



(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-IGSI-RM. VÂLCEA,
STR. UZINEI NR.4, RÂMNICU VÂLCEA, VL,
RO**

(72) Inventatori:
• **TAMAIAN 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

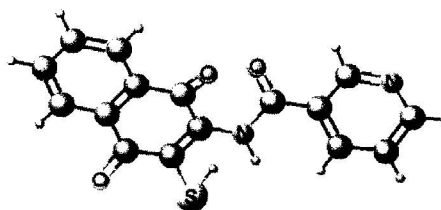
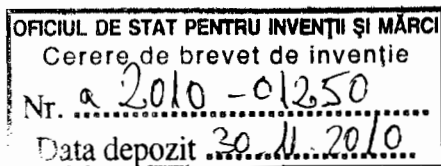


Fig. 1

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 imunoconjugăți 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.

Descrierea invenției:

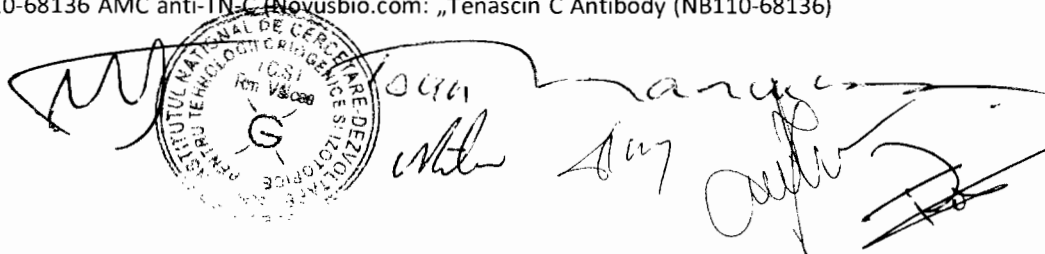
Prezenta invenție se referă la un nou derivat naftalendionic 2,3-disubstituit, tiolat, cu formula C16H10N2O3S: N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidă (Anexa 1 – Figura 1), la două tipuri de imunoconjugăți (determinanții antigenici aleși ca ținte specifice pentru anticorpii 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 imunoconjugăți ca antiproliferative țintite.

Imunoconjugății 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 imunoconjugatilor 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”) de tipul esterilor N-hidroxisuccinimidici sau maleimidelor, care cuplează grupările aminice ale AMC / Fab cu gruparea tiolică a agentului citotoxic (N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamida).

Mecanismul de acțiune al imunoconjugăților cu ADN topo2α: recunoașterea specifică a ADN topo2α de către partea proteică a imunoconjugatului (AMC / Fab anti-ADN topo2α) determină clivarea „săturilor 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.

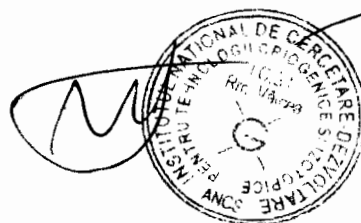
Mecanismul de acțiune al imunoconjugăților cu TN-C: recunoașterea specifică a TN-C de către partea proteică a imunoconjugatului (AMC / Fab anti-TN-C) determină clivarea „săturilor covalente” dintre elementul de cuplare și AMC / Fab, pe de o parte, respectiv dintre elementul de cuplare și agentul citotoxic,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

Prin alegerea a doi epitopi atât de diferiți, dar cu o largă răspândire, s-a dorit țintirea specifică a unui repertoriu cât mai extins de specii tumorale. Mai mult, administrarea combinată a celor două tipuri de imunoconjugăți conduce la concentrarea substanței active 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 specifică a TN-C de către AMC / Fab corespunzător). În plus, utilizarea de AMC / Fab cu reactivitate specifică încrucișată face posibilă testarea de imunocojugăți identici pe mai multe specii de mamifere.

Revendicări: 4

Anexe: 3

Figuri (în anexe): 3



Ioan

wtk

Aug

Autan

[Handwritten signature]

Referințe:

Cumber AJ, Forrester JA, Foxwell BM, Ross WC, Thorpe PE – Preparation of antibody-toxin conjugates. *Methods in Enzymology* 1985; 112:207-225.

Novusbio.com: „Tenascin C Antibody (NB110-68136) / Tenascin C Antibody (4C8MS)”, accesat ultima oară în data de 04 iulie 2010:

http://www.novusbio.com/Tenascin-C-Antibody-4C8MS_NB110-68136.html?rr=true

Novusbio.com: „Topo II Alpha Antibody (NB110-57623) / Topo II Alpha Antibody (EP1102Y)”, accesat ultima oară în data de 04 iulie 2010:

http://www.novusbio.com/Topo-II-Alpha-Antibody-EP1102Y_NB110-57623.html?rr=true

ProteinAtlas.org: „TNC expression profiles”, accesat ultima oară în data de 03 octombrie 2010:

http://www.proteinatlas.org/tissue_profile.php?antibody_id=4592&g_no=ENSG00000041982

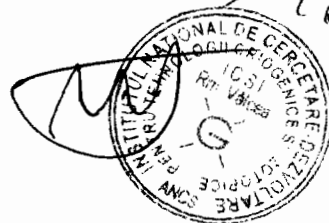
http://www.proteinatlas.org/tissue_profile.php?antibody_id=4823&g_no=ENSG00000041982

ProteinAtlas.org: „TOP2A expression profiles”, accesat ultima oară în data de 03 octombrie 2010:

http://www.proteinatlas.org/tissue_profile.php?antibody_id=2448&g_no=ENSG00000131747

http://www.proteinatlas.org/tissue_profile.php?antibody_id=6458&g_no=ENSG00000131747

Sevastre B, van Ederen AM, Terlouw M, Gruys E, Nederbragt H – Immunohistochemical expression of tenascin in melanocytic tumours of the dogs. *Journal of Comparative Pathology* 2007; 136:49-56.



Handwritten signatures and initials, including 'vth' and 'C. ...'.

Handwritten signature and initials at the bottom right of the page.

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 imunoconjuțați 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

Andreea

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

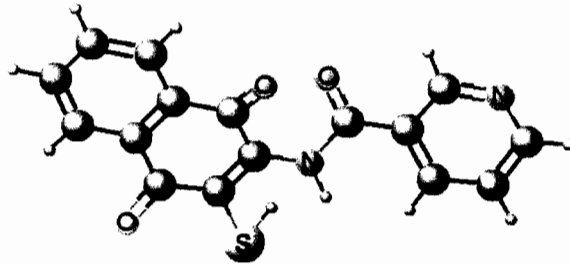
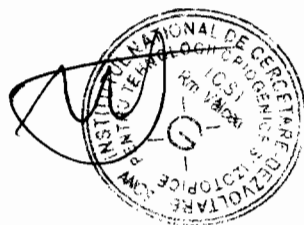


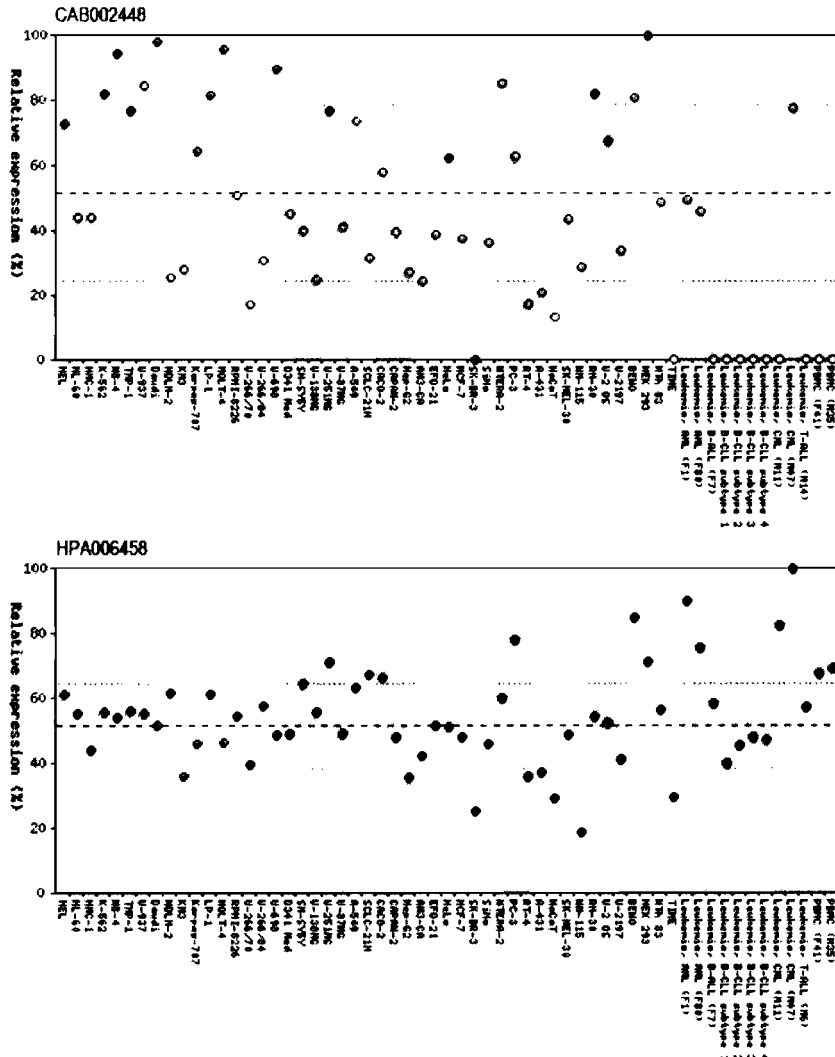
Figura 1. Structura tridimensională a N-(1,4-dioxo-3-sulfanil-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidei

Ion Armas

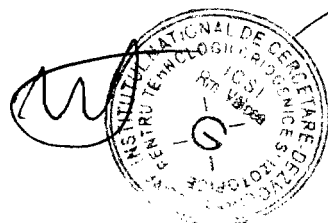


utls
Armas
[Signature]

Anexa 2: Figura 2 – Diagrama exprimării profilelor fenotipice ale genei TOP2A – adaptare după ProteinAtlas.org („TOP2A expression profiles”)

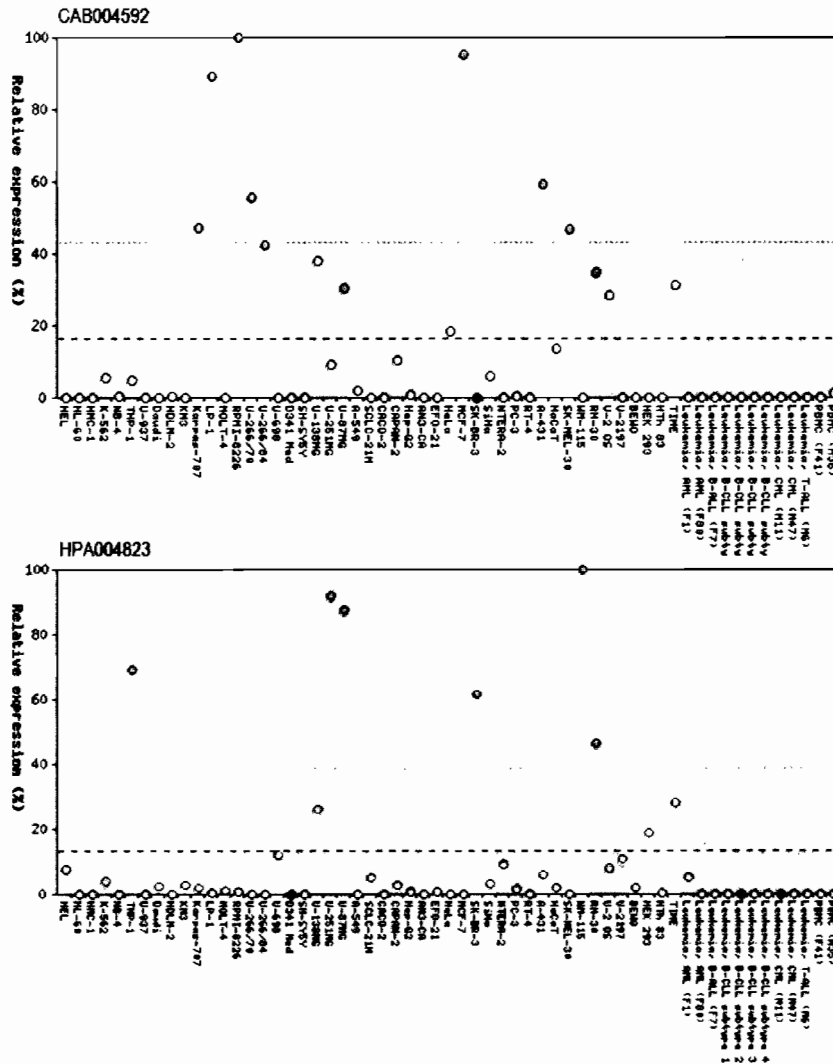


Intensitate	Cantitate	Calitate (Punct)
Puternic	>75%	●
Puternic	25-75%	●
Puternic	+25%	●
Puternic	rar	●
Moderat	>75%	○
Moderat	25-75%	○
Moderat	+25%	○
Moderat	rar	○
Slab	>75%	○
Slab	25-75%	○
Slab	+25%	○
Slab	rar	○
Negativ	>75%	○
Negativ	25-75%	○
Negativ	+25%	○
Negativ	rar	○



Ioan
 [Handwritten signatures]

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



Intensitate	Categorie	Colorare (% de celule)
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	○

