administração parentérica. De forma adequada, a macromolécula é biodegradável, de forma que se impede uma acumulação sistémica durante uma administração repetida. Como é evidente, no entanto, esta não deverá ser degradada tão rapidamente que não se consiga acumular no local do tumor. De preferência, quando conjugado com a enzima seleccionada, o peso molecular e o tamanho do conjugado excedem o do limiar renal para a excreção urinária (PM 60 000), na medida em que isso auxilia a que a concentração no sangue seja suficiente para proporcionar um gradiente de concentração no sangue:tumor eficaz. Geralmente é adequado um peso molecular até pelo menos 800 000, por exemplo até 160 000. A macromolécula é de preferência uma macromolécula que não é facilmente capturada pelo sistema reticuloendotelial. De modo a torná-la catalítica, a macromolécula pode ser conjugada com uma ou mais moléculas de enzima, por métodos químicos simples, utilizando agentes bifuncionais que não degradam a enzima ligada. De preferência, a macromolécula de partida confere uma imunogenicidade reduzida a uma enzima imunogénica à qual está conjugada.

Os pesos moleculares dados excluem qualquer água de hidratação.

As macromoléculas que estão disponíveis como subunidades e não são biodegradáveis, podem ser ligadas por unidades ligantes biodegradáveis, de modo que os componentes não biodegradáveis são filtrados através dos rins e excretados na urina.

Alternativamente, quando o polímero utilizado para fazer a macromolécula não é biodegradável, é preferido que o peso molecular de qualquer porção não biodegradável do conjugado seja inferior ao limite renal (cerca de 70000), de modo a que após a degradação da porção biodegradável, a porção não biodegradável residual seja excretada através dos rins.

Apesar de se saber que algumas moléculas não são internalizadas pelas células, há outras, como a N-(2-hidroxipropil)metilacrilamida que são internalizadas por mais do que um mecanismo (Duncan *et al*, 1996)

De preferência, a macromolécula é polietilenoglicol (PEG). Verificou-se várias vezes, que a derivatização de proteínas com polietilenoglicol aumenta o seu tempo de vida de circulação no sangue, bem como diminui as suas antigenicidade e imunogenicidade. Foram desenvolvidos diversos métodos para ligar o PEG a proteínas e estes estão resumidos na tabela 1.

De forma conveniente, a macromolécula pode ser, excluindo a transferrina, qualquer dextrano; um poliaminoácido; ou uma proteína não específica para tumores, tal como uma imunoglobulina ou uma albumina. De forma adequada, pode ser um copolímero de estireno e anidrido maleico ou pode ser poli(ácido aspártico), poli-L-lisina ou polietilenoimina.

A macromolécula catalítica não é específica para o tumor. Assim, por exemplo, não consiste num anticorpo ou numa sua parte que se ligue especificamente a um antigénio associado a um tumor. Pode compreender, apesar disso, imunoglobulinas não específicas.

A vantagem de se poder utilizar uma macromolécula que não um anticorpo para direccionar uma enzima para locais de um tumor, estende-se a outras aplicações de enzimas localizadas em tumores. Algumas moléculas, em particular alguns polímeros, são conhecidos por serem rapidamente internalizados por células de tumores, de modo que se pode tirar vantagem de

enzimas, como a nitro-redutase, que necessitam de cofactores intracelulares, como o NAD(P)H (a forma reduzida do nicotinamida-adenina-dinucleótido (fosfato)) para activar prodrogas que também são internalizadas e convertê-las em substâncias citotóxicas altamente potentes. Estes agentes citotóxicos são portanto capazes de matar as células que internalizam a macromolécula de enzima e a prodroga e de libertar a droga tóxica em quantidade suficiente para o espaço extracelular, a fim de se obter uma concentração de droga citotóxica que seja letal para as células adjacentes (veja-se o pedido de patente US No. 60/009,361, apresentado em 29 de Dezembro, 1995, aqui incorporado para referência, que é publicado como WO 97/24143; PCT/GB96/03254). Por exemplo, pode-se formar um conjugado entre a nitro-redutase de *E. coli* e a macromolécula (por exemplo hidroxipropilmetilacrilamida), que é internalizada nas células.

Opcionalmente, após inactivação ou remoção da nitro-redutase intravascular (por exemplo com anticorpo anti-nitro-redutase, de preferência poligalactosilado) (veja-se mais à frente), a prodroga CB 1954 (Knox *et al.* (1993) *Cancer & Metastasis Rev.* **12**, 195-212) é administrada e é activada de forma selectiva nas células de tumor pois (i) as células de tumor têm um nível maior de nitro-redutase e (ii) a nitro-redutase apenas funciona na presença do cofactor (intracelular) NAD(P)H ou NRH (nicotinamida-ribósido). O derivado benziloxicarbonilo de actinomicina D também pode ser utilizado como uma prodroga (libertando actinomicina D, veja-se Mauger *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* **37**, 3452-3458) com este sistema baseado em redutase.

Numa concretização preferida do invento, utiliza-se uma enzima humana NQO2. A NQO2 é a NAD(P)H:quinona-óxido-redutase 2 e a sua utilização na terapia direccionada para tumores em conjunção com uma prodroga, como o CB 1954 (5-(aziridin-1-il)-2,4-dinitrobenzamida), é descrita no pedido de patente GB 9712370.7, aqui incorporado para referência. De preferência, nesta concretização, utiliza-se um cofactor que é excluído das células, tal como o ácido nicotínico.

O ADNc que codifica para a NAD(P)H:quinona-redutase 2 (NQO2) humana é descrito em Jaiswal *et al.* (1990) *Biochemisrty* **29**, 1899-1906 e a estrutura genética do gene de NQO2 é descrita em Jaiswal (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 14502-14508, sendo ambos aqui incorporados para referência. O

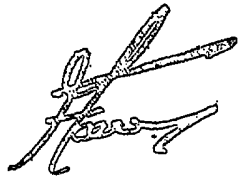
perito na arte pode obter e manipular facilmente o ADN que codifica para o NQO2, com base nos ensinamentos aqui contidos, utilizando técnicas de engenharia genética e de ADN recombinante, que são bem conhecidas, estando algumas descritas em Sambrook *et al.* (1989), "Molecular Cloning, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque.

Pode-se utilizar uma variante, ou fragmento, ou fusão, ou derivado de NQO2, em vez da NQO2 com a sequência de aminoácidos dada, desde que tenha substancialmente a mesma actividade que a NQO2 contra uma dada prodroga. A enzima NQO2 catalisa a conversão de, por exemplo, a prodroga CB 1954 e seus análogos prodrogas. Assim, de preferência, a variante, ou fragmento, ou fusão, ou derivado de NQO2 tem substancialmente a mesma actividade contra o CB1954 que a própria NQO2. De forma conveniente, a referida variante, ou fragmento ou fusão, ou derivado tem pelo menos 0,1 x a k_{cat}/K_m de NQO2, mais preferencialmente pelo menos 0,5 x e ainda mais preferencialmente, pelo menos 0,9 x a k_{cat}/K_m de NQO2.

De preferência, a variante, ou fragmento, ou fusão, ou derivado de NQO2 tem também substancialmente a mesma especificidade para o cofactor. De preferência, a variante, ou fragmento, ou fusão, ou derivado de NQO2 pode utilizar ácido nicotínico como cofactor. De preferência a variante, ou fragmento, ou fusão, ou derivado de NQO2 liga-se ao cofactor pelo menos 0,1 x tão bem como a própria NQO2, mais preferencialmente pelo menos 0,5 x tão bem e ainda mais preferencialmente, pelo menos 0,9 x tão bem.

De preferência, a activação da prodroga pela NQO2 ocorre no espaço extracelular e utiliza-se um cofactor, como o ácido nicotínico, que não é internalizado pela célula.

Quando se aplica o presente invento à abordagem de ADEPT básica, ou a qualquer dos seus desenvolvimentos acima mencionados, o sistema de enzima e prodroga pode ser qualquer dos anteriormente propostos. A substância citotóxica pode ser qualquer droga anti-cancro existente, tal como um agente alquilante; um agente que se intercala no ADN; um agente que inibe quaisquer enzimas chave como a di-hidrofolato-redutase, a timidina-sintetase, a ribonucleótido-redutase, nucleósido-quinases ou topoisomerase; ou um agente



que causa a morte celular por interacção com qualquer outro constituinte celular. O etopósido é um exemplo de um inibidor da topoisomerase.

Os sistemas de prodrogas descritos incluem: uma prodroga de mostarda de fenol activada por uma β -glucuronidase de *E. coli* (Wang *et al.*, 1992 e Roffler *et al.*, 1991); uma prodroga de doxorubicina activado por uma β -glucuronidase humana (Bosslet *et al.*, 1994); outras prodrogas de doxorubicina activadas por α -galactosidase de grão de café (Azoulay *et al.*, 1995); prodrogas de daunorubicina, activadas por α -D-galactosidase do grão de café (Gesson *et al.*, 1994); uma prodroga de fluorouridina activada por uma β -D-galactosidase de *E. coli* (Abraham *et al.*, 1994); e prodrogas de metotrexato (e.g. metotrexatoalanina) activadas por carboxipeptidase A (Kuefner *et al.*, 1990, Vitols *et al.*, 1992 e Vitols *et al.*, 1995). Estes e outros estão incluídos na tabela seguinte.

Enzima	Prodroga
Carboxipeptidase G2	Derivados de ácido L-glutâmico e mostardas de ácido benzóico, mostardas de anilina, mostardas de fenol e mostardas de fenilenodiamina; derivados fluorados destes
Fosfatase alcalina	Fosfato de etopósido Fosfato de mitomicina
Beta-glucuronidase	Mostarda de <i>p</i> -hidroxianilina-glucurónido Epirubicina-glucurónido
Penicilina-V-amidase	Adriamicina-N-fenoxiacetilo
Penicilina-G-amidase	N-(4'-hidroxifenilacetil)palitoxina Doxorubicina e melfalano
Beta-lactamase	Mostarda de azoto - cefalosporina- <i>p</i> -fenilenodiamina; derivados de doxorubicina; derivados de vinblastina- cefalosporina, mostarda de cefalosporina, um derivado de taxol
Beta-glucosidase	Ácido cianofenilmetil-beta-D-glucopiranosidurónico
Nitro-redutase	5-(Azaridin-1-il)-2,4-dinitrobenzamida
Citosina-desaminase	5-fluorocitosina
Carboxipeptidase A	Metotrexato-alanina

(Esta tabela é adaptada de Bagshawe (1995) *Drug Dev. Res.* **34**, 220-230, de onde se podem obter referências completas destes vários sistemas; o derivado de taxol é descrito por Rodrigues *et al* (1995)).

Exemplos de enzimas adequadas para fazer parte das macromoléculas catalíticas do invento incluem: exopeptidases, como as carboxipeptidases G, G1 e G2 (para prodrogas mostarda glutamilados), carboxipeptidases A e B (para prodrogas baseadas em MTX) e aminopeptidases (para prodrogas de 2- α -aminocil-MTC); endopeptidases, como, e.g. a trombolisina (para prodrogas de trombina); hidrolases, tal como fosfatases (e.g. fosfatase alcalina) ou sulfatases (e.g. aril-sulfatases) (para prodrogas fosforiladas ou sulfatadas); amidases,



como penicilina-amidases e arilacrilo-amidase; lactamases, como β -lactamases, glicosidases como a β -glucuronidase (para antraciclinas de β -glucoronamida), α -galactosidase (para amigdalina) e β -galactosidase (para antraciclina de β -galactose); desaminases, como a citosina-desaminase (para 5FC), quinases, como a uroquinase e a timidina-quinase (para ganciclovir); redutases, como a nitro-redutase (para CB1954 e análogos), azo-redutase (para mostardas de azobenzeno) e DT-diaforase e N20 N202 (ambas para CB1954); oxidases como a glucose-oxidase (para glucose), xantina-oxidase (para xantina) e lactoperoxidase; DL-racematos, anticorpos catalíticos e ciclodextrinas.

É provável que a porção catalítica da macromolécula, tipicamente uma enzima ou uma sua parte, seja activa isolada do resto da macromolécula, mas é necessário apenas que seja activa quando (a) está em combinação com o resto da macromolécula e (b) a macromolécula catalítica está ligada a, adjacente a, ou internalizada nas células alvo.

As duas funções da macromolécula catalítica podem estar localizadas em suas porções separadas. Quando cada uma destas porções é um polipéptido, as duas porções podem ser ligadas uma à outra, por qualquer meio convencional de reticulação de polipéptidos, como os que são descritos de um modo geral em O'Sullivan *et al* (1979) *Anal. Biochem.* **100**, 100-108. Por exemplo, a porção de polipéptido pode ser enriquecida com grupos tiol e a porção de enzima pode ser feita reagir com um agente bifuncional capaz de reagir com esses grupos tiol, por exemplo o éster de N-hidroxissuccinimida do ácido iodoacético (NHIA) ou N-succinimidil-3-(2-piridiltio)propionato (SPDP). As ligações amida e tioéter, que se obtêm por exemplo com éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxissuccinimida são geralmente mais estáveis *in vivo* do que as ligações dissulfureto.

Alternativamente, o composto pode ser produzido na forma de um composto de fusão por técnicas de ADN recombinante, em que um comprimento de ADN compreende as regiões respectivas que codificam para as duas porções do composto de acordo com o invento, quer adjacentes uma à outra, quer separadas por uma região que codifica para um péptido ligante que não destrói as propriedades desejadas do composto. É concebível que as duas porções do composto se possam sobrepor, total ou parcialmente.

O ADN é então expresso num hospedeiro adequado para produzir um polipéptido que compreende o composto de acordo com o invento.

Uma parte importante do sistema de três componentes de acordo com o invento é o inibidor. Este inibe a actividade, ou reduz a quantidade, da enzima no compartimento vascular, o que resulta numa redução da enzima em tecidos normais, proporcionando deste modo um diferencial adequado entre a quantidade, ou o efeito, da enzima no tumor e no resto do corpo. Pode-se obter a inactivação do local catalítico e/ou a eliminação da macromolécula catalítica, como descrito em WO 89/10140.

Por exemplo, pode-se utilizar um anticorpo que se liga no, ou próximo do local catalítico, e desse modo bloqueando-o; estes anticorpos (de preferência monoclonais ou humanizados) podem ser produzidos ou expressos por meio de técnicas convencionais. A eliminação acelerada da macromolécula catalítica pode ser conseguida, utilizando um anticorpo que tem resíduos adicionais de galactose ou outros açúcares adicionados para acelerar a eliminação, ou pode ser dessializado. A galactosilação do anticorpo resulta na sua rápida eliminação a partir do sangue, através da absorção por receptores de galactose em hepatócitos. Alternativamente, ou adicionalmente, o conjugado anticorpo-enzima é galactosilado e fornecido após os receptores de galactose hepática terem sido bloqueados pela mucoproteína da glândula sub-maxilar asialo-bovina, ou por um anticorpo dirigido ao receptor de galactose hepático, ou outra molécula com uma afinidade elevada para o receptor de galactose. A substância bloqueadora é mantida no plasma durante um período de até 24 horas, de modo que o complexo anticorpo-enzima se localiza em locais de tumores, mas no final do bloqueamento do receptor de galactose, o anticorpo-enzima galactosilado é rapidamente eliminado através dos receptores de galactose disponíveis. O anticorpo pode ser dirigido para qualquer parte da macromolécula catalítica, uma vez que a sua função é eliminá-lo e não (ou pelo menos não apenas) bloquear a acção catalítica. Alternativamente, podem-se utilizar inibidores enzimáticos de moléculas pequenas; estes são por exemplo descritos em WO 97/20580 e aqui incorporados para referência. Para qualquer enzima, os inibidores de moléculas pequenas preferidos são os indicados como preferidos para essa enzima em WO 97/20580.

De preferência, o composto pequeno, inactivador da enzima, é um

composto que inibe a conversão do primeiro composto no segundo composto, numa extensão útil. A extensão da inibição é de preferência $>5\%$, mais preferencialmente $>10\%$, ainda mais preferencialmente $>50\%$ e o mais preferencialmente $>90\%$.

De preferência, quando a macromolécula catalítica compreende uma enzima, ou outra macromolécula com actividade catalítica, o referido inibidor liga-se ao local activo da enzima ou outra macromolécula.

Em "local activo" inclui-se qualquer local na enzima ou outra macromolécula que influencia a actividade catalítica, quer esse seja ou não o local de catálise.

Com mais preferência, o referido inibidor liga-se ao local activo da enzima, ou outra macromolécula, e, ainda mais preferencialmente, a referida molécula não está exposta na superfície da enzima ou outra macromolécula.

De preferência, o inibidor é uma molécula relativamente pequena e é ainda preferido que a molécula tenha uma massa molecular relativa inferior a 10000, mais preferencialmente inferior a 5000 e mais preferencialmente inferior a 1000.

É particularmente preferido que o inibidor seja um inibidor substancialmente irreversível. Em "inibidor substancialmente irreversível" inclui-se um inibidor que, uma vez ligado a uma enzima ou outra macromolécula com actividade catalítica, inibe substancialmente a actividade catalítica e é pouco provável que se solte.

É particularmente preferido que a k_{cat} da referida enzima ou outra macromolécula com actividade catalítica, relativamente ao inibidor, seja $<10s^{-1}$, de preferência $<1s^{-1}$, mais preferencialmente $<0,1s^{-1}$, ainda mais preferencialmente $<0,01s^{-1}$ e o mais preferencialmente, substancialmente $0s^{-1}$

É também particularmente preferido que o K_i da referida enzima, ou outra macromolécula com actividade catalítica, relativamente ao inibidor seja $<100 \mu M$, de preferência $<1 \mu M$, mais preferencialmente $<1nM$ e ainda mais preferencialmente, substancialmente nulo.

Em WO 97/20580 descrevem-se inibidores de CPG2, sendo todos aqui incorporados para referência.

Os inibidores para utilização com outras enzimas (tal como enumeradas) incluem:

a) **Carboxipeptidase A** (Haenseler *et al.* (1992) *Biochemistry* **31**, 214-220: Hidrolisa a ligação peptídica terminal adjacente ao grupo carboxilo livre. Especificidade vasta, actividade máxima com grupo aromático lateral (Figura 6. Inibidores possíveis para esta enzima também são apresentados, Figura 7)

b) **Glucuronidase** (Mitaku *et al.* (1994) *Ann. Oncol.* **5** (Suppl. 5), 76: as lactonas de açúcar são conhecidas como sendo inibidores desta enzima, tal como a 1,4-lactona do ácido D-sacárido para a β -glucuronidase

c) **β -Lactamase** (Svensson *et al.* (1993) *Bioconj. Chem.* **3**, 176-181: o ácido clavulânico é um inibidor conhecido desta enzima. São também conhecidas outras estruturas, sulbactama, tienamicina e imipenem. Os antibióticos potentes nesta família possuem propriedades inibitórias da β -lactamase e têm assim milhares de derivados. No entanto, os compostos acima são os mais potentes, conhecidos actualmente.

Deve ter-se em conta que podem se podem utilizar os sais de moléculas inibidoras, na prática do presente invento.

Numa outra concretização, é preferido que o inibidor seja proporcionado na forma de um precursor.

De forma adequada, o precursor do referido inibidor compreende a referida molécula numa forma capaz de libertar o referido inibidor num hospedeiro, tal como um paciente. Assim, o precursor pode compreender o referido inibidor ligado a uma entidade através de uma ligação, sendo a referida ligação biodegradável (e portanto clivável no hospedeiro), ou o precursor pode compreender o referido inibidor ligado a uma entidade, através ou não de uma ligação, sendo a referida entidade biodegradável. Em qualquer caso, o inibidor é libertado do precursor no hospedeiro, tal como no paciente a ser tratado.



O sistema inactivador de enzimas de molécula pequena pode ainda ser modificado de modo a abranger uma macromolécula biodegradável. Esta concretização tem moléculas de inibidor ligadas de forma covalente, de forma a que o inibidor-macromolécula não seja capaz de inibir a enzima enquanto esta estiver ligada à macromolécula. No entanto, por degradação em tecidos normais, o inibidor é libertado e difunde-se, de modo a inibir qualquer enzima na sua vizinhança. As características do inibidor-macromolécula podem ser modificadas quimicamente de modo a se ajustarem à localização da distribuição necessária para a terapia, evitando assim uma inibição no local do tumor. Exemplos deste tipo de sistema estão descritos em WO 97/20580, aqui incorporado para referência.

Alternativamente, pode-se utilizar uma porção química que reage espontaneamente com a droga citotóxica activa ou que o faz de forma mais eficaz na presença de um catalisador adequado. Por exemplo, no caso de um agente alquilante como droga, o inibidor pode compreender uma substância que contém tiol e uma glutatona-transferase transportada sobre, ou numa entidade, para restringir a glutatona-transferase ao compartimento vascular (descrito a seguir em maior pormenor). Um inibidor deste tipo compreende assim (i) uma porção inactivadora (i.e., a porção química ou a enzima que actua na porção química) e (ii) uma porção responsável pelo restringimento.

A porção inactivadora pode ser conjugada com a porção de restringimento de acordo com métodos de ligação conhecidos na arte, retendo desse modo o composto de acordo com o invento no compartimento vascular.

A porção de restringimento tem que ser biologicamente compatível com todas as funções do sangue e os órgãos corporais e deverá ser biodegradável, embora a degradação possa ocorrer lentamente. É necessário que a entrada da porção de restringimento no espaço extracelular do tumor seja mínima. Segue-se desta última condição, que a porção inactivadora não deverá ser libertada num estado livre da porção de restringimento, a menos que a porção inactivadora livre seja rapidamente removida do sangue, limitando assim o seu acesso ao espaço extracelular do tumor.

A porção de restringimento pode ser um corpúsculo de um glóbulo vermelho. De forma adequada, o composto pode ser colocado sobre, ou dentro



dos corpúsculos de glóbulos vermelhos, utilizando técnicas conhecidas na arte, para fazer com que as moléculas entrem nos corpúsculos de glóbulos vermelhos. A porção inactivadora pode ser ligada à membrana do eritrócito, ou pode ser introduzida no eritrócito e retida neste.

Foi descrito um método para a introdução de agentes desejados em glóbulos vermelhos de mamífero sem ocorrência de uma perda inaceitável do conteúdo celular (US 4931276 aqui incorporada para referência). Este método compreende (a) suspender e incubar as células numa solução que contém um composto que se difunde rapidamente para dentro e para fora das células, sendo a concentração do composto suficiente para originar a difusão para dentro das células, de forma que o seu conteúdo se torna hipertónico; (b) criar rapidamente um gradiente osmótico transmembranar, através da diluição da solução que contém as células hipertónicas com um meio aquoso isotónico, na presença de pelo menos um agente a ser introduzido, de modo a causar a difusão da água para dentro das células com um conseqüente inchamento e aumento da permeabilidade das membranas exteriores e (c) manter o aumento de permeabilidade das membranas, durante um tempo suficiente apenas para permitir o transporte do agente para dentro das células e a difusão do referido composto para fora das células. Este método é especialmente útil com o mecanismo de "pulso osmótico" da US4478824 para o carregamento das células.

A US4652449 (aqui incorporada para referência) descreve um outro método para a encapsulação de uma substância biologicamente activa em eritrócitos de mamífero que compreende (a) alimentar de forma contínua uma suspensão aquosa de eritrócitos no compartimento principal de uma unidade de diálise, cujo segundo compartimento contém uma solução aquosa que é hipotónica em relação à suspensão de eritrócitos, de modo a causar a lise dos eritrócitos e (b) pôr o lisado de eritrócitos em contacto, ou fazer com que seja contactado, com o(s) composto(s) biologicamente activo(s), fechando de novo as membranas de eritrócitos, através de um aumento da pressão oncótica e/ou osmótica do lisado.

Alternativamente, a porção de restringimento pode ser um lipossoma, ou um polímero de elevado peso molecular (> 25 000 Dalton, de preferência pelo menos 40 000 Dalton), tal como o dextrano, ou uma proteína como a

macroglobulina.

Os lipossomas com tempos de circulação prolongados são também transportadores potenciais para a porção inactivadora. Já se construíram lipossomas com tempos de circulação prolongados, de diferentes modos. Estes incluem a utilização de gangliósido GM1, ou uma mistura de esfingomiéline, fosfatidilcolina de ovo e colesterol, ou outros lípidos transportadores relativamente rígidos. Para cada tipo de lipossoma, a optimização por dimensionamento é também desejável, para optimizar uma permanência intravascular prolongada. Gabizon e Papahadjopoulos (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 6949-6953) verificaram que um tamanho de partículas médio de 100 nm é óptimo. No entanto, os lipossomas com um tempo de circulação prolongado são adequados apenas se não apresentarem uma absorção significativa em tumores.

Os dextranos são polissacáridos que consistem em unidades de α -D-glucose ligadas predominantemente por ligações 1-6. O dextrano parcialmente hidrolisado e fraccionado tem sido amplamente utilizado como expansor do plasma sanguíneo. Os dextranos são eliminados pelas dextranases que existem no fígado, no baço, no rim, na mucosa intestinal e no cólon (Rosenfeld *et al.* (1959) *Biokhimia [Engl]* **24**, 965-970; Ammon (1963) *Enzymologia* **25**, 245-251; Serry & Hehre (1956) *J. Bacteriol.* **71**, 373-380). Os dextranos que são retidos no compartimento vascular estão amplamente disponíveis com pesos moleculares médios de 40 kD (Gentran 40, Rheomacrodex), 70-75 kD (Gentran 70 Macrodex) e 110 kD. São potencialmente antigénicos e algumas pessoas têm anticorpos preexistentes, mas está descrito que as reacções a dextranos não são superiores às de outros agentes farmacêuticos amplamente utilizados e são de carácter moderado (Goodman e Gilman *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 8ª edição, Pergamon Press, Nova Iorque, Oxford, 1990).

Foram desenvolvidos outros transportadores poliméricos de drogas a partir de hidratos de carbono, péptidos e lípidos. Alguns destes podem ser porções de restringimento alternativas, adequadas para a porção inactivadora, desde que preencham os critérios aqui definidos.

A porção de restringimento pode ter, com vantagem, uma carga negativa e pode ter uma lipofilicidade baixa. De forma adequada, a porção de



restringimento é biodegradável. O termo "biodegradável" significa que a porção de restringimento é degradada no corpo do paciente e tem, portanto, uma semivida relativamente curta, por exemplo menos que 72 horas, de preferência menos que 48 horas.

O inibidor pode ser alternativamente, por exemplo, um anticorpo ou uma sua parte, que se liga à droga activa, mas não à prodroga correspondente, ou que apenas o faz numa extensão mais limitada.

A produção de anticorpos contra compostos de baixo peso molecular, como as drogas citotóxicas, pode ser facilitada pela técnica bem conhecida de haptização, em que a molécula de baixo peso molecular é conjugada com uma proteína altamente imunogénica, como a hemocianina de lapa do género *Fissurella*, ou outra molécula transportadora. Em situações em que a prodroga é convertida numa droga activa, por clivagem catalítica de uma porção da prodroga, a produção de um anticorpo capaz de discriminar entre prodroga e droga activa é favorecida, uma vez que na prodroga, a porção não activa pode inibir estereoquimicamente a ligação de um anticorpo anti-droga à porção de droga, assim escondida na prodroga.

Alternativamente, as macromoléculas catalíticas podem ser exploradas de forma benéfica no contexto dos compostos antimetabolito citotóxicos, para os quais existem componentes metabólicos normais e que podem ser utilizados para bloquear a acção do antimetabolito. Nesta situação, o referido "primeiro composto" é um metabolito normal e o "segundo composto" é um seu derivado que não bloqueia a acção do antimetabolito citotóxico. Pode-se utilizar a macromolécula catalítica (por exemplo um conjugado macromolécula-enzima) para degradar o metabolito nos locais de tumor, permitindo ao mesmo tempo que o metabolito proteja os tecidos normais. Neste caso, o conjugado macromolécula-enzima é primeiro administrado e deixa-se decorrer algum tempo para que este se localize em locais de tumor. Administra-se um anticorpo anti-enzima, p.ex. 24 horas após o conjugado de enzima e este tem o efeito de reduzir a actividade enzimática no sangue e tecidos normais, de modo que o antimetabolito e o metabolito co-administrados subsequentemente resultam em que o metabolito protege os tecidos normais, enquanto que no tecido de tumor, a enzima persistente inactiva o metabolito, expondo deste modo as células de tumor à acção do antimetabolito. Veja-se WO 93/13805; em particular a figura

2 de WO 93/13805, que ilustra o sistema em relação a CPG2 dirigido para a célula alvo e utilizado para remover o ácido folínico do local do tumor, de modo que deixa de haver inibição da acção do trimetrexato (aqui incorporado para referência).

Assim, qualquer substância suficientemente não tóxica, que no seu estado nativo é capaz de inibir o efeito de um agente citotóxico, pode ser convertida numa substância que tem um efeito menor no referido agente citotóxico. Um composto adequado é o ácido folínico. O ácido folínico inverte o efeito biológico do agente citotóxico trimetrexato, por exemplo, que actua na enzima di-hidrofolato-redutase. O ácido folínico é desglutamado e tornado inactivo contra o trimetrexato pela enzima carboxipeptidase G2 e outras enzimas desglutamantes.

A droga trimetrexato (NSC 352122; 2,4-diamino-5-metil-6-[3,4,5-trimetoxianilinometil]quinazolina) actua por ligação à di-hidrofolato-redutase; enquanto que o metotrexato entra nas células através de receptores de folato, o trimetrexato entra por mecanismo(s) alternativo(s). A síntese de trimetrexato é descrita por Baker (1967) em *Design of site-directed irreversible enzyme inhibitors*, Wiley, Nova Iorque e por Elslager *et al.* (1974) *Lectures in heterocyclic chemistry*, vol. 2, p. 97/5-133 (Castle & Townsend, ed), Hetero Corp, Oren, Utah. O trimetrexato pode ser adquirido da US Biosciences, One Tower Bridge, 100 Front Street, Suite 400, West Conshohocken, PA 19428, USA.

O metotrexato assemelha-se aos folatos naturais por ter uma porção terminal de ácido glutâmico que pode ser clivada por carboxipeptidase G2, enquanto o trimetrexato não é susceptível à acção desta enzima (Bagshawe (1985) *Clinical Radiol.* **36**, 545-551). A acção do trimetrexato em células de cancro do cólon *in vitro* pode ser aumentada por adição ao meio de cultura da enzima que degrada o folato, a carboxipeptidase G2 (Searle *et al* (1990) *Biochemical Pharmacol.* **39**, 1787-1791).

O efeito biológico tanto do metotrexato como do trimetrexato pode ser invertido por administração de um produto final da reacção que bloqueiam, ou através de um análogo disponível de forma mais acessível, conhecido como ácido folínico [ácido 5-formiltetra-hidrofólico]. O ácido folínico está amplamente

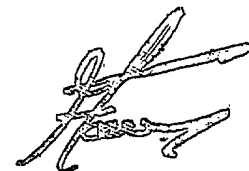
disponível, por exemplo na forma de Leucovorin da Cyanamid Inc., mas também da Wellcom Inc., e Farmitalia. Se o ácido folínico for dado numa dosagem suficiente ao mesmo tempo que o metotrexato ou trimetrexato, as suas acções são bloqueadas.

Pode-se aplicar o mesmo princípio a outras substâncias agentes anti-citotóxicos. Por exemplo, a timidina bloqueia o efeito de um agente citotóxico, como o CB3717 e ICI D1694 (Jodrell *et al.* 1991, *BJC* **64**, 833-8; Jones *et al.* (1986) *J. Med. Chem.* **29**, 468-472), que actua na enzima timidilato-sintetase. Assim, pode-se utilizar uma enzima que degrada a timidina (como a dihidrotimina-desidrogenase, Shiotani & Weber 1981 *J. Biol. Chem.* **256**, 219-224) ou a timidina-quinase (Shiotani *et al.* (1989) *Cancer Res.* **49**, 1090-1094) para tornar a timidina ineficaz contra o agente citotóxico.

Considerações semelhantes referem-se a outros agentes que interferem com os processos normais da incorporação de nucleótidos no ADN ou ARN, uma vez que estes são potencialmente reversíveis pelo metabolito normal, que por sua vez pode ser degradado por uma enzima adequada, direccionada para locais de tumor.

Por exemplo, mostrou-se que os efeitos citotóxicos do 5-fluoroacilo citotóxico, amplamente utilizado, (disponível da Roche Products Inc) pode ser pelo menos em parte, atenuado pela uridina (Groeningen *et al.* (1989) *J. Natl. Cancer Inst.* **81**, 157-162). Assim, a conjugação de uma macromolécula com uma enzima que degrada a uridina pode ser utilizada em conjugação com 5-fluorouracilo e uridina. Esta combinação pode ser particularmente relevante no carcinoma colorrectal e da mama, para os quais o 5-fluorouracilo é um dos agentes citotóxicos mais eficazes. Esta combinação de agentes pode ainda ser combinada com ácido folínico que aumenta a citotoxicidade do 5-fluorouracilo, ou adicionalmente com timidina e uma enzima inactivadora da timidina.

A enzima pode ser de origem humana ou não humana. Poderá não ser necessário utilizar uma enzima convencional. Foram desenvolvidos anticorpos com capacidade catalítica (Tramontano *et al.* *Science* **234**, 1566-1570) e são conhecidos como "abzimas". Estes têm a vantagem potencial de serem capazes de ser humanizados, para reduzir a sua imunogenicidade.




As enzimas bacterianas carboxipeptidase G1 e G2 (CPG1 e CPG2) degradam folatos, incluindo o metotrexato, por clivagem do ácido glutâmico terminal. Pensa-se que as acções das duas enzimas são iguais. A descrição seguinte dos aspectos preferidos do presente invento refere-se à CPG2 mas é igualmente aplicável a CPG1 e a quaisquer outras enzimas que actuam nos mesmos substratos, e a abzymas que actuam nos mesmos substratos.

O isolamento, purificação e algumas das propriedades da carboxipeptidase G2 de *Pseudomonas sp.* estirpe RS-16 foram descritas por Sherwood *et al* (1984) *Eur. J. Biochem.* **148**, 447-453. A clonagem do gene que codifica para a referida carboxipeptidase G2, a sua sequência nucleotídica e a sua expressão em *E. coli* foram descritas por Minton *et al.* (1984) *Gene* **31**, 31-38 e Minton *et al.* (1983) *J. Bacteriol.* **156** 1222-1227. A CP2G2 está disponível na Division of Biotechnology, Centre for Applied Microbiological Research, Porton Down, Salisbury, RU. A carboxipeptidase G1 (CPG1) é descrita por Chabner *et al* (1972) *Cancer Res.* **32**, 2114-2119.

Alternativamente, o citotóxico/droga pode ser convertido em algo menos tóxico por um agente (normalmente uma enzima) que está selectivamente localizado no compartimento vascular, como está descrito em WO 93/13806 (aqui incorporada para referência). Em particular, o sistema é ilustrado na figura 4 de WO 93/13806, com referência ao direccionamento da carboxipeptidase A para uma célula alvo (como um tumor) e conversão do Ala-metotrexato em metotrexato, estando a carboxipeptidase G2 restringida à vasculatura e inactivando o metotrexato por desglutamação.

Poderá ser necessário utilizar um componente para evitar os constrangimentos que poderiam ser impostos pela resposta imunitária do hospedeiro às proteínas estranhas. A natureza deste componente pode variar, consoante a fase de desenvolvimento dos métodos de controlo imunológico. Os métodos que podem ser utilizados para ultrapassar a resposta do hospedeiro à proteína estranha são conhecidos na arte. Um exemplo de uma técnica para reduzir a imunogenicidade de proteínas estranhas, aplicável a conjugados macromolécula-enzima e a conjugados de enzima inibidora é a da conjugação com formas de polietilenoglicol (Wilkinson *et al.* (1987) *J. Immunol* **139**, 326-331), ou com dextranos de baixo peso molecular (Mikolajezck *et al.*, 1996 ou Melton *et al.*, 1987).



Alternativamente, ou adicionalmente, o problema da imunogenicidade pode ser ultrapassado por administração de imunossuppressores, ou agentes indutores de tolerância imunitária. A ciclosporina e o FK506 são drogas amplamente utilizadas para obter uma imunossupressão, em transplante de tecidos. Verificou-se que a ciclosporina atrasa a resposta de anticorpos do hospedeiro a proteínas estranhas (Lederman *et al.* (1988) *Br. J. Cancer* **58**, 562-566 e 654-657). Foi descrita a ocorrência de tolerância a proteínas estranhas, quando o hospedeiro encontra o problema estranho pela primeira vez após receber um anticorpo direccionado contra o epítipo CD4 em linfócitos (Waldman *et al* (1988) p. 16-30 in *Progress in Allergy* (Shizata & Woksman, Eds, Nova Iorque). Foram descritos outros meios para alcançar este fim e estes poderão ser alterados à medida que forem ocorrendo melhorias no controlo das respostas de anticorpos do hospedeiro a antigénios estranhos. Os anticorpos catalíticos (abzimas) podem ser "humanizados", para reduzir ou remover a sua imunogenicidade.

Num outro aspecto, o presente invento proporciona um método para destruir células alvo num hospedeiro, em que o método compreende a administração ao hospedeiro dos vários componentes acima descritos.

Os componentes de acordo com o invento são administrados de qualquer modo adequado, normalmente por via parentérica, por exemplo intravenosa, intraperitoneal ou intravesical, em formulações de diluentes e transportadores não pirogénicos estéreis convencionais. Pode-se medir a intervalos de poucas horas, a concentração da macromolécula no sangue. Tipicamente, após 24 horas, a concentração da macromolécula no tumor é maior do que a sua concentração no sangue.

É esperado que uma enzima conjugada com polietilenoglicol ou dextrano de baixo peso molecular tenha uma imunogenicidade baixa. Esta macromolécula pode ser administrada por infusão intravenosa lenta numa dosagem suficiente para posicionar uma concentração óptima de enzima em locais de tumores. Após deixar decorrer algum tempo (normalmente 24 horas) para que o conjugado se localize nos locais de tumores, pode-se administrar um inibidor de enzimas por infusão intravenosa lenta. O inibidor pode ser um anticorpo monoclonal dirigido para o conjugado ou pode ser mais especificamente dirigido para inactivar a enzima; no último caso, o anticorpo pode ser galactosilado para



auxiliar a sua remoção rápida a partir do sangue e impedir que inactive a enzima nos locais do tumor. Alternativamente, o inibidor pode ser uma molécula pequena que se ajusta no local activo da enzima mais que não é catalisado por esta (por exemplo, são descritos sistemas inibidores adequados em WO 97/20580, aqui incorporado para referência). Administra-se um inibidor deste tipo a um nível de dose tal que inactiva a enzima no sangue e tecidos normais, mas apenas inactiva uma pequena fracção da enzima, então localizada nos tumores. Deste modo, consegue-se obter uma grande diferença entre a concentração de enzima em tecidos normais e tecidos de tumores. Quando deixa de se detectar actividade enzimática em amostras de sangue, fornece-se uma prodroga que seja um substrato para a enzima, por injeções de bolo repetidas, ou por infusão, e continua-se até a concentração de enzima no tumor decrescer abaixo de um valor eficaz. A concentração de enzima nos tumores pode ser monitorizada por câmara gama, quando um pequeno componente do conjugado é conjugado com um radioisótopo adequado, como o ^{131}I odo, utilizando a técnica de tomografia computadorizada de emissão de fotão único (SPECT). Estão bem estabelecidos algoritmos que permitem a quantificação da enzima em locais de tumor. Os valores obtidos são estreitamente comparáveis com os obtidos por HPLC de biópsias de tumor.

Na tentativa de conseguir a erradicação de cancros poderá não ser possível evitar a supressão da função hematopoiética (mielossupressão), embora para um determinado efeito num tumor alvo seja esperado que esta seja muito inferior com o sistema aqui descrito. De modo semelhante, para um dado grau de mielossupressão, é esperado um efeito no tumor muito maior. Os factores de crescimento ou factores de inibição de crescimento que actuam em tecidos hematopoiéticos podem assim ser utilizados de forma útil, em combinação com o sistema aqui descrito.

O sistema aqui descrito pode ser utilizado em conjunção com outras formas de terapia. Estas incluem agentes citotóxicos convencionais e utilização do fornecimento de múltiplas enzimas para inactivar mais do que um metabolito.

De modo semelhante, uma enzima fornecida aos locais de tumor por uma macromolécula pode funcionar tanto para activar uma prodroga, como para inactivar um metabolito que protege os tecidos normais. A carboxipeptidase G2

inactiva o ácido folínico nos locais de tumor deixando as células de tumor desprotegidas contra o trimetrexato. A mesma enzima localizada no tumor pode activar uma prodroga de ácido benzóico para formar uma mostarda citotóxica (tal como descrito por Bagshawe (1989) *Brit. J. Cancer* **60**, 275-281)

Num outro aspecto, o invento proporciona a utilização de uma macromolécula catalítica que não se liga de forma específica a um antigénio de tumor, mas que é capaz, após administração ao compartimento vascular de um mamífero, de ser absorvida por um tumor no mamífero e é capaz de converter um primeiro composto num segundo composto, na produção de uma droga para o combate a um tumor num paciente, em que ao paciente tenha sido, está a ser, ou será administrado um primeiro composto e tenha sido, está a ser ou será administrado um inibidor que, após administração ao referido compartimento vascular, reduz o nível da referida actividade catalítica de conversão no compartimento vascular e tecidos normais (não tumorais).

Os compostos e métodos de acordo com o presente invento serão discutidos nos exemplos seguintes com referência específica à terapia citotóxica, utilizando o agente metotrexato, que é inativado pela enzima carboxipeptidase G2. O agente aminopterinina é outro agente citotóxico potente, que é inativado pela enzima carboxipeptidase G2.

O invento será em seguida descrito em maior pormenor com referência aos exemplos e figuras seguintes, em que:

A Figura 1 mostra a biodistribuição de ^{125}I -[PEG-CPG2] em xenoinxertos de cancros do cólon humano LS174T em ratinhos nus (veja-se Exemplo 9).

Figura 2(a). CPG2 conjugada com PEG de peso mol. 5000, média de 32 moléculas de PEG por molécula de CPG2, 20 μg por ratinho i.v. (ratinhos nus portadores do carcinoma do cólon humano LS174T). A Figura mostra a percentagem de dose injectada por grama em tecidos.

Figura 2(b). As razões entre tumor e tecido normal correspondentes.

Figura 3(a). CPG2 conjugado com PEG de peso mol. 2000, média de 27 moléculas de PEG, por molécula de CPG2, 25 unidades de enzima por ratinho

(ratinhos nus portadores do carcinoma do cólon humano LS174T). Estudo de HPLC.

Figura 3(b). Razões correspondentes entre tumor e órgão. Nenhuma eliminação.

Figura 4(a). Biodistribuição da actividade de CPG2 após utilização de SB43 galactosilado (anticorpo de eliminação). Forneceu-se aos ratinhos (ratinhos nus portadores do carcinoma do cólon humano LS174T), 25 unidades de CPG2 conjugado com PEG de peso mol. 2000 por ratinho, i.v., numa média de 22 moles de PEG por molécula de CPG2, no tempo 0. Forneceu-se anticorpo SB43 monoclonal galatosilado 19, 20 e 21 horas mais tarde por via IP. Os ratinhos foram mortos 24 horas após a CPG2.

Figura 4(b). Razões entre tumor e órgão com o protocolo acima.

Figura 5. Actividade da CPG2 em tumores LS174T, comparando 20 unidades de CPG2 conjugada com PEG 5000 (MDEPT) ou com anticorpo monoclonal A5B7-(Fab')₂ conjugado com CPG2 (ADEPT).

Figura 6. Forneceu-se a ratinhos nus com tumores LS174T, 25 unidades de enzima CPG2-PEG (22 moléculas de PEG, PEG 5000), seguida de SB43 galactosilado às 20 h, 23 h, 26 h. Às 48 horas após o CPG2-PEG receberam 25 mg/kg de uma prodroga de fenol (ácido 4-[N,N-bis(2-cloroetil)amino]-fenoxy-carbonil-L-glutâmico) intraperitonealmente, repetido um total de 3 doses a intervalos de 1 h.

Figura 7. É ilustrada a biodistribuição de CPG2 nativa e PEG-CPG2 às 72 horas. É apresentada a actividade de CPG2 no tumor (LS174T xenoenxertado em ratinhos nus). Injectaram-se os ratinhos com 25 unidades, quer de CPG2-PEG, quer de CPG2 nativa.

Figura 8. É apresentada a biodistribuição de CPG2 nativa marcada com ¹²⁵I e PEG-CPG2 em ratinhos nus xenoenxertados com LS174T.

Exemplo 1: Sistema terapêutico utilizando Ala-metotrexato-carboxipeptidases A e G2

O agente metotrexato, amplamente utilizado, é um antagonista de ácido fólico e a sua acção é bloquear a conversão de ácido fólico, um factor dietético, na sua forma reduzida, o ácido 5-metiltetra-hidrofólico (ácido folínico, factor citrovorum), pela enzima di-hidrofolato-redutase. O ácido folínico é utilizado na transferência de um carbono na síntese do ADN. Na ausência de ácido folínico a reprodução celular é bloqueada na fase S e segue-se a morte celular. O metotrexato é utilizado no tratamento de uma vasta gama de doenças malignas. Ele também causa a morte celular em tecidos normais de renovação celular, através dos mecanismos já descritos. A magnitude dos seus efeitos é largamente uma função da duração da exposição do tecido à droga, sendo, quanto maior a duração, maior o efeito tóxico. Pensa-se que a susceptibilidade à acção do metotrexato resulta da poliglutamação da droga, o qual, ao atrasar a sua degradação no interior da célula e excreção para fora da célula, favorece uma acção prolongada. O efeito do metotrexato pode ser ultrapassado pelo ácido folínico, geralmente fornecido na forma de ácido 5-formiltetra-hidrofólico. Verificou-se que a administração cuidadosamente programada e de dose controlada do metotrexato com ácido folínico é vantajosa em relação à utilização do metotrexato sozinho no tratamento de alguns cancros. Assim, as doses elevadas de metotrexato são normalmente seguidas, após 12-24 horas, por um "salvamento" com ácido folínico. De modo semelhante, a administração de metotrexato em dose baixa, em dias alternados e ácido folínico em cada dia subsequente, mostrou ser um tratamento com sucesso e de baixa toxicidade, para muitos pacientes com algumas formas de tumor trofoblástico (Bagshawe *et al* (1989) *Brit. J. Ob. Gynae* **96**, 795-802).

Verificou-se (Kuefner *et al* (1989) *Biochemistry* **28**, 2288-2297) que quando o metotrexato é modificado por introdução de uma porção alanina, através de uma ligação peptídica ao α -carboxilo do metotrexato, o composto resultante é eficazmente excluído das células e a toxicidade da forma de alanina é 50-100 vezes inferior à do metotrexato nativo em células alvo, *in vitro*. A porção de alanina é clivada por acção da enzima carboxipeptidase A, ficando o metotrexato nativo. O metotrexato de alanina não é metabolizado pela enzima carboxipeptidase G2. A carboxipeptidase G2 degrada o metotrexato e folatos naturais por clivagem da porção de ácido glutâmico.

No presente exemplo, a macromolécula catalítica do sistema de acordo com o presente invento compreende uma macromolécula como o polietilenoglicol, um dextrano ou uma imunoglobulina conjugada com carboxipeptidase A. Como é óbvio, pode-se utilizar uma carboxipeptidase que não a carboxipeptidase A, mas com especificidade para o mesmo substrato, em vez da carboxipeptidase A.

A carboxipeptidase A está disponível a partir de fontes de bovino e bacterianas (por exemplo da Calbiochem, Nottingham, RU) e está também presente no pâncreas humano. A enzima hidrolisa oligopéptidos da extremidade de terminal C de cadeias polipeptídicas ou de outros compostos que contêm aminoácidos conjugados com um grupo carboxilo livre. A carboxipeptidase A tem preferência por resíduos aromáticos. Forma-se normalmente a partir de fontes de mamífero por tripsinização de um conjunto complexo de três subunidades produzido pelo pâncreas.

A CPA é conjugada ao PEG ou ao dextrano por técnicas convencionais, como descrito por exemplo em WO 90/13540.

O "primeiro composto" é metotrexato de alanina (Kuefner *et al* 1989), que é a prodroga a partir da qual é gerada a droga de metotrexato activo (o "segundo composto"), por acção da carboxipeptidase A.

O "inibidor" é a carboxipeptidase G2 conjugada com uma estrutura macromolecular, tal como dextrano. A finalidade desta macromolécula é confinar a actividade da CPG2 ao compartimento vascular.

Por exemplo, a CPG2 pode ser acoplada a dextranos solúveis (Lomodex 40, Lomodex 70, Dextraven 110 e Dextraven 150, todas marcas registadas; Fisons, Loughborough, Leics., RU) de acordo com o método de Melton *et al* (1987). Diluiu-se um volume da preparação de dextrano contendo 1 g de dextrano em NaCl a 0,9% para 100 ml, com NaCl a 0,9% e fez-se reagir com brometo de cianogénio (CNBr, Sigma, Poole, Dorset, RU). O CNBr (0,5 g) foi utilizado para activar os dextranos de 40 000 e 70 000 Dalton e 0,4 g para dextranos de peso molecular superior. Esta redução foi necessária para impedir a precipitação de dextranos de 110 000 e 150 000 Dalton. A mistura reaccional foi agitada vigorosamente à temperatura ambiente e mantida a pH

10,7 \pm 0,1 unidades num pH-stat (Radiometer Copenhaga, Dinamarca), por adiçãõ de NaOH 2M. Adicionou-se CNBr na forma de um pó finamente dividido, em duas porções iguais, a um intervalo de 20 min; a segunda porçãõ foi deixada reagir até o pH da mistura reaccional estar estável a 10,7; o pH foi então ajustado para 9,0 e a mistura foi dialisada contra água corrente durante 2 horas a 4°C. O pH foi ajustado de novo para 9,0 com NaOH 1M e adicionou-se 1 ml de soluçãõ de enzima (1265 U; 2,3 mg) em tampãõ Tris-HCl 0,1 M, pH 7,3. A mistura foi feita reagir durante a noite a 4°C, após o que se adicionaram 0,25 g de glicina, para bloquear o excesso de locais reactivos. A mistura foi agitada por mais 30 minutos e em seguida concentrada até um volume de 40 ml num concentrador modelo 202 utilizando uma membrana de ultrafiltraçãõ de PM10 (Amicon Stonehouse, RU). A mistura (40 ml) foi em seguida cromatografada em Sephadex G150 com um volume de leite de 1,3 litros numa coluna de 4,4 x 87 cm (Pharmacia, Uppsala, Suécia) e eluída com tampãõ fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,0. Recolheram-se fracções (10 ml) e testaram-se quanto à actividade enzimática; o teor de hidratos de carbono foi determinado pelo método do fenol-ácido sulfúrico (M. Dubois *et al.* (1956) *Analyt. Chem.* **28**, 350), utilizando dextrãõ-70 como padrão, na gama de 0-100 µg/ml (Sephadex é uma marca registada).

Reuniram-se as fracções de picos e concentraram-se para um volume de 10-12 ml, como anteriormente. Determinaram-se a actividade enzimática e o teor de hidratos de carbono e o teor proteico foi medido pelo método do azul de Coomassie (M.M. Bradford (1976) *Analyt. Biochem.* **72**, 248), utilizando a fracçãõ V de albumina de soro bovino como padrão, na gama de 0-100 µg/ml. O material concentrado foi esterilizado por filtraçãõ (Millipore "Millex GS", tamanho de poro de 0,22 µm) e armazenado a -20°C. Millex GS é uma marca registada.

O conjugado macromolécula-carboxipeptidase A, se compreendesse uma enzima de origem bovina, seria imunogénico. De modo semelhante, um conjugado de macromolécula de carboxipeptidase G2 seria também imunogénico, uma vez que a CPG2 é de origem bacteriana. Poderá ser desejável, portanto, reduzir a sua imunogenicidade, ou utilizar meios para induzir imunossupressãõ, ou tolerância imunitária.

Exemplo 2: Método de utilização

A administração de um componente capaz de ultrapassar a resposta do hospedeiro a proteínas estranhas pode ser iniciada 48 horas antes da administração da macromolécula catalítica. Podem-se realizar testes iniciais para excluir, tanto quanto possível, uma reacção anormal, por parte do paciente, a qualquer dos componentes proteicos. O conjugado de CPA é fornecido intravenosamente, de preferência por infusão lenta, tipicamente ao longo de 2 horas. A concentração máxima no tumor, do conjugado de CPA é alcançada várias horas mais tarde, mas nesta altura ainda há níveis elevados de actividade de CPA no plasma. É desejável eliminar esta actividade tanto quanto possível, antes da administração da prodroga. O processo de eliminação é conseguido por administração de um componente (como um anticorpo anti-CPA, que pode ser galactosilado) capaz de conseguir uma eliminação ou inactivação aceleradas de CPA a partir de locais que não de tumor. Este componente é administrado intravenosamente ao longo de várias horas, tipicamente 6-24 horas, ou até a enzima deixar de ser detectável no plasma e pode ser administrado por infusão a uma concentração baixa, ao longo do período da administração da prodroga. Durante este tempo, a enzima no fluido extracelular difunde-se de novo para o plasma à medida que o nível de enzima no plasma diminui. Os testes à actividade enzimática no plasma são continuados durante um período de tipicamente 8-24 horas, para assegurar que a actividade da CPA no plasma não é detectável. Se necessário, fornece-se mais quantidade do componente referido que elimina a actividade da CPA. Foram já descritos métodos alternativos de eliminação acelerada.

O conjugado de CPG é em seguida administrado, quer por uma série de injeções de bolo quer por infusão lenta, e é preferido que a prodroga seja administrada em simultâneo.

A prodroga pode ser administrada como uma série de injeções de bolo, ou por infusão contínua. A administração da prodroga e de conjugado de CPG irá continuar normalmente durante cerca de 4-7 dias.

A cerca de 7-10 dias após a administração do conjugado de CPA é desejável observar novamente a actividade enzimática nos locais de tumor. A administração do componente capaz de ultrapassar a resposta do hospedeiro a



proteínas estranhas é continuada, a de prodroga é interrompida e a do conjugado de CPG pode ser interrompida.

O conjugado de CPA é de novo administrado por infusão, como anteriormente, seguido do componente que elimina a actividade de CPA no plasma, como anteriormente. Utilizam-se processos semelhantes aos anteriormente descritos, antes de reiniciar a prodroga.

O ciclo pode ser repetido. Os factores limitantes serão a toxicidade atribuída ao metotrexato de alanina, ou ao desenvolvimento de anticorpos do hospedeiro contra qualquer das proteínas estranhas utilizadas.

Exemplo 3: Utilização de antifolatos de quinazolina

Pode-se utilizar um sistema semelhante ao descrito nos exemplo 1 e 2 com pelo menos alguns membros de uma série de antifolatos de quinazolina, que foram já descritos (Jones *et al* (1986) *J. Med. Chem.* **29**, 468-472; Jodrell *et al* (1991) *Brit. J. Cancer* **64**, 833-8; Harrap *et al* (1989) *Advances in enzyme regulation* **29**, 161; Jackman *et al* (1991) *Advances Enzyme Regulat.* **31**, 13; Jodrell *et al* (1990) *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **31**, 341. Estes agentes diferem dos folatos naturais e metotrexato no que respeita à substituição, por exemplo na posição N¹⁰ e no anel benzoílo, mas, tal como os folatos naturais e o metotrexato, têm uma porção glutamato terminal ligada ao anel benzoílo. Assim, pelo menos algumas drogas desta série são inactivadas por uma substituição no péptido, tal como uma alanina na posição α do glutamato, e esses derivados de alanina ou outros derivados de péptidos substituídos são sintetizados utilizando a metodologia descrita por Kuefner *et al loc. cit.*, ou suas variantes, conhecidas na arte. De modo semelhante, os antifolatos de quinazolina são desglutamados e portanto inactivados, pela carboxipeptidase G2, ou uma enzima semelhante. Estes compostos são de interesse particular pois actuam por inibição da timidilato-sintetase. A aplicação química destas drogas pode ser amplamente alargada pela sua administração na forma de prodroga, conversão no composto activo pela carboxipeptidase A e degradação da droga activa no plasma, pela carboxipeptidase G2.

Exemplo 4: Produção de anticorpo que discriminam entre droga activa e prodroga

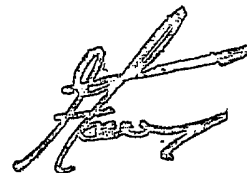
De modo a produzir um anticorpo que reconheça a droga activa (II) mas não a prodroga (I), sintetizou-se um composto que representa a região de maior divergência entre as duas moléculas (I) e (II). Esta região corresponde à porção ácida da droga de mostarda de ácido benzóico (II). Uma vez que o próprio ácido benzóico não é suficientemente grande para ser imunogénico, considerou-se que o método mais eficaz para produzir anticorpos específicos para a região ácida seria a inoculação de animais com um análogo de ácido benzóico, que tinha sido anteriormente conjugado com hemocianina de lapa do género *Fissurella* (KLH). Sintetizou-se um composto que consistia de um aminoácido L-lisina ligado através de uma ligação peptídica a ácido aminobenzóico (VII). Em seguida, conjugou-se (VII) com KLH por métodos convencionais, utilizando os grupos ϵ -NH₂ na porção de lisina da molécula, para produzir o imunogénio específico (VIII), como descrito na WO 93/13806.

Exemplo 5: Produção de um anticorpo monoclonal reactivo contra a carboxipeptidase G2

Utiliza-se um anticorpo monoclonal produzido contra a carboxipeptidase G2 para eliminar e inactivar a actividade enzimática residual em locais que não de tumor.

O anticorpo monoclonal foi produzido como se segue. Imunizaram-se ratinhos Balb/C (6-8 semanas de idade) com 50 µg de CPG2 i.p. em adjuvante de Freund incompleto, seguido de duas injeções de CPG2 em adjuvante de Freund completo (50 µg de CPG2 cada, i.p.) a intervalos mensais e com duas injeções diárias (50 µg e 100 µg em PBS, i.v.) 2 dias antes da fusão. Os esplenócitos imunitários foram fundidos com células de mieloma SP2/O que não segregam imunoglobulinas, de acordo com os processos do hibridoma de Köhler e Milstein (1975).

A presença de anticorpos anti-CPG2 foi detectada por radioimunoensaio indirecto em fase sólida. Colocou-se uma solução de 1 µg ml⁻¹ de CPG2 em tampão fosfato 0,05M em placas de microtítulo de polivinilo (100 ng por poço),



deixou-se secar, fixou-se com metanol e lavou-se com tampão PBS contendo Tween a 0,05% e albumina de soro bovino a 0,1%. Diluiu-se o sobrenadante, ou amostras de anticorpo purificado em PBS e incubou-se nas placas de microtítulo revestidas com CPG2 (100 μ l por poço), a 37°C durante 4 h e em seguida durante 1 h com IgG de coelho anti-ratinho, marcado com 125 I. Os poços foram lavados três vezes com tampão PBS-Tween entre cada fase e após lavagem final, os poços individuais foram cortados e contados num contador gama.

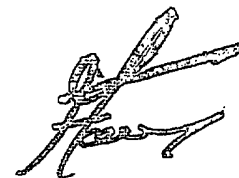
Exemplo 6: Redução da actividade enzimática residual nos locais que não de tumor

É desejável inactivar a porção enzimática do conjugado enzima-macromolécula nos locais que não de tumor, mas não no tumor. Um método para alcançar este efeito é administrar ao paciente a ser tratado com compostos de acordo com o invento, anticorpos produzidos contra a porção de enzima que foi conjugada com resíduos de galactose.

Um anticorpo monoclonal dirigido contra CPG2 inactiva a enzima. Para impedir que o anticorpo inactive as enzimas em locais de tumores, conjugam-se com ele resíduos adicionais de galactose, de modo a que possa ainda inactivar a enzima no plasma quando é administrado por via intravenosa, mas o anticorpo inactivante é rapidamente removido do plasma por receptores de galactose nos hepatócitos.

Fornece-se o anticorpo monoclonal anti-CPG2 galactosilado para eliminar a actividade enzimática no plasma e em seguida para originar uma quantidade de anticorpo monoclonal anti-CPG2 não glicosilado para inactivar a actividade enzimática residual noutros tecidos não tumorais.

O anticorpo monoclonal é galactosilado utilizando o protocolo seguinte. Produziu-se uma solução-mãe do derivado activado, como se segue. Tratou-se cianometil-2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio- β -D-galactopiranosido (Sigma C-4141) [400 mg] em metanol anidro (10 ml) com 5,4 mg de metóxido de sódio, em 1 ml de metanol anidro, à temperatura ambiente, durante 48 horas. A mistura foi mantida num frasco cónico Quickfit de 25 ml, equipado com uma rolha ligeiramente engordurada.



Prepara-se uma solução-mãe de anticorpo monoclonal (1,3 mg/ml) em tampão borato de sódio 0,25 M, pH 8,5. Distribuem-se alíquotas da quantidade necessária de derivado de galactosilo activado (80, 40, 20, 10 μ l) por ampolas de vidro de 3 ml e evapora-se até se obter um resíduo vítreo, numa corrente de azoto. Adiciona-se uma solução de anticorpo (200 μ g) e mistura-se até o resíduo estar dissolvido. Após 2 horas à temperatura ambiente, a solução é dializada contra três mudas de PBS.

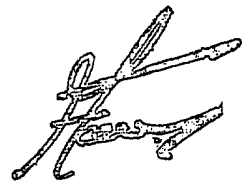
As preparações são levadas a aumento de escala, recolhendo múltiplos dos volumes acima mencionados.

Exemplo 7: Terapia citotóxica com trimetrexato e "salvamento" com ácido folínico

O presente invento poderá proporcionar um meio que permite uma acção anti-folato mais contínua nos locais de tumores, ao mesmo tempo que protegendo os tecidos normais dos efeitos anti-folato, como descrito na WO 93/13805.

O primeiro passo é iniciado com agentes imunossuppressores ou indutores de tolerância imunitária, o que irá normalmente ocorrer não menos de dois dias antes da administração do composto de acordo com o invento. Se a macromolécula catalítica não é imunogénica, este passo é omitido.

Fornece-se um conjugado de macromolécula-CPG2 por via intravenosa, ou outra via adequada. Após se deixar, por várias horas, que o conjugado se localize nos locais de tumores, fornece-se um anticorpo. Este pode ser dirigido para o local activo na enzima, caso em que se ligam resíduos adicionais de galactose ao anticorpo para assegurar a sua rápida eliminação através de receptores de galactose em hepatócitos. Já foram descritos acima mecanismos alternativos para a eliminação rápida do conjugado de locais que não de tumores. Quando os níveis de enzima decresceram para níveis muito baixos, ou indetectáveis no plasma, fornece-se trimetrexato por bolo ou infusão contínua, com o objectivo de manter a concentração plasmática constante. Em simultâneo com o trimetrexato, fornece-se ácido folínico a um nível de dose suficiente para proteger os tecidos normais da toxicidade do trimetrexato. O ácido folínico que atinge os locais de tumores onde se localiza o CPG2 é



desglutamado, tal como o ácido fólico, e tornado inactivo antes de poder entrar nas células e protege-as do trimetrexato. Deste modo, os tecidos normais podem ser protegidos pelo ácido folínico da acção do trimetrexato, ao mesmo tempo que a molécula protectora é rapidamente degradada em locais de tumores. Podem-se utilizar outras drogas antifolato, que, como o trimetrexato, não são degradados pela CPG2, em substituição do trimetrexato.

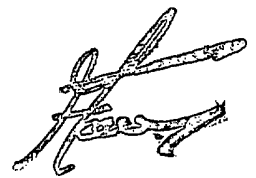
Exemplo 8: Terapia citotóxica com inibidores de timidilato-sintetase e "salvamento" com timidina

Pode-se aplicar o mesmo princípio a outras terapias antimetabolitos. Por exemplo, tem-se feito um esforço considerável em anos recentes para o desenvolvimento de agentes que bloqueiem a enzima chave, a timidilato-sintetase, como CB3717 e ICI D1694 (Jodrell *et al* 1991, *BJC* **64**, 833-8). Estes agentes irão provavelmente sofrer das mesmas limitações que os agentes citotóxicos convencionais, na medida em que também bloqueiam a timidilato-sintetase em células normais. A sua acção é reversível com timidina. A administração de timidina pode assim ser utilizada para proteger os tecidos normais dos inibidores da timidilato-sintetase, ao mesmo tempo que o efeito protector da timidina e a timidina endógena se poderão limitar aos locais de tumores por meio de uma enzima que degrada a timidina, como a di-hidrotimina-desidrogenase, ou timidina-quinase, que iriam inibir a entrada da timidina nas células de tumor. A enzima ou agente inibidores de timidina são fornecidos pela macromolécula não específica, de acordo com o invento.

A di-hidrotimina-desidrogenase pode ser obtida a partir de linfócitos humanos normais (Shiotani & Weber 1989 *Cancer Res* **49**, 1090-1094) e tem, portanto, a vantagem de se poder produzir um conjugado macromolécula-enzima de imunogenicidade baixa, através da sua conjugação com uma macromolécula não imunogénica.

Exemplo 9: Absorção, pelo tumor, do conjugado PEG-enzima e do conjugado IgG-enzima não específico para o tumor

Em cancros do cólon humano LS174T xenoenxertados em ratinhos nus, detectou-se 1,81% da dose administrada de uma polietilenoglicol-carboxipeptidase G2 marcada com ¹²⁵I por grama de tumor, após 24 horas, e



estavam ainda presentes 1,2% após 72 h (veja-se Fig. 1). A ^{125}I -CPG2 nativa originou valores comparáveis de 0,35% e 0,09%.

Por comparação da distribuição tissular de anticorpo monoclonal anti-CEA marcado com ^{125}I conjugado com carboxipeptidase G2 em xenoenxertos de LS174T (positivo para CEA) e CC3 (negativo para CEA) obtiveram-se os resultados seguintes. A 24 horas após injeção intravenosa, o LS174T continha 1,4%, enquanto que o CC3 continha 0,9% da dose injectada por grama de tumor. Após 48 horas, o LS174T tinha 1,2%, enquanto que o CC3 tinha 0,7% e, após 7 dias, o LS174T tinha 0,35%, enquanto que o CC3 tinha 0,3%. Assim, a quantidade de conjugado retido no tumor que não produz CEA era mais de metade da retida no tumor que produz CEA (S.K. Sharma, Tese de doutoramento, Universidade de Londres, 1991).

Verificou-se ainda (tese de S.K. Sharma), para uma vasta gama de dosagens de um conjugado de enzima-anticorpo (20-300 μg por ratinho), que a percentagem de dose injectada por grama de tumor permanecia constante nos limites experimentais (1,57-1,77%)

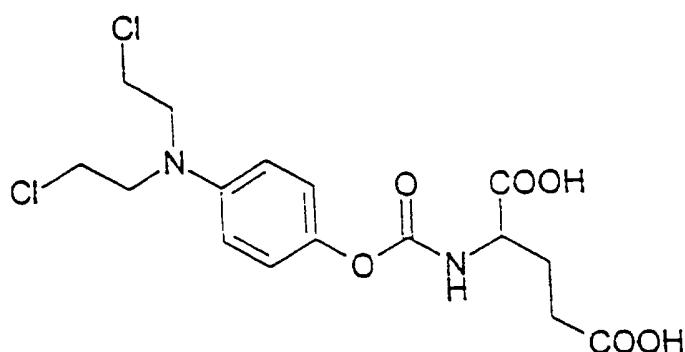
Assim, o fornecimento menos eficiente de enzima ao tumor, pela macromolécula não específica, comparado com um anticorpo específico para o tumor, pode ser compensado por um aumento de cerca de 2 vezes na dosagem administrada.

Foi realizada uma investigação adicional da distribuição de CPG2 conjugada com PEG em ratinhos nus portadores do carcinoma do cólon humano LS174T.

Materiais e Métodos

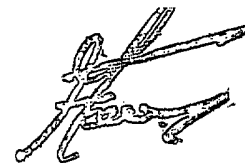
O carbonato de metoxipolietilenoglicol-p-nitrofenol de peso mol. 5000 foi obtido da Sigma. O carbonato de metoxipolietilenoglicol-p-nitrofenol de peso mol. 2000 foi sintetizado de acordo com o método descrito (Veronese, F.M., Largajolli, R. Boccu, E. Benassi, C.A. e Schiavon, O. (1985) Surface modification of proteins - Activation of monomethoxy-polyethylene glycols by phenyl chloroformates and modification of ribonuclease and superoxide dismutase. *App. Biochem. Biotech.* 11, 141-152). O ácido 4-[N,N-bis(2-

cloroetil)amino]fenoxicarbonil-L-glutâmico (prodruga de mostarda de fenol) foi sintetizado de acordo com o processo publicado e a sua estrutura está representada na figura (Dowell, R., Springer, C.J. Davies, D.H., Hadley, E.M., Burke, P.J., Boyle, F.T., Melton, R.G., Connors, T.A., Blakey, D.C. e Mauger, A.B. (1996). New mustard prodrugs for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): Alternative to the amide link. *J. Med. Chem.* **39**, 1100-1105). (Esta prodruga é descrita em WO 94/02450)



Ligação covalente de PEG a CPG2

Adicionaram-se ou 516 mg de carbonato de metoxipolietilenoglicol-p-nitrofenilo de peso mol. 5000, ou 206,4 mg de carbonato de metoxipolietilenoglicol-p-nitrofenilo de peso mol. 2000, a 38,13 mg de CPG2 em 6,7 ml de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,2 (Veronese, F.M., Largajolli, R., Boccu, E. Benassi, C.A. e Schiavon O. (1985) Surface modification of proteins - Activation of monomethoxy-poliethylene glycols by phenyl chloroformates and modification of ribonuclease and superoxide dismutase. *App. Biochem. Biotech* **11**, 141-152). Após 1 hora à temperatura ambiente, removeu-se o PEG que não reagiu numa célula de ultrafiltração (Amicon), utilizando uma membrana XM-50 e tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 como solução de diálise. A CPG2 modificada com polietilenoglicol foi separada da proteína não modificada por FPLC de filtração em gel, utilizando uma coluna de superose S/12 HR (Pharmacia) equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, e eluída com o mesmo tampão.



Estudos em animais

As figuras seguintes (Figuras 2 a 6) ilustram a biodistribuição de carboxipeptidase G2 conjugada com PEG em ratinhos nus portadores do carcinoma do cólon humano LS174T. Os ratinhos foram injectados intravenosamente com a quantidade de enzima especificada (medida como unidades de enzima) utilizando 4 ratinhos por ponto de tempo. Os ratinhos foram mortos após 24 h, 48h e 72 h, da injeccção, nalguns casos após 96 h e 120 h. A actividade de CPG2 no plasma foi medida por meio de um teste espectrofotométrico utilizando metotrexato como substrato. A actividade de CPG2 no tumor e outros tecidos foi medida por HPLC utilizando metotrexato como substrato.

O CPG2 não conjugado é rapidamente eliminado do sangue, tumor e tecidos normais. A biodistribuição de CPG2 nativa e PEG-CPG2 a 72 horas é ilustrada nas figuras 7 e 8.

Figura 2(a). CPG2 conjugada com PEG de peso mol. 5000, média de 32 moléculas de PEG por molécula de CPG2, 20 μ g por ratinho. A Figura mostra a percentagem de dose injectada por grama em tecidos.

Figura 2(b). Razões correspondentes entre tumor e tecido normal.

Figura 3(a) CPG2 conjugada com PEG de peso mol. 2000, média de 27-PEG moléculas por molécula de CPG2, 25 unidades de enzima por ratinho.

Figura 3(b). Razões correspondentes entre tumor e órgão.

Figura 4(a). Biodistribuição da actividade de CPG2 após utilização de SB43 galactosilado (anticorpo de eliminação). Forneceu-se aos ratinhos CPG2 conjugada com PEG de peso mol. 2000, numa média de 22 moles de PEG por molécula de CPG2, no tempo 0. Forneceu-se anticorpo SB43 monoclonal galatosilado 19, 20 e 21 horas mais tarde por via IP. Os ratinhos foram mortos 24 horas após a CPG2.

Figura 4(b). Razões entre tumor e órgão com o protocolo acima.

Figura 5. Actividade de CPG2 em tumores de LS174T, comparando 20 unidades de CPG2 conjugada com PEG 5000 ou anticorpo monoclonal A5B7-(Fab')₂ conjugado com CPG2.

Figura 6. Forneceu-se a ratinhos nus portadores de tumores de LS174T, 25 unidades de enzima CPG2-PEG (22 moléculas de PEG, PEG 5000) seguidas de SB43 galactosilado às 20 h, 23 h, 26 h. A 48 horas após o CPG2-PEG receberam 25 mg/kg de uma prodroga de fenol, intraperitonealmente, repetidos um total de 3 doses a intervalos de 1 h.

Relativamente às figuras 4(a) e 4(b), estas mostram boas concentração e razão entre tumor e tecidos normais, após a utilização do anticorpo de eliminação. No entanto, não é possível administrar o anticorpo de eliminação de forma tão eficaz no ratinho, como no paciente humano.

Ao nível terapêutico, no modelo I de tumor LS174T mostrei existir um atraso significativo do crescimento comparado com os controlos não tratados, quando se utiliza PEG 5000 a 22 PEG por CPG2 com o anticorpo de eliminação de CPG2, SB43 e a prodroga de fenol.

Investiguei o PEG (peso mol. 5000) na gama de 13-32 moléculas de PEG por molécula de enzima (CPG2, peso mol. 83 000); quanto maior é o peso molecular, maior e mais prolongada é a concentração plasmática de enzima. Quanto maior a concentração plasmática, maior a concentração no tumor, no modelo de tumor de LS174T. Uma vez que um dos objectivos é obter tanta enzima quanto possível no tumor e prolongar o período em que uma concentração eficaz de enzima é mantida no tumor, é preferido o conjugado que origine a concentração mais elevada de enzima no sangue. No entanto, a escolha do conjugado também tem em conta a necessidade de libertar a enzima do sangue, após a concentração desejada de enzima ter sido atingida no(s) tumor(es) e antes da prodroga ser administrada. Um conjugado que seja difícil de eliminar do sangue seria desvantajoso, de modo que poderá ser necessário um compromisso entre estes dois requisitos. A desvantagem é que a concentração plasmática, elevada e persistente, de PEG (5000) 32-CPG2 indica que deveria ser utilizada uma maior quantidade de anticorpo de eliminação, para diminuir a concentração de CPG2 activa no plasma.



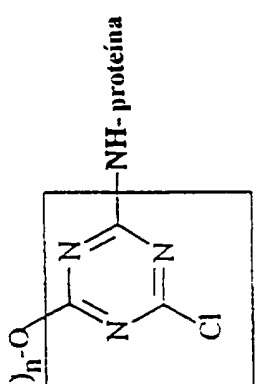
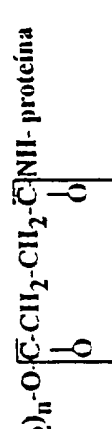
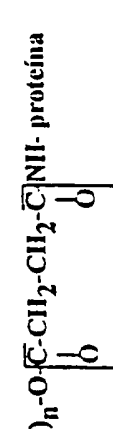
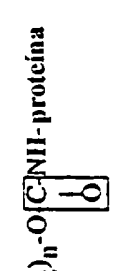


Comparando o PEG 5000 com o PEG 2000, os meus estudos mostram que as concentrações de enzimas no tumor são semelhantes mas que os níveis plasmáticos com PEG 2000 são inferiores. Assim, o PEG com um peso molecular de 2000 na gama de 20 a 40 moléculas de PEG por molécula de enzima, é preferido, obtendo-se um peso molecular total na gama de cerca de 130-160 kDa, mas a água de hidratação associada origina um peso molecular equivalente a moléculas de peso muito maior.

Exemplo 10: Dados da conjugação PEG-NQO2

A NQO2 é uma enzima muito menor (peso mol. 24000) do que a CPG2 (peso mol. 80000). De modo a assegurar que a NQO2 não é rapidamente excretada pelos rins, após administração intravenosa, não conseguindo por isso localizar-se nos tumores, é desejável assegurar que o peso molecular do conjugado seja >70000 . Isto foi conseguido por derivatização e conjugação com polietilenoglicol de peso mol. 5000 (PEG 5000). A ligação de 14 moléculas ou mais de PEG 5000 a cada molécula de NQO2, resultou num conjugado com um peso molecular estimado em 90000.

(Segue Tabela 1)

Tabela 1

MÉTODO	Porção ligante (dentro de uma caixa) e estrutura geral do aducto	Ligação	co-produto	referência
PEG-cloroeto cianúrico	$\text{CH}_3(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{O}$ 		HCl	(1,2,3)
PEG-éster de succinimidilo activo (succinato de succinimidilo)	$\text{CH}_3(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{O}$ 	ligação peptídica ligação éster	N-hidroxi-succinimida	(4,5,6)
PEG-anidrido misto de succinato	$\text{CH}_3(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{O}$ 	ligação peptídica ligação éster	éster mais proteína modificada com éster	(7)
PEG-fenilcloroformatos	$\text{CH}_3(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{O}$ 	Carbamato	fenol substituído	(8)
PEG-carbonildiimidazolo	$\text{CH}_3(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{O}$ 	Carbamato	Imidazolo	(9,10)
PEG-carbonato de succinimida	$\text{CH}_3(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{O}$ 	Carbamato		(11)

<p>Poli-anidrido(PEG-MA)</p>	<p> $\begin{array}{c} \text{CH}_3(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH} \\ \\ \text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{proteína} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH} \\ \\ \text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}-\text{COOH} \end{array}$ </p>	<p>Ligação peptídica</p>		<p>(12)</p>
<p>PEG-maleimida</p>	<p> $\begin{array}{c} \text{CH}_3(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_2)_5-\text{N} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{O} \qquad \qquad \qquad \text{O} \\ \text{S} \cdots \text{proteína} \end{array}$ </p>	<p>Ligação peptídica</p>	<p>cianoboro- hidreto oxidado</p>	<p>(13,14)</p>
<p>PEG-acetaldeído</p>	<p>nenhuma porção ligante presente ou unidade de óxido de etileno $\text{CH}_3(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{proteína}$</p>	<p>Amina secundária</p>	<p>ácido sulfônico</p>	<p>(15)</p>
<p>PEG-halogeneto sulfônico</p>	<p>nenhuma porção ligante presente $\text{CH}_3(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{proteína}$</p>	<p>amina secundária</p>		<p>(16)</p>

PEG-fenilgloxal	<p>CH₂(O-CH₂-CH₂)_n-O</p> <p>C-NH-(CH₂)₃-proteina</p>	amina secundária		(17)
-----------------	--	------------------	--	------

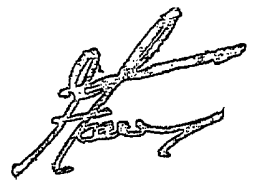


TABELA 2

Distribuição de ^{125}I -PEG-CPG2 em xenoinxertos de LS174T

24 horas % ID/g de tecido

1,61 \pm 0,3

0,63 \pm 0,07

0,98 \pm 0,15

0,58 \pm 0,09

0,36 \pm 0,06

0,14 \pm 0,038

1,81 \pm 0,47

72 horas

0,38 \pm 0,08

0,26 \pm 0,04

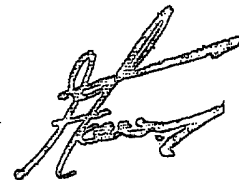
0,38 \pm 0,06

0,14 \pm 0,025

0,10 \pm 0,02

0,03 \pm 0,01

1,2 \pm 0,21



REFERÊNCIAS

Abraham R. *et al.* (1994) *Cell Biophysics* **24/25**, 127

Abuchowski, A. *et al.* (1977) "Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase" *J. Biol. Chem.* **252**, 3582-3586.

Azoulay, M. *et al.* (1995) *Anti-Cancer Drug Design* **10**, 441-450.

Bagshawe (1987) *Br. J. Cancer* **56**, 531-2; (1989) **60**, 275-281.

Bagshawe, K.D. *et al.* (1988) "A cytotoxic agent can be generated selectively at cancer sites" *Br. J. Cancer* **58**, 700-703.

Blair, A.H. & Ghose T.I. (1983) "Linkage of cytotoxic agents to immunoglobulin" *J. Immunol. Methods* **59**, 129.

Blakey, D.C. *et al.* (1996) "2D2767, an improved system for antibody-directed enzyme prodrug therapy that results in tumor regressions in colorectal tumour xenografts" *Cancer Res.* **56**, 3287-3292.

Bosslet, K. *et al.* (1994) *Cancer Research* **54**, 2152

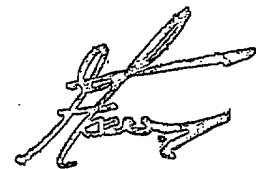
Bradford, M.M. (1976) *Analyt. Biochem.* **72**, 248

Cobb, L.M. (1989) "Intratumor factors influencing the access of antibody to tumor cells" *Cancer Immunol. Immunother.* **28**, 235-240.

Corvalan *et al.* (1987) *Cancer Immunol. Immunother.* **24**, 127-132, 133-137 e 138-143.

Dubois, M. *et al.* (1956) *Analyt. Chem.* **28**, 350.

Duncan, R. *et al.* (1988) "Anti-cancer agents coupled to N-(2-hydroxypropyl)meta-acrylamide copolymers. 11 Evaluation of daunomycin conjugate in vivo against L1210 leukaemia" *Br. J. Cancer* **57**, 147-156



Duncan, R. *et al.* (1996) "The role of polymer conjugates in the diagnosis and treatment of cancer" in *STP Pharma Sciences* **6**, 237-263.

Duran-Reynolds, F. (1939) "Studies on the localisation of dye and foreign particles in normal and malignant tissues" *Amer. J. Cancer* **35**, 98.

Dykes, P.W. *et al.* (1987) "Radioimmunotherapy of cancer: clinical studies and limiting factors" *Cancer Treat. Rev.* **14**, 87-106

Eno-Amooquaye, E.A. *et al.* (1996) "Altered biodistribution of antibody-enzyme conjugate modified with polyethylene glycol" *Br. J. Cancer* **73**, 1323-1327.

Garnett, M.C. & Baldwin, R.W. (1986) "An improved synthesis of a methotrexate-albumin; 791T/36 monoclonal antibody conjugate cytotoxic to human osteogenic sarcoma cell lines" *Cancer Res.* **46**, 2407-2412.

Gesson, J.P. *et al.* (1994) *Anti-cancer Drug Design* **9**, 409-423.

Hurrell, J.G.R. (CRC Press, 1982) "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications".

Jain, R.K. (1989) "Delivery of novel therapeutic agents in tumours: Physiological barriers and strategies" *J. Nat. Cancer Inst.* **81**, 570-576.

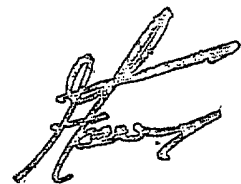
Jungheim, L.N. & Shepherd, T.A. (1994) "Design of anti-tumor prodrugs substrates for antibody targeted enzymes" *Chem. Rev.* **94**, 1553-1566.

Knox, R.J. *et al.* (1993) *Cancer and Metastasis Reviews* **12**, 195.

Köhler & Milstein (1975) *Nature* **256**, 495.

Kuefner *et al.* (1989) *Biochemistry* **28**, 2288-2297

Mach *et al.* (1980) "Tumor localisation of radiolabelled antibody against carcinoembryonic antigen in patients with carcinoma: A critical evaluation" *New Eng. J. Med.* **303**, 5-10



Mauger, A.B. *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* **37**, 3452.

Matsumura, Y. & Macda H. (1986) "A new concept in macromolecule therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumortropic accumulation of proteins and the antitumor agents SMANCS" in *Cancer Res.* **6**, 6387-6392.

Melton *et al.* (1987) *Biochem. Pharm.* **36(1)**, 105-112

Melton *et al.* (1987) *Biochem. Pharm.* **36(1)**, 113-121

Napier, M.P. *et al.* (no prelo) "A phase I tumour site specific study of antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) in recurrent or metastatic colorectal carcinoma with pharmacokinetic analysis".

O'Sullivan *et al.* (1979) *Anal. Biochem.* **100**, 100-108

Rodrigues, M.L. *et al.* (1995) *Chemistry & Biology* **2**, 223

Roffler, S.R. *et al.* (1991) *Biochem. Pharmacol.* **42**, 2062

Searle, F. *et al.* (1981) "A human choriocarcinoma xenograft in nude mice: a model for the study of antibody localisation" *Br. J. Cancer* **44**, 137-144.

Senter, P.D. *et al.* (1988) "Anti-tumour effects of antibody-alkaline phosphatase conjugates in combination with etoposide phosphate" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4842-4846.

Sharma, S.K. *et al.* (1992) "Human immune response to monoclonal antibody-enzyme conjugates in ADEPT pilot clinical trial" *Cell Biophysics* **21**, 109-120.

Sharma, S.K. *et al.* (1994) "Galactosylated antibodies and antibody enzyme conjugates in antibody directed enzyme prodrug therapy" *Cancer* **73**, 1114-1120.

Szerkerke, M. & Driscoll, J.S. (1977) "The use of macromolecules as carriers of anti-tumour drugs" *Europ. J. Cancer* **13**, 529-537.



Wang, S.M. *et al.* (1992) *Cancer Research* **52**, 4484

Wileman *et al.* (1986) "Soluble asparaginase-dextran conjugate show increased circulatory persistence and lowered antigen reactivity" *J. Pharm. Pharmacol.* **38**, 264-271.

Zola, H. (CRC Press, 1988) "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques".



REFERÊNCIAS À TABELA 1

- (1) Abushowski, *et al.* (1977) *Journal of Biological Chemistry* **252**, 3578-3581.
- (2) Pyatak *et al.* (1980) *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **29**, 113-127.
- (3) Yashimoto *et al.* (1986) *Jpn. J. Can. Res.* **77**, 1264-1270.
- (4) Abushowski *et al.* (1984) *Cancer Biochem. Biophys.* **7**, 175-186.
- (5) Leonard *et al.* (1984) *Tetrahedron* **40**, 1585-1590.
- (6) Katre *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1487-1491.
- (7) Wie *et al.* (1981) *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.* **64**, 84-99.
- (8) Veronese *et al.* (1985) *Appl. Biochem. Biotechnol.* **11**, 141-152.
- (9) Beauchamp *et al.* (1983) *Analytical Biochemistry* **131**, 25-33.
- (10) Pizzo (1991) *Advanced Drug Delivery Reviews* **6**, 153-166.
- (11) Zalipsky (1985) WO 90/13540.
- (12) Yoshimoto *et al.* (1987) *Biochemical and Biophysical Research Communications* **148**, 876-882.
- (13) Aldwin & Nitecki (1987) *Analytical Biochemistry* **164**, 494-501.
- (14) Goodson & Katre (1990) *Biotechnology* **8**, 343-346.
- (15) Harris *et al.* (1989) *Applications in Cell Biology and Biotechnology* (p. 203-210) London: Plenum Press.
- (16) Delgado *et al.* (1990) *Biotechnology and Applied Biochemistry* **12**, 119-128.
- (17) Maeda *et al.* (1989) EPA O 340741.

84 811
EP 0 918 545

51

Lisboa,

11. OUT. 2000

Por ENZACTAR & D LIMITED

- O AGENTE OFICIAL -

O ADJUNTO



ENG.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1200 LISBOA

[Handwritten signature]

1/11

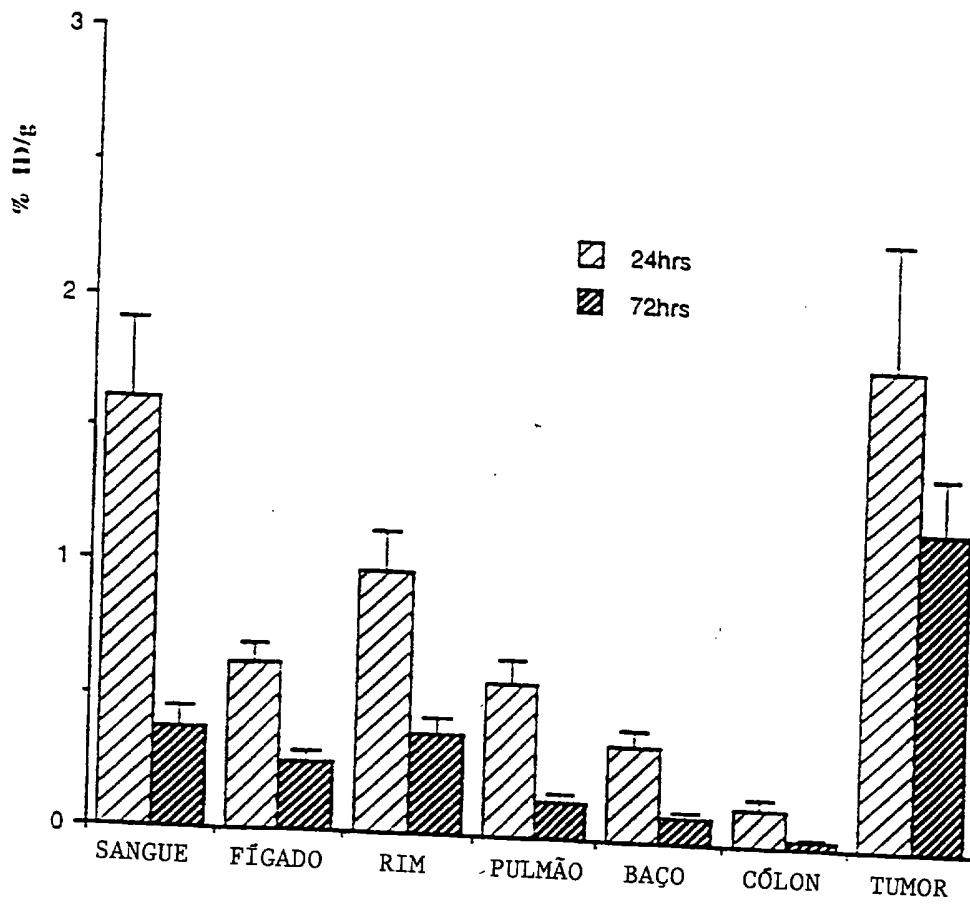


Figura 1

[Handwritten signature]

2/11

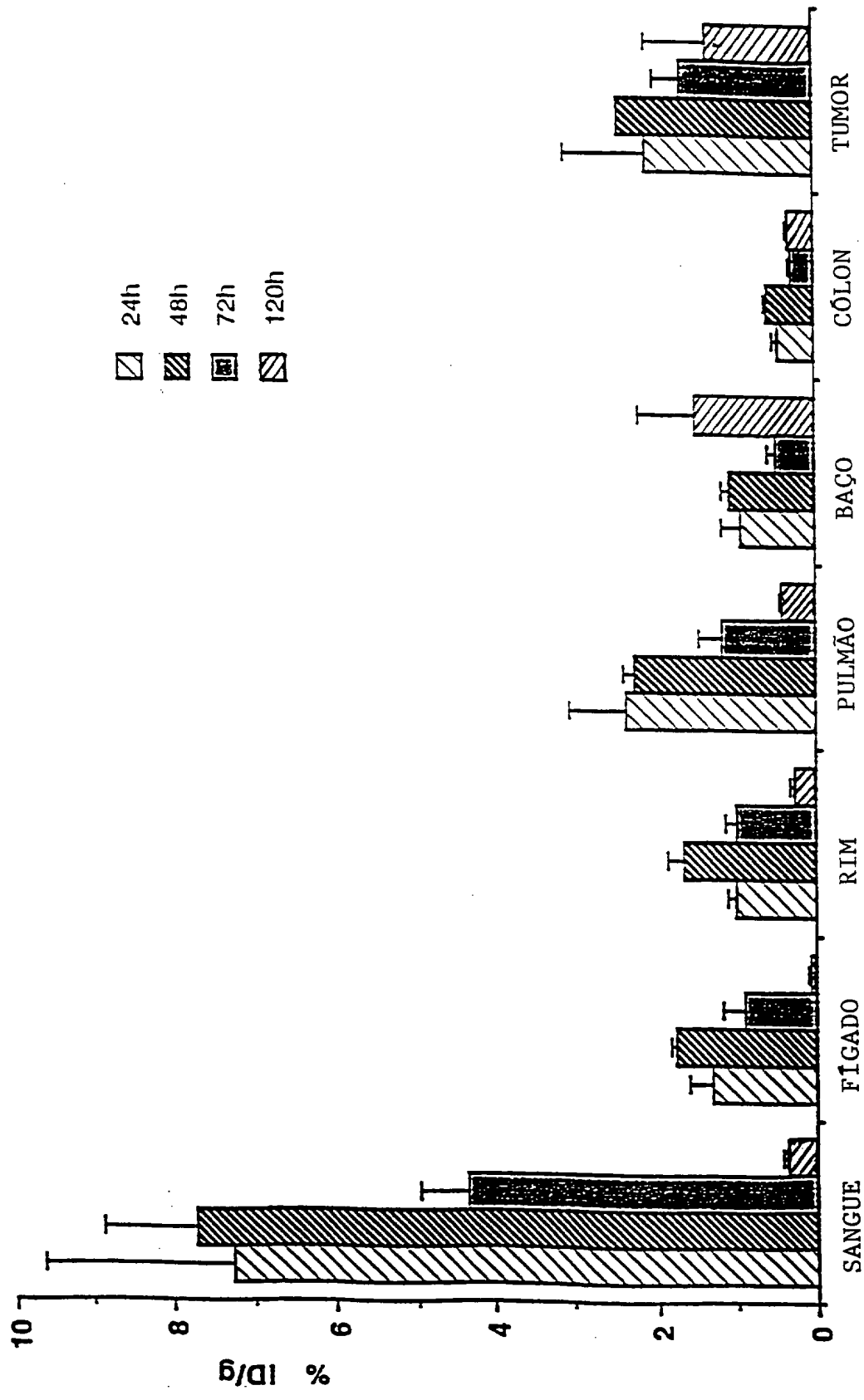


Figura 2(a)

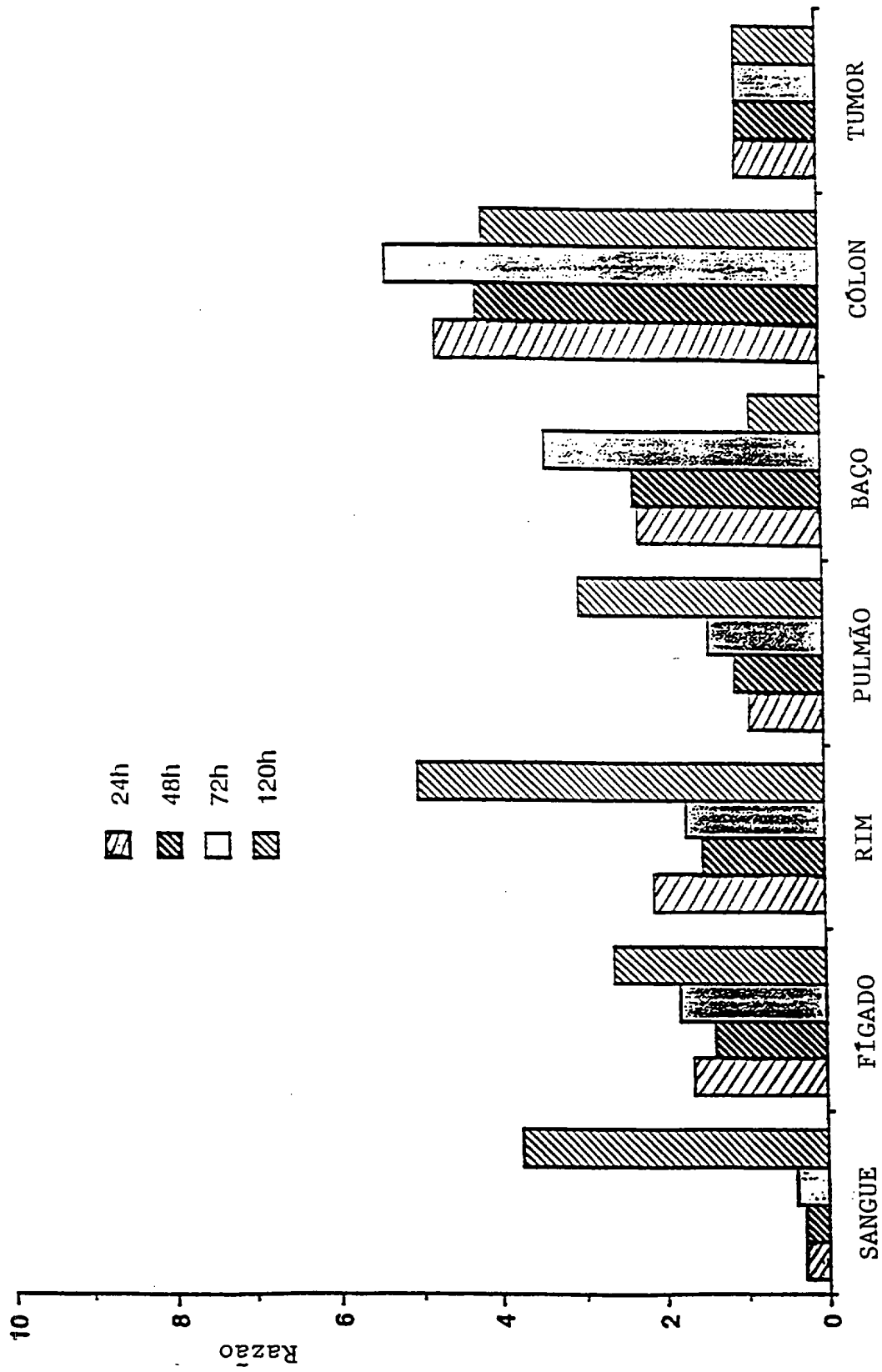


Figura 2(b)

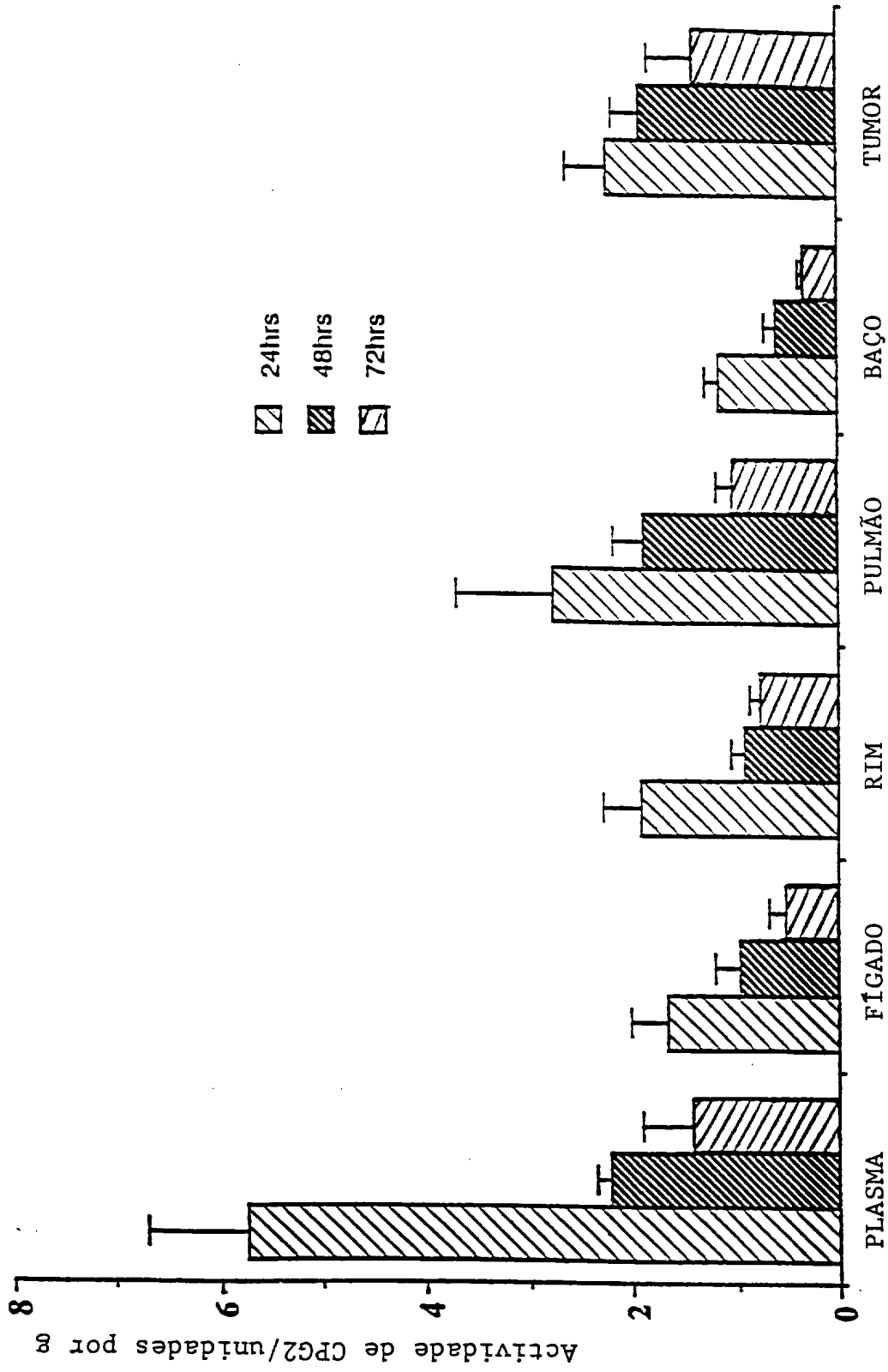


Figura 3(a)

[Handwritten signature]

5/11

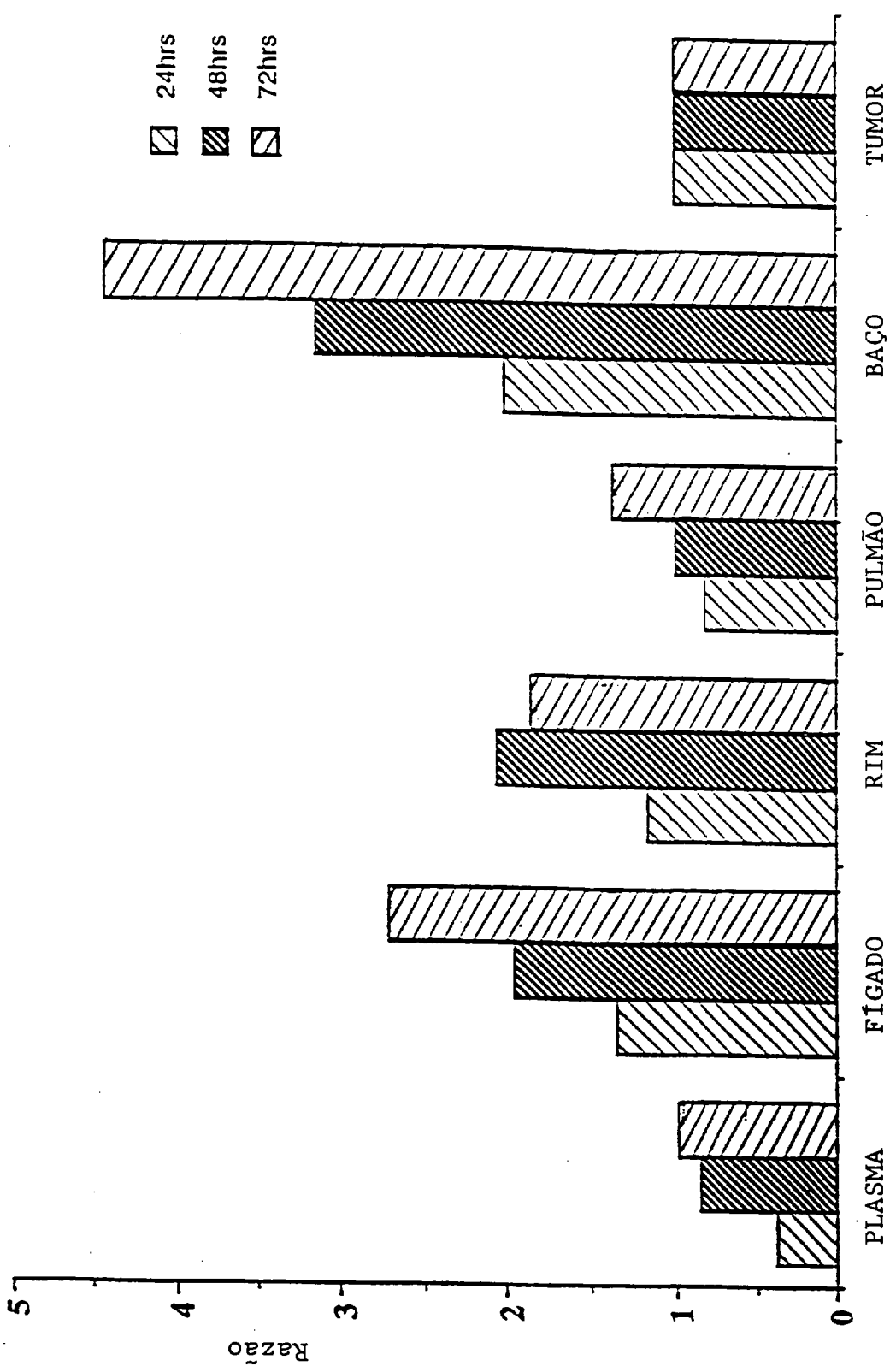


Figura 3(b)

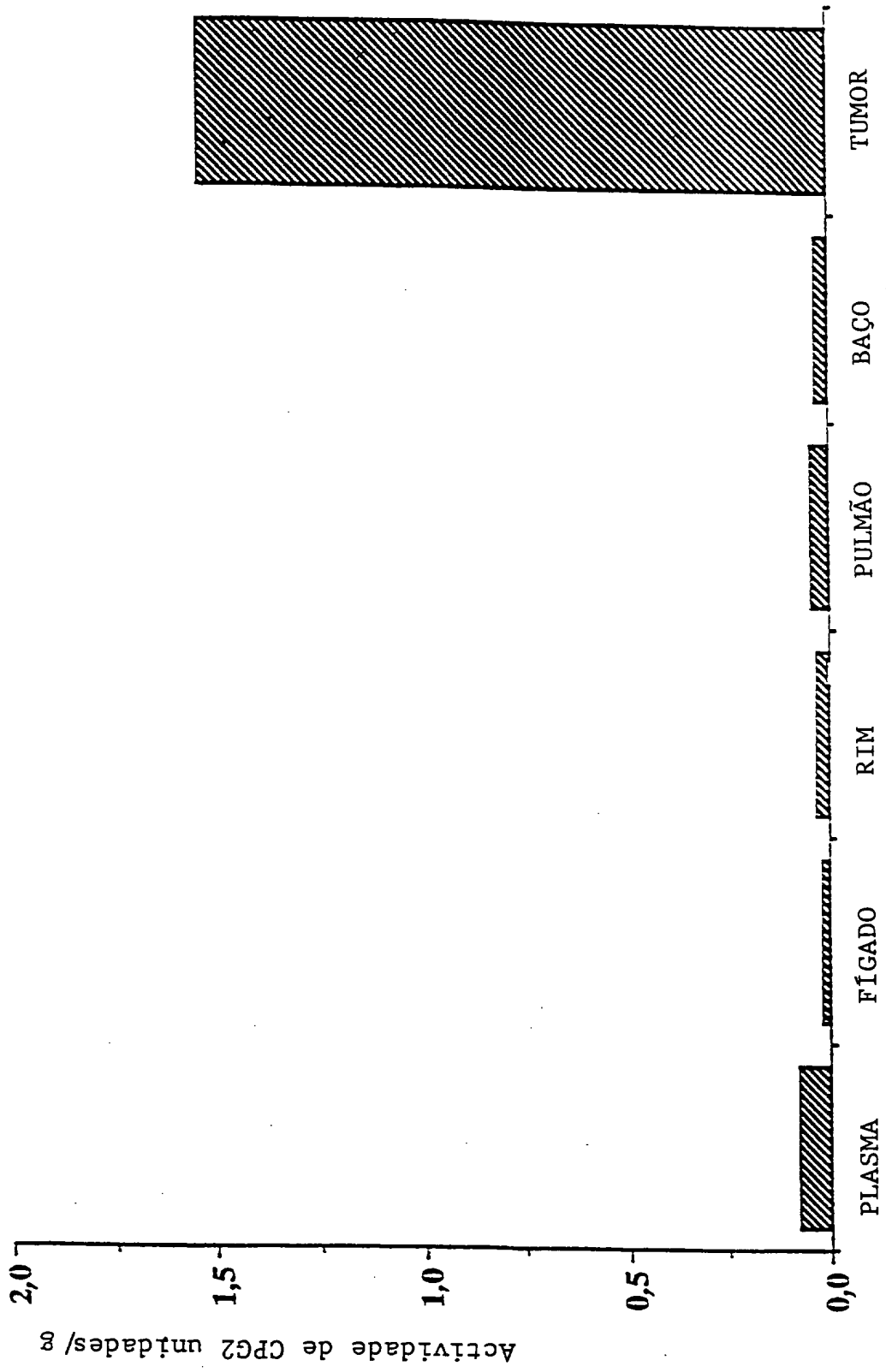


Figura 4(a)

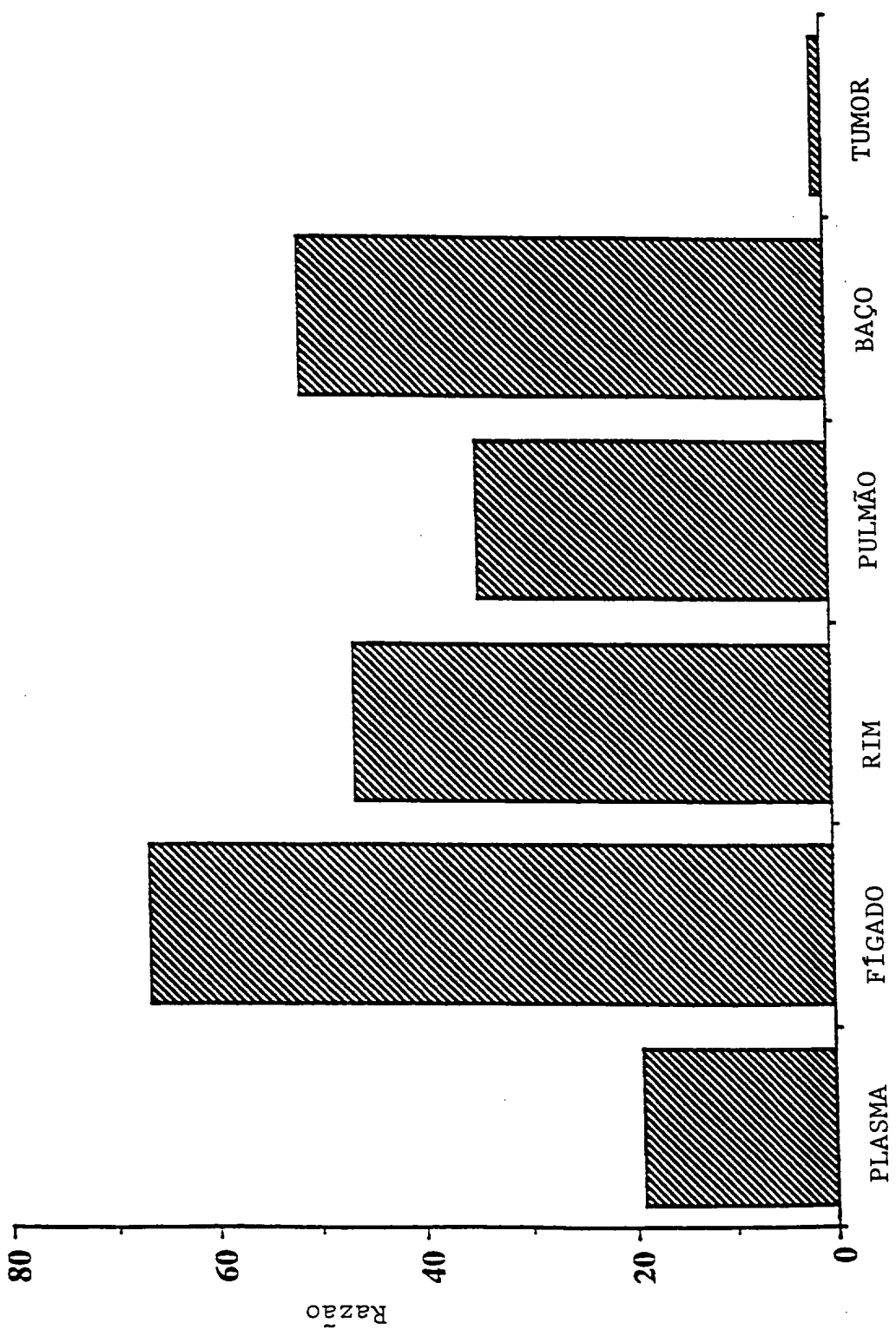


Figura 4(b)

[Handwritten signature]

8/11

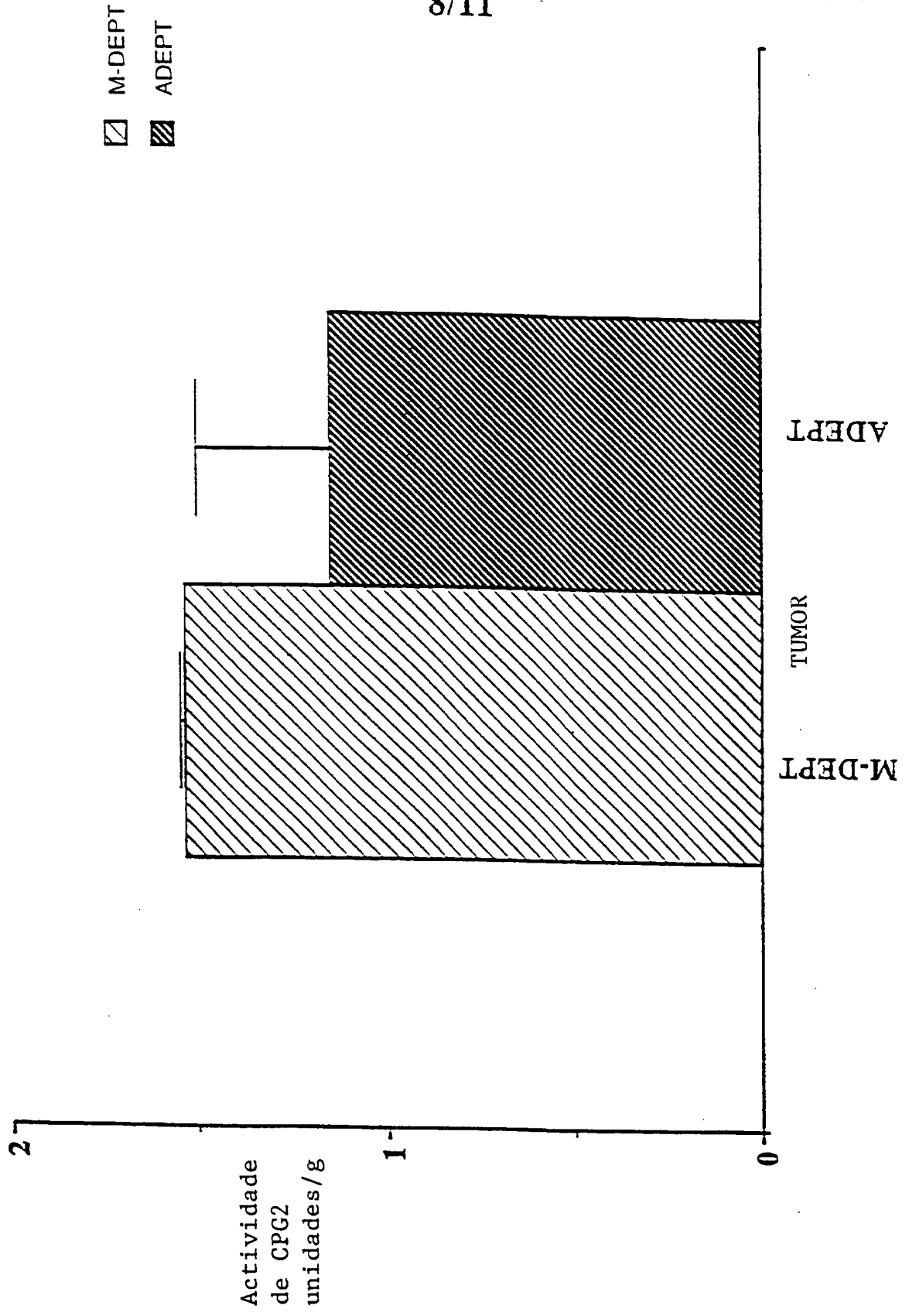


Figura 5

[Handwritten signature]

9/11

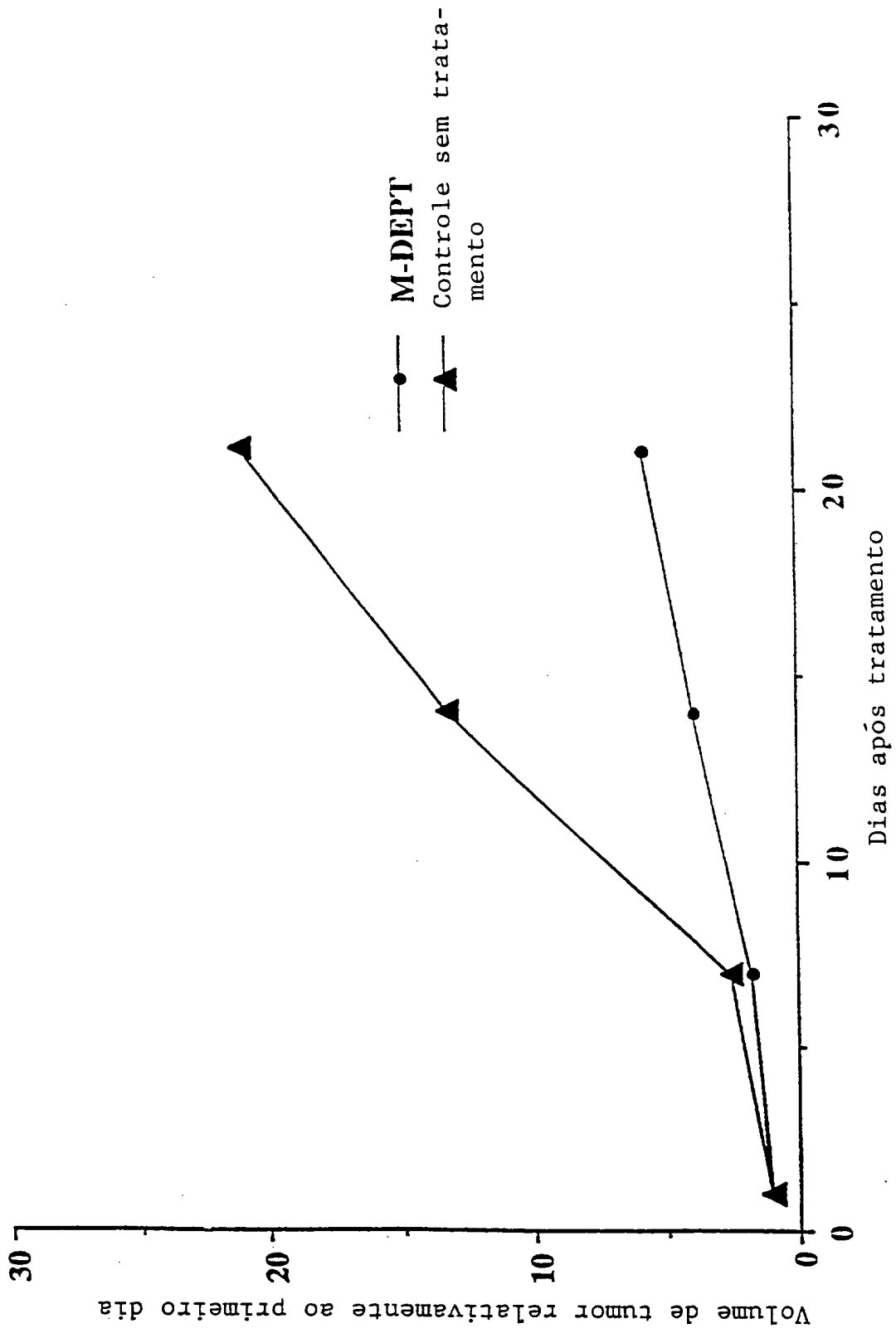


Figura 6

10/11

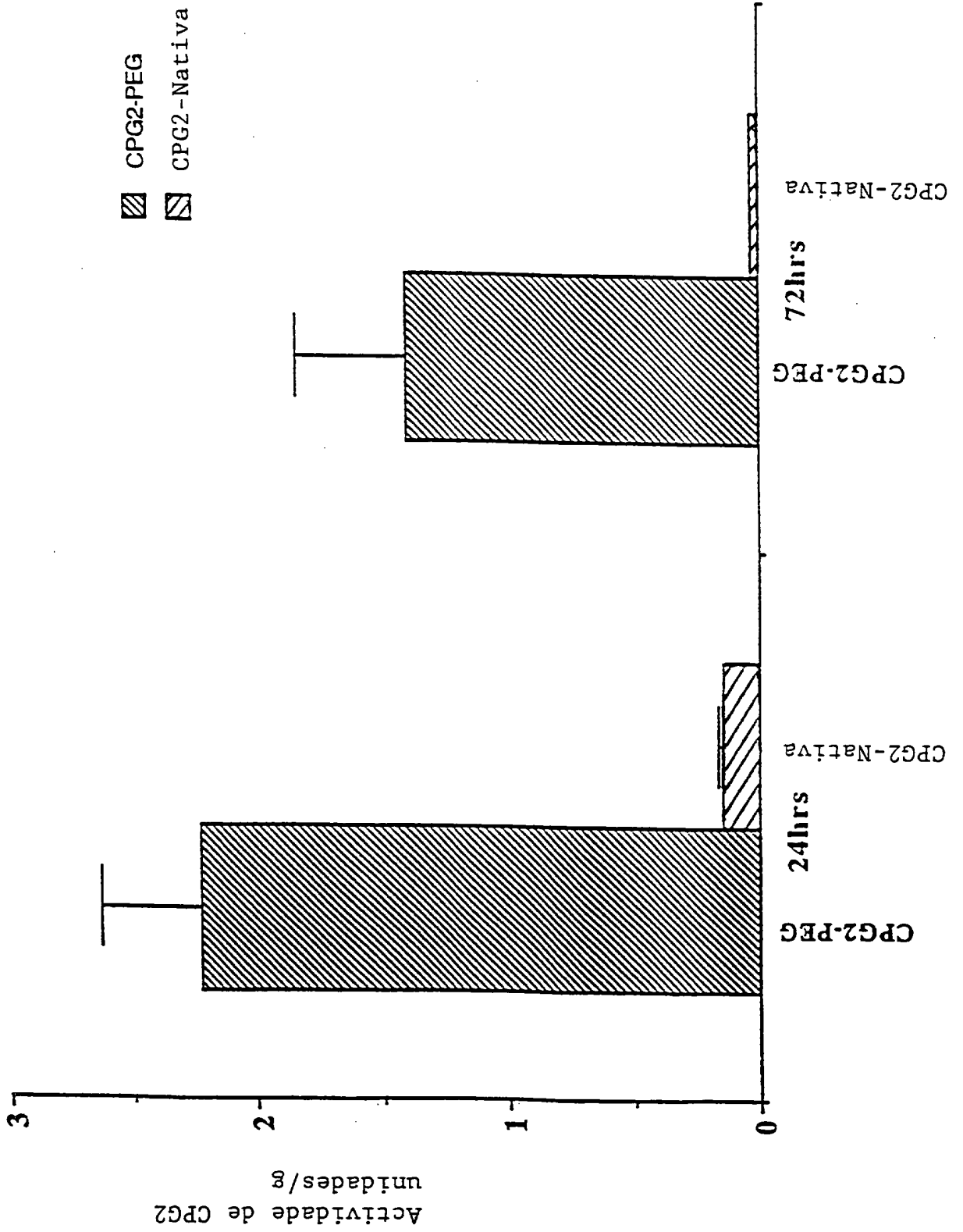


Figura 7

[Handwritten signature]

11/11



Figura 8

REIVINDICAÇÕES

1. Sistema terapêutico de três componentes que compreende
 - (i) um primeiro composto,
 - (ii) uma macromolécula catalítica que não se liga de forma específica a um antigénio de tumor, mas que é capaz, após administração ao compartimento vascular de um mamífero, de ser absorvida por um tumor no mamífero e é capaz de converter o primeiro composto num segundo composto e
 - (iii) um inibidor que, após administração ao referido compartimento vascular, reduz o nível da referida actividade de conversão catalítica no compartimento vascular e tecidos normais (não tumorais).

2. Sistema de acordo com a reivindicação 1, em que a macromolécula catalítica é um conjugado ou fusão de (i) uma enzima, ou sua parte e (ii) uma macromolécula, com a excepção da transferrina, tendo o conjugado, ou molécula de fusão, um PM de pelo menos 60 000.

3. Sistema de acordo com a reivindicação 2 em que a macromolécula é um polietilenoglicol; um dextrano; um poliaminoácido; uma proteína não específica para tumores, tal como uma imunoglobulina, uma albumina; ou hidroxipropilmetacrilamida.

4. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que a macromolécula compreende subunidades que não são biodegradáveis ligadas por unidades ligantes biodegradáveis.

5. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o inibidor é um composto pequeno que inactiva uma enzima.

6. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que o inibidor é um anticorpo.

7. Sistema de acordo com a reivindicação 6, em que o inibidor de anticorpo é poligalactosilado.

8. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a macromolécula catalítica é internalizada pelas células de tumor e é mais capaz de efectuar a referida conversão na presença de um cofactor intracelular endógeno, do que na sua ausência.

9. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores em que o primeiro composto é uma prodroga e o segundo composto é mais citotóxico do que o primeiro composto.

10. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que o primeiro composto é um metabolito.

11. Sistema de quatro componentes, que compreende um sistema de três componentes de acordo com a reivindicação 10 e adicionalmente um composto citotóxico antimetabolito, cuja citotoxicidade é mais reduzida pela presença do referido primeiro composto, do que pela presença do referido segundo composto.

12. Utilização de uma macromolécula catalítica que não se liga especificamente a um antigénio de tumor, mas que é capaz, após administração ao compartimento vascular de um mamífero, de ser absorvido por um tumor no mamífero e é capaz de converter um primeiro composto num segundo composto, para o fabrico de um medicamento para combater um tumor num paciente, em que tenha sido, está a ser, ou será administrado ao paciente um primeiro composto e tenha sido, está a ser, ou será administrado um inibidor que, após administração ao referido compartimento vascular, reduz o nível da referida actividade de conversão catalítica no compartimento vascular e tecidos normais (não tumorais).

13. Utilização de acordo com a reivindicação 12, em que a macromolécula catalítica é um conjugado, ou fusão de (i) uma enzima ou sua parte e (ii) uma macromolécula, com a excepção da transferrina, tendo o conjugado, ou molécula de fusão, um PM de pelo menos 60 000.

14. Utilização de acordo com a reivindicação 13, em que a macromolécula é um polietilenoglicol; um dextrano; um poliaminoácido; uma proteína não específica de tumores, como uma imunoglobulina, uma albumina ou hidroxipropilmetilacrilamida.

Lisboa, 11. OUT. 2000

Por ENZACTAR & D LIMITED

- O AGENTE OFICIAL -

O ADJUNTO



ENG.º ANTÓNIO JOÃO DA CUNHA FERREIRA Ag. Of. Pr. Ind. Rua das Flores, 74 - 4.º 1200 LISBOA
--