



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

(22) Data de depozit: **30/11/2010**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/08/2019** BOPI nr. **8/2019**

(41) Data publicării cererii:
29/06/2012 BOPI nr. **6/2012**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
TEHNOLOGII CRIOGENICE ȘI IZOTOPICE
- ICSI RÂMNICU VÂLCEA, STR.UZINEI
NR.4, OP RÂURENI, CP.7, RÂMNICU
VÂLCEA, VL, RO**

(72) Inventatori:
• **TAMAIAN RADU, STR.CALEA LUI TRAIAN
NR.60, BL.S31, SC.A, ET.2, AP.7,
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. POET GRIGORE ALEXANDRESCU
NR. 7, BL. E13, SC. 1, ET. 2, AP.11,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **POPESCU IULIA LUCIANA,
COMUNA BERISLĂVEȘTI NR.259,
SAT RÂDĂCINEȘTI, VL, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**US 7601354 B2; B. S. DWARAKANATH,
DIVYA KHAITAN, ROHIT MATHUR,
"INHIBITORS OF TOPOISOMERASES AS
ANTICANCER DRUGS: PROBLEMS AND
PROSPECTS", INDIAN JOURNAL OF
EXPERIMENTAL BIOLOGY, VOL. 42,
PP. 649-659, 2004**

(54) **IMUNOCONJUGAȚI CU ÎNCĂRCĂTURĂ CITOTOXICĂ
NAFTALENDIONICĂ ANTIPROLIFERATIVĂ**

Examinator: **biochimist EREMIA LAURA**



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

1 Prezenta invenție se referă la imunoconjugăți cu încărcătură citotoxică naftalen-
dionică antiproliferativă, și la două tipuri de imunoconjugăți terapeutici utilizați ca
3 antiproliferative țintite.

Imunochimia a fost introdusă, ca termen, în anul 1904, de către Svante August
5 Arrhenius, care a ținut la Universitatea din California (University of California) o serie de
prelegeri axate pe aplicarea metodelor fizico-chimice la studiul toxinelor și antitoxinelor (în
7 fapt anticorpi capabili să neutralizeze, în mod specific, anumite toxine); aceste prelegeri au
constituit, ulterior, subiectul primei cărți de imunochimie (Arrhenius, 1907). Numeroase dintre
9 principiile fundamentale ale imunologiei moderne, inclusiv cele ale imunoconjugăților
(Gensini et al., 2007; Silverstein 2002), au la bază conceptul „glonțului magic” al lui Paul
11 Ehrlich (1897; 1900; 1956). Imunoconjugății sunt anticorpi sau fragmente Fab (fragmentul
de anticorp care conține situsul de legare al antigenului) conjugați cu o altă structură
13 moleculară; cele două componente sunt separate printr-un spațiator molecular. În funcție de
utilizare, imunoconjugății sunt de uz terapeutic sau pentru diagnoză. Componenta specifică
15 a imunoconjugatului (indiferent dacă este de uz terapeutic sau este folosit pentru diagnoză)
are rol de țintire specifică, și este un anticorp tipic (de obicei un anticorp monoclonal) sau un
17 fragment Fab, dar poate să fie la fel de bine o citochină, un factor de creștere sau o peptidă
care poate lega un ligand. La imunoconjugății terapeutici o componentă activă (agentul
19 farmacoactiv/citotoxic) este de origine biologică sau chimică, și are funcția de a induce
moartea celulară (Kratz et al., 2007; Roukos, 2009; Senter, 2009). Imunoconjugății sunt
21 structuri macromoleculare hibride - caracterul hibrid al acestui tip de agenți terapeutici țintiți
își are originea în tehnica de obținere: cuplarea covalentă încrucișată („cross-linking”) a unui
23 anticorp monoclonal (AMC) sau a unui fragment de legare la antigen (Fab) cu un agent
farmacoactiv/citotoxic (Cumber et al., 1985).

25 Un aspect deosebit de important în procesul dezvoltării de noi medicamente este
constituit de metoda de livrare în organism a agenților farmacologic activi la locul unde sunt
27 necesari (incluzând aici tehnologia de eliberare, țintirea specifică și transportul membranal
controlat), pentru a obține cu succes și în condiții mai sigure efectul terapeutic dorit. În acest
29 sens se propune utilizarea a două tipuri de imunoconjugăți terapeutici folosiți pentru țintirea
specifică a tumorilor. Astfel de soluții de livrare asigură nu numai transportul și eliberarea
31 controlată, ci protejează substanța activă (agentul farmacoactiv/citotoxic) împotriva
degradării premature. În plus, acest tip de imunoconjugăți terapeutici se prefigurează ca o
33 posibilă alternativă, mai puțin toxică (datorită în principal țintirii specifice), la soluțiile
terapeutice bazate pe naftalendione, care produc grave efecte secundare (Asche, 2005).

35 Brevetul **US 7601354 B2** prezintă faptul că administrarea a cel puțin un
imunoconjugat și cel puțin un agent chimioterapeutic oferă un tratament neașteptat de
37 superior pentru cancer, invenția referindu-se la compoziții care cuprind cel puțin un
imunoconjugat și cel puțin un agent chimioterapeutic, și la metode de tratare a cancerului
39 utilizând cel puțin un imunoconjugat și cel puțin un agent chimioterapeutic. Prezenta invenție
furnizează, de asemenea, metode de modulare a creșterii populațiilor de celule selectate,
41 cum ar fi celulele canceroase, prin administrarea unei cantități eficiente terapeutic, din cel
puțin un agent chimioterapeutic și cel puțin un imunoconjugat.

43 **Dwarakanath BS1, Khaitan D, Mathur R., în articolul “Inhibitors of
topoisomerases as anticancer drugs: problems and prospects”, Indian Journal of
45 Experimental Biology, vol. 42, iulie, 2004, pp. 649-659**, prezintă faptul că topoizomerazele
ADN, ce rezolvă problemele topologice asociate cu diferite tranzații ADN, sunt țintele multor
47 agenți terapeutici. Diferiți inhibitori de topoizomerază, în special topo-otrăvitori, camptotecină
(topo-I) și etopozid (topo-II), sunt unele dintre medicamentele utilizate în protocoalele de

RO 127496 B1

tratament actuale, în special pentru tratamentul leucemiei (AML, ALL etc.). Cu toate acestea, rezistența tumorală, citotoxicitatea țesutului normal și nespecific sunt limitările pentru dezvoltarea cu succes a acestor medicamente ca unul dintre agenții terapeutici primari pentru tratamentul tumorilor *in vitro*. Această revizuire scurtă prezintă înțelegerea actuală privind dezvoltarea citotoxicității, și conturează diferite abordări pentru depășirea limitărilor pentru sporirea eficacității medicamentelor anticanceroase pe bază de otrăvire topo-otrăvitoare.

Prezenta invenție se referă la un nou derivat naftalendionic 2,3-disubstituit, tiolat, și la două tipuri de imunoconjugăți terapeutici utilizați ca antiproliferative țintite.

Agentul citotoxic conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că este un derivat naftalendionic 2,3-disubstituit ce are formula $C_{16}H_{10}N_2O_3S$: N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidă (anexa 1 - fig. 1).

Imunoconjugatul cu specificitate încrucișată, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că este constituit dintr-un anticorp sau fragment de anticorp ce recunoaște specific ADN topo2 α ales dintre Im/LC-ADN topo2 α și Im/SP-ADN topo2 α și agentul citotoxic cu formula N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidă, definit în revendicarea 1.

Imunoconjugatul cu specificitate încrucișată, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că este constituit dintr-un anticorp sau fragment de anticorp ce recunoaște specific TN-C, respectiv, Im/PEG24-TN-C și agentul citotoxic cu formula N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidă, definit în revendicarea 1.

Imunoconjugății terapeutici (determinanții antigenici aleși ca ținte specifice pentru anticorpilor monoclonali sau pentru fragmentele de legare la antigen, provenite de la anticorpilor monoclonali, sunt ADN topoizomeraza II lanț α - ADN topo2 α și tenascina C - TN-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 imunoconjugăți ca antiproliferative țintite.

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 3-piridin-carboxamidă 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-carboxamidă) prin schimbarea pH-ului mediului de reacție.

Exemplu de realizare încărcătură citotoxică, respectiv, sinteza N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidei: se amestecă 2,3-dicloro-1,4-dihidronaftalen-1,4-dionă (0,048 mol) cu 3-piridin-carboxamidă (0,049 mol) în alcool etilic absolut (100 mL), amestecul fiind refluxat la 120°C, timp de 3,5 h. Amestecul de reacție este apoi răcit și, după filtrare, se obține intermediarul 2-cloro-3-nicotinamido-1,4-naftochinonă. Acest compus (0,022 mol) se amestecă cu tiouree (0,044 mol), și se refluxează amestecul în alcool etilic absolut (80 mL) la 120°C, timp de 1,5 h. După acest interval de timp, volumul amestecului de reacție este adus la jumătate prin distilare sub vid, și apoi se adaugă 100 mL apă ultrapură și 10 g (0,4 mol) NaOH, continuând refluxarea încă 2 h. Produsul este apoi filtrat, spălat cu apă ultrapură și uscat. Purificarea produsului final se realizează prin dizolvări succesive în soluție 1N NaOH, și reprecipitări în soluție 1N acid acetic.

RO 127496 B1

Pentru a obține informații referitoare la natura legăturilor chimice și tipul atomilor implicați în construcția moleculei, s-a efectuat analiza elementală (tabelul 1) și s-a înregistrat spectrul IR al compusului sintetizat, care prezintă un număr de 8 maxime de absorbție (tabelul 2).

Tabelul 1

Analiza elementală pentru N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidă

M _{calc} (Da)	mp (°C)	tPSA	clogP	Aspect	Randament (%)		
						Element	Calc./Exp %
310,33	143	75,6	1,8854	roșu-cărămiziu	95	C	61,93/61,95
						H	3,25/3,23
						N	9,03/9,05
						O	15,47/15,45
						S	10,33/10,33

M_{calc} = greutatea moleculară (calculată)

mp = punctul de topire (calculat)

tPSA = suprafața moleculară polară (calculată)

clogP = coeficientul de partiție octanol/apă (calculat)

Tabelul 2

Frecvențe vibrație în IR pentru N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidă sintetizată

Compus Frecvența vibrație	vS-H	vC=O	vC-N	vC-C	vC-H	vC-H	vH	vC-S
	Derivat naftalendionic	3680 s	1550 i	1160 m	1140 s	1080 m	860 s	720 s

m - mediu, s = slab, i = intens

Suplimentar, s-a determinat spectrul ¹H RMN al N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidei (fig. 2). Se remarcă apariția semnalului corespunzător dimetilsulfoxidului deuterat (DMSO-d₆) la 2,51 ppm, iar cel al apei la 3,35 ppm. De asemenea, se observă apariția semnalului corespunzător grupării -NH la δ = 8,95 ppm, iar cel corespunzător grupării -SH la δ = 7,23 ppm. Toți ceilalți protoni caracteristici ciclului benzenic, respectiv, piridinic dau naștere la o structură de multipleți foarte complicată, centrată în zona 7,3...8,6 ppm. În tabelul 3 se prezintă deplasările chimice δ și constantele de cuplaj J, calculate "ab initio" considerând drept solvent D₂O.

Tabelul 3

Deplasări chimice calculate "ab initio" pentru N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidă

Proton	δ (ppm)	J (Hz)	Structura
1	7,630	7,7; 4,8; 1,3	ddd
2	7,774	7,9; 7,7 1,3	ddd
3	7,768	7,9; 7,7; 1,3	ddd

Tabelul 3 (continuare)

Proton	δ (ppm)	J (Hz)	Structura
4	7,650	7,7; 4,8; 1,3	ddd
5	8,060	8,1; 1,9; 1,4	ddd
6	7,981	8,1; 4,8; 4,5	ddd
7	8,65	4,8; 1,9; 1,8	ddd
8	9,04	4,5; 1,9; 1,4	ddd

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 fig. 3 (ProteinAtlas.org: „TOP2A expression profiles”), cu precizarea că pentru localizarea antigenelor s-au folosit doi AMC 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 fig. 4 (ProteinAtlas.org: „TNC expression profiles”), cu precizarea că pentru localizarea antigenelor s-au folosit doi AMC 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)/Tenascin C Antibody (4C8MS)). NB110-57623 aparține seriei clonale EP1102Y (organismul gazdă este iepurele) și are reactivitate încrucișată la speciile: *Mus musculus* (M+) și *Homo sapiens* (H+). NB110-68136 aparține seriei clonale 4C8MS (organismul gazdă este șoarecele) și are reactivitate încrucișată la speciile: *Mus musculus* (M+), *Rattus norvegicus* (R+) și *Homo sapiens* (H+).

Imunoconjugății sunt realizați prin fuzionarea covalentă încrucișată și reversibilă a AMC/Fab cu N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamida, prin intermediul unui element de cuplare („cross-linker”). Elementul de cuplare (tabelul 4) poate fi de tipul esterilor N-hidroxisuccinimidici (esteri NHS) sau de tipul spațiatorilor PEG-ilați de tip maleimidic, abreviat SM(PEG)_n. Esterii NHS realizează cuplarea grupărilor aminice (-NH₂) și sulfhidrililor (-SH) prin legături disulfurice. Reactivii SM(PEG)_n sunt lianți heterobifuncționali care au ca grupări reactive N-hidroxisuccinimidic și o grupare maleimidică, ce permit conjugarea covalentă a moleculelor care au grupări funcționale amino și sulfhidril - acești lianți au ca spațiator molecular polietilenglicolul (PEG), compus care poate îmbunătăți unele aspecte ADMET (absorbția, distribuția, metabolismul, excreția și toxicitatea). Esterii N-hidroxisuccinimidici utilizați pentru cuplare în vederea livrării intracelulare a imunoconjugatului sunt succinimidil 6-[3'-(2-piridilditio)-propionamido] hexanoatul, abreviat LC-SPDP, respectiv, acidul 3-(2-piridilditio)propionic N-hidroxisuccinimid ester, abreviat SPDP. Elementul de cuplare de tip maleimidic, care se utilizează pentru livrarea în matricea extracelulară a imunoconjugatului, este succinimidil-[(N-maleimido-propionamido)-tetracosaeileneglicol] esterul, abreviat SM(PEG)₂₄.

Proprietățile elementelor de legătură (prezentare succintă a proprietăților care pot influența caracteristicile imunoconjugatului)

Proprietatea (unitatea de măsură)	SPDP	LC-SPDP	SM(PEG) ₂₄
Solubilitatea în apă	Nu	Nu	Da
Solubilitatea în solvenți	DMSO, DMF	DMSO, DMF	DMSO, DMF
Permeabilitatea la nivel celular	Da	Da	Nu
Lungimea spațiatorului molecular (Å)	6,8	15,7	95,2
Greutatea moleculară (Da)	312,37	425,52	1394,55

DMSO = dimetilsulfoxid

DMF = dimetilformamidă

Mecanismul de acțiune al imunoconjugatilor cu recunoaștere specifică a ADN topo2 α : recunoașterea specifică a ADN topo2 α de către partea proteică a imunoconjugatului (AMC/Fab anti-ADN topo2 α) determină clivarea „siturilor covalente” dintre elementul de cuplare și AMC/Fab, pe de o parte, respectiv, dintre elementul de cuplare și agentul citotoxic, pe de altă parte. Are loc astfel eliberarea încărcăturii citotoxice chiar în proximitatea țintei sale moleculare - acest mod de „livrare” a încărcăturii citotoxice presupune pătrunderea imunoconjugatului în celulă.

În continuare sunt prezentate 3 exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1 de realizare imunoconjugat cu recunoaștere specifică a ADN topo2 α : se face prin cuplarea AMC anti-ADN top2 α (NB110-57623, purificat) cu derivatul naftalendionic, respectiv, N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidă prin intermediul SPDP, cu obținerea unui imunoconjugat având ca determinat antigenic ADN topoizomeraza II lanț α (Im/SP-ADN topo2 α) (tabelul 5).

Modalitățile de cuplare a N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidei cu anticorpii, prin intermediul elementelor de legătură din exemplele de realizare imunoconjugate

Nr. crt.	Imunoconjugat	Element de legătură	AMC	Locație epitop
				(observații)
1	Im/SP-ADN topo2 α	SPDP	anti-ADN topo2 α : NB110-57623, purificat	Intracelular (imunoconjugatul își atinge ținta intracelular)
2	Im/LC-ADN topo2 α	LC-SPDP	anti-ADN topo2 α : NB110-57623, purificat	Intracelular (imunoconjugatul își atinge ținta intracelular)
3	Im/PEG24-TN-C	SM(PEG) ₂₄	anti-TN-C: Nb110-68136 purificat	Extracelular (exportat) și intracelular (sintetizat) (imunoconjugatul își atinge ținta în matrice, nu poate pătrunde în celulă)

RO 127496 B1

Se lucrează la temperatura camerei și se prepară mai întâi o soluție de SPDP (20 mM) prin dizolvarea a 2 mg SPDP în 320 μ l dimetilsulfoxid (DMSO). Se face modificarea AMC anti-ADN top2 α purificat prin adăugarea unei soluții de 25 μ l SPDP (20 mM) la 2...5 mg AMC anti-ADN top2 α purificat, dizolvat în 1,0 ml de soluție tampon fosfat salin cu acid etilendiaminotetraacetic (PBS-EDTA: 100 mM fosfat de sodiu, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,02% azidă de sodiu - pH de 7,5), și se lasă la incubat timp de 30 min, la temperatura camerei. Se pregătește o coloană de desalinizare (de exemplu: Zeba™ Spin Desalting Columns) astfel: se îndepărtează capacul inferior al coloanei și se slăbește cel superior; se pune coloana într-un tub de centrifugare de 1,5...2,0 ml și se centrifughează la 1500 x g timp de 1 min, pentru îndepărtarea soluției de stocare, apoi se șterge fundul coloanei, pentru îndepărtarea excesului de lichid. Se pune coloana într-un alt tub de centrifugare de 1,5...2,0 ml, se adaugă 300 μ l PBS-EDTA și se centrifughează la 1500 x g timp de 1 min, pentru îndepărtarea PBS-EDTA - se repetă de trei ori aruncând PBS-EDTA din tubul de centrifugare. Se pune coloana într-un nou tub de centrifugare de 1,5...2,0 ml, se pune întreaga cantitate de soluție de AMC anti-ADN top2 α cu SPDP în PBS-EDTA, se adaugă 15 μ l de apă ultrapură și se centrifughează la 1500 x g timp de 2 min, pentru colectarea AMC legat de SPDP. În continuare se adaugă la soluție 1...3mg de β -galactozidază și se lasă la incubat peste noapte, la temperatura camerei, pentru finalizarea conjugării, cu obținerea Im/SP-ADN topo2 α .

Exemplul 2 de realizare imunoconjugat cu recunoaștere specifică a ADN topo2 α : se face prin cuplarea AMC anti-ADN top2 α (NB110-57623, purificat) cu derivatul naftalendionic, respectiv, N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamida prin intermediul LC-SPDP, cu obținerea unui imunoconjugat având ca determinat antigenic ADN topoizomeraza II lanț α (Im/LC-ADN topo2 α) (tabelul 5). Se lucrează la temperatura camerei și se prepară mai întâi o soluție de LC-SPDP (20 mM) prin dizolvarea a 2 mg LC-SPDP în 235 μ l dimetilformamidă (DMF). Se face modificarea AMC anti-ADN top2 α purificat, prin adăugarea unei soluții de 25 μ l LC-SPDP (20 mM) la 2...5mg AMC anti-ADN top2 α dizolvat în 1,0 ml de soluție tampon fosfat salin cu acid etilendiaminotetraacetic (PBS-EDTA: 100 mM fosfat de sodiu, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,02% azidă de sodiu - pH de 7,5), și se lasă la incubat timp de 30 min, la temperatura camerei. Se pregătește o coloană de desalinizare (de exemplu: Zeba™ Spin Desalting Columns) astfel: se îndepărtează capacul inferior al coloanei și se slăbește cel superior; se pune coloana într-un tub de centrifugare de 1,5...2,0 ml și se centrifughează la 1500 x g, timp de 1 min, pentru îndepărtarea soluției de stocare, apoi se șterge fundul coloanei, pentru îndepărtarea excesului de lichid. Se pune coloana într-un alt tub de centrifugare de 1,5...2,0 ml, se adaugă 300 μ l PBS-EDTA și se centrifughează la 1500 x g timp de 1 min, pentru îndepărtare PBS-EDTA - se repetă de trei ori, aruncând PBS-EDTA din tubul de centrifugare. Se pune coloana într-un nou tub de centrifugare de 1,5...2,0 ml, se pune întreaga cantitate de soluție de AMC anti-ADN top2 α cu LC-SPDP în PBS-EDTA, se adaugă 15 μ l de apă ultrapură și se centrifughează la 1500 x g timp de 2 min, pentru colectarea AMC legat de LC-SPDP. În continuare se adaugă la soluție 1...3 mg de β -galactozidază și se lasă la incubat peste noapte, la temperatura camerei, pentru finalizarea conjugării, cu obținerea Im/LC-ADN topo2 α .

Mecanismul de acțiune al imunoconjugatilor cu recunoaștere specifică a TN-C: recunoașterea specifică a TN-C de către partea proteică a imunoconjugatului (AMC/Fab anti-TN-C) determină clivarea „siturilor covalente” dintre elementul de cuplare și AMC/Fab, pe de o parte, respectiv, dintre elementul de cuplare și agentul citotoxic, pe de altă parte. Astfel are loc eliberarea încărcăturii citotoxice la locul interacțiunii dintre AMC și epitop: în matricea extracelulară - TN-C este rapid exportată la exteriorul celulei după sinteza sa la nivel intracelular.

RO 127496 B1

1 **Exemplul 3** de realizare imunoconjugat cu recunoaștere specifică a TN-C
(Im/PEG24-TN-C): se face prin cuplarea AMC anti-TN-C (NB110-68136, purificat) cu
3 derivatul naftalendionic, respectiv, N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-
carboxamida prin intermediul SM(PEG)₂₄, cu obținerea unui imunoconjugat având ca
5 determinat antigenic tenascina C (Im/PEG24-TN-C) (tabelul 5). Reacția de conjugare se face
după o schemă de reacție în doi pași. Mai întâi, AMC anti-TN-C purificat reacționează cu
7 SM(PEG)₂₄ adăugat în exces molar. Apoi se face îndepărtarea excesului de reactiv
(nereacționat) prin desalinizare sau microdializă. În final, este adăugat derivatul
9 naftalendionic pentru a reacționa cu grupările maleimidice atașate la AMC anti-TN-C în
primul pas al reacției. Se lucrează la temperatura camerei și se prepară mai întâi o soluție
11 stoc de SM(PEG)₂₄ (250 mM), prin dizolvarea a 100 mg SM(PEG)₂₄ în 187 μl DMSO.
Ulterior, se face modificarea AMC anti-TN-C purificat prin adăugarea a câte 4,0 μl
13 SM(PEG)₂₄ (250 mM) pentru fiecare mililitru de soluție AMC anti-TN-C purificat, dizolvat în
PBS-EDTA (de exemplu, 5 mg AMC anti-TN-C purificat, dizolvat în 1,0 ml PBS-EDTA), și se
15 lasă la incubat timp de 30 min, la temperatura camerei (alternativ se poate incuba timp de
2 h, la 4°C). Se pregătește o coloană de desalinizare (de exemplu: Zeba™ Spin Desalting
17 Columns) astfel: se îndepărtează capacul inferior al coloanei și se slăbește cel superior; se
pune coloana într-un tub de centrifugare de 1,5...2,0 ml, și se centrifughează la 1500 x g timp
19 de 1 min, pentru îndepărtarea soluției de stocare, apoi se șterge fundul coloanei, pentru
îndepărtarea excesului de lichid. Se pune coloana într-un alt tub de centrifugare de
21 1,5...2,0 ml, se adaugă 300 μl PBS-EDTA și se centrifughează la 1500 x g, timp de 1 min,
pentru îndepărtarea PBS-EDTA - se repetă de trei ori, aruncând PBS-EDTA din tubul de
23 centrifugare. Se pune coloana într-un nou tub de centrifugare de 1,5...2,0 ml, se pune
întreaga cantitate de soluție de AMC anti-TN-C cu SM(PEG)₂₄ în PBS-EDTA, se adaugă
25 15 μl de apă ultrapură și se centrifughează la 1500 x g timp de 2 min, pentru colectarea AMC
legat de SM(PEG)₂₄. Se lasă la incubat timp de 30 min, la temperatura camerei (alternativ
27 se poate incuba timp de 2 h, la 4°C, sau chiar peste noapte), pentru finalizarea conjugării,
cu obținerea Im/PEG24-TN-C.

29 Punerea în evidență a integrității N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-
il)piridin-3-carboxamidei din imunoconjugată s-a făcut prin LC-MS/MS (fig. 5), în timp ce
31 confirmarea structurii/formării imunoconjugatilor s-a făcut prin tehnici RMN (fig. 6 și fig. 7).

Prin alegerea a doi epitopi atât de diferiți, dar cu o largă răspândire, s-a dorit țintirea
33 specifică a unui repertoriu cât mai extins de specii tumorale. Mai mult, administrarea
combinată a celor două tipuri de imunoconjugată conduce la concentrarea substanței active
35 a imunoconjugatului atât la interiorul celulei (prin țintirea specifică a ADN topo2α de către
AMC/Fab corespunzător), cât și în matricea din proximitatea celulei tumorale (prin țintirea
37 specifică a TN-C de către AMC/Fab corespunzător). În plus, utilizarea de AMC/Fab cu
reactivitate specifică încrucișată face posibilă testarea de imunocojugată identici pe mai multe
39 specii de mamifere.

Evaluarea efectului antiproliferativ al Im/PEG24-TN-C s-a efectuat pe șoareci albi linia
41 NMRI, femele, cu o greutate de 30,5 ± 1 g, pe o perioadă de 10 zile. În ziua 0 toate animalele
au primit 10⁶ celule în suspensie de carcinom ascitic intraperitoneal (i.p.). Animalele au fost
43 împărțite în trei loturi: L1 (s-a administrat 0,6 mg derivat naftalendionic/animal, i.p. în ziua 5),
L2 (tratat cu 0,6 mg Im/PEG24-TN-C/animal i.p. în ziua 5) și L3 (lot martor, pentru obținerea
45 valorilor de referință). Animalele au fost cântărite la începutul și la sfârșitul experimentului,
iar pe durata întregului experiment au fost examinate clinic în fiecare zi. După sacrificarea
47 loturilor experimentale la sfârșitul experimentului, lavajul peritoneal la animalele care au
necesitat acest lucru (datorită unei cantități foarte mici de lichid ascitic tumoral) s-a făcut prin

RO 127496 B1

introducerea a 1 ml de ser fiziologic steril în cavitatea abdominală, urmată apoi de recoltarea acestuia cu ajutorul unei pipete semiautomate. La finalul experimentului, examenul clinic al loturilor de animale luate în studiu a relevat o stare generală bună, cu excepția lotului martor, în cazul căruia animalele au prezentat o serie de tulburări comportamentale, cum ar fi starea de letargie pronunțată, lipsa apetitului, somnolența. Inocularea EAC la șoareci atrage după sine creșterea masei corporale datorată dezvoltării tumorii ascitogene, după cum s-a putut observa drastic în cazul L3. În urma administrării N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidei la lotul L1, la finele experimentului s-a putut observa o ușoară creștere a masei corporale, fără relevanță statistică față de lotul martor - datorită efectului inhibitor asupra dezvoltării tumorale (fig. 8). În cazul lotului L2 s-a înregistrat o creștere ușoară a masei corporale, însă nu atât de pronunțată ca în cazul lotului martor, și nesemnificativă din punct de vedere statistic (fig. 8). Cuantificarea cantității de lichid ascitic și a celulelor tumorale viabile a arătat că cel mai mic volum de lichid ascitic tumoral a fost înregistrat la sfârșitul experimentului în cazul L1 (fig. 9). Cuantificarea numărului de celulelor tumorale viabile a indicat că cel mai scăzut număr a fost înregistrat în cazul lotului L1, urmat de lotul cu imunoconjugat (fig. 10). În cazul L1 și L2, la colorația cu albastru de tripan nu s-au remarcat celule tumorale moarte, rezultând astfel că atât derivatul naftalendionic, cât și imunoconjugatul nu numai că au efect inhibitor asupra dezvoltării tumorale, dar nici nu prezintă efecte citotoxice.	1 3 5 7 9 11 13 15 17 19
Invenția are aplicabilitate în domeniul oncologiei comparate experimentale (de exemplu: carcinoamele ascitice).	21

RO 127496 B1

Revendicări

1

3

1. Agent citotoxic, **caracterizat prin aceea că** este un derivat naftalendionic 2,3-disubstituit ce are formula N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il) piridin-3-carboxamidă.

5

7

2. Imunoconjugat cu specificitate încrucișată, **caracterizat prin aceea că** este constituit dintr-un anticorp sau fragment de anticorp ce recunoaște specific ADN topo2 α ales dintre Im/LC-ADN topo2 α și Im/SP-ADN topo2 α , și agentul citotoxic cu formula N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidă, definit în revendicarea 1.

9

11

3. Imunoconjugat cu specificitate încrucișată, **caracterizat prin aceea că** este constituit dintr-un anticorp sau fragment de anticorp ce recunoaște specific TN-C, respectiv, Im/PEG24-TN-C și agentul citotoxic cu formula N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il) piridin-3-carboxamidă, definit în revendicarea 1.

13

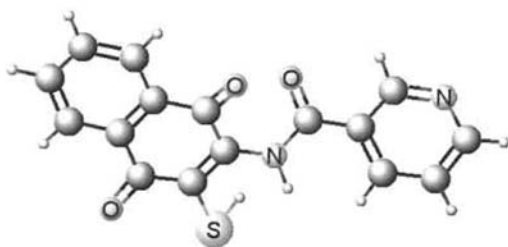


Fig. 1

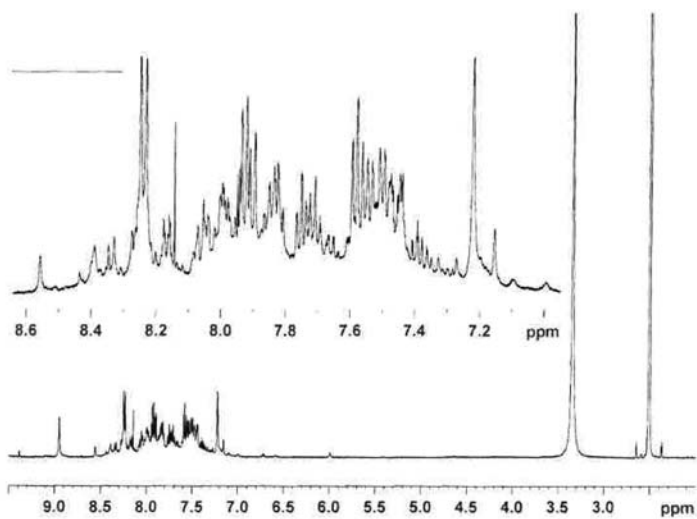
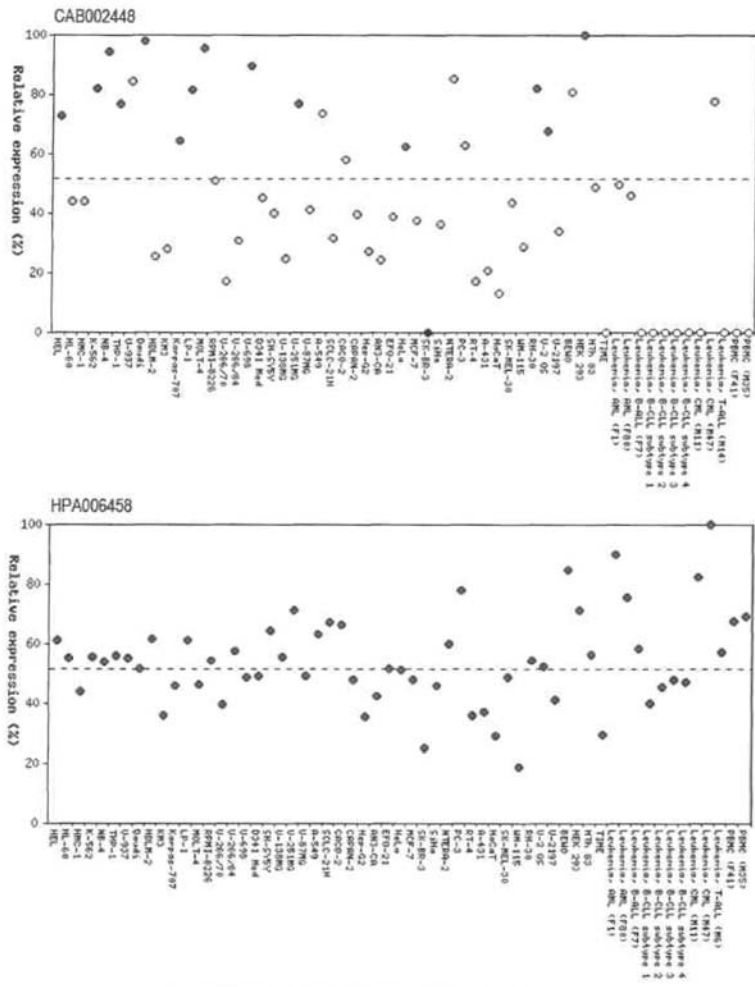


Fig. 2



Intensitate	Cantitate	Culoare (Scor)
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	○

Fig. 3

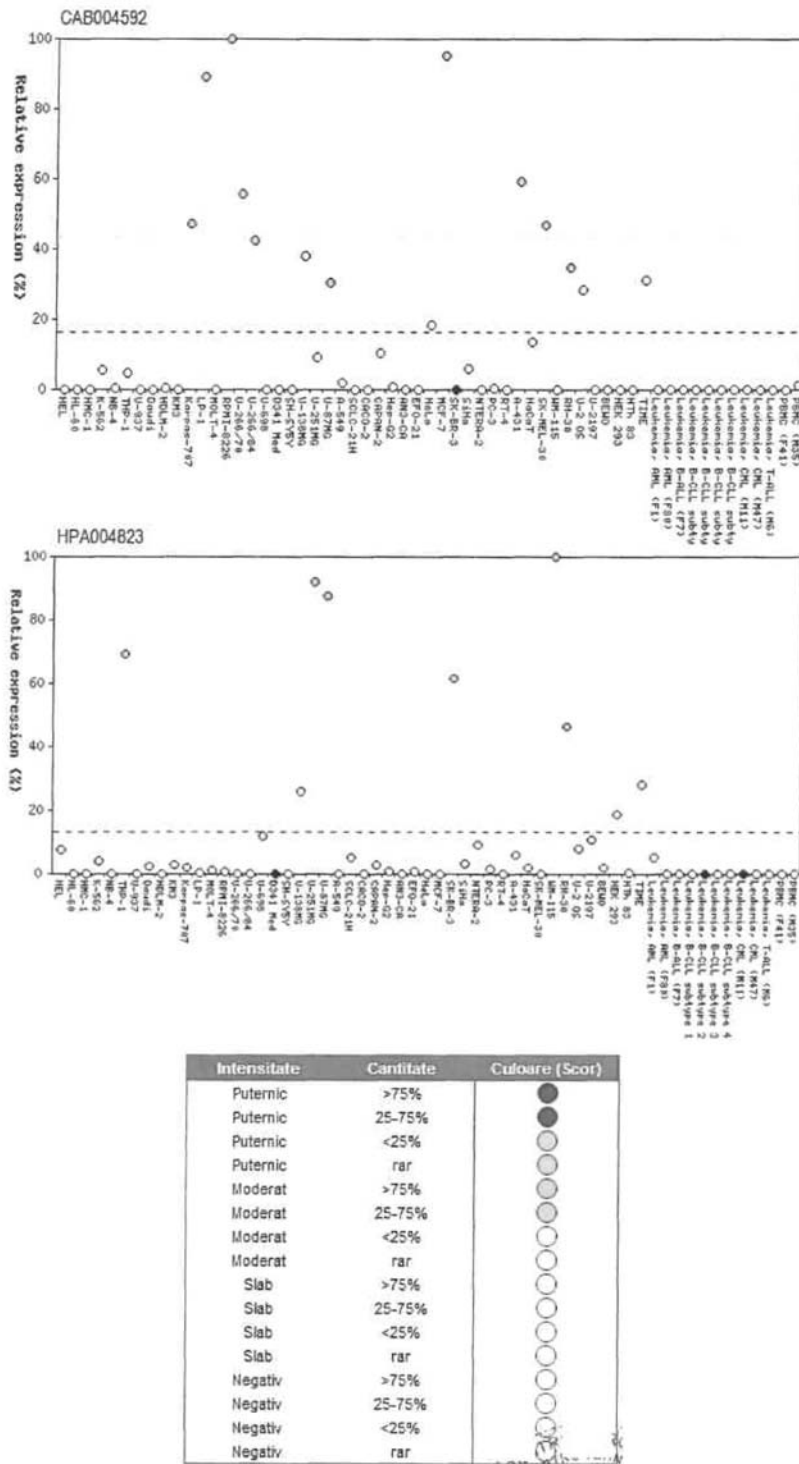


Fig. 4

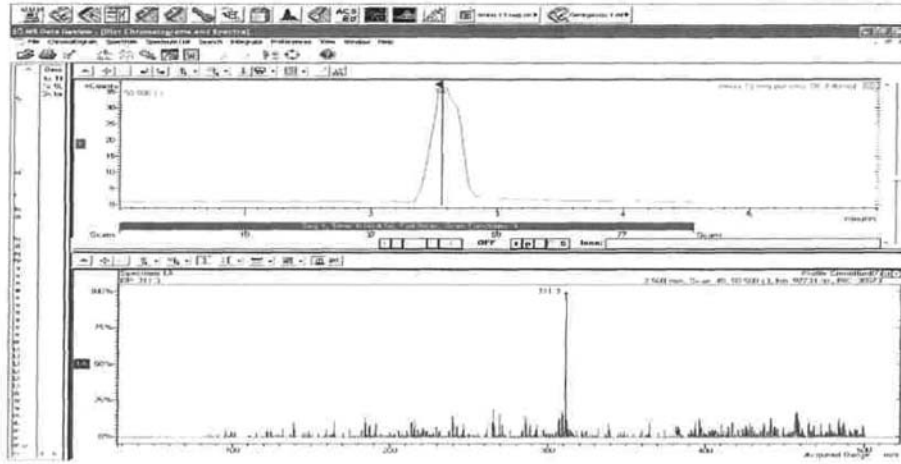


Fig. 5

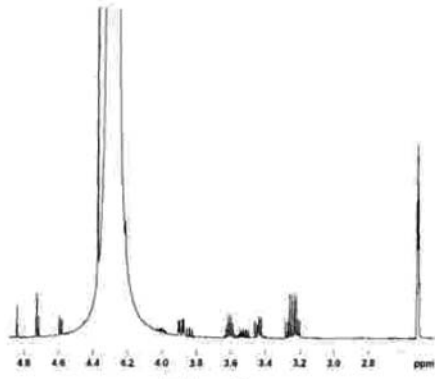


Fig. 6

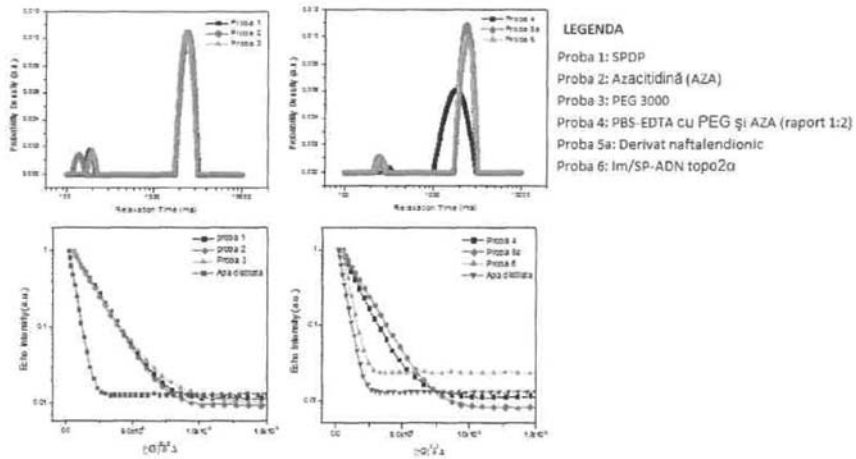


Fig. 7

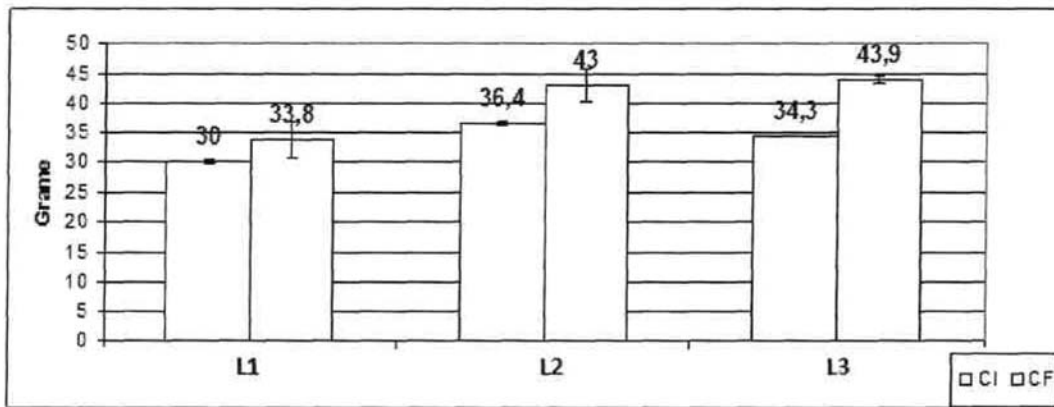


Fig. 8

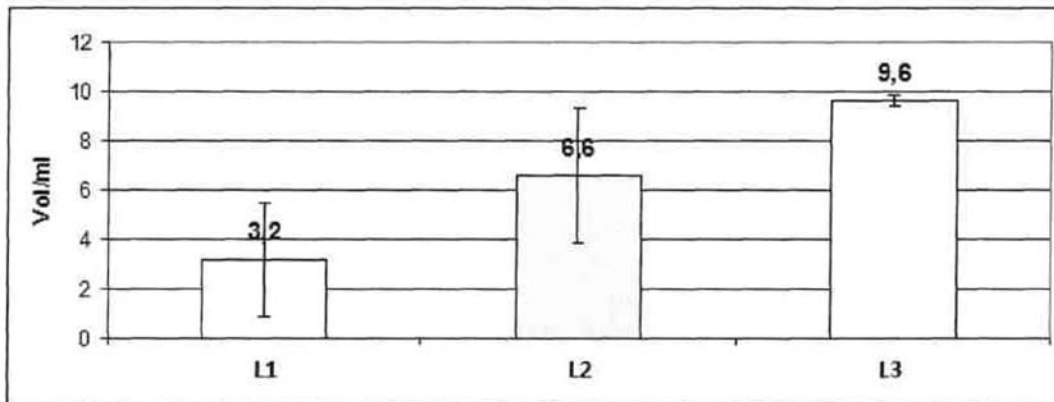


Fig. 9

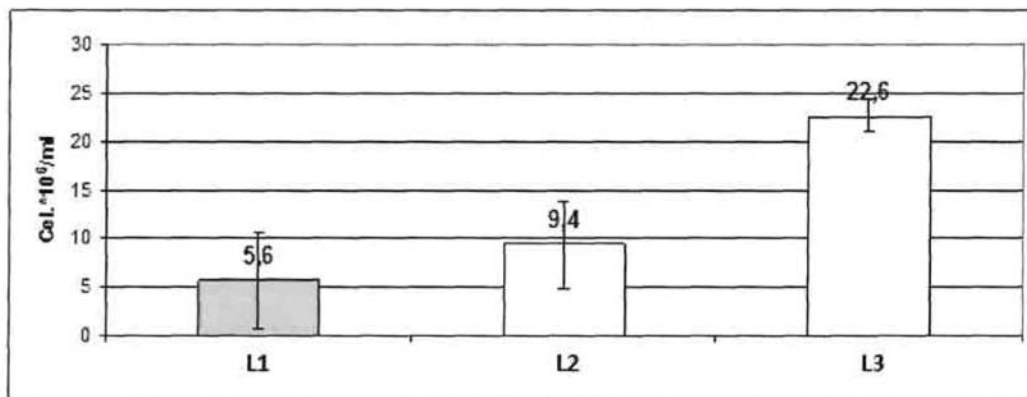


Fig. 10

