



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01250**

(22) Data de depozit: **30.11.2010**

(41) Data publicării cererii:

29.06.2012

BOPI nr. **6/2012**

(71) Solicitant:

• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
TEHNOLOGII CRIOGENICE ȘI
IZOTOPICE-ICSI-RM. VÂLCEA,
STR. UZINEI NR.4, RÂMNICU VÂLCEA, VL,
RO**

(72) Inventatori:

• **TAMAIA RADU,
ALEEA TRANDAFIRILOR NR. 1, BL. B8, SC.
A, ET. 1, AP. 5, RÂMNICU VÂLCEA, VL, RO;**

• **MARCUS IOAN, STR. TĂȘNAD NR. 17,
BL. P6, SC. 1, ET.1, AP. 19, CLUJ-NAPOCA,
CJ, RO;**

• **NICULESCU VIOLETA CAROLINA,
STR. DACIA NR.10, BL. UJCM, SC. B, ET. 1,
AP. 8, RÂMNICU VÂLCEA, VL, RO;**

• **SEVASTRE BOGDAN,
STR. GRIGORE ALEXANDRESCU NR. 7,
BL. E13, SC. 1, ET. 2, AP.11,
RÂMNICU VÂLCEA, VL, RO;**

• **PRODAN IULIA LUCIANA,
ALEEA CONSTRUCTORILOR NR. 2, BL. 9,
SC. B, AP. 2 AP. 9, CUGIR, AB, RO**

(54) IMUNOCONJUGAȚI CU ÎNCĂRCĂTURĂ CITOTOXICĂ NAFTALENDIONICĂ ANTIPROLIFERATIVĂ

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un agent citotoxic, derivat naftalendionic 2,3-disubstituit, tiolat: N-(1, 4-dioxo-3-sulfanil-1, 4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidă, cu structură tridimensională, și la două tipuri de imunoconjugăți, realizați prin fuzionarea covalentă încrucișată a AMC/Fab cu derivatul naftalendionic, prin intermediul unui element de cuplare de tipul esterilor N-hidroxisuccinimidici și maleimidici, care cuplează grupările amine ale AMC/Fab cu gruparea tiolică a agentului citotoxic. Cei doi imunoconjugăți pot fi utilizați combinat, ca antiproliferative țintite pe o gamă largă de specii tumorale.

Revendicări: 4

Figuri: 3

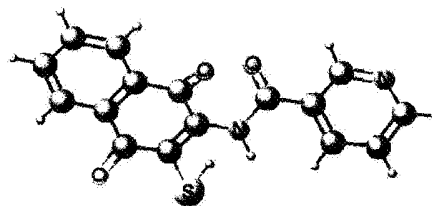
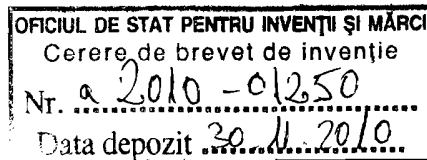


Fig. 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





IMUNOCONJUGAȚI CU ÎNCĂRCĂTURĂ CITOTOXICĂ NAFTALENDIONICĂ ANTIPROLIFERATIVĂ

Rezumatul invenției:

Prezenta invenție se referă la un nou derivat naftalendionic 2,3-disubstituit, tiolat, cu formula C₁₆H₁₀N₂O₃S: N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidă, la două tipuri de imunoconjugați polispecifici (cu reactivitate specifică încrucișată la *Mus musculus* și/sau *Rattus norvegicus* și *Homo sapiens*) care au ca încărcătură citotoxică N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamida, precum și la utilizarea combinată a acestor imunoconjugați ca antiproliferative țintite.

Descrierea invenției:

Prezenta invenție se referă la un nou derivat naftalendionic 2,3-disubstituit, tiolat, cu formula C₁₆H₁₀N₂O₃S: N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidă (Anexa 1 – Figura 1), la două tipuri de imunoconjugați (determinanții antigenici aleși ca ținte specifice pentru anticorpii monoclonali sau pentru fragmentele de legare la antigen provenite de la anticorpii monoclonali sunt ADN topoizomeraza II lanț α și tenascina C) polispecifici (cu reactivitate specifică încrucișată la *Mus musculus* și/sau *Rattus norvegicus* și *Homo sapiens*) care au ca încărcătură citotoxică N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamida, precum și la utilizarea combinată a acestor imunoconjugați ca antiproliferative țintite.

Imunoconjugații sunt structuri macromoleculare hibride – caracterul hidrid al acestui tip de agenți terapeutici țintiți își are originea în tehnica de obținere: cuplarea covalentă încrucișată („cross-linking”) a unui anticorp monoclonal (AMC) sau a unui fragment de legare la antigen (Fab) cu un agent (cito)toxic (Cumber et al., 1985).

Încărcătura citotoxică a imunoconjugatului (substanța activă): N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamida, se poate obține pornind de la 2,3-dicloro-1,4-dihidronaftalen-1,4-dionă printr-o succesiune de reacții utilizând ca și reactanți nicotinamidă și tiouree. Reacția se poate efectua utilizând ca și solvent etanolul absolut. Raportul molar al substratului și reactanților este de 1:1:2. Lanțul de reacții conduce la un intermediar tiouronic prin crearea unui mediu bazic, care, în continuare, se transformă în produsul final (N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamida) prin schimbarea pH-ului mediului de reacție.

Determinanții antigenici (epitopii) pentru AMC / Fab (partea proteică, specifică, a imunoconjugatului) sunt constituiți de ADN topoizomeraza II lanț α (ADN topo2 α) și tenascina C (TN-C). O imagine de ansamblu asupra exprimării profilelor fenotipice ale genei TOP2A, în diferite tipuri celulare, determinată prin tehnici de imunohistochimie sunt prezentate în Anexa 2 – Figura 2 (ProteinAtlas.org: „TOP2A expression profiles”), cu precizarea că pentru localizarea antigenelor s-au folosit doi anticorpi anti-ADN topo2 α (CAB002448 și HPA006458). O reprezentare schematică generală asupra exprimării profilelor fenotipice ale genei TNC, în diferite tipuri celulare, determinată prin tehnici de imunohistochimie este redată în Anexa 3 – Figura 3 (ProteinAtlas.org: „TNC expression profiles”), cu precizarea că pentru localizarea antigenelor s-au folosit doi anticorpi anti-TN-C (CAB004592 și HPA004823).

Anticorpii monoclonali (AMC), respectiv **fragmentele de legare la antigen** (Fab) reprezintă componenta specifică a imunoconjugatelor responsabilă de recunoașterea determinanților antigenici (ADN topo2 α , respectiv TN-C). Astfel de AMC cu reactivitate specifică încrucișată sunt: NB110-57623 AMC anti-ADN topo2 α (Novusbio.com: „Topo II Alpha Antibody (NB110-57623) / Topo II Alpha Antibody (EP1102Y)), respectiv NB110-68136 AMC anti-TN-C (Novusbio.com: „Tenascin C Antibody (NB110-68136)

1000

with Guy

after



Louise

Stella

Long

Curtis

[Signature]

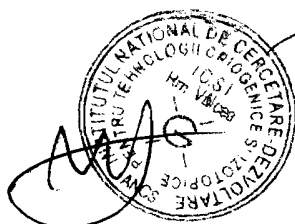
Revendicări:

1. Se revendică **agentul citotoxic**: N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamida.

2. Se revendică **modelul de imunoconjugat cu specificitate încrucișată care recunoaște specific ADN topo2 α** și are ca încărcătură citotoxică N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamida.

3. Se revendică **modelul de imunoconjugat cu specificitate încrucișată care recunoaște specific TN-C** și are ca încărcătură citotoxică N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamida.

4. Se revendică **modelul de administrare combinată a celor două tipuri de imunoconjugăți de la revendicările 2 și 3**, care conduce la concentrarea N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidei atât la interiorul celulei (prin țintirea specifică a ADN topo2 α de către AMC / Fab corespunzător), cât și în matricea din proximitatea celulei tumorale (prin țintirea specifică a TN-C de către AMC / Fab corespunzător).



1000

Stela

Andrei

Anexa 1: N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamida

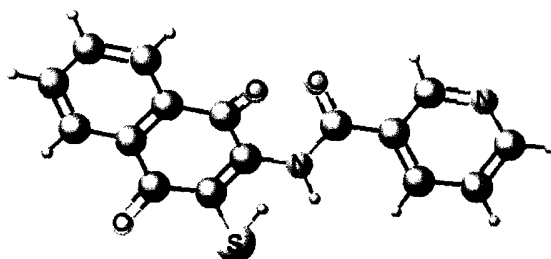
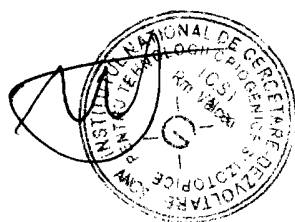


Figura 1. Structura tridimensională a N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidei

Ionel



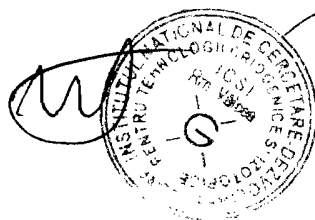
utlu

Gu
atlu

R

[illegible]

Intensitate	Cantitate	Culoare (%os)
Puternic	>75%	●
Puternic	25-75%	●
Puternic	<25%	●
Puternic	rar	●
Moderat	>75%	●
Moderat	25-75%	●
Moderat	<25%	●
Moderat	rar	●
Slab	>75%	○
Slab	25-75%	○
Slab	<25%	○
Slab	rar	○
Negativ	>75%	○
Negativ	25-75%	○
Negativ	<25%	○
Negativ	rar	○



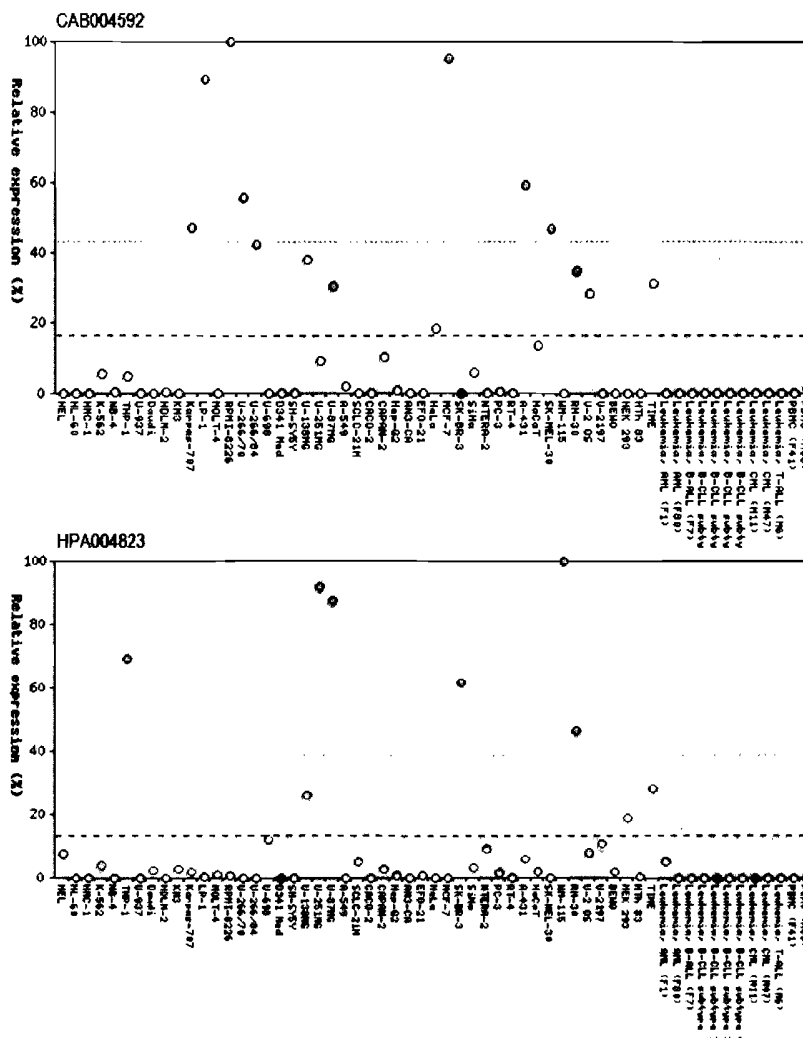
7000

Atten

Am

[Handwritten signature]

Anexa 3: Figura 3 – Diagrama exprimării profilelor fenotipice ale genei TNC – adaptare după ProteinAtlas.org („TNC expression profiles”)



Intensitate	Cantitate	culoare (% cor)
Puternic	>75%	●
Puternic	25-75%	●
Puternic	<25%	●
Puternic	rari	●
Moderat	>75%	●
Moderat	25-75%	●
Moderat	<25%	●
Moderat	rari	●
Siab	>75%	○
Siab	25-75%	○
Siab	<25%	○
Siab	rari	○
Negativ	>75%	○
Negativ	25-75%	○
Negativ	<25%	○
Negativ	rari	○

[Handwritten signatures and stamps]

INSTITUTUL NATIONAL DE GERENCIARE DEZVOLTARE
PENTRU TEHNOLOGII SI INOVATII
BUCURESTI