



Modalidade e n.º (11)	T D	Data do pedido: (22)	Classificação Internacional (51)
99.675 G			
Requerente (71): FARMITALIA CARLO ERBA S.R.L., italiana, industrial, com sede em Via Carlo Imbonati 24, 20159 Milão, Itália			
Inventores (72): FRANCESCO ANGELUCCI, DANIELA RUGGIERI, STEFANIA STEFANELLI, ANTONINO SUARATO e LAURA BERSANI			
Reivindicação de prioridade(s) (30)			Figura (para interpretação do resumo)
Data do pedido	País de Origem	N.º de pedido	
05.12.1990	GB	9026491.2	
Epigrafe: (54) "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE CONJUGADOS DE ANTRACICLINAS E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE OS CONTÊM"			
Resumo: (máx. 150 palavras) (57) Descreve-se um processo para a preparação de conjugados de fórmula geral $[A-O-W-Z]_a-T$ $\underline{1}$ que consiste (a) em converter um derivado de fórmula geral $A_1-O-W-OH$ $\underline{4}$			

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBRADAS



Modalidade e n.º (11)	T D	Data do pedido (22)	Classificação Internacional (51)
Resumo (continuação) (57)			<u>2</u>
em um outro derivado activado de fórmula geral $A_1-O-W-L$ <u>5</u> para se obter uma ligação amídica; e (b) em condensar, por exemplo, o composto resultante de fórmula geral 5 com um composto de fórmula geral $T-NH_2$ Estes conjugados são úteis como agentes antitumorais porque contêm uma ligação acetálica que liberta o fármaco inicial, uma antraciclina de fórmula geral A-O-H, após hidrólise catalisada por iões hidrónio ou "in vivo" por cisão enzimática.			
○ Agente Oficial da Propriedade Industrial  (Dr. Jorge Garin)			

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE CONJUGADOS DE ANTRACICLINAS
E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE OS CONTÊM"

A presente invenção diz respeito a conjugados de antraciclinas, úteis sob o ponto de vista terapêutico, com veículos, tais como anticorpos monoclonais e policlonais ou proteínas ou péptidos de origem natural ou sintética; a métodos para a sua preparação, a composições farmacêuticas que os contêm e à sua utilização no tratamento de determinados tumores nos mamíferos. A presente invenção diz respeito também a novos derivados antraciclínicos e à sua preparação.

Nos últimos anos, foram sintetizadas muitas antraciclinas, altamente citotóxicas, por exemplo, as que comportam um núcleo morfolino ou morfolino substituído ligado à posição G-3' do radical açúcar mostram actividade anti-tumoral promissora nos tumores

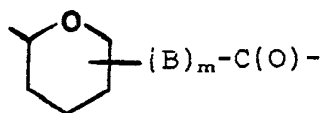
experimentais dos ratos [ver: Bioactive molecules, 55-101, vol 6, editado por J. William Lown, Elveiser, 1988].

A finalidade da presente invenção é proporcionar conjugados de antraciclina com veículos, tais como anticorpos monoclonais ou policlonais ou proteínas ou péptidos ou outros veículos de origem sintética, com o fim de tirar vantagem da alta potência das antraciclina, por exemplo, os derivados morfolínicos, para aumentar a sua eficácia terapêutica e reduzir os seus efeitos tóxicos.

Os conjugados da presente invenção, caracterizados pela presença de uma ligação acetálica sensível aos ácidos, possuem a fórmula geral



na qual A-O representa um resto de uma qualquer antraciclina de fórmula geral A-O-H comportando, pelo menos, um grupo hidróxi primário ou secundário; o símbolo a representa um número inteiro de 1 a 30; o símbolo W representa um resto de fórmula geral.



(2)

na qual o símbolo B representa um grupo alquilenos C eventualmente interrompido por um hetero átomo e o símbolo m representa zero ou o número inteiro 1; um grupo alquilenos C_{1-6} , pode ser um grupo metileno, etileno, etilideno ou n-propileno. O heteroátomo que interrompe o grupo alquilenos pode ser um átomo de oxigênio ou de azoto. De preferência, o símbolo B representa um grupo $-CH_2-O-CH_2-$, $-CH_2-NH-CH_2-$, $-CH_2-$, $-C_3H_6-$ ou $-C_6H_{12}-$; o símbolo Z representa um grupo espaçador e o símbolo T representa um radical de um veículo.

Grupos Z preferidos são:

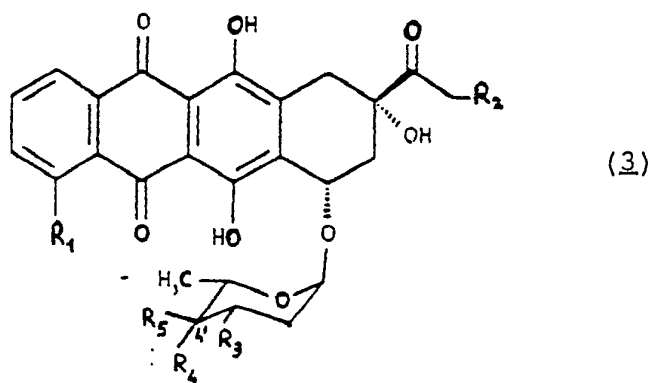
i) $-NH-$ e T-Z representa um resíduo de um veículo de fórmula geral T-NH, contendo pelo menos um grupo amino livre ou

ii) $-NH-[D]_d-N=CH-$, em que o símbolo d representa zero ou o número inteiro 1 ou 2, o símbolo [D] representa um grupo de fórmula geral $-NH-CO(CH_2)_n-CO-NH-$ (o símbolo n representa o número inteiro 2 ou 4) e T-Z representa um

resíduo de um veículo de fórmula geral T-CHO contendo pelo menos um grupo formilo.

iii) o grupo piperazinilcarbonilo ou um grupo de fórmula geral -NH-[D]_d-NH-CO- , na qual os símbolos [D] e d têm os significados definidos antes e T-Z representa um resíduo de um veículo de fórmula geral T-[COOH]_a , na qual o símbolo a tem o significado definido antes.

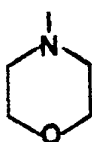
Na fórmula geral anterior 1, o glicósido antraciclina A-O-H é derivado, de preferência, de compostos de fórmula geral



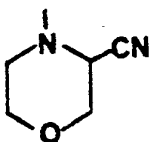
na qual R_1 representa um átomo de hidrogénio ou um grupo hidroxil ou metoxil;

a) R_2 representa um grupo hidroxil e R_4 ou R_5 representa um átomo de hidrogénio e o outro dos símbolos R_4 e R_5 representa um grupo hidroxil ou R_4 representa um átomo de iodo e R_5 representa um átomo de hidrogénio ou R_4 e R_5 representam, cada um, um átomo de hidrogénio ou

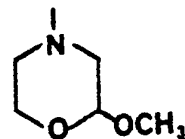
b) R_2 representa um átomo de hidrogénio e o R_4 ou R_5 representa um grupo hidroxil e o outro dos símbolos R_4 e R_5 representa um átomo de hidrogénio; e R_3 representa um grupo amino ou representa um átomo de azoto encerrado em um anel morfolino (MO) ou 3-ciano-4-morfolino (CM) ou 2-metoxi-4-morfolino (MM) no qual o átomo de azoto está ligado a G-3'



(MO)



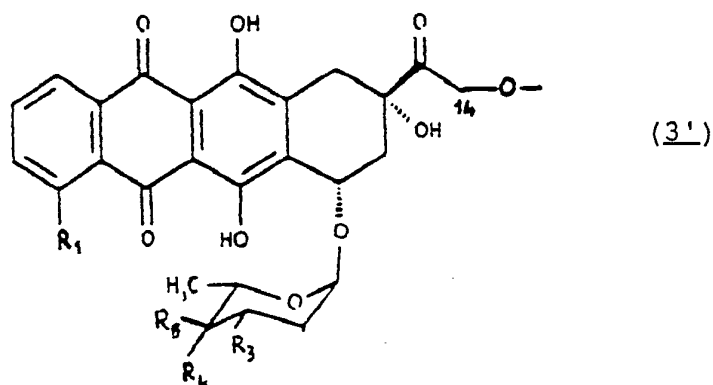
(CM)



(MM)

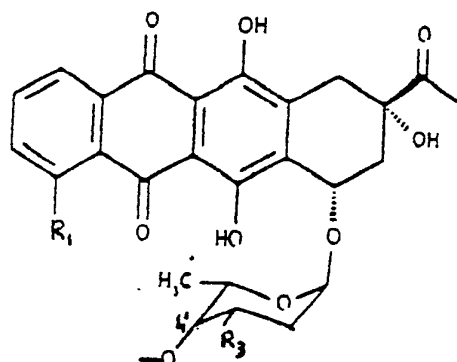
A antraciclina pode ser o agente de ligação ao veículo, via grupo hidroxil, nas posições C-14 ou C-4' do composto antraciclínico. Num aspecto, o veículo ligado à

antraciclina na posição C-14, fórmula 3', representa um grupo A-O-:



em que R_1 e R_2 têm os significados definidos antes e a R_4 ou R_5 representa um átomo de hidrogénio e o outro desses símbolos representa um grupo hidroxil ou R_4 representa um átomo de hidrogénio ou de iodo e R_5 representa um átomo de hidrogénio.

Noutro aspecto, o veículo ligado à antraciclina, via grupo hidroxil, em C-4', fórmula 3'', representa um grupo A-O-:



(3'')

em que os símbolos R_1 e R_3 têm os significados, definidos antes.

O veículo é escolhido, vulgarmente, a partir de um anticorpo policlonal ou de um seu fragmento que compreenda um sítio de ligação ao antigénio, capaz de ligação a um antigénio associado ao tumor; um anticorpo monoclonal ou um seu fragmento que compreenda um sítio de ligação ao antigénio, capaz de ligação a um antigénio, de preferência ou selectivamente, expresso em populações de células tumorais; um péptido ou uma proteína capaz de, de preferência ou selectivamente, ligação a uma célula tumoral; e um veículo polimérico.

A porção $T-NH_2$ ou $T-[COOH]_a$ dos conjugados é, por conseguinte, de preferência, derivada dos anticorpos



policlonais produzidos contra os antígenos associados aos tumores; ou de anticorpos monoclonais que se ligam a antígenos, de preferência ou selectivamente expressos em populações de células tumorais; ou de péptidos ou de proteínas naturais ou de recombinação ou de factores de crescimento, de preferência ou, selectivamente, ligados a células tumorais; ou de veículos poliméricos, naturais ou sintéticos, tais como polilisina, ácido poliglutâmico, ácido poliaspártico e seus análogos e derivados, ou tais como o destrano ou outros análogos hidratos de carbono poliméricos e seus derivados; ou de copolímeros, sintéticos, tais como os derivados de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HPMA) [ver: J. Kopecek, Macromolecules, H. Benoit & P. Rempp, Ed.: 505-520 (1982) Pergamon Press. Oxford, Inglaterra], ou de copolímeros poli(aminoácidos), tais como poli (gluNa, Ala, Tyr) que são utilizáveis como veículos para os fármacos que têm como alvo o tecido pulmonar [R.Duncan et al., Journal of Bioactive and Compatible Polymers, vol. 4, Julho de 1989]. A porção do veículo pode derivar também das porções dos veículos mencionados antes, tais como os fragmentos de anticorpos Fab ou F(ab')₂, ou tais como as porções dos péptidos ou proteínas, mencionados antes, obtidos através de técnicas de recombinação de ADN.

São exemplos representativos dos anticorpos, mencionados antes, e das respectivas aplicações terapêuticas, possíveis:

- 
- anticorpo anti-célula T101 [Royston, I. et al., J. Immunol. 1980, 125, 725]
 - anticorpo anti-CD5 OKT1 (Orto) ATCC CRL 8000 (leucémias linfocitas crônicas)
 - anticorpo anti-receptor da transferrina OKT9 (Orto) ATCC CRL 8021 (tumores ováricos e outros)
 - anticorpo anti-melanoma MAb 9.2.27 (Bumol, T.F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 1245) (melanomas)
 - anticorpo anti-marcadores de carcinomas tais como:
 - anti-CEA 1116 NS-3d ARCC CRL 8019
 - anti-alfa-fetoproteína OM 3-1, 1 ATCC HB 134 (também hepatomas)
 - 791T/36 [Embleton, M.J. et al., BR. J. Cancer 1981, 43 582] (também sarcoma osteogénico)
 - B 72.3 [Patente de invenção Norte-americana nº 4 522 918 (1985)] (carcinomas colo-rectais e outros tumores)
 - anticorpo anti-carcinoma ovárico OVB 3 ATCC HB 9147
 - anticorpo anti-carcinoma da mama (HMGF antigénio) [Aboud-Pirak, E. et al., Cancer Res. 1988, 48, 3188]

- 
- anticorpo anti-carcinoma da bexiga 1G3.10 [Yu, D.S. et al., Eur.J. Urol. 1987, 13, 198].

São exemplos representativos dos factores de crescimento e das proteínas de origem natural ou de recombinação, mencionados antes: FGF, EGF, PDGF, TGF- α , α -MS, interleucinas, interferonas, TNF, melanotropina (MSH), etc.

O veículo T-CHO deriva, de preferência, de anticorpos monoclonais ou policlonais que possuem o grupo hidrato de carbono, de preferência, localizado na região Fc, selectivamente oxidado para grupos aldeído por intermédio de métodos enzimáticos ou químicos, como se descreve na patente de invenção norte-americana nº 4 671 958 (9 de Junho de 1987). O veículo T-CHO pode derivar também da formilação ou da oxidação de veículos poliméricos apropriados ou da oxidação de grupos aldeído dos resíduos hidratos de carbono de glicoproteínas apropriadas.

A presente invenção proporciona, ainda um processo para a preparação de compostos de fórmula geral 1 que consiste em:

a) a converter um derivado de fórmula geral



na qual A_1-O- representa um resíduo de qualquer antraciclina que contem, pelo menos um grupo hidroxilo primário ou secundário e tem o grupo amino do grupo açúcar protegido ou substituído por um derivado morfolino e W tem o significado definido antes, num derivado activado de fórmula geral

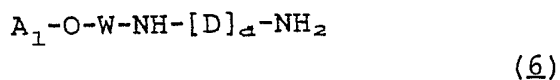


na qual A_1-O- e W têm os significados, definidos antes e L representa um grupo activador para formar uma ligação amídica, tal como N-oxisuccinimido, N-oxisulfossuccinimido ou 2,4-dinitrofenoxi ou 2,3,4,5,6-pentafluorofenoxi ou t-butoxi-carboniloxi; e

b) (i) condensar os compostos resultantes de fórmula geral 5, como se definiu antes, com um composto de

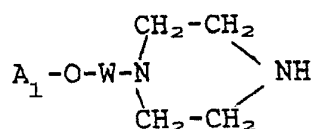
fórmula geral $T-NH_2$, como se definiu previamente; ou

(ii) fazer reagir o composto activado de fórmula geral 5 com um derivado de fórmula geral $NH_2-[D]_d-NH_2$, tal como a hidrazina ($d=0$) ou a di-hidrazina succínica ($d=1$ e $n=2$) ou adípica ($d=1$ e $n=4$) opcionalmente desprotegendo o derivado resultante de fórmula geral



na qual A_1-O- , W , d e $[D]$ têm os significados definidos antes e efectuar a sua condensação com um composto de fórmula geral $TCHO$ ou $T-[COOH]_a$, como se definiu previamente, ou

(iii) fazer reagir o composto de fórmula geral (5) com 1,4-piperazina e condensar o composto resultante de fórmula geral



(7)

$$L = \text{—O—N} \begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{O} \end{array} \text{—Ra}$$



na qual R^a representa um átomo de hidrogénio ou um grupo sulfato de sódio.

Os métodos de condensação para a preparação de conjugados de fórmula geral 1, a partir dos derivados de fórmula geral 5, mencionados antes, e de um veículo de fórmula geral T-NH₂, efectuam-se em condições capazes de criar ligações² covalentes do tipo amídico e compatíveis com a estrutura de veículo. As condições preferidas incluem a utilização de soluções aquosas tamponadas a pH de 7 a 9,5 e temperaturas de 4° a 35° C durante tempos de algumas horas a vários dias.

Por exemplo, as condições para a condensação (b) (i) entre os compostos de fórmula geral 5 e os anticorpos T-NH₂, são: fosfato de sódio aquoso 0,1M e cloreto de sódio aquoso 0,1M, a pH 8, contendo um anticorpo monoclonal a 1 mg/ml, tratados com um excesso molar 30 vezes maior de uma solução de 6 a 110% (p/v) em N,N-dimetilformamida, durante 24 horas, à temperatura de 20° C. O conjugado é purificado por meio de filtração por gel em uma coluna Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemical, Piscataway, N.J.), eluindo com PBS (concentração salina tamponada com fosfato).

Os métodos para a preparação de conjugados de fórmula geral 1, condensando os derivados 6, mencionados antes,

com um veículo de fórmula geral T-CHO, efectuam-se em condições capazes de criar ligações covalentes do tipo hidrazona e compatíveis com a estrutura do veículo. As condições preferidas incluem a utilização de soluções aquosas tamponadas a pH de 4 a 7,5, à temperatura de 4 a 37 C, durante tempos de algumas horas a vários dias.

As condições para a ligação (b) (ii) entre os compostos de fórmula geral 6 e os anticorpos T-CHO são: acetato de sódio aquoso 0,1M e cloreto de sódio aquoso 0,1M, a pH 6, contendo um anticorpo monoclonal a 1 mg/ml, tratados com um excesso molar 30 vezes maior de uma solução de 8 a 5% (p/v) no mesmo tampão, durante 24 horas, à temperatura de 20° C. O conjugado é purificado por meio de filtração por gel, como se descreveu antes.

Os métodos para a preparação do conjugado de fórmula geral 1, por meio da condensação dos derivados 6 ou 7, mencionados antes, com um veículo de fórmula geral T[COOH]_a, efectuam-se em condições capazes de criar ligações covalentes do tipo amídico e compatíveis com a estrutura do veículo.

As condições preferidas incluem a utilização de soluções aquosas tamponadas a pH de 7 a 9,5 a uma temperatura de 4° a 37° C, durante tempos de algumas horas

4

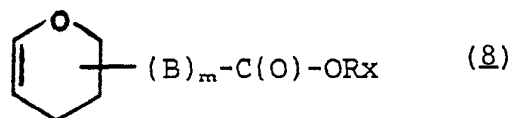
a vários dias. Outras condições incluem a utilização de dimetilformamida anidra ou dimetilsulfóxido, à temperatura ambiente, durante 1 a 3 horas. As condições preferidas para a condensação entre compostos de fórmula geral 6 ou 7 e um veículo activado de fórmula geral $T[CO-E]_a$, na qual o símbolo E representa um grupo carbonilo activador apropriado, tal como o p-nitrofenilo, são: um dissolvente polar anidro, tal como a dimetilformamida, contendo 5 a 50 mg/ml do composto 6 ou 7, tratados com uma quantidade equivalente do composto $T[CO-E]_a$, durante 1 a 24 horas, à temperatura ambiente.

Tal como aqui se utiliza, a expressão "de algumas horas a vários dias" pode ser de 4 horas a 5 dias.

Os derivados de fórmula geral 4, 5, 6 e 7 e a sua preparação são novos e estão dentro do âmbito da presente invenção. Os compostos 4, 5, 6 e 7 são todos compostos intermédios úteis e/ou agentes anti-tumorais activos sob o ponto de vista terapêutico. Os derivados de fórmula geral 4 preparam-se por meio de um processo que compreende:

(a) condensação de uma antraciclina, opcionalmente protegida, de fórmula geral A-O-H, como se definiu antes, com a condição de que o radical amino do grupo açúcar da antraciclina A-O-H esteja sob a forma de um grupo amino

protegido, com um derivado carboxílico di-hidropirânico de fórmula geral



na qual os símbolos B e n têm os significados definidos antes e o símbolo Rx representa um grupo protector;

(b) remoção dos ou de cada grupo(s) protector(es) dos compostos intermédios resultantes, para formar, por este meio, um derivado de fórmula geral



na qual o símbolo W tem o significado definido antes, com a condição de que o radical amino do grupo açúcar do resíduo A-O- da antraciclina esteja sob a forma de um grupo amino livre; e

(c) (i) conversão do radical amino livre do grupo açúcar da antraciclina de fórmula geral 4' em um derivado morfolino ou

(ii) protecção do referido grupo amino livre da citada antraciclina de fórmula geral 4'.

O derivado intermédio de fórmula geral 4' e a sua preparação são novos também e fazem parte da presente invenção.

Os derivados são também úteis compostos intermédios e/ou agentes anti-tumorais activos sob o ponto de vista terapêutico. A conversão das antraciclinas de fórmula geral A-O-H, protegidas apropriadamente, em derivados de fórmula geral 4, como se definiu antes, pode efectuar-se por meio de tratamento com um composto de fórmula geral 8, definido antes.

A presente invenção proporciona um processo para a preparação de derivados de fórmula geral 4', que compreende:

(a) condensação de uma antracilcina, opcionalmente protegida, de fórmula geral A-O-H, como se definiu antes, com a condição de que o radical amino do grupo açúcar da

5

antraciclina A-O-H esteja sob a forma de um grupo amino protegido, com um derivado di-hidropirano-carboxílico de fórmula geral 8, como se definiu antes; e

(b) remoção do ou de cada grupo protector do composto intermédio resultante.

As condições preferidas para a realização da reacção das antraciclinas A-O-H, tipicamente protegidas, com um composto 8 incluem a utilização de um ácido sulfónico tal como o ácido p-toluenossulfónico, como catalisador, no seio de um dissolvente apolar anidro, tal como o cloreto de metileno, à temperatura ambiente durante tempos de algumas horas a 1 dia, seguida de tratamento alcalino suave para desbloquear os grupos protectores.

Os derivados 8 estão sob a forma de uma mistura enantiomérica. Porém, a reacção de eterificação com o grupo hidroxilo das antraciclinas, efectuado, com um catalisador ácido, origina apenas dois diastereómeros, indicados como X e Y, tendo o anel de configuração indefinida (R ou S), tanto na posição acetálica C-2'' como na outra posição que comporta o grupo $-(B)_m -C(O)ORX$.

5

O composto resultante de fórmula geral A-O-W-ORX é convertido no composto de fórmula geral 4, como se definiu antes, por meio de hidrólise e desprotecção. Alguns dos compostos iniciais de fórmula geral 8 são novos e estão dentro do âmbito da presente invenção.

Os derivados preferidos de fórmula geral 8 compreendem:

8A) 2-etoxicarbonil-3,4-di-hidro-2H-pirano [$m=0$, $Rx=C_2H_5$]

8B) 2-[3,4-di-hidro-2H-pirano-2-ilo]metiloxiacetato de etilo [$B=CH_2-O-CH_2$, $m=1$, $Rx=C_2H_5$]

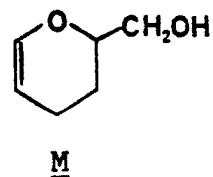
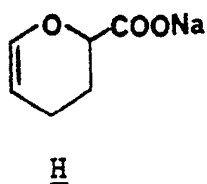
8C) 2-(3,4-di-hidro-2H-pirano-2-ilo]metiloxiacetato de metilo [$B=CH_2-O-CH_2$, $m=1$, $Rx=CH_3$]

8D) 2-(3,4-di-hidro-2H-pirano-2-ilo)metiltioacetato de etilo [$B=CH_2-S-CH_2$, $m=1$, $Rx=C_2H_5$]

8E) 2-(3,4-di-hidro-2H-pirano-2-ilo)metilaminoacetato de etilo [$B=CH_2-NH-CH_2$, $m=1$, $Rx=C_2H_5$]

Os compostos de fórmula geral 8 podem ser preparados de várias maneiras. Por exemplo, podem preparar-se facilmente a partir do ácido 3,4-di-hidro-2H-pirano-2-carboxílico apropriado, do sal de sódio de [CAS 16698-52-5] de fórmula H ou do derivado metanólico

correspondente [CAS 3749-36-8] de fórmula M:



Mais particularmente, o composto 8A é preparado por meio da reacção do composto H com iodeto de etilo no seio de um dissolvente polar anidro, tal como dimetilformamida, como se descreveu em macromolecules, vol. 12, nº 1, págs. 5 a 9, Janeiro-Fevereiro de 1979. O metiloxiacetato 8B pode ser preparado por meio da reacção do álcool M com ácido cloroacético em dimetilformamida anidra, à temperatura de 100° C, na presença de dois equivalentes de hidróxido de sódio ou de potássio, e depois, arrefecimento da mistura e seu tratamento com iodeto de etilo.

Os compostos de fórmula geral 8C-E podem ser preparados por meio de condensação de Wurcz, do derivado iodado de M, preparado por intermédio da deslocação de um éster sulfônico de M com iodeto de sódio, e 3-iodopropionato de etilo, 4-iodobutanoato de etilo ou 7-iodo-heptanoato de etilo. O metilaminoacetato 8F é preparado submetendo a refluxo um éster sulfônico do álcool M com etilglicina em tolueno anidro, durante 6 horas.

As antraciclinas iniciais de fórmula geral 3 para utilização na presente invenção incluem as que contêm um grupo hidroxilo livre na posição C-4' ou na posição C-14, tais como:

- daunorrubicina (3a: $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = R_5 = \text{H}$, $R_3 = \text{NH}_2$, $R_4 = \text{OH}$)
- 4-desmetoxidaunorrubicina (3b: $R_1 = R_2 = R_5 = \text{H}$, $R_3 = \text{NH}_2$, $R_4 = \text{OH}$)
- 4'-epidaunorrubicina (3c: $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = R_4 = \text{H}$, $R_3 = \text{NH}_2$, $R_5 = \text{OH}$)
- 4'-desoxidoxorrubicina (3d: $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OH}$, $R_4 = R_5 = \text{H}$, $R_3 = \text{NH}_2$)
- 4'-desoxi-4'-iodoxorrubicina (3e: $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OH}$, $R_5 = \text{H}$, $R_4 = \text{J}$, $R_3 = \text{NH}_2$)

e as que comportam ambos os grupos hidroxí, primários e secundários, tais como :

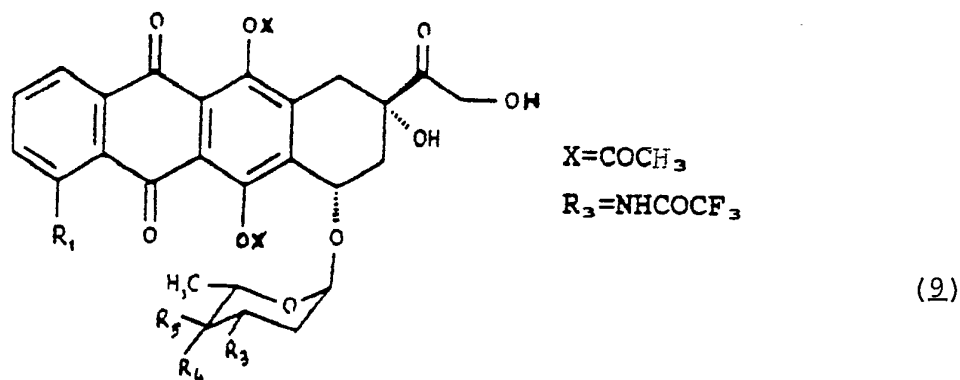
- doxorubicina (3f: $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = R_4 = \text{OH}$, $R_5 = \text{H}$, $R_3 = \text{NH}_2$)
- 4' -epidoxorubicina (3g: $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = R_5 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_3 = \text{NH}_2$), todas descritas em patentes anteriores; vide: F. Arcamone "DOXORUBICIN", Medical Chemistry, vol. 17, Nova Iorque, N.Y. 1981.

Por exemplo, as antracilinas que transportam originalmente um grupo hidroxilo, por exemplo, as representadas pelos compostos 3a-e, são convertidas nos seus análogos N-trifluoroacetilados e depois reagem com um derivado do éster di-hidropirano-carboxílico de fórmula geral 8, como se descreveu previamente, para originarem compostos 4(a-e)(A-Z) nos quais (a-e) indica o resíduo de antracilinas de fórmula geral 3'' (a-e) e 3' (d) e (A-Z) indica o resíduo de fórmula geral 2 obtido por meio de condensação de um composto de fórmula geral 8 com o grupo hidroxilo em C-4' ou em C-14 da antraciclina.

As antracilinas que comportam ambos os grupos hidroxilo nas posições C-4' e C-14, por exemplo, as representadas pelos compostos 3 (f,g), podem ser condensadas,

selectivamente, no grupo hidroxilo em C-14, com compostos de fórmula geral 8, após protecção temporária do outro grupo hidroxilo em C-4', para originarem derivados de fórmulas gerais 4 e 4', indicados como 4 (f,g) (A-Z) e 4' (f,g) (A-Z), em que (f,g) indica o resíduo da antraciclina de fórmula geral 3' (f,g) (piranilação em C-14) ou 3'' (f,g) (piranilação em C-4') e (A-Z) tem o significado definido antes.

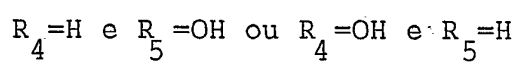
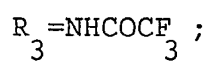
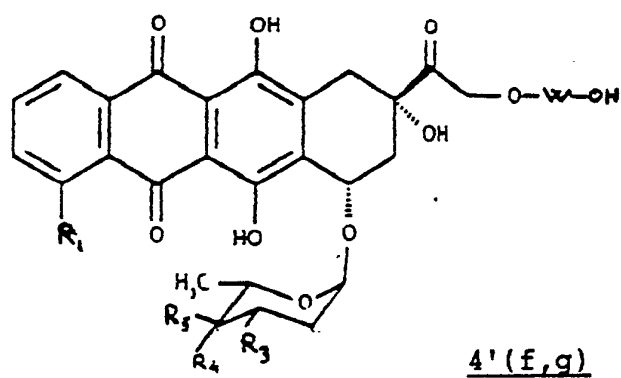
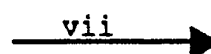
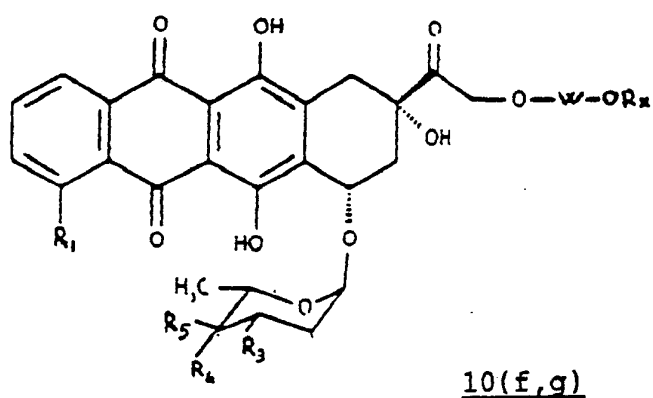
Os derivados 4 e 4', referidos antes, nos quais o resíduo -O-w está ligado à posição do grupo hidroxilo em C-14, preparam-se por meio de reacção de um composto de fórmula geral 8, nas condições previamente, descritas, com um derivado da antraciclina comportando um grupo hidroxilo C-4' protegido de fórmula geral



na qual R_1 tem o significado, definido antes, R_4 ou R_5 representa um grupo acetoxi e o outro dos símbolos R e R_4 representa um átomo de hidrogênio.

Por exemplo, os derivados N-trifluoroacetilados de fórmula geral 3 ($R_3 = \text{NHCOCF}_3$), tais como 3(f,g) são protegidos, em primeiro lugar, em C-9 e C-14, sob a forma de 9,14-etilortoformiato, após reacção com ortoformiato de trietilo, segundo o processo descrito por H. Umezawa et al., J. Antib., vol XXXIII, nº 12 (1980) 1581, e, depois, acilados em grupos hidroxilofenólicos em C-4' utilizando anidrido acético e piridina e, subsequentemente, desbloqueados na posição hidroxílica C-14 com o auxílio de ácido clorídrico aquoso para se obterem derivados 6,11,4'-tri-O-acetil-N-trifluoroacetil-doxorrubicina de fórmula geral 9 que são condensados com um composto de fórmula geral 8 nas mesmas condições referidas antes, para se obter o composto 10, após desbloqueamento dos grupos fenólicos com o auxílio de morfolina em metanol e desbloqueamento do grupo hidroxilo em C-4', com metilato de sódio em metanol. Finalmente, o tratamento do composto 10 com hidróxido de sódio aquoso 0,1N origina o derivado 4'. O processo está ilustrado no Esquema I.

ESQUEMA 1



Reagentes e condições:

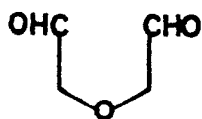
i: $\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_3)_3$, pTSA, CH_2Cl_2 ; ii: $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$, piridina;
iii: 0,1N HCl-THF; iv: 2. pTSA. CH_2Cl_2 , v: morfolina,
 CH_3OH ; vi: NaOCH_3 , CH_3OH ; vii: 0,1N NaOH.

Outro aspecto da presente invenção diz respeito à preparação de morfolina (MO) e dos derivados de morfolina (CM) e (MM) de fórmulas gerais 4(MO), 4(CM) e 4(MM) a partir dos derivados de fórmula geral 4' ($\text{R}_3=\text{NH}_2$), substituídos em C-4' ou C-14, preparados como se referiu antes, segundo processos convencionais descritos em patentes anteriores.

Mais particularmente, a preparação dos compostos 4-morfolino 4(a-g) (A-Z) (MO) e 3-ciano-4-morfolino 4(ag) (A-Z) (CM) segue o processo descrito por E.M. Acton et al., em J. Med. Chem., 27, (1984) 638; os derivados 2-metoxi-4-morfolino 4(a-g) (A-Z) (MM) preparam-se segundo o processo descrito na patente de invenção norte-americana nº 4 672 057, de 9 de Junho de 1987. Será de realçar que o resíduo -W nos compostos de fórmula geral 4' (a-g) (A-Z) não interfere com a preparação dos

derivados morfolínicos mencionados antes.

De acordo com o processo de preparação dos derivados morfolínicos (MO), os compostos 4'(a-g) (A-Z) dissolvidos em água, reagem em primeiro lugar, com 2-oxietil-dialdeído



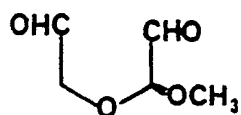
(11)

e depois, com ciano-hidreto de sódio para originar os derivados morfolínicos.

Alterando as condições reaccionais da redução do cianoboro-hidreto, por exemplo, por meio da adição de cianeto de sódio, recuperam-se os derivados cianomorfolínicos (CN).

5.

A preparação dos derivados 2-metoxi-4-morfolínicos (MM) efectua-se por meio do tratamento dos compostos 4' (a-g) (A-Z), dissolvidos em água, com 1-metoxi-2,2'-oxidiacetaldeído



(12)

e depois, com cianoborohidreto de sódio.

Os conjugados de fórmula geral 1 da presente invenção são agentes terapêuticos úteis dado que contêm uma ligação acetálica que liberta o fármaco de origem A-O-H após hidrólise catalizada pelo ião hidrónio ou cisão enzimática in vivo.



Sabe-se bem que, nos tumores malignos, há uma quantidade elevada de glicólise comparada com a do tecido normal.

Isto provoca um aumento da produção de lactato e, assim, uma diminuição do pH no tumor [ver: H.M. Raven et al., Z. Naturforsch., Teil B, 23 (1968) 1461]. Também os compostos de fórmulas gerais 4, 4', 6 e 7 podem libertar a antraciclina citotóxica dentro dos tecidos tumorais.

A presente invenção origina um nível duplo de especificidade de acção dos compostos: o primeiro consiste numa localização preferencial do conjugado no tecido tumoral por meio do reconhecimento antigénico e o segundo consiste numa libertação preferencial do fármaco, sob a forma activa, no tecido tumoral por intermédio de cisão ácida preferencial.

Os conjugados, produzidos de acordo com os métodos descritos, caracterizam-se segundo diferentes métodos físico-químicos.

A retenção do peso molecular original e a falta de formação de agregados são verificados por meio de técnicas de filtração cromatográfica por gel [Yu D.S. et



al., J. Urol., 140 (1988) 415] com detecção simultânea e independente de antraciclina e anticorpos em diferentes comprimentos de onda e por meio de métodos electroforéticos em gel.

A distribuição da carga total dos compostos obtidos é verificada por meio de métodos de cromatografia e de permuta iónica.

A concentração de antraciclina é determinada por meio de titulação espectrofotométrica em relação a uma curva de calibração "padrão" obtida a partir da antraciclina de origem.

A concentração de proteína determinada por meio de ensaios colorimétricos, tais como o ensaio do ácido bicincónico [Smith, P.K. et al., Anal. Biochem., 150 (1985) 76] ou o ensaio do corante de Bradford [Bradford, M.M., Anal. Biochem., 72 (1976)].

A retenção da actividade de ligação ao antigénio, dos anticorpos, após os processos de conjugação, é verificada por meio de um método ELISA [Yu. D.S. et al., J. Urol., 140 (1988) 415] e por meio de métodos

citofluorimétricos [Gallego, J. et al., Int. J. Cancer, 33 (1984) 737].

A avaliação da retenção da citotoxicidade dos conjugados em comparação com o fármaco de origem verifica-se por meio de um teste de inibição da captação de H-timidina pelas células alvo, após um tempo de incubação suficientemente longo para explicar o efeito citotóxico máximo [Dillmann, R.O. et al., Cancer res., 48 (1988) 6097].

A avaliação da citotoxicidade selectiva dos conjugados em relação a um antigénio positivo em comparação com uma linha de células antigénica negativa é efectuada por meio de um teste de inibição da captação de H-timidina pelas linhas de células antigénicas positivas vs. antigénicas negativas, após um curto tempo de incubação [Dillmann, R.O. et al., Cancer Res. 48 (1988) 6096].

A sensibilidade aos ácidos do conjugado é avaliada por meio dos métodos cromatográficos mencionados antes, após incubação dos compostos em soluções tamponadas apropriadas.

Como alternativa utilizam-se a radio-marcação dos conjugados na parte anticorpo (^{125}I) e/ou na parte antraciclina (^{14}C) e os métodos analíticos de HPLC para a avaliação da estabilidade no plasma.

O efeito terapêutico dos compostos e a melhoria da sua eficácia terapêutica em comparação com o fármaco de origem são verificados em modelos animais com tumores transplantados dos seres humanos. Murganhos pelados portadores de xeno-enxertos de tumores humanos são tratados com doses apropriadas de conjugados, de fármaco livre, de anticorpo e de uma mistura física de fármaco e de anticorpo, em doses equivalentes, e o crescimento tumoral é registado e comparado nos diferentes grupos de tratamento.

Os conjugados de imunoglobulina são formulados como composições farmacêuticas com um veículo ou diluente, aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico. Pode utilizar-se qualquer veículo ou diluente apropriado. Os veículos e diluentes apropriados incluem a solução salina fisiológica e a solução de dextrose de Ringers.

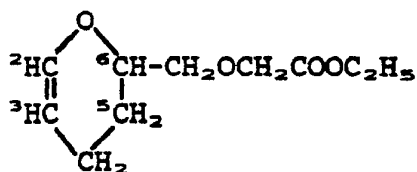
Descrição Pormenorizada da Invenção

As cromatografias TLC executam-se com placas Merck de Kieselgel F₂₅₄, utilizando os seguintes sistemas eluentes (v/v);

- sistema A : cloreto de metileno: metanol (98:2)
- sistema B : cloreto de metileno: metanol: ácido acético : água (80:20:7:3)
- sistema C : cloreto de metileno : metanol (95:5)
- sistema D : cloreto de metileno: acetona (4:1)
- sistema E : cloreto de metileno: metanol: ácido acético (80:20:1)
- sistema F : cloreto de metileno: acetona (9:1)
- sistema G : cloreto de metileno : acetona (95:5)
- sistema H : cloreto de metileno : metanol (90:10)

Exemplo 1

Preparação de 2-(3,4-di-hidro-2H-piran-2-il-metiloxi-
acetato de etilo (8b)



(8B)

Adicionaram-se 4,2 g (35 mmoles, fórmula M) de 2-metanol-
-3,4-di-hidro-2H-pirano, dissolvidos em 100 ml de metanol
anidro, a 1,6 g (40 mmoles) de hidróxido de sódio e
aqueceu ligeiramente. Depois, eliminou-se o dissolvente
in vácuo e dissolveu-se o resíduo com 100 ml de
dimetilsulfóxido. A esta solução, aquecida à
temperatura de 110° C, adicionaram-se 6 g (1,5 mmoles) de
2-cloro-acetato de sódio em 100 ml de dimetilsulfóxido

durante 2 horas, sob vigorosa agitação . Após repouso durante meia hora, arrefeceu-se a mistura reaccional, adicionaram-se 5 ml de trietilamina e 5 ml de iodeto de etilo e conservou-se à temperatura ambiente durante a noite. Depois, diluiu-se a mistura reaccional com água e extraíu-se com éter etílico. Após o processamento habitual, purificou-se o composto em título por meio de cromatografia em ácido silício, eluindo-se com uma mistura de éter de petróleo - éter (8:10 v/v). Recuperaram-se 1,68 g do composto 5 sob a forma de um óleo, com o rendimento de 26% TLC em placas de Kieselgel F₂₅₄ (Merck) utilizando-se como sistema eluente a mistura éter de petróleo : éter (1:1 em volume) R_f= 0,7.

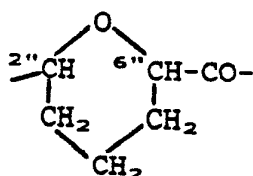
RMN¹H (200 MHz, CDCl₃) δ:

1,26 (t, J=7,1 Hz, 3H, CH₂ CH₃); 1,6 - 2,2 (m, 4H, CH₂-3, CH₂-4); 3,64 (d, J=5,2 Hz 2H CH₂O); 4,00 (m, 1H, H-2); 4,13 (m, 2H, OCH₂ C=O); 4,19 (q, J=7,1 Hz, 2H, CH₂ CH₃); 4,65 (m, 1H, H-5); 6,35 (ddd, J=6,2, 2,0 Hz, 1H, H-6).

Exemplo 2

Preparação de 4'-epi-4'-O-(2-carboxitetra-hidropiran-6-il)-daunorrubicina: isómeros x e y (2''R, 6''R e 2''S, 6''S).

4'c(A): A₁-O=3''C (R₃=NH₂); W=



Dissolveram-se 3,1 g (5 mmoles) de 4'-epi-N-trifluoroacetil-daunorrubicina (3c: R₃ = NHCOCF₃) em 500 ml de cloreto de metileno anidro e trataram-se com 3,4 g (25 mmoles) de 3,4-di-hidro-2H-piran-2-etoxicarbonilo (8A), preparado como se descreveu em Macromolecules, vol. 12, nº 1, págs. 5-9, Jan-Fev de 1979, e 100 mg de ácido p-tolueno-sulfônico, à temperatura ambiente, sob atmosfera de azoto. Após 1 hora, um controle cromatográfico mostrou a formação de dois compostos possuindo, respectivamente, o valor R_f de 0,53 e 0,36 no sistema A.

Lavou-se a mistura reaccional com uma solução aquosa de hidrogeno carbonato de sódio a 5% e água, depois separou-se a fase orgânica até um pequeno volume sob

pressão reduzida e cromatografou-se em uma coluna de ácido silícico para se obterem os derivados 4'-epi-4'-O-(2-carboetoxitetra-hidropiran-6-il)-N-trifluoroacetil-daunorrubicina dos compostos em título possuindo, respectivamente, o valor Rf de 0,53 (1,5 g; rendimento de 40%) e 0,36 (1,28 g; rendimento de 32%) no sistema A.

Composto Rf = 0,53; FD-MS; m/e 663 (M+)

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃) inter alia δ:

1,31 (COOCH₂CH₃, J=7,1Hz), 1,33 (5'-CH₃ J=6,4Hz),
2,41 (COCH₃), 3,40 (4'-H, J=9,7Hz), 4,07 (4-CH₃ O),
4,55 (6"-H), 4,96 (2"-H), 5,30 (7-H), 5,48 (1'-H), 7,92
(NHCOCF₃)

Composto Rf=0,36

FD-MS: m/e 663 (M+)

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃) inter alia δ

1,28 (COOCH₂CH₃) , J=7,1Hz), 1,38 (5-CH₃, J=6,4Hz),
2,42 (COCH₃), 3,54 (4'-H, J=8,7Hz), 4,07 (4-CH₃ O),
4,42 (6"-H), 5,10 (2"-H), 5,29 (7-H), 5,48 (1'-H),
6,62 (NHCOCF₃).

Dissolveram-se 1,4 g (1,79 mmoles) do composto de Rf=0,53 em hidróxido de sódio aquoso 0,2N, sob atmosfera de azoto

e conservou-se à temperatura de 0° C durante 8 horas. Depois, ajustou-se a solução aquosa para H-3 com ácido clorídrico aquoso 1N e extraíu-se repetidamente com cloreto de metileno. Lavou-se a fase orgânica com água, separou-se, secou-se sobre sulfato de sódio anidro e evaporou-se sob pressão reduzida para se obter o composto X, um dos dois isômeros (X e Y) do composto em título 4'c(A) (0,9g; rendimento de 79%).

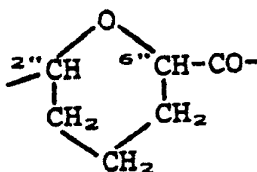
$R_f=0,60$ (sistema B). FD-MS: m/e 639 (m+)

Hidrolisaram-se 1,1 g a (1,4 mmoles) com composto $R_f=0,36$, como se descreveu antes, para se obter, após a operação convencional o isômero Y do composto em título 4'c(A) (0,72 g : rendimento de 80%). $R_f=0,45$ (sistema B). FD-MS: m/e 630 (M+).

Exemplo 3

Preparação de 4'-epi-4'-0-(2-carboxitetra-hidropiram-6-il)-3'-desamino-3'-(4-morfolino)-daunorrubicina: isómero X (um dos dois 2''R, 6''R ou 2''S, 6''S).

4c(A) (MO): A-O=3''C (R_3 =MO); W =



Dissolveram-se 1,2 g (1,8mmoles) do composto 4''c(A) (isómero X) preparado como se descreveu no Exemplo 2, em 200 ml de água, ajustou-se o pH a 7,5 com hidrogeno carbonato de sódio e adicionaram-se 3 g de 2-oxietil-dialdeído (11) dissolvidos em 20 ml de água. Após 1 hora, adicionou-se uma solução de 100 mg de cianoboro-hidreto de sódio em 6 ml de água, sob agitação e à temperatura ambiente. Após 30 minutos, levou-se a mistura reaccional a pH 6 com uma solução aquosa de ácido acético a 5% e extraíu-se com álcool n-butílico.

Lavou-se a fase orgânica com água e eliminou-se o dissolvente sob pressão reduzida. Purificou-se o resíduo por cromatografia em uma coluna de ácido silícico, utilizando o sistema cloreto de metileno: metanol: ácido acético (90:8:2, em volume) para se obterem, após operação convencional, 0,6 g (rendimento de 45%) do composto em título 4c(A) (MO).

Rf=0,70 (sistema b). FD-MS: m/e 724 (M+)

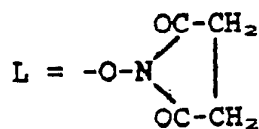
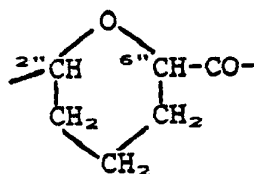
RMNH¹_H (200 MHz, CDCl₃) inter alia δ:

1,29 (5'-CH₃, J=6,3Hz), 2,42 (COCH₃), 2,4-2,8 (CH₂-N-CH₂), 2,98 (3'-H), 3,65 (CH₂-O-CH₂), 3,40 (4'-H, J=9,0 OHZ), 4,08 (4-CH₃O), 4,30 (6"-H), 5,00 (2"-H), (5,27 (7-H), 5,51 (1'-H)

Exemplo 4

Preparação do derivado N-oxi-succinimidílico de 4'-epi-4'-O-(2-carboxitetra-hidropiram-6-il)-3'-desamino-3'-(4-morfolino)-daunorrubicina: isómero X (um dos dois 2"R, 6"R ou 2"S, 6"S)

5c(A) (MO): A-O=3''C ($R_3=MO$); =



Dissolveram-se 0,55 g (0,7 mmoles) do composto 4c(A) (MO), preparado como se descreveu no Exemplo 3, em 25 ml de dimetilformamida anidra e tratou-se com 95 mg de N-hidroxi-succinimida e 0,15 g de N,N-diciclo-hexilcarbodiimida. Conservou-se a mistura à temperatura de 4° C durante 2 dias e depois eliminou-se o dissolvente sob pressão reduzida. Recolheu-se o resíduo com um pouco de acetato de etilo, filtrou-se e eliminou-se o dissolvente sob pressão reduzida. Executou-se este procedimento quatro vezes com o fim de eliminar a diciclo-hexilureia. Finalmente, tratou-se o resíduo com éter com o qual cristalizou-se 0,45 g (rendimento de 72%) do derivado puro de etilo 5c(A) (MO).

$R_f=0,45$ (sistema B)

FD-MS m/e 821 (M+)

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃) inter alia δ :

2,42 (COCH₃), 2,4-2,6 (CH₂-N-CH₂), 2,82 (CO-CH₂-
-CH₂-CO), 3,5-3,7 (CH₂-O-CH₂), 4,08 (4-CH₃O), 5,13 (2''H),
5,28 (7-H, 6''-H), 5,52 (1'-H).

Exemplo 5

Preparação de 6,11,4'-tri-O-acetil-N-trifluoroacetil-do-
xorrubicina (9 f)

Faz-se uma suspensão de 6,4 g (10 mmoles) de N-trifluoroacetil-doxorrubicina (3f: R₃ = NHCOCF₃) em 750 ml de cloreto de metileno anidro e adicionaram-se 150 ml de ortoformiato de trietilo e 3 g de ácido p-tolueno-sulfônico, com agitação à temperatura ambiente. Após 3 horas, um controle cromatográfico mostrou o desaparecimento do composto inicial.

Após a operação convencional com água , separou-se a fase orgânica, secou-se sobre sulfato de sódio anidro e filtrou-se. Eliminou-se o dissolvente in vacuo para se obter um composto impuro que se dissolveu em uma mistura de 50 ml de piridina e 50 ml de anidrido acético e adicionou-se um pouco de dimetilaminopiridina (0,5 g). Após 2 horas, verteu-se a mistura reaccional em água e gelo (2000 ml). Recolheu-se o precipitado sobre vidro sinterizado, lavou-se com água, dissolveu-se com 400 ml de tetra-hidrofurano e tratou-se com 50 ml de ácido clorídrico aquoso 0,1N, durante a noite e à temperatura ambiente. Depois, adicionou-se o cloreto de metileno e lavou-se a fase orgânica com água, hidrogeno carbonato de sódio aquoso a 5% e duas vezes com água.

Após a operação habitual, purificou-se o resíduo por meio de cromatografia em uma coluna de ácido silícico, utilizando o sistema dissolvente cloreto de metileno: acetona (90:10 em volume) para se obterem 5 g (rendimento de 65%) do composto em título 9f.

Rf=0,18 (sistema D)

FD-MS m/e 765 (M+)

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃) . δ:

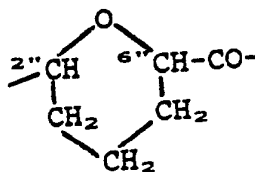
1,20 (d, J=6,4Hz , 3H, 5'-CH₃), 1,9-2,0 (m, 2H, 2'-CH₂),

2,1-2,4 (m, 2H, 8-CH₂), 2,19, 2,49, 2,53 (s, 9H, COCH₃x
 3) , 2,95 (bt, J=4,2, 1H, CH₂-OH), 3,13 (bm, 2H,
 10-CH₂), 3,99 (s, 3H, 4-CH₃O), 4,20 (q, J=6,6Hz, 1H,
 5'-H), 4,35 (m, 1H, 3'-H), 4,44 (bs, 1H, 9-OH), 4,74
 (m, 2H, CH₂-OH), 5,1-5,3 (m, 3H, 7-H, 1'-H, 4'-H),
 6,40 (bd, J=6,4Hz, 1H, NH), 7,3 - 7,8 (m, 3H, 1-H, 2-H,
 3-H).

Exemplo 6

Preparação de 14-0-(2-carboxitetra-hidropiran-6-il)-
 -doxorubicina, isómeros X e Y (2"R, 6"R e 2"S, 6"S)

4'f(A): A₁-O=3'f (R₃=NH₂):; W =



4.

Dissolveram-se 5 g (6,5 mmoles) de 6,11,4'-tri-0-acetil-N-trifluoroacetildoxorrubicina (10f), preparada como se descreveu no Exemplo 5, em 600 ml de cloreto de metileno anidro e trataram-se com 5 g (36 mmoles) de 2-etoxicarbonil-3,4-di-hidro-2H-pirano (8A) e 500 mg de ácido p-tolueno-sulfônico à temperatura ambiente e sob atmosfera de azoto. Após 2 horas, lavou-se a mistura reaccional com uma solução aquosa de hidrogeno carbonato de sódio a 5% e com água, depois separou-se a fase orgânica, secou-se sobre sulfato de sódio anidro, concentrou-se até um pequeno volume sob pressão reduzida, e adicionou-se éter de petróleo. Dissolveu-se o precipitado em 500 ml de metanol, adicionaram-se 8 ml de morfolina e conservou-se à temperatura ambiente durante 2 horas. Em seguida adicionou-se à mistura reaccional 10 ml de ácido acético e extraíu-se com cloreto de metileno. Concentrou-se a fase orgânica até um pequeno volume e cromatografou-se em uma coluna de ácido silicico, utilizando como sistema eluente, uma mistura de cloreto de metileno: acetona (95:5 em volume) para se obterem 4,2 g (rendimento de 82%) de N-trifluoroacetil-14-0-(2-carboniltetrahidropi-ran-6-il)-doxorrubicina (10f).

4

Rf=0,41 (sistema D); FD-MS m/e 795 (M+)

RMN¹H (200 M, CDCl₃) inter alia δ:

1,3 (5'-CH₃), COOCH₂CH₃), 3,65 (4'-H), J=2,1Hz), 4,08
(4-OCH₃), 4,21 (COOCH₂ CH₃), J=7,0Hz), 4,48 (6"-H), 4,88
(9-COCH₂-O), 5,04 (2"-H), 5,27 (7-H), 5,50 (1'-H),
6,69 (NH)

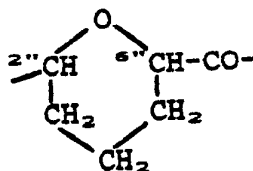
Dissolveu-se o composto 10f à temperatura de 0° c com 500 ml de hidróxido de sódio 0,1N sob a atmosfera de azoto. Após 1 hora, levou-se a mistura reaccional a pH 6 com ácido acético, extraíu-se com n-butanol e lavou-se com água. Separou-se a fase orgânica e eliminou-se o dissolvente in vacuo. Recolheu-se o resíduo com um pouco de cloreto de metileno e adicionou-se éter para se obter o composto em título 4'f(A) (isómeros X e Y), 2,9 g (rendimento de 66%).

Rf=0,5 (sistema B); FD-MS m/e 671 (M+).

Exemplo 7

Preparação de 14-0-(2-carboxitetra-hidropiran-6-il)-3'-
-desamino-3'-[2-(S)-metoxi-4-morfolino]-doxorrubicina:
isômeros X e Y (2"R, 6"R e 2"S, 6"S).

4f (A) (MM): A-O=3'f ($R_3=MM$); W =



Dissolveram-se 1,3 g (2 mmoles) de 14-0-(2-carboxitetra-hidropiran-6-il)-doxorrubicina (4'f(A)) preparada como se descreveu no Exemplo 6, em 300 ml de água e adicionaram-se 3,4 g de 1-metoxi-2,2'-oxidiacetaldeído (12), dissolvidos em uma mistura de 20 ml de acetonitrilo e 20 ml de água. Levou-se a mistura a pH 7,5-8,0 com trietilamina e deixou-se sob agitação à temperatura ambiente durante 1 hora. Depois, adicionou-se 0,126 g de cianoboro-hidreto de sódio

dissolvido em 10 ml de água e conservou-se a mistura reaccional à temperatura ambiente durante 15 minutos. Em seguida, adicionaram-se 10 ml de acetona e adicionou-se um pouco de ácido acético à mistura reaccional e extraíu-se com n-butanol. Lavou-se a fase orgânica com água e eliminou-se o dissolvente in vacuo. Cromatografou-se o resíduo em uma coluna de ácido silícico utilizando como dissolvente eluente uma mistura de cloreto de metileno: ácido acético: metanol (100:1:7 em volume). Recuperou-se 0,30 g (rendimento de 26%) do composto em título 4f (A) (MM), após operação usual.

$R_f = 0,8$ (sistema E), FD-MS m/e 771 (M+)

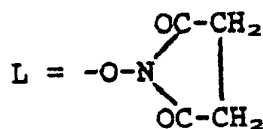
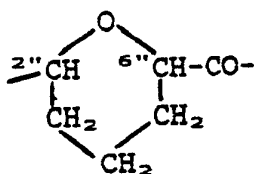
RMN¹H (200 MHz, CDCl₃) inter alia δ :

1,34 (5'-CH₃), 3,39 (CH₃- "morfolino"), 4,07 (4-OCH₃),
4,47 (6"-H), 4,58 (CH-OCH₃ "morfolino"), 4,85 (9-COCH₂-
-O-), 5,04 (2"-H), 5,27 (7-H), 5,59 (1'-H).

Exemplo 8

Preparação do derivado N-oxi-succinimidílico de 14-0-(2-carboxitetra-hidropirran-6-il)-3'-desamino-3'-[2(S)-metoxi-4-morfolino]-doxorubicina: isómeros X e Y (2''R,6''R e 2''S,6''S)

5f(AA) (MM): A-O=3'f ($R_3=MM$) ; W =



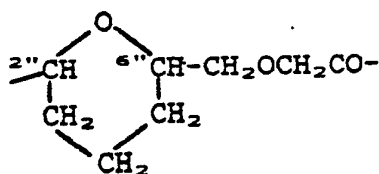
Dissolveu-se 0,150 mg do composto 4f(A) (MM), preparado como se descreveu no Exemplo 7, em 25 ml de dimetilformamida anidra e tratou-se com 95 mg de N-hidroxi-succinimida e 0,15 g de N,N'-diciclo-hexilcarbodiimida, segundo o procedimento descrito no Exemplo 4. Obteve-se o composto em título 5f(A) (MM) com um rendimento de 85% (0,15g).

R_f=0,20 (sistema A): FD-MS m/e 868 (M⁺).

Exemplo 9

Preparação de 14-O-(2-carboximetiloximetil-tetra-hidro-piran-6-il)doxorubicina: mistura dos isômeros 2"R, 6"R, 2"S, 6"S; 2"S, 6"R; 2"R, 6"S.

4'f (B): $A_1-O=3'f$ ($R_3=NH_2$) ; W =



Dissolveu-se 0,65 g (0,85 mmoles) de 6,11,4'-tri-O-acetil-N-trifluroacetil-doxorrubicina (9f), preparado como se descreveu no Exemplo 5, em 50 ml de cloreto de metileno anidro e tratou-se com 0,7 (3,5 mmoles) do composto 8B e 0,045 g do ácido p-tolueno-sulfônico anidro, sob atmosfera de azoto, à temperatura ambiente. Após 10 minutos, adicionou-se uma solução aquosa saturada de 20 ml de hidrogeno carbonato de sódio. Separou-se a fase orgânica e lavou-se duas vezes, com água, secou-se sobre sulfato de sódio anidro e eliminou-se o dissolvente sob pressão

reduzida. Dissolveu-se o resíduo oleoso em 50 ml de metanol e tratou-se, em primeiro lugar, com 1,2 ml de morfolina durante 2 horas e depois, com 0,1 g de metóxido de sódio durante meia hora.

Após isto, levou-se a mistura reaccional a pH 7,5 com ácido clorídrico aquoso 0,1N e extraíu-se com cloreto de metileno. Após operação convencional, cromatografou-se o resíduo sobre ácido silícico, utilizando cloreto de metileno como eluente, para se obter 0,4 g (rendimento de 56%) de um derivado protegido de N-trifluoroacetilo e (2-etiloxicarbonilo) do composto em título. $R_f=0,31$ (sistema D).

FD-MS: m/e 839 (76, M⁺); 639 (84); 201 (100).

Tratou-se 0,4 g (0,47 mmoles) do derivado de N-trifluoroacetil e 2-etiloxicarbonilo, descrito antes, com 100 ml de hidróxido de sódio aquoso 0,1N à temperatura de 0°C sob atmosfera de azoto, durante 90 minutos. Após isto, levou-se a solução a pH 5 com ácido acético, extraíu-se com água saturada de n-butanol e lavou-se com n-butanol saturado de água. Eliminou-se o dissolvente sob pressão reduzida;

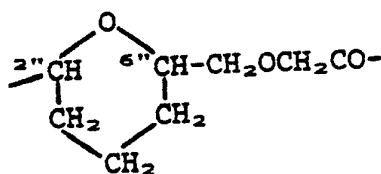
recolheu-se o resíduo com uma mistura de cloreto de metileno-metanol e tendo-se precipitado o composto em título 4'f(B), (0,32 g; rendimento de 94%), por meio da acção de éter etílico e recolhido em um funil de vidro sinterizado .
Rf=0,31 (sistema B).

FD-MS: m/e 716 (23, MH⁺); 321 (100).

Exemplo 10

Preparação de 14-0-(2-carboximetiloximetil-tetra-hidro-piran-6-il)-3'-desamino-3'-(4-morfolino)-doxorrubicina:
mistura de isómeros 2"R, 6"R; 2"S, 6"S; 2"S,6"R, 2"R, 6"S.

4f(B) (MO): A-O=3'f (R₃=MO); W =



5

Dissolveu-se 0,3 g do composto 4'f(B) em 40 ml de dimetilformamida anidra e tratou-se com 0,3 ml de trietilamina e 2 ml de bis (éter 2-iodoetílico) (11) a uma temperatura compreendida entre 4° e 5° C.

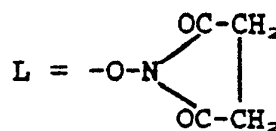
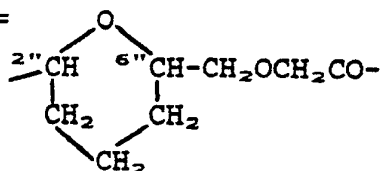
Após 24 horas, acidificou-se a solução com ácido acético e eliminou-se o dissolvente sob pressão reduzida, Tratou-se o resíduo com hidróxido de sódio aquoso 0,1N à temperatura de 0° C, sob atmosfera de azoto. Após 20 minutos, acidificou-se a solução com ácido acético e extraíu-se com n-butanol e lavou-se com água. Eliminou-se o dissolvente sob pressão reduzida e purificou-se o composto impuro em uma coluna de ácido silícico eluindo com uma mistura de cloreto de metileno/metanol (90:5 em volume) para se obter 0,05 g (rendimento de 23%) do composto em título 4f(B)(MO). Rf=0,48 (sistema B) FAB-MS:757 (M+).

Exemplo 11

Preparação do derivado N-oxi-succinimidílico de 14-0-[2-carboximetiloximetil-tetra-hidropiran-6-il]-3'-desamino-3'-(4-morfolino)-doxorubicina: mistura de isômeros 2"R, 6"R; 2"S, 6"S; 2"S, 6"R; 2"R, 6"S.

5f(B)(MO): A-O=3'f ($R_3 = MO$);

W =



Dissolveu-se 0,03 g (0,037 mmoles) do composto 4f(B)(MO) em 3 ml de dimetilformamida anidra e adicionaram-se 0,01 g de N-hidroxi-succinimida e 0,02 g de diciclo-hexilcarbodiimida. Conservou-se a mistura à temperatura ambiente durante 8 horas, após o que se eliminou o dissolvente in vacuo e se cromatografou o resíduo em uma coluna de ácido silícico utilizando cloreto de metileno: metanol (95:5) como eluente,

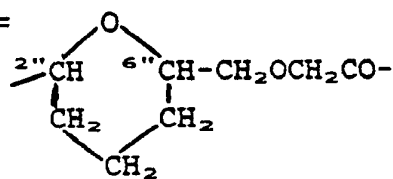
para se obter 0,028 g (rendimento de 85%) do composto em
título 5f(B)(MO). Rf=0,52 (sistema H),

FAB-MS: 852 (13, MH⁺); 200 (100).

Exemplo 12

Preparação de 14-0-(2-carboximetiloximetil-tetra-hidropi-
ran-6-il)-3'-desamino-3'-[2(S)-metoxi-4-morfolino]-doxorru-
bicina: mistura de isómeros 2"R, 6"R; 2"S, 6"S; 2"S, 6"R; 2"R,
6"S.

4f(B)(MM): A-O=3'f (R₃=MM); W =



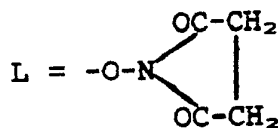
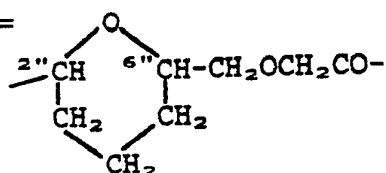
Converteu-se 0,3 g de 14-0-(2-carboximetiloximetil-tetra-hidropiran-6-il)-doxorubicina (4'f(B)), preparada como se descreveu no Exemplo 9, no composto em título 4f(B)(MM) por meio de tratamento com 1-metoxi-2,2'-oxidiacetaldeído e redução com cianoboro-hidreto de sódio, segundo o mesmo procedimento descrito no Exemplo 7. Rf=0,50 (sistema B).
FAB-MS: 787.

Exemplo 13

Preparação do derivado N-oxi-succinimidílico de 14-0-[2-carboximetiloximetil-tetra-hidropiran-6-il]-3'-desamino-3'-[2[(S)-metoxi-4-morfolino]-doxorubicina: mistura de isómeros 2"R,6"R; 2"S,6"S; 2"S,6"R; 2"R,6"S;

5f(B)(MM): A-O=3'f (R₃=MM);

W =



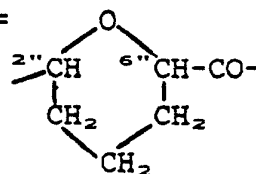
Dissolveu-se 0,03 g (0,037 mmole) do composto 4f(B)(MM), preparado no Exemplo 12, em 3 ml de dimetilformamida e adicionou-se N-Hidroxi-succinimida para se obter o composto em título 5f(B)(MM) (Exemplo 8); Rf=0,55 (sistema H).

FAB-MS:882.

Exemplo 14

Preparação de 14-0-(6-piperazinocarboniltetra-hidropiran-2-il)-3'-desamino-3'-[2(S)-metoxi-4-morfolinil]-doxorubicina:
isômeros X e Y (2"R,6"R e 2"S,6"S).

7f(A)(MM): A-O=3'f (R₃=MM), W =



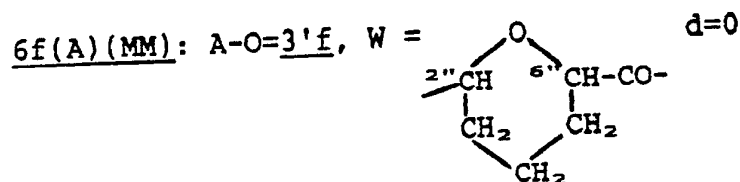
4.

Dissolveram-se 100 mg do derivado N-oxi-succinimidílico de 14-0-(2-carboxitetra-hidropiran-6-il)-3'-desamino-3'-[2(S)-metoxi-4-morfolinil]-doxorubicina (5f(A)(MM)) preparado como se descreveu no Exemplo 8, em 20 ml de tetra-hidrofurano anidro, arrefeceu-se a mistura até à temperatura de 0 °C e adicionou-se-lhe uma solução de 50 mg de 1,4-piperazina em 2 ml de tetra-hidrofurano anidro. Agitou-se a mistura reaccional à temperatura de 0 °C durante 15 minutos, depois diluiu-se com 100 ml de cloreto de metileno e lavou-se com água (3x50 ml). Separou-se a fase orgânica, secou-se sobre sulfato de sódio anidro e eliminou-se o dissolvente sob pressão reduzida. Cromatografou-se o composto impuro em uma coluna de ácido silícico, utilizando como sistema eluente uma mistura de cloreto de metileno/metanol (80/20 em volume). O composto em título 7f(A)(MM) (80 mg) foi precipitado com éter etílico. TLC em placa Kieselgel (Merck) F₂₅₄, eluindo com o sistema cloreto de metileno/metanol.

(70/30 em volume). Rf=0,55; FD-MS: m/z 839.

Exemplo 15

Preparação de 14-0-(6-hidrazinocarboniltetra-hidropiran-
-2-il)-3'-desamino-3'-[2(S)-metoxi-4-morfolinil]-doxorru-
bicina: isômeros X e Y (2"R,6"R e 2"S,6"S)



Dissolveram-se 100 mg do derivado N-oxi-succinimidílico de 14-0-(2-carboxitetra-hidropiran-6-il)-3'-desamino-3'-[2(S)-metoxi-4-morfolinil]-doxorubicina (4f(A)(MM)), preparado como se descreveu no Exemplo 8, em 20 ml de tetra-hidrofurano anidro e adicionou-se uma solução de hidrato de hidrazina 1M em isopropanol (5 ml). Conservou-se a mistura à temperatura de 0° C durante 1 horas. Após isto, adicionou-se cloreto de metileno e lavou-se a mistura três

vezes com água fria.

Separou-se a camada orgânica, secou-se sobre sulfato de sódio anidro, filtrou-se e eliminou-se o dissolvente sob vazio. Purificou-se o resíduo em uma coluna de ácido silícico, utilizando uma mistura de cloreto de metileno/metanol (99/1 em volume). Precipitou-se o composto em título 6f(A)(MM) (95 mg) com éter etílico.

TLC em placa Kieselgel (Merck) F₂₅₄, eluindo com o sistema cloreto de metileno/metanol (95/5 em volume).

Rf=0,23

FD-MS: m/z 785.

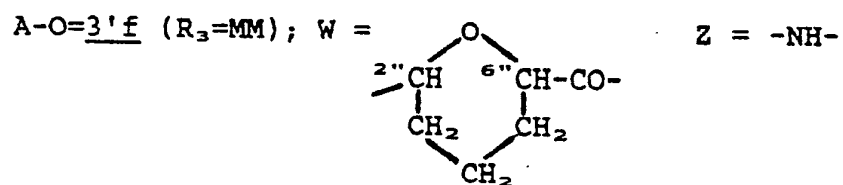
RMN¹H (200 MHz, CDCl₃): δ:

1,36 (d, J=6,6Hz, 3H, 5'-CH₃); 1,2-2,2 (m, 9H, 3"-CH₂, 4"-CH₂, 5"-CH₂, 2'-CH₂ 8ax-H); 2,3-2,7 (m, 6H, 3'-H, 8e-H, NCH₂CH₂O, NCH₂-CH(OCH₃)O); 2,9-3,4 (m, 2H, 10-CH₂); 3,38 (s, 3H, NCH₂CH(OCH₃)O); 3,55, 3,90 (dois m, 2H, NCH₂CH₂O); 3,68 (m, 1H, 4'-H); 3,95 (m, 1H, 5'-H); 4,08 (s, 3H, 4-OCH₃); 4,38 (m, 1H, 6"-H); 4,49 (m, 1H, NCH₂CH(OCH₃)O); 4,6-4,9 (m, 2H, 14-C₂); 4,97 (m, 1H, 2"-H); 5,29 (m, 1H, 7-H); 5,54 (m, 1H, 1'-H); 7,39 (d, J=7,6Hz, 1H, 3-H); 7,59 (bd, J=6,8Hz, 1H, CON); 7,78 (t, J=7,6Hz, 1H, 2-H);

8,03 (d, J=7,6Hz, 1H, 1-H); 13,29 (s, 1H, 11-OH); 13,98 (s, 1H, 6-OH).

Exemplo 16

Preparação do conjugado anti-melanoma humano 1¹.



Adicionou-se 38 mcl de uma solução 10^{-2} M do composto 5f (A) (MM) (Exemplo 8) em dimetilformamida a 1 ml de uma solução a 2 mg/ml de anticorpo purificado de murganho, monoclonal, anti-melanoma humano Ep1. [P. Giacomini, O.

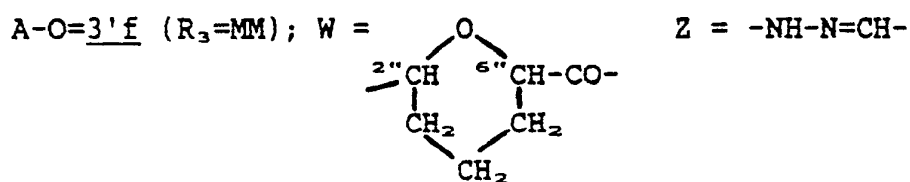


Segatto, P.G. Natali, Int. J. Cancer, 39 (1987) 729] em tampão PBS a pH 7,5. Agitou-se a mistura reaccional, durante a noite, à temperatura ambiente e clarificou-se por meio de centrifugação. Isolou-se o composto por cromatografia de filtração por gel em uma coluna de Sephadex G-25 (PD-10, Pharmacia), eluindo com PBS a pH 7,5. Recolheram-se 2 ml do pico rejeitado e analisaram-se por espectrofotométrica a 480 nm para determinação do teor de antraciclina.

O teor de proteína foi determinado por uma análise de proteínas por colorimetria (BCA, Pierce). O conjugado 1¹ continha 0,98 mg/ml do anticorpo com uma relação antraciclina: proteína de 8,7:1. O perfil físico-químico do composto foi determinado por meio de análise por HPLC de filtração por gel com detecção em dois comprimentos de onda (280 e 480 nm) e por SDS-PAGE. Por HPLC, o peso molecular do composto foi de cerca de 160 KD e a absorção da antraciclina a 480 nm correspondia a esse peso molecular. A prova da formação da ligação covalente foi obtida por SDS-PAGE e tanto a absorção de antraciclina a 480 nm como a reacção de coloração proteica de Coomassie se localizaram no peso molecular de 160 KD.

Exemplo 17

Preparação do conjugado anti-carcinoma do cólon 1².



Tratou-se 1 ml de uma solução do anticorpo B72,3 (patente de invenção norte-americana nº 4 522 918 de 1985) a 2,6 mg/ml de um tampão de fosfato 0,1M, pH 6, com 0,1 ml de uma solução de NaIO₄ 0,1M em água, à temperatura de 4° C na escuridão. Após 1 hora, purificou-se o composto por cromatografia de filtração por gel em uma coluna de Sephadex G-25 (PD-10, Pharmacia), eluindo com um tampão de fosfato 0,1M, pH 6.

Trataram-se 1,7 mg (2 ml) da fracção contendo a proteína com 30 equivalentes molares de uma solução 10⁻² M do composto 6f (A)(MM) (Exemplo 15) em dimetilformamida. Após 24 horas, à temperatura de 37° C na escuridão, centrifugou-se a mistura reaccional e purificou-se por

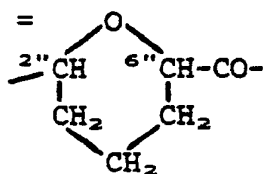
cromatografia de filtração por gel em uma coluna de Sephadex G25 (PD-10, Pharmacia) eluindo com um tampão de fosfato 0,1M, pH 7,3. Recolheram-se 2 ml do pico que continha a proteína e trataram-se como no Exemplo 16.

O conjugado 1² continha 0,45 mg/ml do anticorpo com uma relação antraciclina/proteína de 1,3/1 e mostrou um perfil analítico análogo ao do conjugado obtido no Exemplo 16.

Exemplo 18

Preparação do conjugado receptor anti-transferrina 1³

A-O=3'f ($R_3=MM$); W =



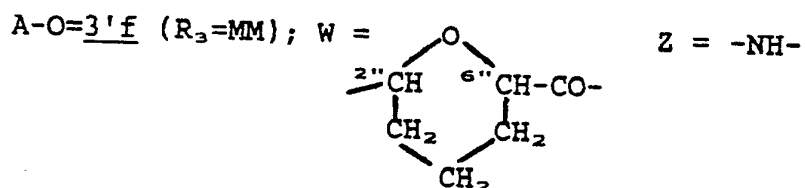
Z = -NH-

5

Adicionou-se 37 mcl de uma solução $10E^{-2}$ M do composto 5f(A)(MM) (descrito no Exemplo 8) em N,N-dimetilformamida a 1 ml de uma solução a 2 mg/ml do anticorpo OKT9 monoclonal anti-receptor humano da transferrina, purificado de murganho [Sutherland, R., Delia., D., Schneider, G., Newman, R., Kemshead, J. Greaves, M., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 78 (1981) 4515; ATCC CRL 8021] em tampão de NaH_2PO_4 0,1M, NaCl 0,1M, pH8. Agitou-se a mistura reaccional durante a noite à temperatura ambiente, na escuridão, e clarificou-se por centrifugação. Isolou-se o conjugado em título 1³ por cromatografia de filtração por gel em uma coluna de Sephadex G-25 (PD-10 Pharmacia, Cat. nº 17 - 0851-01) eluindo com PBS, pH 7,3 (Gibco, 10X, Cat. nº 042-04200M). Recolheu-se o pico rejeitado e analisou-se em relação ao teor de antraciclina (espectrofotometricamente a 480 nm) e em relação ao seu teor proteico (BCA Protein Assay Reagen, Pierce, Cat. 23225). O conjugado continha 1,94 mg/ml do anticorpo e 80,9 mcg/ml de antraciclina, com uma relação molar antraciclina: proteína de 9,5. O perfil analítico do composto foi avaliado como no Exemplo 16, com resultados semelhantes.

Exemplo 19

Preparação do conjugado anti-carcinoma do cólon 1⁴

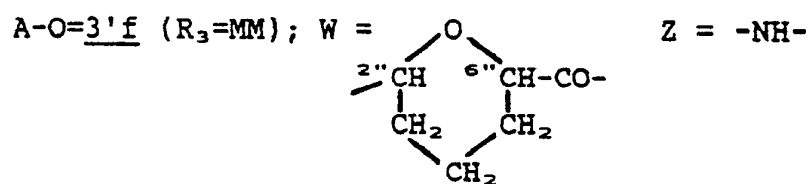


Obteve-se um conjugado de fórmula 1⁴, contendo 0,74 mg/ml de proteína e 27,5 mcg/ml de antraciclina, com uma relação antraciclina/proteína de 9,1 procedendo como no Exemplo 18 e utilizando, em vez de OKT9, uma solução do anticorpo B72.3 (2,3 mg/ml) [Schlom, J. et al., patente de invenção norte-

-americana nº 4 522 918 (1985)] e 43 mcl da solução de 5f(A) (MM).

Exemplo 20

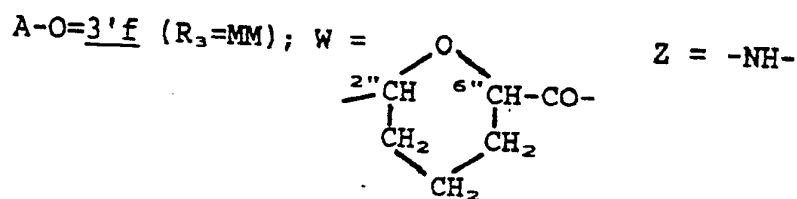
Preparação do conjugado factor de crescimento anti-epidérmico 1⁵.



Obteve-se o conjugado 1⁵, contendo 0,49 mg/ml de proteína e 14,3 mcg/ml de antraciclina, com uma relação antraciclina/ proteína de 6,9, procedendo como no Exemplo 18 e utilizando, em vez de OKT9, uma solução de um anticorpo receptor do factor de crescimento anti-epidérmico (1,15 mg/ml) (BioMacor Cat. nº 6080, clone 29.2) e 13 mcl da solução do composto 5f(A)(MM).

Exemplo 21

Preparação do conjugado receptor anti-transferrina 1⁶.

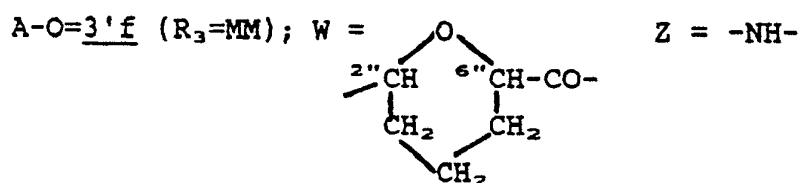


4

Obteve-se o composto em título 1⁶, contendo 0,34 mg/ml de proteína e 5,3 mcg/ml de antraciclina, com uma relação antraciclina/proteína de 3,9 procedendo como no Exemplo 18 e utilizando, em vez de OKT9, uma solução do anticorpo B3/25 (0,5 mg/ml) anti-receptor da transferrina (Boehringer Cat. nº 1118048) e 9,4 mcl da solução de 5f(A)(MM).

Exemplo 22

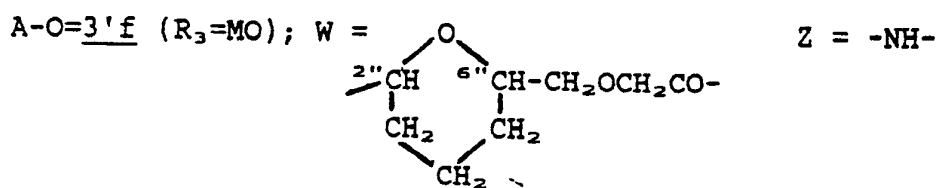
Preparação do conjugado FGF 1⁷



Preparou-se o composto 1⁷, contendo 0,77 mg/ml de proteína e 117 mcg/ml de antraciclina, com uma relação antraciclina/ proteína de 3,4, procedendo como no Exemplo 18 e utilizando, em vez de OKT9, uma solução de FGF recombinante humano (1,35 mg/ml) [Barr et al., J. Biol. Chem., 263 (1988) 16471] e 48 mcl da solução 5f(A)(MM).

Exemplo 23

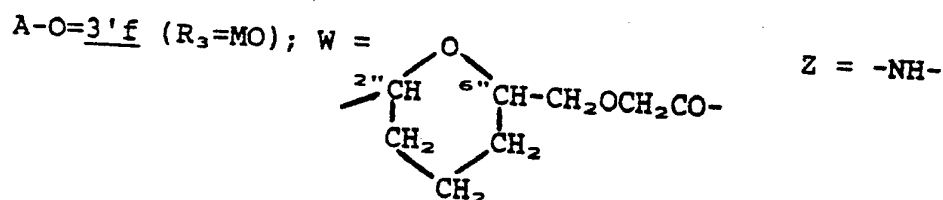
Preparação do conjugado anti-receptor da transferrina 1⁸



Obteve-se o conjugado 1⁸, contendo 0,46 mg/ml de proteína e 13 mcg/ml de antraciclina, com uma relação antraciclina/proteína de 4,90, procedendo como no Exemplo 18 e utilizando 37 mcl de uma solução $10E^{-2}$ M de 5f(A)(MO) (Exemplo 11).

Exemplo 24

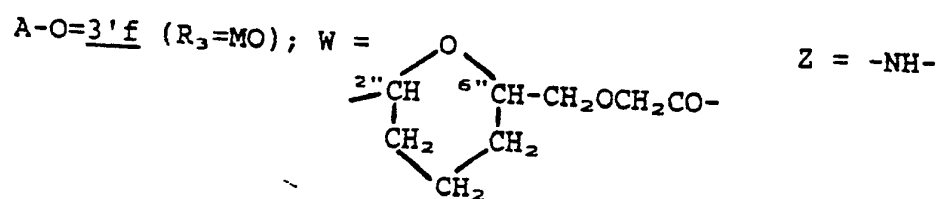
Preparação do conjugado anti-carcinoma do cólon 1⁹.



Obteve-se o conjugado de fórmula 1⁹, contendo 0,46 mg/ml de proteína e 8,38 mcg/ml de antraciclina, com uma relação antraciclina:proteína de 4,5 procedendo como no Exemplo 18 e utilizando, em vez de OKT9, o anticorpo B72.3 anti-carcinoma do cólon e 43 mcl de uma solução $10E^{-2}$ M de 5f(A)(MO) (Exemplo 11).

Exemplo 25

Preparação do conjugado anti-receptor da transferrina 1¹⁰

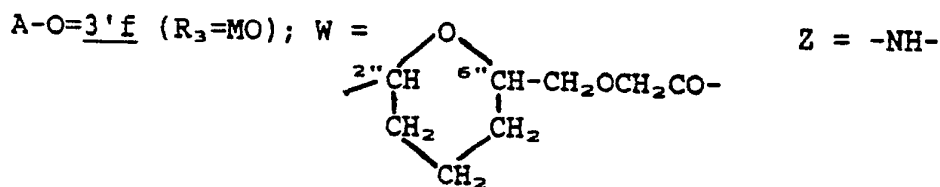


Obteve-se o composto 1¹⁰ contendo 0,67 mg/ml de proteína e 20,3 mcg/ml de antraciclina, com uma relação antraciclina/

/proteína de 7,6, procedendo como no Exemplo 18 e utilizando 37 mcl de uma solução $10E^{-2}M$ de 5f(A)(MM) (Exemplo 13).

Exemplo 26

Preparação do conjugado anti-carcinoma do cólon 1¹¹



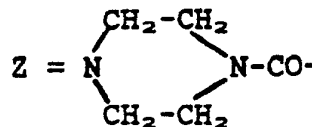
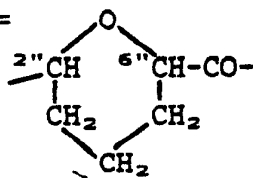
Procedendo como no Exemplo 18 e utilizando, em vez de OKT9, o anticorpo B72.3 anti-carcinoma do cólon e 43 mcl de uma solução $10E^{-2}M$ do composto 5f(A)(MO), preparou-se o composto em título 1¹¹ contendo 0,55 mg/ml de proteína e 7,4

mcg/ml de antraciclina, com uma relação antraciclina/proteína de 3,2.

Exemplo 27

Preparação do conjugado de Poli (glu.Na.Ala,Tyr) (1:1:1) 1¹²

A-O=3'f (R₃=MM); W=



Dissolveu-se 0,2 g de Poli (glu.Na.Ala,Tyr) (1:1:1) de peso molecular 25000 a 40000 (Sigma) em 5 ml de água, sob agitação e à temperatura ambiente. O correspondente ácido livre foi precipitado a partir da solução aquosa a pH 3 com

HCl 0,1N. Recuperou-se e secou-se sob vazio 0,17 g de Poli (Glu-OH, Ala, Tyr), dissolveu-se em 10 ml de dimetilformamida anidra e adicionaram-se 0,035g de 14-0-(6-piperazinocarboniltetra-hidro-piran-2-il)-3'-desamino-3'-[2(S)-metoxi-4-morfolinil]-doxorubicina [7f(A)(MM)] (descrita no exemplo 14) e 0,08g de N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-di-hidroquinolina (EEDQ). Adicionou-se outra alíquota de 0,08 g de EEDQ, após 3 horas. Agitou-se a mistura reaccional durante a noite à temperatura ambiente e, depois, verteu-se em 300 ml de éter etílico.

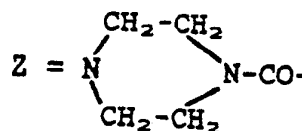
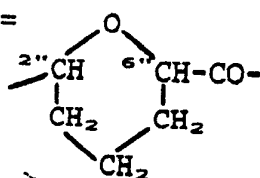
Fez-se uma suspensão do precipitado em 10 ml de água e tratou-se com 14 ml de NaOH 0,1N; levou-se a solução a pH 8,5 com HCl 0,1N e passou-se sobre uma coluna de Sephadex G10. Liofilizou-se a solução aquosa para se obter 0,16 g do composto em título 1¹²

O teor de antraciclina (%p/p), calculado sob a forma de cloridrato de 3'-desamino-3'-[2(S)-metoxi-4-morfolinil]-doxorubicina, foi de 10%.

Exemplo 28

Preparação do conjugado do ácido poli-L-glutâmico 1¹³

A-O=3'f ($R_3=MM$); W=



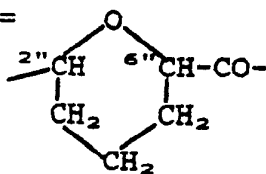
Dissolveram-se 0,1 g de ácido poli-L-glutâmico de peso molecular 2000 a 15000 (sigma) e 0,03 g de 14-0-(6-piperazinocarboniltetra-hidropiran-2-il)-3'-desamino-3'-[2(S)-metoxi-4-morfolinil]-doxorubicina [7f(A)(MM)] (descrita no Exemplo 14) em 2 ml de dimetilformamida anidra e agitou-se durante 3 horas. Após isto, adicionou-se 0,03 g de N-etoxi-carbonil-2-etoxi-1,2-di-hidro-quinolina (EEDQ). Conservou-se a mistura sob agitação durante a noite e, depois, verteu-se em uma mistura de éter etílico e éter de petróleo. Recolheu-se o precipitado em um filtro de vidro sinterizado, lavou-se com éter etílico e dissolveu-se com 8

ml de uma solução aquosa a 2,5% de hidrogeno carbonato de sódio. Passou-se a solução através de uma coluna RP-8 de fase inversa, 40-63 μ m (Merck) (30x1,8 cm) e eluíu-se com uma mistura de água e acetonitrilo. O eluído contendo o conjugado foi liofilizado, depois recolhido em um filtro de vidro sinterizado e lavado com metanol e éter etílico para se obterem 65 mg do composto em título 1¹³. Por análise espectroscópica, verificou-se que o conjugado continha 16% (%p/p) de cloridrato de 3'-desamino-3'-[2(S)-metoxi-4-morfolinil]-doxorubicina.

Exemplo 29

Preparação do conjugado do ácido poli-L-glutâmico 1¹⁴

A-O=3'f ($R_3=MM$); W=



Z = -NH-NH-CO-

Seguindo o mesmo processo descrito no Exemplo 28, fez-se reagir 0.1 g de ácido poli-L-glutâmico, de peso molecular 2000 a 15000 (Sigma) com 6,05 g de 14-0-(6-hidrazinocarboniltetra-hidropiran-2-il]-3'-desamino-3'-[2(S)-metoxi-4-morfolinil]-doxorubicina [6f(A)(MM)] (descrita no Exemplo 15) em dimetilformamida na presença de EEDQ. Após operação e purificação em uma coluna RP-8, 40-63 µm (Merck), recolheram-se 50 mg do composto em título 14. Por análise espectroscópica verificou-se que o conjugado continha 12% (% p/p), de cloridrato de 3'-desamino-3'-[2(S)-metoxi-4-morfolinil]-doxorubicina.

Exemplo 30

Avaliação da actividade de ligação celular do conjugado 13 anti-receptor da transferrina sobre uma linha de células de melanoma humano.

Ref: Matsui, M. et al., J. Immunology, 141 (1988) 1410

Bumol., T.F. et al., Antibody-Mediated Delivery Systems, Rodwell, J. D. Ed., (1988) 55

Harper, J.R. et al., Anal. Biochem, 113 (1980) 51.



Colocaram-se células de melanoma humano M10 (ATCC CRL 8021) em um meio de RPMI 1640 (PBI 12/167B), 10% de FCS (Flow Laboratories 29101-54) 1% de glutamina em placas microtituladas de 96 cavidades (Costar 3596) (10 000 células/cavidade). Após 16 horas à temperatura de 37° C, lavaram-se as células com PBS, 3% de FCS e incubaram-se com diferentes concentrações do conjugado 1³ (Exemplo 18) ou do anticorpo OKT9, em PBS, 3% de FCS, 100 mcl, 5-1000 mg/ml durante 1 hora à temperatura de 37° C. Após 3 lavagens com PBS, 3% de FCS, adicionaram-se a cada cavidade, 100 mcl de uma diluição a 1:1500 de peroxidase de rábano silvestre conjugada com IgG de cabra anti-murganho (BioRad 172-1011). Depois, incubaram-se as placas durante 1 hora à temperatura de 37° C e lavaram-se 3 vezes com PBS, 3% de FCS. Então, adicionaram-se a cada cavidade, 100 mcl de uma solução de substrato, preparada recentemente, de dicloridrato de o-fenilendiamina (Sigma P6912) (0,5 mg/ml) e H₂ O₂ (0,015%) em água. Após uma incubação de 30 minutos à temperatura de 37° C, interrompeu-se a reacção por meio da adição de 25 mcl de H₂ SO₄ 4,5N a cada cavidade e leu-se a absorção a 495 nm com um Leitor BioRad EIA, modelo 2550. O conjugado mostrou uma boa retenção da actividade de ligação celular em comparação com o anticorpo de origem como se mostra na Fig. 1.

Exemplo 31

Avaliação da citotoxicidade selectiva do conjugado 1³ anti-receptor da transferrina.

Ref:Dillman, R.O. et al., Cancer Res., 48 (1988) 6097.

Ahmad, A. et al., Anticancer Res., 10 (1990) 837.

Colocaram-se células M10 de melanoma humano (ATCC CRL 8021) em placas de 96 cavidades (Costar 3596) em 200 mcl de RPMI 1640 (PBI 12/167B) contendo 10% de FCS (Flow Laboratories, 29101-54), 1% de glutamina (10000 células/cavidade) à temperatura de 37° C. Após 18 horas, retirou-se o meio de cultura e adicionaram-se 100 mcl de meio fresco. Adicionaram-se 50 microlitros de concentrações diferentes do conjugado 1³ e dos respectivos controlos em PBS e 3% de FCS a cavidades em triplicado. Incubaram-se as placas durante 24 horas à temperatura de 37° C e, depois, adicionou-se 0,8 microCurie/cavidade de [³H]timidina (NEN Dupont NET 355) em 20 mcl do meio de cultura e continuou-se a incubação à temperatura de 37° C durante 7 horas. Colheram-se as células com uma "ceifeira" celular Dynatech MultiMash 2000

para dentro de filtros de papel (Whatman 1827842), secaram-se os filtros com ar, colocaram-se em frascos com fluido de cintilação (Kontron Analytical Supertron 56920-04010) e contaram-se com um contador de cintilações (Kontron Instrument Betamatic).

Todos os conjugados se mostraram substancialmente menos citotóxicos do que os fármacos de origem, mas o conjugado anti-receptor da transferrina específico mostrou um efeito cinco vezes superior ao de um conjugado de controlo irrelevante, como mostra a comparação entre as CI_{50} dos dois compostos.

Os resultados de uma experiência típica mostraram-se na Fig. 2.

Exemplo 32

Inibição da citotoxicidade do imunoconjugado 1³ anti-receptor da transferrina pelo anticorpo não-conjugado.

Ref: Chaumdhary, V.K. et al., Nature, 339 (1989) 394.

Batra, J.K. et al., Mol. and Cell.Biol., 11 (1991) 2200.
Siegal, C.B. et al., J. Biol. Chem., 265 (1990) 16318.

Colocaram-se células M10 de melanoma humano (ATCC CRL 8021) em placas de 96 cavidades (Costar 3596) em 200 mcl de RPMI 1640 (PBI 12/167B) contendo 10% de FCS (Flow Laboratories 29101-54) e 1% de glutamina (10000 células/cavidade) à temperatura de 37° C. Após 18 horas, retirou-se o meio de cultura e adicionaram-se 50 mcl de meio fresco. Depois, adicionaram-se 50 mcl de uma solução do anticorpo OKT9 em meio de cultura completo às cavidades em triplicado (concentração final nas cavidades de 7000 a 56 mcg/ml).

Trataram-se as cavidades de controlo com 50 mcl de meio de cultura completo. Incubaram-se as placas durante 1 hora à temperatura de 4° C e depois, adicionaram-se 50 mcl de concentrações diferentes do conjugado 1^3 , em meio de cultura completo (concentração final do anticorpo nas cavidades de 70 a 0,56 mcg/ml), correspondendo a 1:100 do excesso molar do anticorpo livre adicionado no passo anterior). Após 24 horas à temperatura de 37° C, adicionou-se 0,8 microCurie/cavidade de [3 H]timidina (NEN



DuPont NET 355) em 20 mcl do meio e continuou-se a incubação à temperatura de 37° C durante 7 horas. Colheram-se as células e avaliou-se a incorporação de radioactividade como no Exemplo 31.

Como se mostra na Figura 3, a adição do anticorpo livre inibe a citotoxicidade do imunoconjugado num intervalo de doses de teor de antraciclina, confirmando assim o efeito mediado pelo receptor dos compostos aqui descritos.

Os resultados de uma experiência típica mostram-se na Figura 3.

Exemplo 33

Inibição da citotoxicidade do imunoconjugado 1³ anti-receptor da transferrina pelo anticorpo não conjugado, como resposta à dose.

Ref: Chaundhary, V.K. et al., Nature, 339 (1989) 394.

Batra, J.K. et. al., Mol. and Cell. Biol., 11 (1991) 2200.

Siegal, C.B. et. al., J. Biol. Chem., 265 (1990) 16318.

Colocaram-se células M10 em placas e incubaram-se durante 18 horas como se descreveu no Exemplo 32. Após isto retirou-se o meio de cultura e adicionaram-se 50 mcl de meio-fresco. Depois, adicionaram-se 50 mcl de uma solução anticorpo OKT9 em meio de cultura completo às cavidades em triplicado (concentração final nas cavidades de 2120 e 21,2 mcg/ml). Trataram-se as células de controlo com 50 mcl de meio de cultura completo. Incubaram-se as placas durante 1 hora à temperatura de 4° C. Depois, adicionaram-se 50 mcl do conjugado 1³ em meio de cultura completo (concentração final do anticorpo nas cavidades: 2,12 mcg/ml). Incubaram-se as células, colheram-se e avaliou-se a incorporação da radioactividade como no exemplo 31.

Como a Figura 4 mostra, obtem-se uma inibição da citotoxicidade do conjugado relacionada com a resposta à dose pelo pré-tratamento das células com diferentes excessos do anticorpo não conjugado, confirmando a citotoxicidade mediada pelo receptor dos compostos.



Exemplo 34

Avaliação da citotoxicidade selectiva do conjugado FGF 1⁷

Procedendo como no Exemplo 31 e utilizando o conjugado de fórmula 1⁷, demonstrou-se a citotoxicidade selectiva do conjugado FGF (Figura 5).

Exemplo 35

Utilizando o protocolo descrito no Exemplo 31 e diferentes combinações de antraciclinas, agentes de ligação e veículos de alvejamento apropriados, prepararam-se diferentes conjugados e testou-se a sua citotoxicidade em diferentes linhas de células, utilizando conjugados de não-ligação como controlos. Como no Quadro 1 indica, os conjugados específicos são consistentemente mais eficientes na inibição do crescimento das células tumorais em comparação com os conjugados de controlo de não-ligação. A relação entre as CI_{50} pode ser tomada como um índice da selectividade dos compostos. Assim, de 7% a 38% de um



conjugado específico é tão citotóxico como 100% de uma dose de um conjugado de controlo. As selectividades observadas foram confirmadas em experiências executadas com diferentes antraciclinas, agentes de ligação, células alvo e durante vários tempos de incubação.

CITOTOXICIDADE SELECTIVA DOS CONJUGADOS DE ANTRACICLINA

Conjugado Específico	Conjugado de Controlo	Células Alvo	Tempo de Incubação	CI $\times 10E^7$ 50 Espec/Contr.	Relação das CI 50
<u>1</u> ³	<u>1</u> ⁴	M10	24	5,0/21,0	0,23
"	"	"	48	1,2/ 6,8	0,17
"	"	"	72	1,7/ 5,6	0,30
"	"	M14	48	3,9/16,0	0,24
"	"	"	72	5,0/17,0	0,29
"	"	OVCAR3	72	4,1/18,0	0,23
"	"	A431	24	9,1/40,0	0,23
<u>1</u> ⁵	"	"	24	18,0/40,0	0,45
<u>1</u> ⁷	"	M10	24	1,5/21,0	0,07
<u>1</u> ⁶	"	"	48	5,1/10,0	0,51
<u>1</u> ⁵	"	M14	48	11,0/20,0	0,55
<u>1</u> ⁸	<u>1</u> ⁹	M10	24	1,0/ 9,0	0,11
"	"	"	72	0,4/ 2,3	0,17
"	"	M14	24	1,2/11,0	0,10
"	"	"	72	1,6/12,0	0,13
<u>1</u> ¹⁰	<u>1</u> ¹¹	M10	24	2,2/9,0	0,24
"	"	"	72	3,0/ 8,0	0,38
"	"	M14	24	5,1/>10,0	n.d.
"	"	"	72	6,0/>10,0	n.d.

Referência das células alvo:

M10 : melanoma humano, ATCC CRL 8021

M14 : melanoma humano, Natali, P.G: et al., J. Immunol. Meth., 62
(1983), 337.

OVCAR-3 : carcinoma ovárico humano, ATCC HTB 161

A431 : carcinoma epidermóide humano, ATCC CRL 1555

Exemplo 36

Avaliação do composto 1¹⁴

O composto 1¹⁴ foi avaliado in vivo contra leucémias P388 de murino resistentes à doxorubicina em comparação com a 3'-desamino-3'-[2(S)-metoxi-4-morfolino]-doxorubicina (DMM) e a doxorubicina. Os dados estão referidos no Quadro 2.

O conjugado mostrou actividade anti-tumoral semelhante, mas para doses mais elevadas ao fármaco livre.

4.

Quadro 2: Actividade anti-tumoral contra P388/DX (Johnson)
Leucemia

P388/DX ⁽¹⁾			
composto	dose (2) (mg/kg)	T/C ⁽³⁾ %	TOX
<u>1</u> ¹⁴	5,2 ⁽⁴⁾	200	0/10
Doxorrubicina	16,9	100	0/10
DMM ⁽⁵⁾	0,09	192	0/39

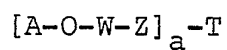
(1) 10^5 células/murganho (P388/DX, Johnson) transplantadas i.v. em murganhos CDF1. Tratamento no 1º dia após a inoculação do tumor.

(2) Dose óptima.

- (3) Tempo médio de sobrevivência % em relação a controles não tratados.
- (4) Dose do fármaco activo: 3'-desamino-3'-[2(S)-metoxi-4-morfolino]-doxorubicina (DMM).
- (5) 3'-desamino-3'-[2(S)-metoxi-4-morfolino]-doxorubicina.

REIVINDICAÇÕES

1.- Processo para a preparação de conjugados de fórmula geral



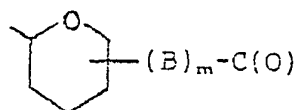
1

na qual

o radical A-O- representa o resto de uma qualquer antraciclina de fórmula geral A-O-H comportando, pelo menos, um grupo hidroxil primário ou secundário;

a representa um número inteiro de 1 a 30;

W representa um resto de fórmula geral



2

na qual

B representa um grupo alquilenos C_{1-6} eventualmente interrompido por um grupo hetero; e

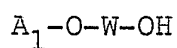
m representa zero ou o número inteiro 1;

Z representa um grupo espaçador; e

T representa o radical de um veículo;

caracterizado pelo facto

(a) de se converter um derivado de fórmula geral



4

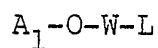
na qual

A_1-O- representa um resto de uma antraciclina comportando, pelo menos, um grupo hidroxil primário ou secundário e com o grupo amino do radical açúcar protegido ou substituído por um grupo morfolino; e

W tem os significados definidos antes;

em um outro derivado activado de fórmula geral

...



5

na qual

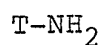
A_1-O- e W têm os significados definidos antes; e

L representa um grupo activador;

para se obter uma ligação amídica; e

(b)

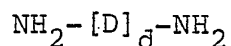
(i) de se condensar o composto resultante de fórmula geral 5 com um composto de fórmula geral



na qual

T tem o significado definido antes; ou

(ii) de se fazer reagir um composto activado de fórmula geral 5 com um derivado de fórmula geral



na qual

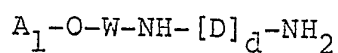
[D] representa um grupo de fórmula geral

$NHCO(CH_2)_nCONH$ na qual n representa o número inteiro 2 ou 4; e

d representa zero ou o número inteiro 1 ou 2;

de se desproteger eventualmente o derivado resultante de fórmula geral

...

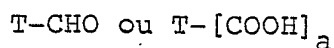


6

na qual

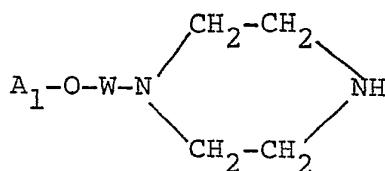
A_1-O- , W, d e [D] têm os significados definidos antes;

e de se condensar o mesmo derivado com um composto de fórmula geral



em que

T e a têm os significados definidos antes; ou (iii) de se fazer reagir um composto de fórmula geral 5 com 1,4-piperazina e de condensar o composto resultante de fórmula geral



7

na qual

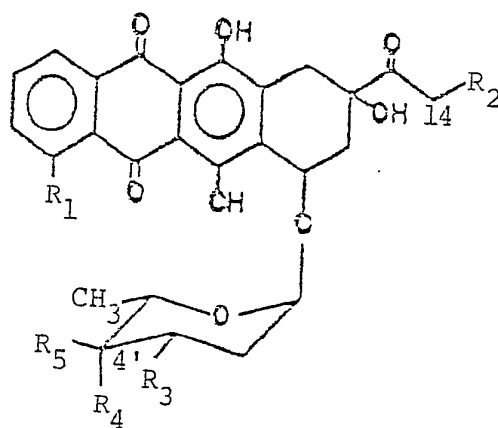
A_1-O- e W têm os significados definidos antes; com um composto de fórmula geral $T[COOH]_a$ definida antes eventualmente na presença de um agente de condensação para se obter um conjugado de fórmula geral 1 na qual se podem inactivar, com uma amina aceitável em farmácia, os grupos carboxilo activados eventualmente presentes que não reagiram.

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de compostos de fórmula geral 1 na qual

(i) Z representa um grupo -NH- e T-Z representa o resto de um veículo de fórmula geral T-NH₂ comportando pelo menos um grupo amino livre, ou (ii) Z representa um grupo de fórmula geral NH-[D]_d-N=CH- na qual d representa zero ou o número inteiro 1 ou 2, [D] representa um grupo de fórmula geral -NH-CO(CH₂)_nCO-NH-, na qual n representa o número inteiro 2 ou 4, e T-Z representa o resto de um veículo de fórmula geral T-CHO comportando, pelo menos, um grupo formilo ou T[COOH]_a na qual a tem os significados definidos antes ou (iii) Z representa um grupo piperazinil-carbonilo ou um grupo de fórmula geral -NH-[D]_d-NH-CO- na qual [D] e d têm os significados definidos antes e T-Z representa o resto de um veículo de fórmula geral T-[COOH]_a definida antes, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

3.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de compostos de fórmula geral 1 na qual o radical A-O- representa uma antraciclina comportando pelo menos um grupo hidroxil primário ou secundário de fórmula geral

...



3

na qual

R_1 representa um átomo de hidrogênio ou um grupo hidroxil ou metoxil;

- (i) R_2 representa um grupo hidroxil e um dos símbolos R_4 ou R_5 representa um átomo de hidrogênio e o outro dos símbolos R_4 e R_5 representa um grupo hidroxil;

R_4 representa um átomo de iodo; e

R_5 representa um átomo de hidrogênio ou R_4 e

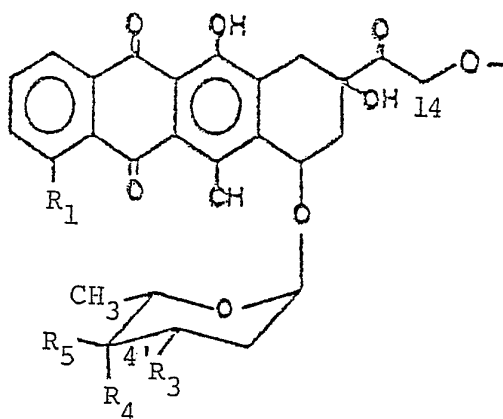
R_5 representam ambos átomos de hidrogênio; ou

- (ii) R_2 representa um átomo de hidrogênio e um dos símbolos R_4 ou R_5 representa um grupo hidroxil e o outro dos símbolos R_4 e R_5 representa um átomo de hidrogênio;

R_3 representa um grupo amino ou um átomo de

azoto encerrado em um núcleo morfolino;
caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais
correspondentemente substituídos.

4.- Processo de acordo com a reivindicação 3, para a preparação de compostos de fórmula geral 1 na qual o radical A-O- representa uma antraciclina de fórmula geral



na qual

R_1 e R_3 têm os significados definidos antes na reivindicação 3; e

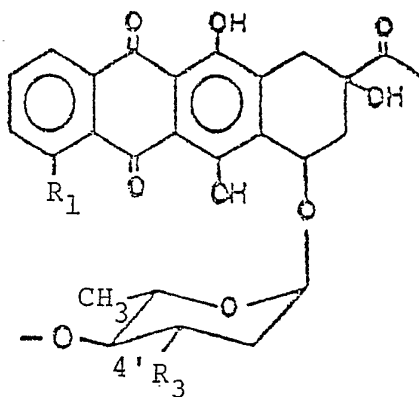
um dos símbolos R_4 ou R_5 representa um átomo de hidrogênio e o outro representa um grupo hidroxil; ou

R_4 representa um átomo de hidrogênio ou de iodo; e

R_5 representa um átomo de hidrogênio;

caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

5.- Processo de acordo com a reivindicação 3, para a preparação de compostos de fórmula geral 1 na qual o radical A-O- representa uma antraciclina de fórmula geral



na qual

R_1 e R_3 têm os significados definidos na reivindicação 3;

caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

6.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, para a preparação de compostos de fórmula geral 1 na qual B representa um grupo $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-$, $-\text{C}_3\text{H}_6-$ ou C_6H_{12} , caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente subs-

tituídos.

7.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo facto de se utilizar um veículo escolhido entre anticorpos policlonais ou os seus fragmentos que incluem um sítio de ligação a um antigénio, capazes de se ligarem a um antigénio associado a um tumor; anticorpos monoclonais ou os seus fragmentos que incluem um sítio de ligação a um antigénio, capazes de se ligarem a um antigénio preferencial ou selectivamente expresso por populações de células tumorais; péptidos ou proteínas capazes de se ligarem preferencial ou selectivamente a uma célula tumoral; ou veículos poliméricos.

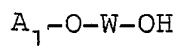
8.- Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de se utilizar um veículo escolhido entre anticorpos anti-células T, anticorpos anti-CD5, anticorpos de receptores anti-transferrina e anticorpos anti-melanoma, anticorpos de marcadores anti-carcinoma, anticorpos anti-carcinoma ovárico, anticorpos anti-carcinoma da mama e anticorpos anti-carcinoma da bexiga.

9.- Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de se utilizar como veículo um factor de crescimento.

...

10.- Processo para a preparação de composições farmacêuticas utilizadas no tratamento de tumores malignos, caracterizado pelo facto de se misturar, como princípio activo, um conjugado de uma antraciclina e de um veículo como, por exemplo, anticorpos mono- ou policlonais ou proteínas ou péptidos naturais ou de síntese, preparado pelo processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 9, com um diluente aceitável em farmácia.

11.- Processo para a preparação de compostos iniciais de fórmula geral



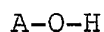
4

na qual

A_1-O- e W têm os significados definidos na reivindicação 1;

caracterizado pelo facto

(a) de se condensar uma antraciclina eventualmente protegida de fórmula geral

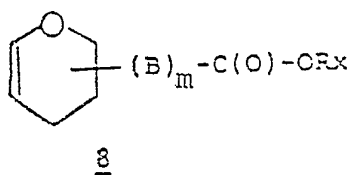


na qual

A-O- tem os significados definidos na reivindicação 1;

com a condição do grupo amino do radical açu-

car da antraciclina de fórmula geral A-O-H se encontrar livre ou protegido;
com um derivado di-hidropirano-carboxílico de fórmula geral

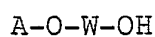


na qual

B e m têm os significados definidos na reivindicação 1; e

Rx representa um grupo protector;

(b) de se remover do composto intermédio resultante cada um dos grupos protectores para se obter um composto de fórmula geral



4'

na qual

A-O- e W têm os significados definidos na reivindicação 1;

com a condição do grupo amino do radical açúcar do resto da antraciclina de fórmula geral A-O- se encontrar livre; e

...

(c)

(i) de se converter o grupo amino livre do radical açúcar do resto da antraciclina de fórmula geral 4' em um derivado morfolínico; ou

(ii) de se proteger o grupo amino livre da antraciclina de fórmula geral 4'.

12.- Processo de acordo com a reivindicação 11, para a preparação de

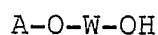
4'-epi-4'-O-(2-carboxitetra-hidropiran-6-il)-3'-desamino-3'-
-(4-morfolino)-daunorubicina;

14-O-(2-carboxitetra-hidropiran-6-il)-3'-desamino-3'-(2-meto-
xi-4-morfolino)-doxorubicina; e

14-O-(2-carboximetiloximetil-tetra-hidropiran-6-il)-3'-desami-
no-3'-(4-morfolino)-doxorubicina;

caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais
correspondentemente substituídos.

13.- Processo para a preparação de compostos inter-
médios de fórmula geral



4'

na qual

A-O- e W têm os significados definidos na rei-
vindicação 11;

caracterizado pelo facto

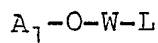
- (a) de se condensar uma antraciclina eventualmente protegida de fórmula geral A-O-H definida na reivindicação 1, com a condição do grupo amino do radical açúcar da antraciclina de fórmula geral A-O-H se encontrar livre ou protegido; com um derivado di-hidropirano-carboxílico de fórmula geral 8 definida na reivindicação 11; e
- (b) de se remover do composto intermédio resultante cada um dos grupos protectores.

14.- Processo de acordo com a reivindicação 13, para a preparação de

4'-epi-4'-O-(2-carboxitetra-hidropiran-6-il)-daunorubicina;
 14-O-(2-carboxitetra-hidropiran-6-il)-doxorubicina; e
 14-O-(2-carboximetiloximetil-tetra-hidropiran-6-il)-doxorubicina;

caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

15.- Processo para a preparação de compostos intermédios de fórmula geral



na qual

A_1 -O-, W e L têm os significados definidos na reivindicação 1;

caracterizado pelo facto de se converter um derivado de fórmula geral 4 definida na reivindicação 11 no correspondente derivado pretendido de fórmula geral 5.

16.- Processo de acordo com a reivindicação 15, para a preparação de

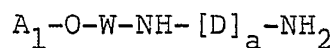
4'-epi-4'-O-(2-succinimidocarbonil-tetra-hidropiran-6-il)-3'-desamino-3'-(4-morfolino)-daunorubicina;

14-O-(2-succinimidocarbonil-tetra-hidropiran-6-il)-3'-desamino-3'-(2-metoxi-4-morfolino)-doxorubicina; e

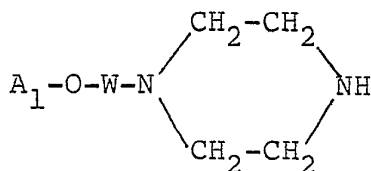
14-O-(2-succinimidocarbonil-metiloximetil-tetra-hidropiran-6-il)-3'-desamino-3'-(4-morfolino)-doxorubicina;

caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

17.- Processo para a preparação de compostos intermédios de fórmula geral



6



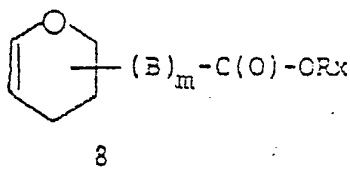
7

em que

A_1 -O-, W, d e [D] têm os significados definidos na reivindicação 1;

caracterizado pelo facto de se fazer reagir um composto de fórmula geral 5 definida na reivindicação 10 com um derivado de fórmula geral $NH_2[D]NH_2$ ou 1,4-piperazina e de se desproteger, eventualmente, o derivado resultante de fórmula geral 6 ou 7.

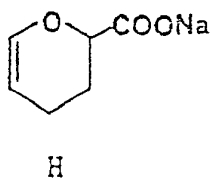
18.- Processo para a preparação de compostos intermédios de fórmula geral



na qual

B, m e Rx têm os significados definidos na reivindicação 11;

caracterizado pelo facto de se fazer reagir, por exemplo, um composto de fórmula



com iodeto de etilo no seio de um dissolvente polar anidro.

19.- Processo de acordo com a reivindicação 18, para a preparação de

2-etoxicarbonil-3,4-di-hidro-2H-pirano;

2-(3,4-di-hidro-2H-piran-2-il)-metiloxiacetato de etilo;

2-(3,4-di-hidro-2H-piran-2-il)-metiloxiacetato de metilo;

2-(3,4-di-hidro-2H-piran-2-il)-metiltioacetato de etilo; e

2-(3,4-di-hidro-2H-piran-2-il)-metilaminoacetato de etilo;

caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais

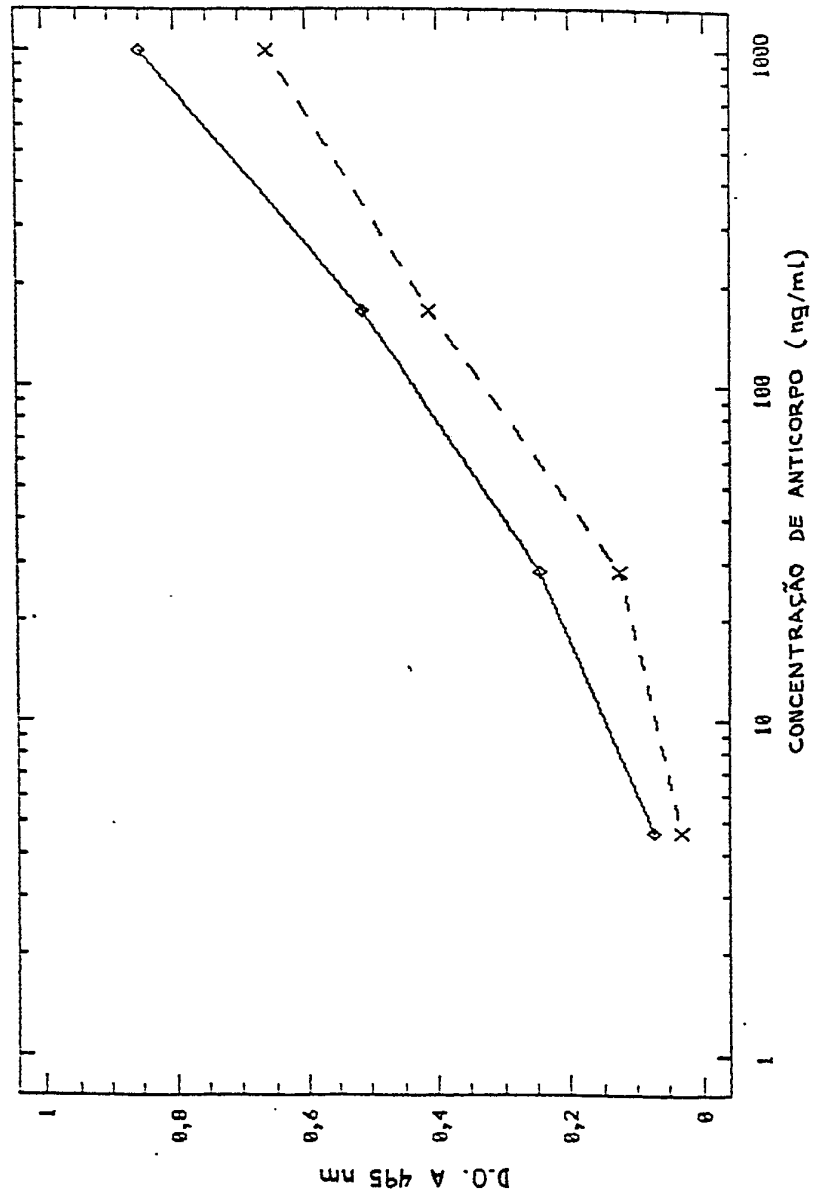
correspondentemente substituídos.

O Agente Oficial da Propriedade Industrial



FIGURA 1

LIGAÇÃO DE CÉLULAS POR ELISA DE UM IMUNOCONJUGADO ANTI-RECEPTOR DA TRANSFERRINA



—◇— ANTICORPO OKT9 ANTI-RECEPTOR HUMANO DA TRANSFERRINA

✓

FIGURA 2
CITOTOXICIDADE SELETIVA DE UM IMUNOCONJUGADO
ANTI-RECEPTOR DA TRANSFERRINA

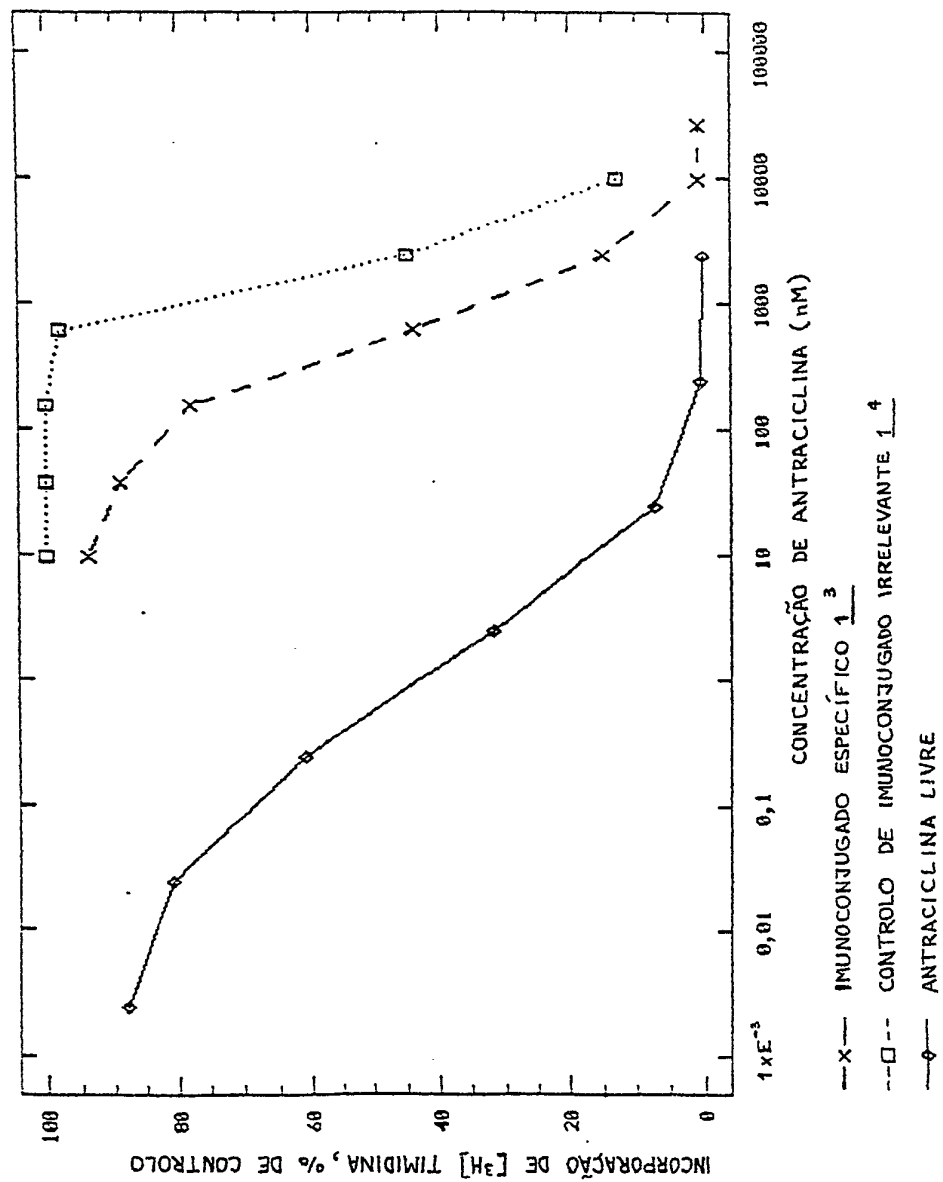
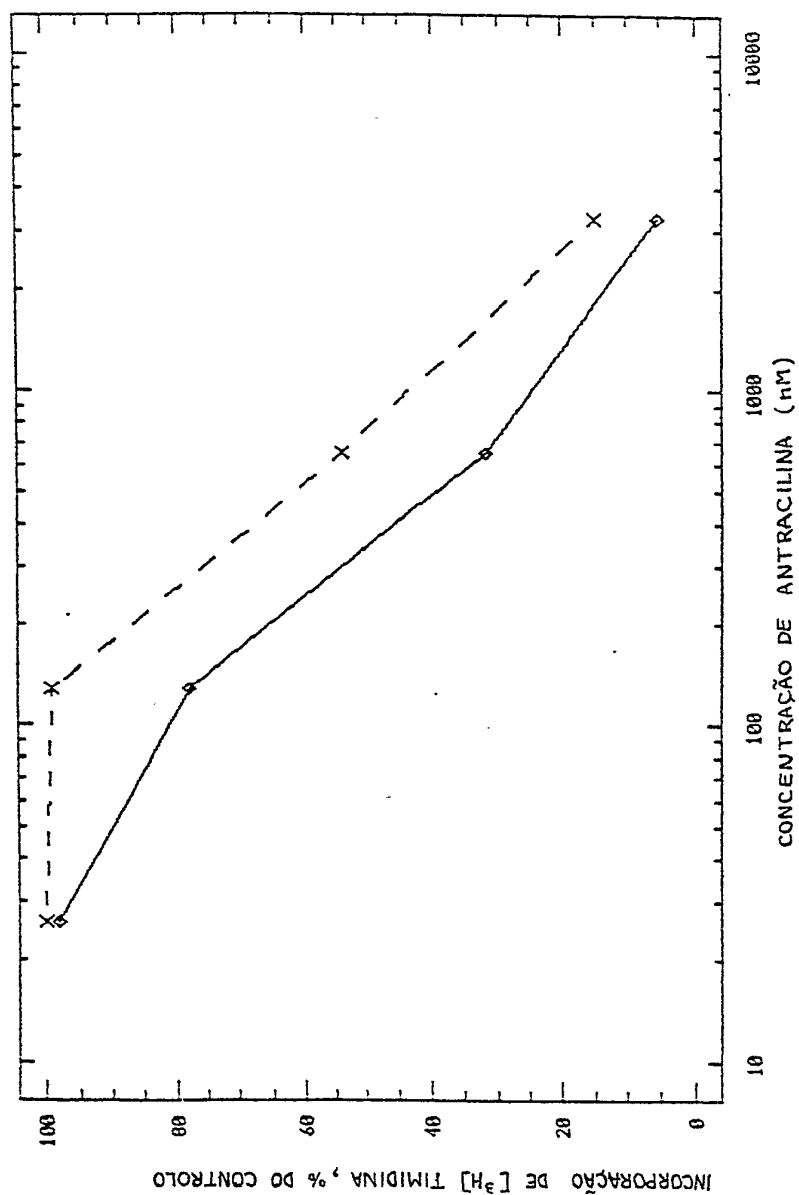


FIGURA 3
INIBIÇÃO DA CITOTOXICIDADE
PELO ANTICORPO NÃO CONJUGADO



—○— IMUNOCONGUGADO 1³
 -X- IMUNOCONGUGADO 1³ + ANTICORPO OKT⁹
 (EXCESSO MOLAR DE 1/100 DO ANTICORPO LIVRE)

0

FIGURA 4

INIBIÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE UM IMUNOCONJUGADO
ANTI-RECEPTOR DA TRANSFERRINA POR UM ANTICORPO NÃO CONJUGADO,
COMO RESPOSTA À DOSE

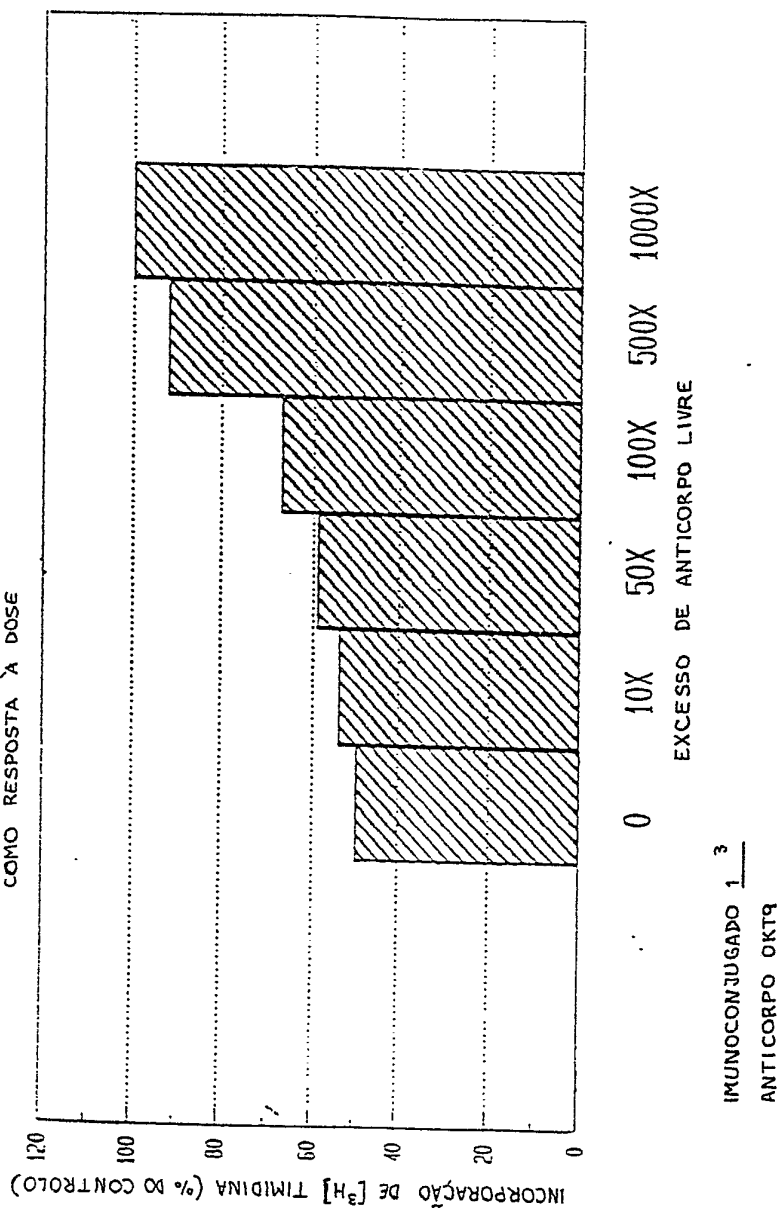


FIGURA 5
CITOTOXIDADE SELECTIVA DE UM CONJUGADO DE FGF

