

MEMORIA DESCRITIVA

Resumo

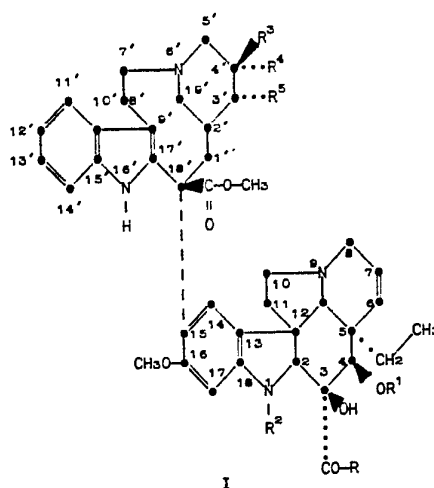
O presente invento refere-se a um processo para a preparação de conjugados de imunoglobulinas. Estes conjugados formam-se pela reacção de um alcaloide indole-di-hidro-indole-vinca de acção anti-neoplásica, e contendo um grupo hidrazida, que está ligada no átomo de carbono 3 ou 4 (C-3 ou C-4), com uma glicoproteína oxidada contendo

=====
ELI LILLY AND COMPANY

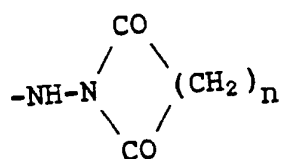
"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE CONJUGADOS DE IMUNOGLOBULINAS"

grupos aldeído.

As hidrazidas de vinda, utilizadas na preparação dos referidos conjugados apresentam a fórmula



em que R^2 é H, CH_3 ou CHO ; R^3 e R^4 são C_2H_5, H ou OH ; R^5 é H ; R^4 e R^5 , quando tomados conjuntamente, são oxirano; R é $NHNH_2$.



$O(C_1-C_3\text{-alquil}), NH_2, NH(C_1-C_3\text{-alquil}), NH-CH_2CH_2-Y$, 1-pirrolidinilo ou 1-piperidinilo; R^1 é por exemplo, H ou $(C_1-C_3\text{-alquil})CO$.

As imunoglobulinas são glico-proteínas, isto é, elas são proteínas às quais estão ligados oligo-sacáridos em vários locais. Os dióis vicinais destes oligo-sacáridos podem ser oxidados com per-iodatos, dando origem a di-aldeídos, e os grupos aldeído assim formados podem ser levados a reagir com várias aminas e hidrazinas, obtendo-se bases de Schiff e hidrazonas. Assim, por ex., Willan et al., FEBS Letters, 80, 133 (1977), procederam à oxidação de um oligo-sacárido ligado a um radical de asparagina na posição 297 (segundo a numeração adoptada para a proteína Eu de mieloma da IgG1 humana), na área CH₂ da IgG de coelhos. A seguir à sua purificação, este material oxidado foi levado a reagir com o radical livre 4-amino-2,2,6,6-tetrametil-piperidin-1-oxilo e a imina resultante (reacção do grupo amino com aldeídos de sacáridos), reduzida com NaBH₃CN, formando-se uma proteína marcada com spine. Timofeev et al., FEBS Letters, 89, 191 (1978), usaram também anticorpos glicoproteicos, oxidados, para a preparação de materiais marcados com spine. Murayama et al., Immunochimistry, 15, 523 (1978), marcaram com compostos contendo amino, por via da formação de bases de Schiff, grupos de oligo-sacáridos oxidados com per-iodato, numa imunoglobulina (IgG). As "aminas" utilizadas eram o ácido aspártico e peroxidase de rábano bravo. Utilizou-se o conjunto de base de Schiff-ácido aspártico para detectar a antigenidade de IgG humana mediante contra-imunoelectroforese. O'Shannessy et al., Immunology Letters, 8, 273 (1984), acoplaram hidrazida de biotina com grupos aldeído de imunoglobulinas oxidadas e sugeriram o emprego deste processo para a conjugação de corantes (pigmentos) fluorescentes com anticorpos monoclonais.

Chua et al., Biochimica and Biophysica, Acta, 800, 291 (1984), oxidaram grupos de hidratos de carbono (glicídios) na área constante da cadeia pesada de IgM (que tem um teor de hidratos de carbono relativamente elevado)

formando aldeídos. Em seguida, estes grupos aldeído foram levados a reagirem com grupos hidrazida, ligados a uma membrana lipossomal. Os anticorpos IgM monoclonais mostravam-se específicos para uma proteína contendo um hapteno de estrutura 1-dimetilamino-naftaleno-5-sulfonilo.

Rothfus et al., J.B.C., 238, 1402 (1963) lançaram mão da oxidação com per-iodato, seguida da redução com borohidreto para determinar a identidade do componente sacarídea do glico-péptido da gama-globulina humana.

A ligação de agentes citotóxicos a imunoglobulinas foi novamente analisada por Blair et al., J. Immun. Meth., 59 129 (1983) e Ghose, Blair and Kulkarni, Methods in Enzymology, 93 280 (1983). A página 130 do seu trabalho, Blair et al indicam a possibilidade de ligar o agente citotóxico ao oligo-sacário de uma Ig. No entanto, não se refere a oxidação, dando origem a um grupo aldeído, e ligação do agente citotóxico ao grupo aldeído. Ghose et al menciona a oxidação com per-iodato de IgG anti-BSA de coelho contendo oligo-sacáridos para formarem grupos aldeído, e a reacção destes grupos com etilenodiamina, seguida de redução com borohidreto da base de Schiff, para se formarem novos grupos amino primária de aminoetilo, ligados à fracção de oligo-sacário das glicoproteínas.

O requerimento de patente europeia EPO nº 88695 recomenda largamente os processos referidos nas publicações atrás indicadas; isto é, a reacção de um aldeído obtido por oxidação de uma fracção de hidrato de carbono com uma hidrazina, hidrazida ou amina ligante de um composto, para se formar um conjugado. Aparentemente, este requerimento de patente trata de grupos de acoplamento que são conjugados com o anticorpo contendo grupos aldeído, e o próprio grupo de acoplamento está combinado com um suporte insolúvel ou um segundo composto. Reivindicam-se também conjugados de

anticorpos contendo qualquer composto ligado a uma fracção glicídica de um anticorpo por via de uma ligação covalente com hidrazona, imina ou enamina. Mais especialmente, reivindicam-se agentes de acoplamento peptídicos, amino-ácidos de acoplamento ou um agente de acoplamento de fórmula geral $W(CH_2)_nQ$, em que W representa $C_6H_5NH-CH_2-$ ou $-CH_2-$, e Q representa um amino-ácido, péptido, agente quelante ou derivado de um agente quelante. Medicamentos especificamente revelados para alibertação mediado por anticorpos, através deste sistema, incluem daunomicina, bleomicina, vinblastina, vincristina e 5-fluoro-uracilo. No entanto, não se fornecem pormenores sobre a maneira como devem ser ligados estes medicamentos e, em especial, falta qualquer indicação sobre a forma de ligação de VLB ou vincristina, uma vez que nenhuma delas contém uma função hidrazida ou amina. Destaca-se o acoplamento a fragmentos de Fab-anticorpos. Refere-se especificamente apenas o acoplamento de ALKERAN^(R) (N-[bis(beta-cloroetil)-fenil]-alamina) e de anticorpos monoclonais contra eritrócitos de ovelhas. Não se mencionam quaisquer dados in vivo.

Além disso, VLB, vincristina e outros medicamentos de acção antineoplásica têm sido acoplados a imunoglobulinas ou outras proteínas.

O requerimento de patente Britânica nº 2.090.837 a revela conjugados de imunoglobinas, ligados por covalência a uma fracção de pervinca, mediante formação de uma amida. A ligação amídica propriamente dita, forma-se pela reacção de um alcaloíde de pervinca de indole-dihidro-indole, tal como 4-desacetil-VLB, por intermédio de um grupo carboxazida em C-3, com um grupo amino livre de uma imunoglobina ou um fragmento de uma imunoglobulina. Prepara-se a azida a partir de 4-desacetil-VLB-3-carboxi-hidrazida que, por sua vez, é obtida pela acção de hidrazina sobre VLB. A ligação covalente formada entre a fracção de pervinca e a

imunoglobulina geralmente não é reversível; isto é, a ligação não está sujeita a cisão hidrólítica (química), em presença de um pH fisiológico.

A parente norte-americana nº 4.203.898 (Cullinan I) revela e reivindica 3-carboxi-azidas de pervinca-alcalóides de indole-dihidroindole, tais como VLB, vincristina, etc. Estas azidas foram utilizadas para a preparação dos conjugados de imunoglobulinas, ligados por covalência, mencionados no requerimento anterior. A azida prepara-se a partir de uma 4-desacetil-3-carboxi-hidrazida de um alcalóide de indole-dihidroindole. Estas hidrazidas são também reveladas e reivindicadas na referida patente.

A patente norte-americana nº 4.166.810 (Cullinan II) revela uma série de derivados de 4-desacetil-VLB-3-carboxihidrazida, inclusivé derivados N,N-dialquilo. Os compostos são preparados pela formação de uma hidrazona, por reacção do grupo amina sec. com um aldeído, ou uma cetona, seguida da redução da enamina resultante.

Neuss et al., Tetrahedron Letters, 783 (1968), revelam a leurosina hidrazida.

Barnett et al., J. Med. Chem., 21, 88 (1978), revelam também as hidrazidas de VLB e derivados de indole-dihidro-indole relacionados.

Conrad et al., ibid., 22, 391 (1979) discutem, de maneira genérica, as amidas de VLB e as suas actividades como agentes anticancerígenos. Revelam-se também as mesmas amidas, atrás discutidas, em relação com Cullinan I. Além disso, preparou-se uma ponte de dissulfureto, em que o grupo carboxamida foi ligada a um agrupamento de etilditio-etilcarboxamida. Revelam-se também radioimunoensaios para

VLB e vincristina. O radioimunoensaio foi realizado pelo acoplamento de azida de 4-desacetilvinblastinóico (4-desacetil-VLB-3-carboxazida) com BSA. Este antigénio foi utilizado para a produção de anticorpos em coelhos, que, em seguida, iriam captar a fracção de VLB do antigénio. A quantidade de antigénios foi determinada mediante VLB marcado com trítio--
[Root et al., F.A:C.S.S., 2nd National Meeting, October 6-10, 1975, Abstract 183.]

Hargrove, nas patentes norte-americanas nos. 3.392.173 e 3.387.001, revela novos ésteres em C-4 de VLB, vincristina, leurosídina, etc. Entre os referidos ésteres encontra-se um éster de cloroacetilo, derivado desse que se empregou na EP 124.502 para o acoplamento com uma proteína. Hargrove (II) fez reagir este éster de 4-cloroacetilo com aminas para a preparação, por ex., de um éster de N,N-dimetil-glicina--vinglicinato.

Langone et al., Anal. Biochem., 95, 214 (1979) idealizaram radioimunoensaios para vinblastina e vincristina. Os antigénios utilizados foram preparados pela oxidação de VLB, formando-se um ácido dicarboxílico e, em seguida, procedeu-se ao acoplamento deste produto com um reagente carbodiimida de ligação.

Teale et al., Brit. J. Clin. Pharm., 4, 469 (1977) idealizaram também radioimunoensaios para vinblastina e vincristina. O alcalóide de pervinca conjuga-se com a albumina mediante uma reacção de Mannich, usando um grupo amina na proteína (BSA), formaldeído e vinblastina. No entanto, não se indica o ponto de ligação do alcalóide de pervinca, vinblastina ou vincristina.

Johnson et al., Brit. J. Can. 44, 372 (1981) revelam a preparação de vindesina ligada a anti-CEA-
-imunoglobulina, por meio de uma azida. Há que sublinhar-se de que a azida de desacetil-VLB e o análogo de azida da vindesina são idênticos, dado que os compostos apenas se distinguem na parte de C-3 do ácido carboxílico, e esta parte (éster ou amina) desaparece após a reacção de acoplamento. Descobriu-se que estes conjugados são citotóxicos para as células tumorais humanas, in vitro. A patente britânica nº GB 2.090.837 (inventores: Rowland e Simmonds) trata do mesmo assunto.

Rowland et al., Cancer Immunology and Immunotherapy, 19 1 (1985), discutem as propriedades antitumorais de conjugados de vindesina-anticorpos monoclonais (derivados de 4-desacetil-VLB conjugados através do C-3 do grupo carboxiazida, tal como se descreve na patente britânica nº 2.090.837 A, e em Johnson et al.). Ensaíram-se 4 conjugados relativamente a enxertos heterólogos tumorais, humanos, em ratos atímicos, tendo demonstrado todos alguma acção antitumoral. Em relação ao mesmo tumor, vindesina mostrou-se inactiva, quando administrada em doses não-tóxicas.

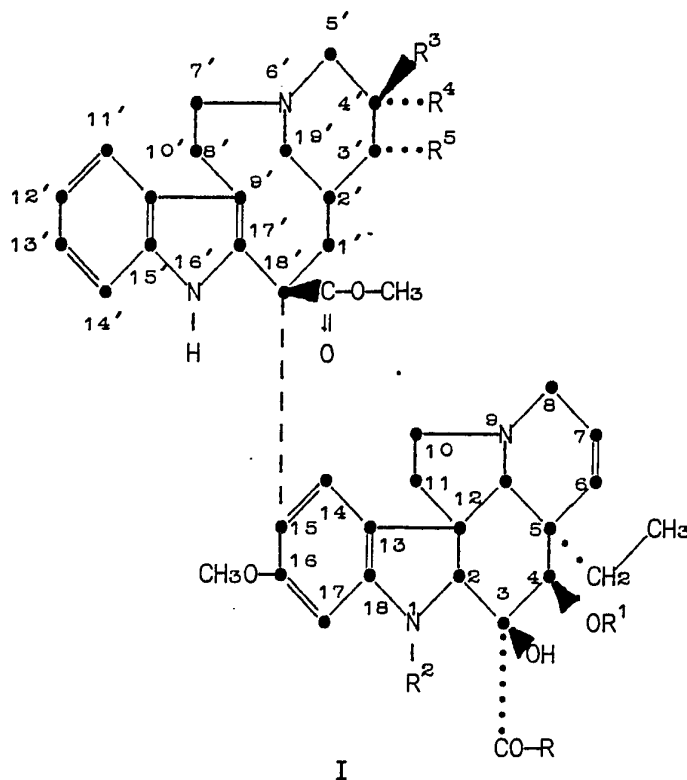
A EP0 124502 revela conjugados preparados a partir de uma imunoglobulina e um 4-desacetil-VLB ou vindesina, ou uma outra 4-desacetil-VLB-3-carboxamida, ligada por meio de um 4-succinato; isto é, um grupo ligante ou uma ponte entre o grupo 4-hidroxi e a proteína. O grupo de ponte desta estrutura pode ser CO-CH_2 (de um grupo 4-cloroacetilo) ou $\text{CO(CH}_2)_n\text{-CO}$ (ácido succínico ou glutárico). Os mesmos derivados de 4-succinilo vêm revelados no requerimento de patente britânica nº GB 2.137.202, e os conjugados formados a partir destes derivados estão referidos em GB 2.137.210.

Bumol et al., Proc. Am. Assn. Cancer Research, 25 356 Abstract 1410 (1984) (Bumol I), analisam as características de um conjugado preparado segundo a patente GB 2.137.210; isto é, um conjugado de 4-desacetil-4-succinoil-VLB com um anticorpo monoclonal para um adenocarcinoma humano (KS1/4). Bumol et al., Federation Proceedings, 44 1864 Abstract 8484 (1985) (Bumol II) discutem um conjugado semelhante com um anticorpo monoclonal para um melanoma humano. Bumol et al., J. Cellular Biochemistry, Supplement 9A Abstract 0124 (1985) (Bumol III), discutem ainda trabalhos posteriores sobre o conjugado de 4-desacetil-4-succinoil-VLB para KS1/4 (adenocarcinoma).

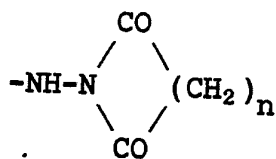
No entanto, nenhum dos trabalhos referenciados atrás revela ou sugere a conjugação de um derivado aminado ou de hidrazida de um alcalóide de indole-dihidro-indole, dímero, de acção antineoplásica, com um glícido oxidado (oxidado para um ou mais grupos aldeído), na superfície de um anticorpo monoclonal, que é igualmente uma glicoproteína.

O presente invento refere-se a conjugados formados pela reacção de uma glicoproteína oxidada, contendo um ou mais grupos aldeído, com uma hidrazida de vinca. O grupo hidrazida pode ser uma carboxi-hidrazida em C-3 (CO-R na fórmula I) ou um éster contendo o grupo hidrazida em C-4, ligado (R^6 tal como se define atrás) por meio de uma cadeia de hidrocarbonetos.

A fracção vinca do conjugado do presente invento vem caracterizada pela fórmula I, adiante apresentada. Os conjugados do presente invento são formados pela reacção de um grupo aldeído de uma glicoproteína com um composto de estrutura I:



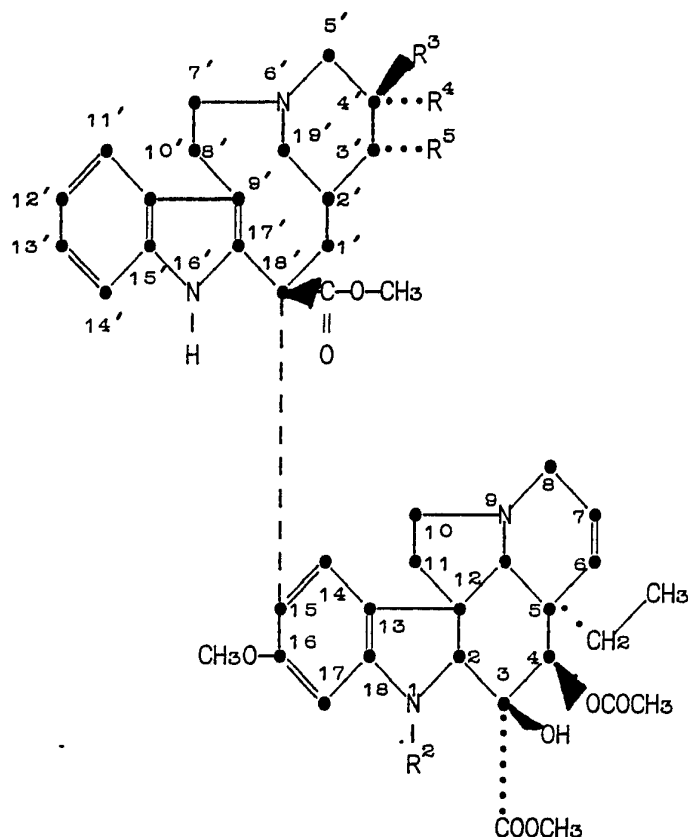
em que R^2 representa hidrogénio, metilo ou aldeído (CHO); quando R^4 e R^5 são considerados separadamente, R^5 representa H, e um dos símbolos R^3 e R^4 representa etilo e o outro símbolo representa H ou OH; e, quando R^4 e R^5 são considerados em conjunto com os átomos de carbono, aos quais estão ligados, eles formam um anel de oxirano, sendo que, neste caso, R^3 representa etilo; R representa $-NHNH_2$,



-O(C₁₋₃-alquil), NH₂, -NH(C₁₋₃-alquil), -NH-CH₂CH₂-Y, 1- pirrolidinilo ou 1-piperridinilo, onde n é igual a 2 a 4, e Y representa Cl, -OCH₃ ou -SCH₃; R₁ representa H, (C₁-C₃-alquil) -CO, substituído por cloro ou R₆, onde R₆ representa -COXCONHNH₂, onde X representa C₁-C₄-alcileno de cadeia linear, C₂-C₈-alcileno de cadeia ramificada, C₂-C₄-alcenileno, C₃-C₄-alcinileno, C₃-C₆-cicloalcileno, fenileno, C₁-C₄-alcileno substituído por hidróxi, ou uma ligação directa; sendo que R não poderá ser NHHN₂, se R¹ for R⁶, e R¹ não poderá ser R⁶, se R for NHHN₂.

O símbolo X representado nas fórmulas atrás referidas inclui grupos, tais como metileno, etileno propileno, butileno, vinilo, propileno, butenileno, butinileno, propinileno, hidróxi-etileno, 1,2-dihidróxi-etileno, 1,2-dimetileno, 1,2,3,4,-tetrahidróxi-butileno, 3,4-dimetilbutileno, 1,4-ciclohexileno, 1,4-fenileno, 1,2-fenileno, e grupos similares.

Os alcalóides de indole-dihidro-indole que são úteis para a preparação das hidrazidas intermédias que formam os conjugados do presente invento, podem representar-se pela fórmula II:



II

em que R² a R⁵ têm os significados atrás referidos.

Na fórmula II, representa-se VLB (vinblastina), quando R² significa metilo, R³ significa hidroxí, R⁴ denota etilo e R⁵ assinala H; quando R² representa formilo R³ representa hidroxí, R⁴ denota etilo e R⁵ é H, então a estrutura apresentada corresponde à vincristina (VCR); quando R² representa metilo, R³ denota etilo, R⁴ representa hidroxí e R⁵ representa H, a estrutura corresponde à leurosídina; quando R² representa metilo ou formilo, R³ representa etilo e R⁴ e R⁵, em conjunto com os átomos de carbono aos quais estão ligados, formam um anel de alfa-epóxido, então a estrutura apresentada corresponde à leurosina e leuroformina, respectivamente; quando R² representa metilo, R³ denota etilo e R⁴ e R⁵ são H, a estrutura representada corresponde à desoxi-VLB 'B' (4'-desoxi-leurosídina

ou 4'-epidesoxi-VLB); quando R^2 representa metilo, R^4 representa etilo e R^3 e R^5 são hidrogénio, a estrutura apresentada equivale à desoxi-VLB 'A' ou 4'-desoxi-VLB; e quando R^2 representa CH_3 , R^3 significa etilo, R^4 e R^5 denotam hidrogénio então a fórmula representada significa a 4'-epidesoxi-vincristina (1-fórmula-1-desmetil-4'-desoxi-leurosidina).

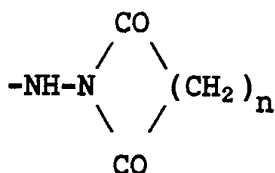
Na literatura científica existem dados os alcaloides de vinca progenitores (II) nas seguintes patentes; leurosina (patente norte-americana nº 3.370.057), VLB (patente norte-americana nº 3.097.137), leurosidina (vinrosidina) e leurocristina (adiante referenciadas sob a designação de vincristina) (ambas na patente norte-americana nº 3.205.220), desmetil-VLB (patente norte-americana nº 3.354.163), 4'-epivincristina (patente norte-americana nº 4.143.041), leuroformina, formil-leurosina (patente norte-americana nº 4.279.816) e desoxi-VLB 'A' e 'B' (Tetrahedron Letters, 783 (1958)).

As hidrazidas que são apropriadas para a formação dos conjugados do presente invento são preparados de maneira diferente, consoante o grupo hidrazida esteja ligado ao C-3 ou ao C-4. As hidrazidas em C-3 preparam-se através do processo divulgado na patente norte-americana nº 4.203.898, coluna 12, linha 65 e seguintes, e no exemplo prático 3, col. 18. De acordo com este processo de síntese faz-se reagir uma hidrazina anidra com um alcaloide de vinca de fórmula II, em etanol, num tubo hermeticamente fechado a cerca de 60° C. O produto desta reacção é uma 4-desacetil-3-carboxi-hidrazida, porque o grupo acetoxi em C-4 sofre hidrólise nas condições básicas da reacção. Caso haja vantagem em preparar um éster em C-4 (R^1 na fórmula I representa $(C_1-C_3\text{-alquilo})-CO$ ou $(C_1-C_3\text{-alquilo})-CO$, substituído por Cl), a carboxi-hidrazida em C-3, segundo a fórmula I, em que R^1 representa hidrogénio, será preciso primeiro protegida pela reacção com acetona, formando um derivado de N,N-propilideno.

Uma vez o grupo NH_2 acilável da hidrazida protegido seguramente contra uma eventual acilação, este derivado "protegido" pode então ser acilado, de maneira usual, com um haleto de acilo (cloreto de cloroacetilo, por ex.,) ou um anidrido de ácido (anidrido propiônico, por ex.,). Em seguida, o grupo protector pode ser removido mediante tratamento com um ácido. Se a acilação se verificar também no hidroxilo em C-3, o que acontece normalmente, este grupo acilo em C-3 poderá ser removido, de preferência, mediante tratamento com sílica-gel h-umido (cf. Hargrove, patente norte-americana nº 3.392.173).

Quando o grupo hidrazida faz parte de uma cadeia de C-4 (isto é, faz parte de R^6 , na fórmula I), os materiais de partida de 4-desacetilo são preparados da seguinte forma, consoante a natureza do grupo em C-3: quando C-3 é um grupo éster, o derivado de 4-desacetilo é preparado mediante o processo segundo Hargrove, patente norte-americana nº 3.392.173, exemplos práticos 1 a 5; quando C-3 é um grupo amida, o derivado de 4-desacetilo é preparado pelo processo segundo Conrad et al. supra, ou Cullinan, patente norte-americana nº 4.203.898. Este processo implica a preparação de uma carboxihidrazida em C-3, acompanhado por hidrólise em C-4. Em seguida, a hidrazida é transformada na azida e a azida é levada a reagir com amônia ou uma amina primária de fórmula $\text{NH}_2-(\text{C}_1-\text{C}_3\text{-alquilo})$, ou com $\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3$, $\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$, pirrolidina, piperidina ou $\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Cl}$. Um processo preferido para a preparação deste último composto, ou seja, cloroetilamida, para se obter o desejado derivado de carboxamida em C-3 e de hidroxil em C-4, consiste na decomposição de uma 3''-(beta-cloroetil)-3-spiro-5''-oxazolidino-2'', 4''-diona de um alcalóide de pervinca, segundo a fórmula II, atrás referenciada. A preparação destes derivados de oxazolidina-diona descreve-se na patente norte-americana RE nº 30.560, Miller e Gutowski. A preparação da beta-cloroetilamida

a partir da oxazolidinodiona, atrás mencionada, descreve-se no exemplo 1 da patente norte-americana nº 4.357.334 (Miller e Gutowski). (Exemplo 2, da mesma patente, prepara-se a mesma beta-cloro etilamida, mediante o processo tradicional com azida). A amida primária (R, na fórmula I, representa NH₂), pode também ser preparada mediante amonólise directa ou por redução da hidrazida com níquel de Raney (cf., também, a patente norte-americana nº 4.203.898. Por último, quando R, na fórmula I, for



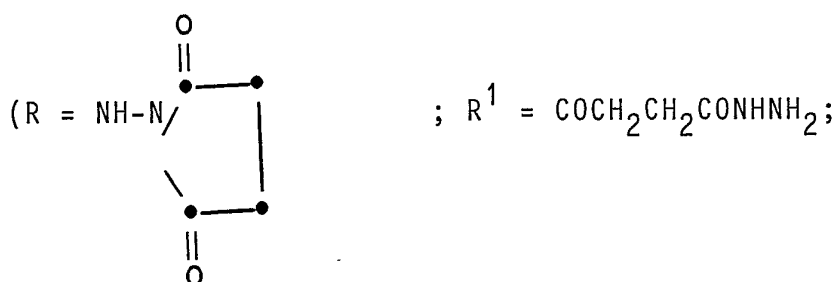
onde n é igual a um número inteiro de 2 a 4; isto é, uma adipimida, glutarimida, succinimida cíclicas, respectivamente, os derivados de 4-hidroxi serão preparados através do processo descrito no requerimento co-pendente de Cullinan, nº 745.562, e que corresponde ao requerimento europeu nº 86304522.5.

A seguinte lista contém alguns dos derivados de pervinca, de fórmula I, que podem ser utilizados no âmbito do presente invento, indicando-se também os respectivos nomes genéricos pelos quais se conhecem neste ramo da Química:

4-Desacetil-VLB-3-carbixihidrazida (fórmula I, R = NHH₂; R¹ = R⁵ = hidrogénio; R² = metilo; R³ = hidroxi; R⁴ = etilo.

4-Desacetil-VLB-4-hemi-succinato-hidrazida (R = OCH₃; R¹ = COCH₂CH₂ CONHH₂; R² = metilo; R³ = hidroxi; R⁴ = etilo; R⁵ = hidrogénio).

4-Desacetil-VLB-3-carboxihidrazida-N,N-succinimida-4-hemi-succinato-hidrazida



R² = metilo; R³ = hidroxí; R⁴ = etilo; R⁵ = hidrogénio).

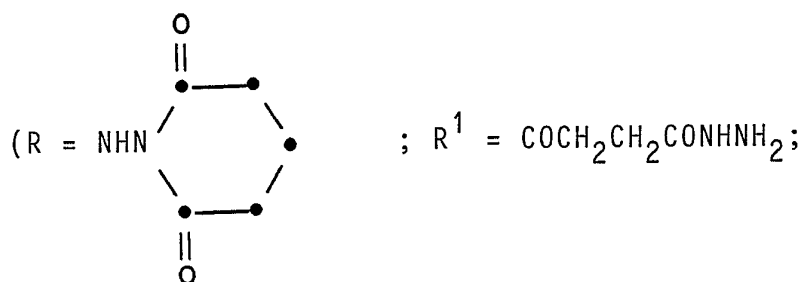
4-Desacetil-VLB-3-carboxiamida-4-hemi-succinato-hidrazida (R = NH₂; R¹ = COCH₂CH₂CONHNNH₂; R² = metilo; R³ = hidroxí; R⁴ = etilo; R⁵ = hidrogénio).

4-Desacetil-VLB-4-hemi-glutarato-hidrazida (R = OCH₃; R¹ = COCH₂CH₂CONHNNH₂; R² = metilo; R³ = hidroxí; R⁴ = etilo; R⁵ = hidrogénio).

4-Desacetil-VCR-4-hemi-succinato-hidrazida (R = OCH₃; R¹ = COCH₂CH₂CONHNNH₂; R² = CHO; R³ = hidroxí; R⁴ = etilo; R⁵ = hidrogénio):

4-Desacetil-4'-epidesoxi-VLB-4-hemi-succinato-hidrazida (R = OCH₃; R¹ = COCH₂CH₂CONHNNH₂; R² = metilo; R³ = etilo; R⁴ = R⁵ = hidrogénio):

4-Desacetil-VLB-3-carboxihidrazida-N,N-glutarimida-4-hemi-succinato-hidrazida



$R^2 = \text{metilo}; R^3 = \text{hidroxi}; R^4 = \text{etilo}; R^5 = \text{hidrogénio}).$

4-Desacetil-VCR-3-carboxihidrazida
($R = \text{NHNH}_2; R^1 = R^5 = \text{hidrogénio}; R^2 = \text{CHO}; R^3 = \text{hidroxi}; R^4 = \text{etilo}).$

4-Desacetil-4'-epidesoxi-VLB-3-carboxihidrazida ($R = \text{NHNH}_2; R^1 = R^4 = R^5 = \text{hidrogénio}; R^2 = \text{metilo}; R^3 = \text{etilo}).$

4-Desacetil-VLB-3-etilcarboxamida-4-hemisuccinato-hidrazida ($R = \text{NHCH}_2\text{CH}_3; R^1 = \text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CONHNH}_2; R^2 = \text{metilo}; R^3 = \text{hidroxi}; R^4 = \text{etilo}; R^5 = \text{hidrogénio}).$

4-Desacetil-VLB-3-metoxietilcarboxamida-4-hemisuccinato-hidrazida ($R = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3; R^1 = \text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CONHNH}_2; R^2 = \text{metilo}; R^3 = \text{hidroxi}; R^4 = \text{etilo}; R^5 = \text{hidrogénio}).$

4-Desacetil-VLB-4-propionil-3-carboxihidrazida ($R = \text{NHNH}_2; R^1 = \text{COCH}_2\text{CH}_3; R^2 = \text{metilo}; R^3 = \text{hidroxi}; R^4 = \text{etilo}; R^5 = \text{hidrogénio}).$

Algumas das amidas cíclicas e de seus sais (Requerimento de Patente Europeia nº 86304522.5, atrás referido) são preparadas da seguinte forma:

PREPARAÇÃO I

4-desoxi-4-desacetil-leurosidin-3-carboxi-hidrazida-N,N-succinimida

Prepara-se uma solução a partir de 1320 mg de 4'-desoxi-4-desacetil-leurosidin-3-carboxi-hidrazida, em 25 ml de piridina.

Juntam-se depois 175 mg de anidrido succínico e agita-se a mistura reaccional, à temperatura ambiente, numa atmosfera de azoto, durante cerca de 24 horas. Em seguida, removem-se os componentes voláteis da mistura reaccional, num vácuo, e o resíduo obtido é dissolvido em cloreto de metileno, e metanol suficiente para dissolver todo o resíduo. Lava-se (2x) a fase orgânica com volume igual de água e, em seguida, seca-se a fase orgânica. A evaporação dos componentes voláteis, num vácuo, deu origem a um resíduo contendo N,N-succinoil-4'-desoxi-4-desacetil-leurosidin-3-carboxi-hidrazida, resíduo que é dissolvido seguidamente em 25 ml de piridina, à qual tinham sido adicionados 350 mg de anidrido acético; forma-se um anidrido misto dos ácidos succínico e acético, que, espontâneamente, se transforma numa estrutura cíclica, obtendo-se 4'-desoxi-4-desacetil-leurosidin-3-carboxi-hidrazida-N,N-succinimida. A mistura reaccional é evaporada, até à secagem, num vácuo, e o resíduo é dissolvido em dicloreto de metileno. O extracto de dicloreto de metileno é lavado duas vezes com um volume igual de água e, em seguida, é seco.

A evaporação do dicloreto de metileno deu origem à formação de 4'-desoxi-4-desacetil-leurosidin-3-carboxi-hidrazida-N,N-succinimida, que foi submetida a cromatografia sobre sílica-gel, utilizando como sistema eluente, acetato de etilo contendo volumes crescentes (0 a 50%) de metanol. As frações que, segundo TLC (cromatografia em camada fina), continham o desejado derivado de succinimida, foram reunidas e o sólido foi separado, por evaporação, num vácuo. Obtêm-se 190 mg de 4'-desoxi-4-desacetil-leurosidin-3-carboxi-hidrazida-N,N-succinimida com as seguintes constantes físicas:

Espectro do infra-vermelho (em cloróformio): picos a 3470, 1736, 1615 e 1572 cm^{-1} .

RMN (CDCl_3): δ em 10,90; 7,88; 7,49; 7,12 6,48; 6,05; 5,80; 4,10; 3,76; 3,56; 2,82; 0,93; 0,85.

Prepara-se o sal sulfato, dissolvendo a base livre em etanol anidro, a pH $\approx$ 8,0. Em seguida, o pH é ajustado a cerca de 3,9 pela adição de uma solução recente de ácido sulfúrico, etanólico, a 2%. Após evaporação da mistura reaccional, até à secagem, obtêm-se o sulfato de 4'-desoxi-4-desacetil-leurosidin-3-carboxihidrazida-N,N-succinimídeo.

Seguindo o processo atrás descrito, dissolve-se 4-desacetil-VLB-hidrazida (2,4 g) em 125 ml de piridina, juntando-se 385 mg de anidrido glutárico. A N,N-glutaróil-4-desacetil-VLB-3-carboxi-hidrazida, assim formada, é isolada através do processo descrito atrás, e é purificada mediante cromatografia de sílica-gel, utilizando o mesmo sistema eluente. Faz-se reagir o composto de glutaróilo com anidrido acético, obtendo-se o anidrido misto, que se transformou espontaneamente numa estrutura cíclica, dando origem à formação de 4-desacetil-VLB-3-carboxihidrazida-N,N-glutarimida. O composto é purificado por meio de cromatografia

sobre sílica-gel, utilizando-se o mesmo sistema eluente que o empregado atrás. Obtêm-se 460 mg do derivado de N,N-glutarimida, que apresenta as seguintes constantes físicas:

Espectro de massa $m/e = 864$ ($C_{48}H_{60}N_6O_9$).

Espectro do infra-vermelho ($CHCl_3$): picos a 3475, 1714, e 1616 cm^{-1} .

pK_a (DMF aquosa, a 66%) = 5,1; 7,4; 12,9.

RMN ($CDCl_3$): em 9,96; 8,91; 8,04; 7,52; 7,14; 6,58; 6,08; 5,83; 4,15; 3,78; 3,69; 3,61; 2,86; 0,93; 0,89.

Prepara-se o sal sulfato pelo processo atrás referido; rendimento = 210 mg, de 290 mg de material de partida.

Adoptando o processo atrás indicado, mas substituindo de novo 4'-desoxi-4-desacetil-leurosidin-3-carboxi-hidrazida por 4-desacetil-VLB-3-carboxi-hidrazida, e utilizando cloreto de acetilo em vez de anidrido acético, obtêm-se N,N-succinoil-4-desacetil-VLB-3-carboxi-hidrazida. Cromatografia da succinimida obtida forneceu duas fracções, uma das quais é a 4-desacetil-VLB-3-carboxi-hidrazida-N,N-succinimida esperada e a outra fracção constitui o seu derivado de 4-acetilo, que se formou como produto secundário durante o processo de ciclização.

4-Desacetil-VLB-3-carboxi-hidrazida-N,N-succinimida apresenta as seguintes constantes físicas:

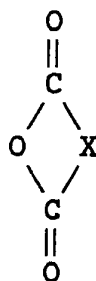
Espectro de massa $m/e = 850$ ($C_{47}H_{50}N_6O_9$).

Espectro de infra-vermelho (KBr): picos a 3480, 1734 e 1616 cm^{-1} .

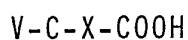
RMN ($CDCl_3$): em 9,69; 9,47; 8,22; 7,49; 7,12; 6,53; 6,07; 5,82; 5,71; 4,01; 3,77; 3,63; 3,59; 2,84; 2,82; e 0,89.

Prepara-se o sal sulfato segundo o processo descrito atrás; rendimento = 250 mg, de 350 mg do material de partida.

A preparação dos derivados em C-4 dos referidos alcalóides de indole-dihidro-indole, dímeros, substituídos de várias maneiras no átomo de carbono 3 (C-3) (cf. R na fórmula I), realiza-se pela reacção de compostos de fórmula I, em que R^1 representa H e R e R^2 a R^5 têm os significados indicados, no âmbito de um processo de várias etapas, tal como se indica na patente britânica GB 2.137.202 A (já citada), ou na patente norte-americana nº 745.562 (Cullinan) (já citada), (Exemplo 4). De acordo com estes processos, faz-se reagir um anidrido cíclico de fórmula

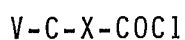


em que X tem o significado atrás referido, com o composto de fórmula I, em que R^1 significa hidrogénio. O produto desta reacção é um semi-éster de ácido de fórmula



em que V representa o alcalóide de pervinca de 4-desacetilo, de fórmula I, ligado por meio do hidroxilo em C-4. Em seguida, o grupo de acilação substitui o "OH" do ácido carboxílico (COOH).

O cloreto de acilo é um grupo acilante muito eficaz. Segundo um processo alternativo, pode usar-se um anidrido misto, preparado pela reacção sucessiva de N-metilmorfolina e um cloroformato de alquilo com o grupo de ácido carboxílico livre do hemi-éster-ácido. Este ácido carboxílico "activado"



faz-se reagir, por ex., com hidrazida, para se formar a hidrazida desejada, V-CO-X-CONHNH_2 . Segue-se a Preparação II, que vai ilustrar este processo.

PREPARAÇÃO II

Prepara-se uma solução, dissolvendo 2,5 g de 4-desacetil-VLB-4-hemi-succinato (4-succinoil-VLB) do Exemplo 1 (GB 2.137.202 A), em 50 ml de clorofórmio. Juntam-se, em seguida, 870 mg de N-metilmorfolina. Depois da dissolução total, a mistura reaccional é arrefecida, num banho de gelo, deixando passar uma corrente de azoto. Juntam-se 985 mg de cloroformato de isobutilo e a mistura reaccional

é agitada, a 0° C, durante cerca de 45 minutos. Adiciona-se 1 ml de hidrazina anidra e agita-se a mistura reaccional durante cerca de 10 minutos. Em seguida, extrai-se a mistura reaccional com água, separa-se o extracto de água e rejeita-se este extracto aquoso; seca-se a fase orgânica. A evaporação do solvente forneceu um resíduo contendo 4-desacetil-VLB-4-hemi-succinato-hidrazida. Uma solução de dicloreto de metileno do resíduo é cromatografada sobre sílica-gel, utilizando-se acetato de etilo/metanol (100/0 a 50/50) como eluente. As fracções apropriadas forneceram 950 mg de 4-desacetil-VLN-4-hemi-succinato-hidrazida purificada; m/e = 882.

O sal sulfato é preparado, dissolvendo a base livre em etanol anidro (25 ml), ajustando o pH a cerca de 4, pela adição de ácido sulfúrico etanólico, a 2% (24,5 g de etanol anidro; 0,5 g de H₂SO₄ 18M) e separando os solventes, num vácuo.

Espectro de infra-vermelho: picos em 3400, 3009, 1738, 1680, e 1616 cm⁻¹.

RMN (CDCl₃) : em 9,9; 8,35; 8,05; 7,55; 7,10; 6,85; 6,10; 5,85; 5,45; 5,30; 3,80; 3,70; 3,60; 2,70; 0,90; 0,85.

Os novos conjugados do presente invento compreendem uma glicoproteína oxidada, de preferência, uma imunoglobulina e, desta classe de compostos, de preferência, um anticorpo monoclonal (MoAb), que é uma gama-globulina, tal como IgG ou IgM. Fragmentos de imunoglobulinas (Ig) contendo hidratos de carbono, tal como sucede na imunoglobulina progenitora, a partir da qual estes fragmentos derivam, podem também usar-se para a formação de novos conjugados do tipo revelado na presente memória descritiva.

A classe preferida de glicoproteínas, as imunoglobulinas, são aquelas capazes de reagirem com antígenos, ou capazes de reconhecerem antígenos, na célula alvo desejada, isto é, estas globulinas conseguem "detectar" os antígenos que invadem um organismo. Preferem-se sobretudo aquelas glicoproteínas que sejam capazes de identificarem os antígenos na superfície da célula-alvo desejada (isto é, que se pretende proteger).

Conhecem-se muito bem as técnicas para a preparação destas imunoglobulinas a partir do soro de animais imunizados, ou por cultivo de hibridomas que segregam produtos monoclonais. Vd., por ex., Kohler e Milstein, Nature, 256, 495 (1975). O tipo de anticorpo preferido, utilizado no âmbito do presente invento, é uma imunoglobulina sob a forma de uma gama-globulina. Preferem-se especialmente as sub-classes de globulinas IgG, IgA, IgE, IgM. Algumas imunoglobulinas representativas são as seguintes:

Anticorpos mono- ou poli-clonais para

- (i) antígenos associados com tumores em animais ou humanos;
- (ii) antígenos para B- e T-células humanas;
- (iii) antígenos para Ia humano;
- (iv) antígenos de origem viral, fúngica e bacteriana; e
- (v) células implicadas nas reacções alérgicas ou inflamatórias em humanos.

Podemos referir entre os anticorpos preferidos para os antigénios associados com tumores em animais ou humanos, os seguintes tipos:

- (i) Ig de cabras ou ovelhas, imunizadas com antigénio embriocarcinogénico;
- (ii) Ig de soro anti-agudo de coelhos contra a leucemia linfoblástica;
- (iii) Ig obtido de vários anti-soros de primatas contra leucemia de linfoblastos aguda, leucemia de mieloblastos aguda, leucemia de linfoblastos crónica e leucemia de granulócitos crónica;
- (iv) Ig obtido de cabras ou ovelhas imunizadas com células de carcinoma pulmonar, ou fracções celulares;
- (v) Ig monoclonal obtida de hibridomas de ratos que segregam anticorpos contra o carcinoma colo-rectal humano;
- (vi) Ig monoclonal obtida de hibridomas de ratos que segregam anticorpos contra o melanoma humano;
- (vii) Ig monoclonal obtida de hibridomas de ratos que segregam anticorpos que reagem com células da leucemia humana;
- (viii) Ig monoclonal de hibridomas de ratos, que segregam anticorpos que entram em reacção com células de neuroblastomas humanos;

- (ix) Ig monoclonal de hibridomas de ratos, que segregam anticorpos que reagem com an tigénios do cancro da mama em seres humanos;
- (x) Ig monoclonal de hibridomas de ratos, que segregam anticorpos que reagem com célu-
las do carcinoma ovárico humano;
- (xi) Ig monoclonal de hibridomas de ratos, que segregam anticorpos que reagem com célu-
las do osteosarcoma humano, com células do carcinoma pancreático humano, com células do carcinoma da próstata de humanos, etc.;
- (xii) Ig monoclonal de hibridomas de ratos, que segregam anticorpos para adenocarcinomas, inclusivé adenocarcinomas pulmonar, renal, torácico e pancreático;
- (xiii) Ig monoclonal de hibridomas de ratos, que segregam anticorpos, que entram em reac-
ções com células de carcinomas escâneos humanos;
- (xiv) Ig monoclonal de hibridomas humanos (hi-
bridomas que segregam anticorpos para o antigénio associado com tumores em huma-
nos, incluindo, embora não se limitando aos exemplos atrás referidos, os anticorpos monoclonais atrás indicados);

- (xv) qualquer anticorpo ou fragmento deste, contendo carboidratos, quer na cadeia de baixo peso molecular, quer na cadeia de elevado peso molecular;
- (xvi) Ig monoclonal de ratazanas, cobaias, ou outras espécies de mamíferos, que não vêm referidas especificamente atrás, e obtida de hibridomas, que segregam anticorpos para antigénios associados com tumores humanos, incluindo (embora não se limitando aos exemplos apresentados) aqueles referidos atrás.

Tal como se refere atrás, o conjugado poderá também ser preparado com fragmentos de imunoglobulinas Ig', também designados por Fab, Fab', F(ab')₂ e monómero de IgM, derivado de um anticorpo, por ex., mediante digestão enzimática de proteínas ou alquilação redutora. Estes materiais e os processos da sua preparação são bem conhecidos. O processo preferido para a preparação destes fragmentos consiste na utilização de enzimas proteolíticas, tais como pepsina e papaína. Para uma visão genérica, cf. Parham, J. Immunology, 131, 2895 (1983); Lamoyi et al., J. Immunology Methods, 56, 235 (1983); Parham, id., 53, 133 (1982); e Matthew et al., id., 50, 239 (1982).

Existem MoAb's específicos que interferem com vários tumores; estas imunoglobulinas apropriadas no âmbito do presente invento, e que estão associadas com antigénios, ou que identificam antigénios, na superfície de células tumorais, incluem os seguintes, embora não se limitem à lista apresentada:

QUADRO I

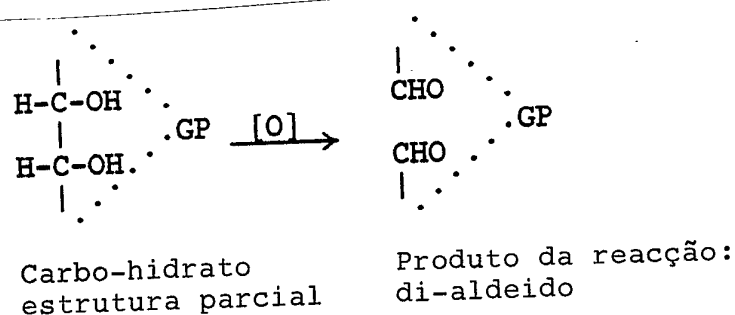
<u>Tumor</u>	<u>MoAb</u>	<u>Bibliografia</u>
Pulmonar	KS1/4	N.m. Varki, <u>et al.</u> , <u>Cancer Res.</u> 44:681, 1984
	534,F8;604A9	F. Cuttitta, <u>et al.</u> , in: G. L. Wright (ed) <u>Monoclonal Antibodies and Cancer</u> , Marcel Dekker, Inc., N.Y., p. 161, 1984.
Cancro pulmonar escâmico	G1, LuCa2, LuCa3, LuCa4	Kyoizumi <u>et al.</u> , <u>Cancer Res.</u> , 45:3274, 1985
Cancro pulmonar de células pequenas pavimentosas	TFS-2	Okabe <u>et al.</u> , <u>Cancer Res.</u> 45:1930, 1985
Cólon	11.285.14 14.95.55	G. Rowland, <u>et al.</u> , <u>Cancer Immunol. Immunother.</u> , 19:1, 1985.
	NS-3a-22, NS-10 NS-19-9, NS-33a NS-52a, 17-1A	Z. Steplewski, <u>et al.</u> , <u>Cancer Res.</u> , 41:2723, 1981.

Melanoma	9.2.27	T. F Bumol and R. A. Reisfeld, <u>Proc. Natl. Acad. Sci., (USA)</u> , 79:1245, 1982
	p97	K. E. Hellstrom, <u>et al.</u> , <u>Monoclonal Antibodies and Cancer</u> , <u>loc. cit.</u> p. 31.
	R24	W. G. Dippold, <u>et al.</u> , <u>Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)</u> , 77:6114, 1980.
Neuroblastoma	Pl 153/3	R. H. Kennet and F. Gilbert, <u>Science</u> , 203:1120, 1979.
	MIN 1	J. T. Kemshead in <u>Monoclonal Antibodies and Cancer loc. cit.</u> p. 49.
	UJ13A	Goldman <u>et al.</u> , <u>Pediatrics</u> , 105:252, 1984.
Glioma	BF7,GE2,CG12	N. de Tribolet, <u>et al.</u> , in <u>Monoclonal Antibodies and Cancer</u> , <u>loc. cit.</u> p. 81.

Cancro da mama	B6.2,B72.3	D. Colcher, <u>et al.</u> , in <u>Monoclonal Antibodies and Cancer</u> , <u>loc. cit.</u> p. 121.
Sarcoma Osteogénico	791T/48 791T/36	M. J. Embleton, <u>ibid</u> , p. 181
Leucemia	CALL 2	C. T. Teng, <u>et al.</u> , <u>Lancet</u> , 1:01, 1982.
	anti-idiotipo	R. A. Miller, <u>et al.</u> , <u>N. Eng. J. Med.</u> , 306:517, 1982.
Ovário	OC 125	R. C. Bast, <u>et al.</u> , <u>J. Clin. Invest.</u> , 68:1331, 1981.
Prostático	D83.21, P6.2, Turp-27	J. J. Starling, <u>et al.</u> , in <u>Monoclonal Antibodies and Cancer</u> , <u>loc. cit.</u> p. 253.
Renal	A6H, D5D	P. H. Lange, <u>et al.</u> , <u>Surgery</u> , 98:143, 1985.

Conjugados preferidos são aqueles que se preparam a partir de anti-corpos monoclonais, nomeadamente aqueles que conseguem 'identificar' células tumorais humanas tais como adenocarcinomas, carcinomas de células escâneas de células epiteliais pavimentosas, melanomas, neuroblastomas carcinomas de células esféricas, pequenas, leucemia, linfomas e sarcomas.

Uma glicoproteína (GP) do tipo atrás indicado, pode ser oxidada com per-iodato ou por outro agente oxidante apropriado, de forma que seja cindida uma ligação entre dióis vicinais, na área superficial de um carbohidrato, formando-se grupos aldeído em qualquer um dos lados da ligação original.



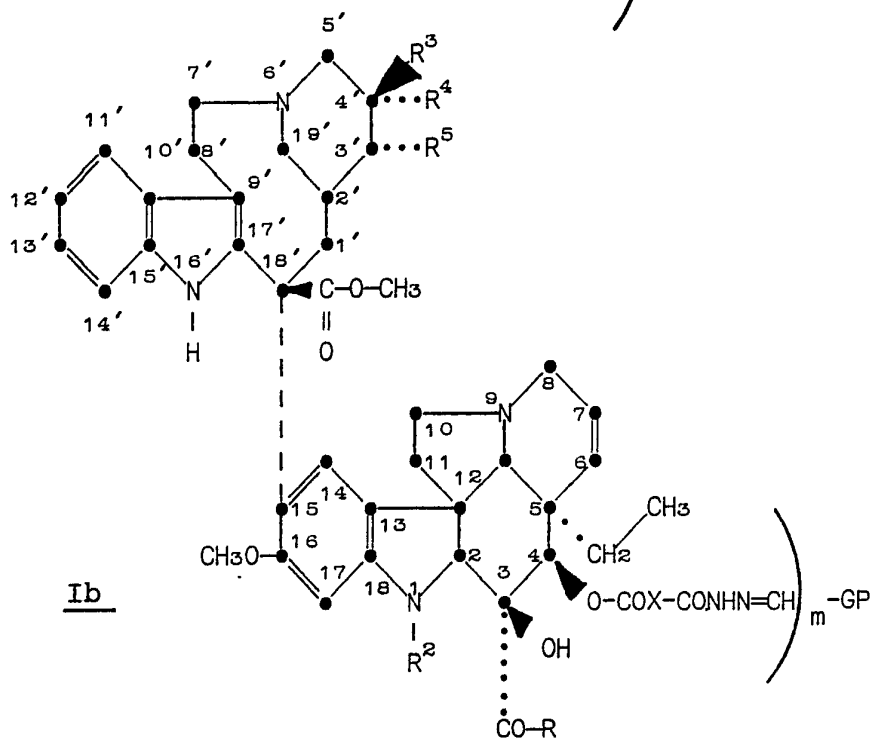
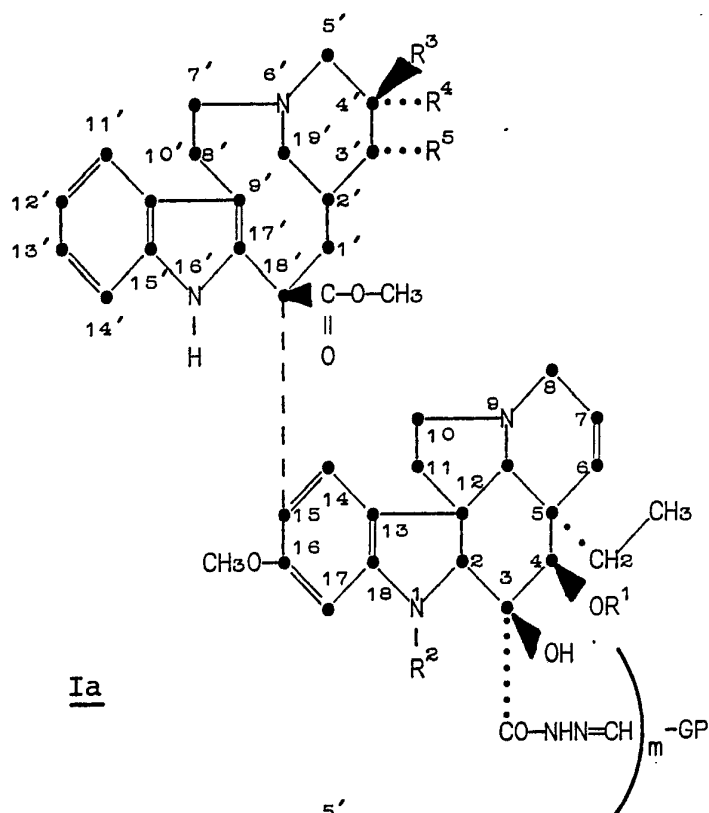
Como os técnicos irão facilmente compreender, o número de unidades de dialdeído obtidas depende dos seguintes factores:

Quantidade do per-iodato empregada, condições reaccionais gerais da oxidação (por ex., duração, temperatura, solvente, concentração. etc.), número de unidades de carbo-hidratos com dióis vicinais presentes na proteína, e facilidade com que entram em reacção com o reagente

per-iodato (factores estéreo).

Num processo alternativo, ou em associação com a oxidação por per-iodato, atrás referida, pode-se utilizar a oxidação enzimática, por ex., com galactose-oxidase. Esta enzima representa um reagente mais selectivo que cataliza a transformação da posição 6-CH₂OH de radicais de galactose, nas cadeias glicídicas da glicoproteína, numa função aldeído. Para permitir uma oxidação eficaz, este grupo 6-CH₂OH deve estar insubstituído. A libertação de um grupo protegido, tal como um grupo ao qual esteja ligado um radical de ácido siálico, poderá realizar-se com a enzima neuraminidase. Tal como se indica acima, o número de grupos ou unidades de aldeído obtido depende de vários factores.

Em seguida, as mucoproteínas contendo grupos aldeído (OCH)_m-GP, são conjugadas com apervinca-hidrazida, V'-3-CONHNH₂ ou V-4-O-CO-X-CONHNH₂, para se formar uma hidrazona, (V'-3-CONHN=CH)-GP ou (V-4-O-COX-CONHN=CH)_m-GP em que V' representa o radical de pervinca, definido na fórmula I, menos o radical -COR na posição 3, e m representa o número de grupos aldeído ou de pervinca, ligados à glicoproteína. Estes conjugados são objectos do presente invento e vêm definidos pelas fórmulas Ia e Ib, respectivamente:



De uma maneira geral, o número representado por $\underline{m}$ é uma função do número de grupos aldeído formados pelos processos de oxidação, atrás descritos. Observaram-se conjugados contendo um número máximo de cerca de 25 radicais de pervinca por anticorpo. As proporções médias (número de pervinca por anticorpo) variam entre 1 a 10 (isto é, $\underline{m}$ é igual a 1 a 10), e preferem-se as proporções de cerca de 4 a 10.

A conjugação das hidrazidas de pervinca com glicoproteínas oxidadas realiza-se mediante processos usuais, bem conhecidos dos técnicos. Geralmente, uma solução do composto de pervinca, num solvente miscível com a água, tal como dimetilformanida, é adicionada a uma solução congelada, tamponada, aquosa, da glicoproteína oxidada. adoptam-se, geralmente, temperaturas entre cerca de 0 e 8°C e utiliza-se um tampão de cerca de sódio 0,1N.

Com vantagem, a reacção realiza-se ao abrigo da luz e numa atmosfera de um gás inerte. Geralmente a reacção termina após cerca de 10-24 horas, e o conjugado resultante poderá ser purificado mediante processos usuais, tal como cromatografia numa coluna de Sephadex.

Apresentam-se, a seguir, os processos de oxidação e conjugação de MoAb's específicos.

Preparação III

Conjugados com MoAb de X-63AG8-S1.

Prepara-se uma solução, dissolvente 200 mg de X-63AG8S1 (peso molecular = cerca de 150.000, $1,34 \times 10^{-6}$ moles; estirpe celular depositada e prontamente disponí-

vel sob a designação ATCC TIB9, Coleção Americana de culturas-padrões, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852), em 20 ml de um tampão de acetato de sódio 0,1 M, (pH = 5,6) (29,3 g de acetato de sódio, 2,44 ml de ácido acético, mais água esterilizada suficiente para preparar 4 litro de tampão). A solução resultante é armazenada, a cerca de 0° C, durante uma noite (cerca de 10% da proteína não se dissolveu). Adicionam-se, numa única porção, 685 mg de meta-periodato de sódio, sob agitação rápida.

A mistura é agitada durante 21 minutos a cerca de 0° C, ao abrigo da luz, e, em seguida, é esfriada pela adição de um excesso quintuplo (em relação ao total do per-iodato) de 1,28 ml de uma solução 12,5M de etileno glicol, em água esterilizada.

A mistura resultante é agitada, a 0° C durante 5 minutos, ao abrigo da luz, e, em seguida, é centrifugada, formando-se um material límpido, que sobrenada e uma massa sólida, branca. O material que sobrenada é colocado sobre uma coluna de sílica-gel (Sephadex G25 (malhas [mesh] de tamanho médio) e o produto é eluído com o próprio tampão, acetato de sódio. O eluato é observado sob luz UV, a 280 nm. Qualquer vestígio de per-iodato encontrado é retirado da coluna, por lavagem, e é inutilizado.

A concentração do produto oxidado é determinada, em cada fracção eluída, a 279 nm; rendimento = 96 %. Uma segunda operação de cromatografia, realizada da mesma maneira, forneceu um rendimento de 96,5 %.

As soluções de eluato, atrás referidas e contendo 4,72 e 4,02 mg/ml de produto oxidado, foram misturadas; adiciona-se então 0,1N acetato de sódio (tampão), o que resulta numa concentração final proteica de 2,77 mg/ml

(volume total = 69 ml). A solução resultante é arrefecida até cerca de 0° C.

Uma solução de 4-desacetil-VLB-3-carboxi-hidrazida, em DMF (5,6 ml de uma solução de 53,7 mg/ml) é adicionada, gota a gota, à solução de MoAb arrefecida, tamponada. Faz-se passar uma corrente de nitrogénio através do balão, que, seguidamente, é tapado herméticamente. Agita-se a mistura reaccional, a frio, e ao abrigo da luz mediante um dispositivo agitador magnético, durante 24 horas.

Em seguida, destapa-se o vaso reaccional e procede-se à centrifugação da mistura reaccional límpida amarelada. O material que sobrenada é submetido a cromatografia sobre Sephadex G25 (sílica-gel), previamente equilibrada com uma solução salina, tamponada com fosfato (pH = 7,4) (H_3PO_4 0,01 M, NaCl 0,15 M), que serviu de eloente. Elui-se primeiro o conjugado (formado pela formação da hidrazona, entre o grupo 3-carboxi-hidrazida e um grupo aldeído numa molécula de carbohidrato, no MoAb), e segue-se 4-desacetil-VLB-3-carboxi-hidrazida que não reagiu. O rendimento em termos de conjugado obtido (a partir de 4 colunas) é de 173 mg, em 224 ml (rendimento de 90 %).

O conjugado obtido contém cerca de 6 moles de 4-desacetil-VLB-3-carboxi-hidrazona por mole de X-63AG8-S1 MoAb.

Procedeu-se a uma segunda operação reaccional, utilizando 200 mg de KS 1/4 (um MoAb capaz de identificar antigénios superficiais de células de adenocarcinomas humanas), em 20,0 ml de acetato tampão, com as mesmas quantidades de per-iodato e etileno glicol que na Preparação 3. Obtêm-se 176 mg de MoAb oxidado, em 39,9 ml do tampão, após cromatografia (rendimento de 88%).

A conjugação com 274 mg de 4-desacetil-VLB-3-carboxi-hidrazida, num tampão de acetato (pH = 5,6) fornece 146 mg (rendimento de 83%) de um conjugado, contendo cerca de 7,5 moles de 4-desacetil-VLB-3-carboxihidrazona por mole de KS 1/4.

Adoptando o processo acabado de referir prepara-se um conjugado pela reacção de 4-desacetil-VLB-3-carboxi-hidrazida com grupos aldeído, formados pela oxidação dos carboidratos na superfície de 9.2.27, um MoAb glicoproteico capaz de identificar locais para antigénios na superfície de células de melanomas em humanos.

Utilizando 200 mg do MoAb oxidado com 685 mg de meta-per-iodato de sódio, num tampão de acetato (pH = 5,6) (0,1 M), obtêm-se 184 mg de (rendimento de 92 %) de um 9.2.27 MoAb oxidado, contendo grupos aldeído. Este material é conjugado (acoplado) com 4-desacetil-VLB-3-carboxi-hidrazida (279 mg).

O rendimento final da poli-4-desacetil-VLB-hidrazona, de 9.2.27 conjugado oxidado, contendo grupos aldeído, é de 91%, sob a forma de uma solução, em solução salina, tamponada com sulfato.

O produto final contém cerca de 4,9 moles de composto pervinca de partida por mole de 9.2.27.

Segundo mostra o Quadro II, prepararam-se vários outros conjugados de anticorpos, de acordo com os processos adoptados na Preparação III, e utilizando 4-desacetil-VLB-carboxi-hidrazida como fracção de pervinca.

Quadro IIAnticorpo

Moles de composto de vinca
(em média) por mole de anti-
corpo, no produto conjugado
final

11.285.14	4,2 (3)‡
11A8	5,7 (4)
11B2	5,5 (6)
13H1	4,1 (1)
14.95.55	6,2 (4)
17H12	4,2 (1)
2A11	6,0 (1)
324.9.4.10	5,9 (2)
4D12	4,3 (6)
4E8.11	4,4 (3)
6D2	5,1 (4)
F9	6,6 (2)
L1KS	5,8 (7)
L2KS	6,4 (2)
L4KS	4,5 (4)
L6KS	4,25 (2)
ZCE-025	11,9* (11)

‡) o número entre parênteses indica o número de operações de repetição (réplicas) realizadas para calcular o valor médio.

*) Neste grupo, observou-se um conjugado contendo cerca de 27 grupos de pervinca por anticorpo.

Tal como se refere em cima, os conjugados podem também preparar-se com fragmentos de imunoglobulinas Ig', monómero de IgM, ou outros monómeros Ig, contendo glícidos derivados de um anticorpo semelhante, po ex., por meio de digestão enzimática de proteínas ou por alquilação. Conhecem-se muito bem estes compostos e os processos da sua preparação. A pepsina e a papaína são as enzimas proteolíticas preferidas para a preparação destes fragmentos.

A caracterização dos conjugados do presente invento pode realizar-se mediante técnicas conhecidas, tal como mediante cromatografia por afinidade. A eficácia biológica dos conjugados pode ser apreciada pela contagem do número de células viáveis a seguir ao tratamento de uma suspensão de células tumorais com o respectivo conjugado, ou pela medição da absorção de uridina tritiada. As concentrações de proteína e composto activo (droga) medem-se através das densidades ópticas de soluções de conjugados em dois comprimentos de onda, por ex., a 270 e 279 nm, e relacionando os valores obtidos com aqueles relativos ao composto activo livre e à imunoglobulina não conjugada nos mesmos comprimentos de onda. In vivo o conjugado poderá também ser avaliado pela sua acção sobre enxertos heterólogos de tumores humanos em ratos atímicos.

Os novos conjugados do presente invento são agentes antineoplásicos eficazes e, como tais, são formulados, de preferência, sob a forma de injeções. Assim o presente invento diz também respeito a uma fórmula ou composição farmacêutica, por ex., um preparado injectável contendo um conjugado de acordo com o presente invento, associado com um excipiente ou diluente, farmacêuticamente aceitáveis e bem conhecidos em farmacêutica. De preferência, a composição farmacêutica reveste uma forma de unidade dosagem, contendo cada dosagem, por ex., entre 0,01 e 10 mg de com-

posto activo (em termos da fracção do composto pervinca). Um excipiente ou diluente, farmacêuticamente aceitáveis, é um agente útil no tratamento quimioterápico de um animal de sangue quente.

Os novos conjugados exercem a sua eficácia terapêutica numa vasta gama de unidades de dosagem e dosagens por semana. Assim, por ex., para o tratamento de humanos adultos que sofrem de cancro, as posologias entre cerca de 0,01 e 10 mg/Kg (fracção do composto de pervinca) e, mais preferentemente, entre 0,03 e 9 mg/Kg. No entanto o médico assistente irá estabelecer a dose do conjugado de acordo com as circunstâncias específicas, tais como a doença a tratar e a via de administração.

Os Quadros seguintes mostram a eficácia terapêutica dos conjugados descritos no tratamento de doenças neoplásicas.

Quadro III

Dose mínima eficaz (equivalente de composto vinca), em modelos experimentais de enxertos heterólogos de melanoma com conjugado de 9.2.27-desacetil-VLB-hidrazida

<u>Estirpe de células de melanoma</u>	<u>M.E.D. (mg/KG de teor em composto vinca)*</u>
M14 Melanoma	< 0,0625
FTM Melanoma	< 0,375
SC1 Melanoma	< 0,375
SKMEL28 Melanoma	< 0,375
A375	< 0,185

* M.E.D.= dose mínima eficaz, que suprime em >50% o desenvolvimento tumoral, durante 28 dias, de conjugado de 9.2.27-desacetil-VLB-hidrazida, em termos do teor em composto de pervinca, no âmbito de um esquema experimental de injeções intravenosas, em 3 doses diferentes (dias 2, 5 e 8, após implatação do tumor).

Quadro IV

Dose minima eficaz (equivalente de composto de vinca), em modelos experimentais de enxertos heterólogos de células de adenocarcinomas, com um conjugado de KS 1/4-desacetil-VLB-hidrazida

Estirpe de células adenocarcinoma

M.E.D. *
(mg/Kg de teor em
composto de vinca)-

P3-UCLA Carcinoma pulmonar humano	< 0,0625
Carcinoma Colorectal HT-29	< 0,25
HT-29VTE* * Colorectal Carcinoma	< 0,25

* M.E.D.= dose minima eficaz de KS 1/4-desacetil-VLB-hidrazida (conjugado), que suprime em >50% o desenvolvimento tumoral em termos de teor em composto pervinca, no âmbito de um esquema experimental de injeções i.v., de 3 doses diferentes (dias 2, 5 e 8, após implatação do tumor).

* * HT29VTE é uma estirpe celular mutante, seleccionada, in vivo, que resiste a uma terapia com alcalóides de vinca.

Quadro V

Doses minimas eficazes para conjugados de anticorpos monoclonais-4-desacetil-VLB-hidrazida, em modelos experimentais de enxertos heterólogos (implatações) de tumores humanos em ratos depilados

<u>Conjugado de anticorpo†</u>	<u>Estirpe celular**)</u> <u>envolvida</u>	<u>M.E.D.(mg/Kg)*</u>
L1-KS ^A	P3UCLA	0,05
	HT-29	0,0625
	FADU	0,5
	LS174	0,3
L2-KS ^A	P3UCLA	0,125
L4-KS ^A	P3UCLA	0,125
11.285.14 ^A	P3UCLA	1,2
14.95.55	P3UCLA	0,6
	LS174	0,5
	LS174	<0,5
VX007B ^A	LS174	<0,5
P3X63AG-8(SI) ^A	P3UCLA	>1,0
	HT29	3,0

Quadro V (cont.)

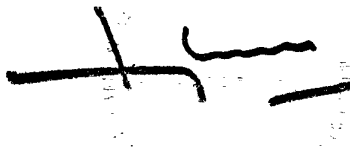
<u>Conjugado de anticorpo†</u>	<u>Estirpe celular**</u> <u>envolvida</u>	<u>M.E.D.(mg/Kg)*</u>
11B2 ^B	T222	1-2
6D2 ^B	T222	1-2
	FADU	0,5
4D12 ^B	P3UCLA	>2,0
11A8 ^B	FADU	1-2
	T222	>2,0
17H12 ^B	T222	1-2
13H1 ^B	T222	>2,0

*) cf. Quadros III e IV, atrás.

† Fracção de composto vinca do conjugado, que é 4-desacetil-VLB-hidrazida.

**) P3UCLA é um adenocarcinoma pulmonar; HT29 é um adenocarcinoma do cólon; FADU é um carcinoma de células escâneas da faringe; LS174 é um adenocarcinoma do colo; T222 é um carcinoma de células escâneas.

A) Os animais de ensaios foram tratados 3 vezes com o conjugado nos dias 2 a 8 após implantação dos tumores. O desenvolvimento tumoral foi avaliado decorridos 28 dias sobre a implantação dos tumores. A inibição tumoral foi determinada em relação aos animais tratados com PBS (grupo-tes-temunha).

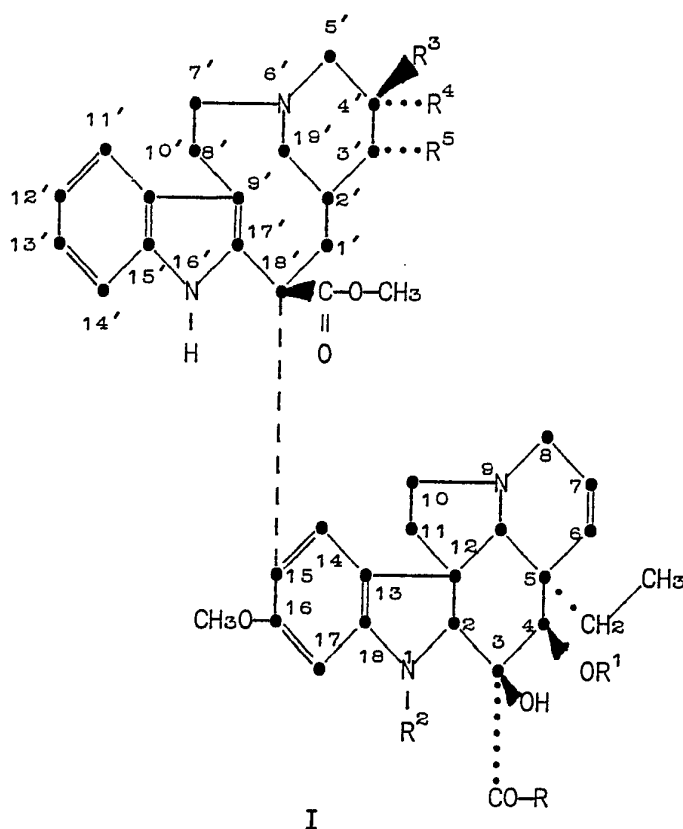


-45-

B) o esquema adoptado é identico ao referido em A), excepto que as doses foram administrados nos dias 3, 6 e 9 e a evolução tumoral foi avaliada passadas 2, 3 ou 4 semanas.

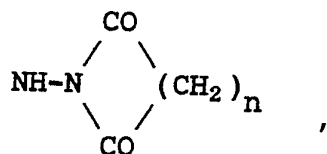
REIVINDICAÇÕES

1ª. - Processo para a preparação de um conjugado de hidrazona, caracterizado por se fazer reagir com um grupo aldeído de uma glicoproteína oxidada, uma hidrazida de vinca de fórmula I



em que R^2 representa H, CH_3 ou CHO ; quando R^4 e R^5 são considerados independentemente um do outro, R^5 representa H, e um dos símbolos R^3 e R^4 represente etilo e o outro representa H ou OH, ou R^4 e R^5 , em conjunto com os átomos de

carbono aos quais estão ligados, formam um anel de oxirano sendo que, neste caso, R^3 representa etilo; R representa $NHNH_2$



1 pirrolidinilo ou 1-piperridinilo, onde n é um número inteiro de 2 a 4, e Y representa Cl, OCH_3 ou SCH_3 ; R^1 representa H, $(C_1-C_3\text{-alquil})-CO$, $(C_1-C_3\text{-alquil})-CO$ substituído por cloro, ou R^6 , onde R^6 representa $COXCONHNH_2$, em que X representa C_1-C_4 -alcileno de cadeia linear, C_2-C_8 -alcileno de cadeia ramificada, C_2-C_4 -alcenileno, C_3-C_4 -cicloalcileno fenileno C_1-C_4 -alcileno substituído por hidróxi, ou representa uma ligação directa, com a condição de que R não possa ser $NHNH_2$, se R^1 for R^6 , e R^1 não possa ser R^6 , se R for $NHNH_2$.

2ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a hidrazida de vinca ser 4-desacetil-VLB-3-carboxi-hidrazida, 4-desacetil-VLB-4-hemisuccinato-hidrazida, 4-desacetil-VLB-3-carboxi-hidrazida- N^2 -succinimida-4-hemi-succinato-hidrazida, 4-desacetil-vlb-3-carboxamida-4-hemi-succinato-hidrazida, 4-desacetil-VLB-4-hemi-gluturato-hidrazida, 4-desacetil-VCR-4-hemisuccinato-hidrazida, 4-desacetil-4'-epidesoxi-VLB-4-hemisuccinato-hidrazida, 4-desacetil-VLB-3-carboxihidrazida- N^2 -glutarimida-4-hemi-succinato-hidrazida, 4-desacetil-VCR-3-carboxi-hidrazida ou 4-desacetil-4'-epidesoxi-VLB-3-carboxi-hidrazida.

3ª. - Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 ou 2, caracterizado por se preparar um conjugado, em que R^1 representa hidrogénio.

4ª. - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por se preparar um conjugado, em que a parte que representa a glicoproteína é uma imunoglobulina ou um dos seus fragmentos.

5ª. - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por se preparar um conjugado, em que a imunoglobulina é um anticorpo ou um fragmento deste anticorpo.

6ª. - Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por se preparar um conjugado, em que o anticorpo mono-clonal ou uma fracção deste anticorpo.

7ª. - Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 6, caracterizado por se preparar um conjugado, em que a glicoproteína é KS 1/4.

8ª. - Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 7, caracterizado por se preparar um conjugado, em que o número médio de radicais de vinca por anticorpo é de cerca de 1 a 10.

9ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar um conjugado, em que o referido conjugado contém entre cerca de 1 e cerca de 10 moles de 4-desacetil-VLB-3-carboxi-hidrazona por mole de KS 1/4.

Lisboa, 22 de Maio de 1987



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial de Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A, 1.º
1200 LISBOA