



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

85492

C (18) 1071 141 1 071 141 071
Patent 1071 141 1 071 141 071

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 07F 15/00 // A 61K 9/127

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	872646
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	15.06.87
(24) Alkupäivä - Löpdag	17.10.86
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	15.06.87
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	15.01.92
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	US86/02181
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	

18.10.85 US 788750 P

07.10.86 US 914591 P

(71) Hakija - Sökande

1. Board of Regents, the University of Texas System, 201 West 7th Street, Austin, Tex.,
USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Khokhar, Abdul R., 1800 Holcombe, Apt. No. 214, Houston, Tex., USA, (US)
2. Lopez-Berestein, Gabriel, 5630 Rutherglen, Houston, Tex., USA, (US)
3. Perez-Soler, Roman, 3023 South Braeswood, Houston, Tex., USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

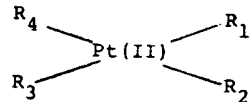
Menetelmä kasvainvastaisessa kemoterapiassa käytettävien hydrofobisten
platina(II)nelikoordinaattikompleksien valmistamiseksi
Förfarande för framställning av vid antitumör kemoterapi användbara hydrofoba
platina(II)fyrkoordinatkomplex

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 113508 (C 07F 15/00), EP A 130482 (C 07C 87/38),
Chemical Abstracts, vol. 88 (1978), 16014k: Cancer Treat. Rep., vol. 61 (1977) nro 8,
p. 1519-25,
Chemical Abstracts, vol. 101 (1984), P 177510w: BE 898614

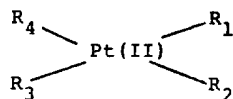
(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee platina(II)nelikoordinaat-
tikomplekseja, joilla on kaava



jossa R_1 ja R_2 ovat karboksylaattomonoanio-
neja, joissa on hydrofobinen radikaalifunk-
tio, tai merkitsevät yhdessä karboksylaat-
todianionia, jossa on hydrofobinen radikaalifunk-
tio, ja R_3 ja R_4 merkitsevät ammoniak-
kia tai primaarisia amiineja tai yhteen
liittyneinä diaminoalkaania tai diaminosyk-
loalkaania, joiden aminoryhmät ovat liitty-
neet vierekkäisiin hiiliatomeihin. Tämä
kompleksi on oleellisesti liukoinen metano-
liin tai kloroformiin ja oleellisesti liu-
kenematon veteen. Se voidaan sisällyttää
fosfolipidiliposomeihin. Tällaiset fosfoli-
pidiliposomeihin kapseloidut platinakomp-
leksit ovat käyttökelpoisia platinakomple-
seille herkkien kasvainten kemoterapiassa.

Uppfinningen avser platina(II) fyrkoordinat-komplex med formeln



vari R_1 och R_2 är karboxylatomonoanjoner, vilka bär en hydrofob radikalfunktion, eller betecknar tillsammans en karboxylatodianjon, som bär en hydrofob radikalfunktion, och R_3 och R_4 betecknar ammoniak eller primära aminer eller bundna vid varandra en diaminalkan eller diaminocykloalkan, i vilka aminogrupperna är bundna vid angränsande kolatomer. Komplexet är väsentligen lösligt i metanol eller kloroform och väsentligen olösligt i vatten. Den kan inkorporeras i fosfolipidliposomer. Dylika i fosfolipidliposomer inkapslade platinakomplex är användbara för kemoterapi av platinakomplex-känsliga tumörer.

Menetelmä kasvaimenvastaisessa kemoterapiassa käytettävien hydrofobisten platina(II)nelikoordinaattikompleksien valmistamiseksi

5 Tämä keksintö koskee menetelmää uusien hydrofobisten platinakompleksien valmistamiseksi, joilla on kasvainten vastaisia ominaisuuksia. Kuvataan myös näitä uusia komplekseja sisältävien liposomien käyttöä kasvaimia estävässä kemoterapiassa.

10 Cis-platina (CDDP) on hyvin tehokas lääke hoidettaessa useita ihmisen kasvainsairauksia [Loehrer et al., Ann. Int. Med. V 100 (1984) 704-713]. Sen käyttöä rajoittaa kuitenkin voimakas myrkyllisyys elimistölle, erityisesti myrkyllisyys munuaisille ja hermoille [Zwelling et al., Platinum Complexes, Pharmacologic principles of
15 cancer treatment (1982) ed. B.A. Chabner, Saunders, Philadelphia, PA]. CDDP:n terapeuttista indeksia on viimeksi kuluneen vuosikymmenen aikana yritetty modifioida syntetisoimalla uusia johdannaisia. Kuitenkin joidenkin
20 lupaavien analogien kehityksen on estänyt niiden alhainen vesiliukoisuus, joka vähentää niiden mahdollisuuksia kliinisessä käytössä [Burchenal et al., V. 63 (1979) 1493-1497].

Liposomit ovat lipidirakkuloita, jotka voivat muodostua spontaanisti lisättäessä vesiliuosta kuivaan lipidifilmiin [Mayhew et al., Liposomes (1983) ed. Marc J. Ostro, Marcel Dekker Inc., New York, NY]. Liposomeja voidaan käyttää kantajina hydrofobisille tai hydrofiilisille
25 lääkkeille, jotka on sidottu liposomien hydrofobisiin tai vastaavasti hydrofiilisiin osastoihin. Multilamellaariset liposomit ovat monikerroksisia lipidirakkuloita (MLV), jotka soveltuvat erityisen hyvin kantamaan hydrofobisia
30 lääkkeitä, sillä niiden hydrofobinen osasto on laajempi kuin niiden hydrofiilinen osasto. Injektoitaessa suonen sisäisesti (iv) eläimiin [Kasi et al., Int. J. Nucl. Med.
35

Biol. V 11 (1984) 35 - 37, Lopez-Berestein et al., Cancer Drug Deliv. V 1 (1) (1984) 199-205] ja ihmisiin [Lopez-Berestein et al., Cancer Res. V 44 (2) (1984) 375-378] MLV konsentroituu maksaan, pernaan ja muihin retikulo-endoteeli-(RES)solurikkaisiin elimiin.

Liposomeja on aiemmin käytetty in vitro kuljetamaan kemoterapeuttisia aineita [Mayhew et al., Liposomer (1983), ed. Ostro, Marcel Dekker, Inc., New York, NY] sekä immunomodulaattoreita ja fungisidillisiä aineita in vitro [Mehta et al., Immunology V 51 (1984) 517-527] sekä in vivo eläimissä [Lopez-Berestein et al., Clin. Exp. Metastasis V 2 (4) (1984) 127-137 ja Lopez-Berestein et al., J. Inf. Dis. V 147 (1983) 937-945] ja ihmisissä [Lopez-Berestein et al., J. Inf. Dis V 151 (1985) 704-710].

Viimeaikaiset tutkimukset osoittavat, että liposomit voivat vähentää tiettyntyyppisiä lääkkeisiin liittyviä myrkkyyvaikutuksia, kuten doksorubisiinin myrkyllisyyttä sydämelle [Forssen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. V 78 (1981) 1873-1877, Olson et al., Eur. J. Cancer Clin. Oncol. V 18 (1982) 167 - 176, Gabizon et al., Cancer Res. V 42 (1982) 4734 - 4739 ja Herman et al., Cancer Res. V 43 (1983) 5427 - 5432] ja CDDP-munuaismyrkyllisyyttä [Freise et al., Arch. Int. Pharmacodynamie Therapie V 258 (1982) 180 -192] ja ne saattavat lisätä kasvaimia estävää vaikutusta slow release -mekanismin tuloksena [Mayhew et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. V 308 (1978) 371 - 386 ja Patel et al., int. J. Cancer V 34 (1984) 717 - 723], kasvainsolujen korkeamman lääkkeenoton tai selektiivisemmän elimiin jakaantumisen johdosta [Gabizon et al., Cancer Res. V 43 (1983) 4730 - 4735 ja Mayhew et al., Cancer Drug Deliv. V 1 (1983) 43 - 58]. US-patentin 4 330 534 mukaan havaittiin esimerkiksi liposomeihin assimiloitunut N⁴-asyylisytosiiniarabinosidi terapeuttisesti tehokkaaksi, kun sitä annettiin eläimille, joilla oli kasvaimia. Näistä lupaavista

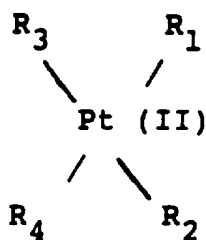
tuloksista huolimatta liposomeihin kapseloitujen kasvaimia estävien aineiden kliininen soveltaminen on viivästynyt pääasiassa formuloinnissa, lääkestabiilisuudessa ja suuren mittakaavan tuotannossa esiintyneiden vaikeuksien vuoksi.

5 CDDP:tä on aiemmin kapseloitu MLV:hen, mutta hyvin alhaisella kapseloitumistehokkuudella (7,4 %) ja huonolla stabiilisuudella (75 % 48 tunnin kuluttua 0,9-%:isessa NaCl-liuoksessa) [Freise et al., Arch. Int. Pharmacodynamie Therapie V 258 (1982) 180 - 192].

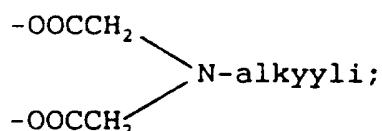
10 US-patentissa 4 256 652 kuvataan tiettyjä platina-yhdisteitä, joita ovat 1,2-diaminosykloheksaanin (DACH) isomeeriseoksesta erotetut stereoisomeerit. Käytetyt isomeerit olivat cis-DACH, trans-RR-Dach ja trans-SS-DACH. Siinä kuvatut platinayhdisteet sisälsivät erotetun DACH-
15 isomeerin lisäksi kaksi hydrofiilistä platinaligandia, kuten bromidin, jodidin, nitraatin, bromiasetaatin, sulfaatin tai glukuronaatin. Trans-RR-DACH:ta sisältävät platinayhdisteet kuvattiin terapeuttisesti usein tehokkaamiksi kuin cis-DACH:ta sisältävät.

20 EP-patenttihakemuksessa 83306726.7 kuvataan tiettyjä platinayhdisteitä, jotka saattavat sisältää diaminosykloheksaania (stereokemiallisesti erottamatonta) ja sisältävät fosfatidyyliiryhmiä, joissa on rasvahappo-substituentteja. Nämä yhdisteet kuvataan valtaosin plas-
25 maan liukenemattomiksi ja ensisijaisesti lipidirakkulakan-tajien kanssa käytettäviksi. Platinayhdiste-fosfolipidirakkulat valmistettiin edullisesti äärivärähtelymenetelmällä, jolla saantona tyypillisesti saadaan unilamel-laarisia rakkuloita.

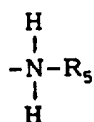
30 Tämän keksinnön mukaisesti valmistetaan hydrofobin platina(II)nelikoordinaattikompleksi, jolla on kaava



jossa R_1 ja R_2 merkitsevät kumpikin alkyylikarboksylaattoja, jossa alkyyliryhmä on hydrofobinen radikaali $(CH_2)_n CRR'R''$, jossa n on 0-8 ja R , R' ja R'' , jotka voivat olla samat tai erilaiset, merkitsevät kukin alkyyliryhmää, tai R_1 ja R_2 ovat liittyneet toisiinsa muodostaen dikarboksylaattoryhmän, johon on liittynyt hydrofobinen radikaali ja jolla on kaava



ja R_3 ja R_4 merkitsevät kumpikin ryhmää

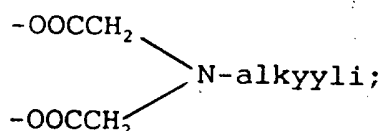


jossa R_5 on vety, alkyyli tai sykloalkyyli, tai R_3 ja R_4 ovat liittyneet yhteen muodostaen noin 3 - 7 hiiliatomia sisältävän sylkoalkyyli-1,2-diaminoryhmän, tai noin 2 - 12 hiiliatomia sisältävän alkyyli-1,2-diaminoryhmän, ja joka kompleksi on oleellisesti liukoinen metanoliin tai kloroformiin ja oleellisesti liukenematon veteen.

Edullinen alkyylikarboksylaatto R_1 tai R_2 on neodekyyli. R_5 on edullisesti vety, 1- 20 hiiliatomia sisältävä alkyyli, edullisemmin 6 - 12 hiiliatomia ja edullisimmin 2 - 6 hiiliatomia sisältävä alkyyli, tai 3 - 12 hiiliatomia sisältävä sykloalkyyli.

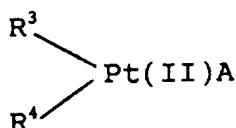
Edullinen radikaalien R_3 ja R_4 yhdessä muodostama alkyyli-1,2-diaminoryhmä on yhdeksi ryhmäksi etyyli-1,2-diamino, ja edullinen sykloalkyyli-1,2-diaminoryhmä on 1,2-diaminosykloheksaani, edullisimmin trans-R,R- tai trans-S,S-muodossa

Yllä kuvatussa kompleksissa alkyylikarboksylaattoryhmät R_1 ja R_2 ovat edullisesti välillä noin 5 - 20 hiiliatomia sisältäviä alkyylikarboksylaattoryhmiä. Kun R_1 ja R_2 toisiinsa liittyneinä, ovat dikarboksylaatto, jolla on kaava



niin tässä ryhmässä alkyyli on noin 10- 20 hiiliatomia sisältävä alkyyli , edullisimmin pentyyli, neopentyyli, dekyyli tai neodekyyli.

Edellä kuvattuja platina(II)nelikoordinaattikomplekseja valmistetaan keksinnön mukaisesti siten, että dinitraatto-taisulfaatto-1,2-diaminoalkaaniplatina(II)kompleksi, jolla on kaava



jossa A tarkoittaa sulfaattianionia tai kahta nitraattianionia, saatetaan reagoimaan radikaaleja R_1 ja R_2 vastaavien karboksylaattomonoanionien tai, R_1 :n ja R_2 :n ollessa liittyneinä toisiinsa, vastaavan karboksylaattodianionin alkalimetalli- tai maa-alkalimetallisuolan kanssa.

Yleisesti edellä kuvattujen platina(II)yhdisteiden synteesin kulkua voidaan kuvata yhdessä mittakaavassa seuraavasti : (1) noin 10 millimoolia diaminosykloalkaania tai diaminoalkaania, jossa aminoryhmät ovat vierekkäisissä hiiliatomeissa, lisätään 50 ml:aan K_2PtCl_4 :n (3,5 g) vesiliuosta ja sekoitetaan 6 - 8 tuntia huoneen lämpötilassa. Muodostunut cis-bis-dikloori-1,2-diimiini-Pt(II):n sisältävä keltainen kiinteä aine voidaan poistaa suodattamalla ja pestä nesteillä, kuten vedellä, metanolilla tai asetonilla. Kiinteä aine voidaan sitten suspensoida noin 20 ml:aan H_2O :ta, johon lisätään noin 0,75 g AgSO_4 :ää sisältävää vesiliuosta. Sekoitetaan noin 24 tunnin ajan pimeässä, minkä jälkeen saostunut AgCl voidaan poistaa suodattamalla. Sulfaattoryhmän viereinen diimiini-Pt voidaan sitten liuottaa noin 100 ml:aan H_2O :ta ja lisätä noin 2 millimooliin in situ valmistettua karboksylaattoanionin maa-alkalimetallisuolaa sekoittaen tällöin noin 30 minuutin

ajan. Kun BaSO_4 on poistettu suodattamalla, haluttu platina(II)kompleksi voidaan saada esimerkiksi kiteyttämällä tai poistamalla liuotin haihduttamalla.

5 Jäljempänä esitetyissä esimerkeissä kuvattuja tiettyjen platina(II)kompleksien valmistusmenetelmiä ja kuvattuja kemoterapeuttisia hoitomenetelmiä tietyillä platina(II)komplekseilla voidaan helposti soveltaa analogisten kompleksien valmistukseen ja käyttöön yksinkertaisesti korvaamalla sopivasti vikinaaliset diamiinit tai
10 hydrofobisia radikaaleja sisältävät karboksylaattomonoanionit toisilla vastaavilla yhdisteillä.

Keksinnön mukaisesti valmistettujen platinakompleksien tärkeä käyttömuoto ovat rasva-aineita, kuten fosfolipidejä ja valinnaisesti kolesterolia, sekä yllä kuvattuja
15 platina(II)nelikoordinaattikomplekseja sisältävät liposomit. Nämä liposomit sisältävät platinakompleksia ja fosfolipidiä edullisesti suhteessa noin 1:10 - noin 1:30, erityisesti suhteessa noin 1:10 - noin 1:30, edullisin suhde on 1:15.

20 Näiden liposomien edullisiin fosfolipideihin kuuluvat fosfatidyyliglyseroli, fosfatidyylikoliini, sfingomyeliini, fosfatidiinihappo tai fosfatidyyliiseriini, jolloin edullisimpia fosfolipidejä ovat fosfatidyyliglyseroli, fosfatidyylikoliini tai näiden yhdistelmä. Edullisin
25 fosfatidyyliglyseroli koostuu pääasiallisesti dimyristoyylifosfatidyyliglyserolistä ja edullisin fosfatidyylikoliini koostuu pääasiallisesti dimyristoyylifosfatidyylikoliinista. Liposomien sisältäessä dimyristoyylifosfatidyyli-
glyserolia ja dimyristoyylifosfatidyylikoliinia, ne ovat
30 ensisijaisesti suhteessa välillä noin 1:10 - 10:1, edullisimmin suhteessa noin 3:7.

Keksinnön mukaisesti valmistettua platinakompleksia sisältävät liposomit voivat olla multilamellaarisia tai unilamellaarisia tai niiden lamellaarirakenne voi olla
35 määrittelemätön. Liposomeja ja farmaseuttisesti hyväksyt-

tävää kantajaa tai laimenninta sisältävää farmaseuttista koostumusta voidaan käyttää tautitilojen, kuten syövän, terapiassa.

5 Keksinnön mukaisesti valmistettuja platina(II)neli-
koordinaattikomplekseja voidaan käyttää hoidettaessa isän-
täeläintä, jolla on näille komplekseille herkkiä kasvain-
soluja. Tällöin isäntäeläimelle annetaan yllä kuvattua
platina(II)nelikoordinaattikompleksia tai fosfolipidiä ja
mainittua platinakompleksia kasvainsoluja estävässä te-
10 hokkaassa määrässä sisältävää liposomia. Anto suoritetaan
edullisesti ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti suonensi-
säisellä, valtimonsisäisellä, lihaksensisäisellä, intra-
lymfaattisella, vatsaontelonsisäisellä, ihonalaisella,
keuhkopussinsisäisellä tai intratekaalilla injektioilla tai
15 ulkonaisesti käyttämällä tai suun kautta annostelemalla.
Suositellaan lääkeannon toistamista tietyssä aikataulussa,
esimerkiksi kahdesti päivässä kahden viikon aikana. Hoitoa
voidaan ylläpitää, kunnes on saavutettu kasvaimen regres-
siota tai häviäminen ja sitä voidaan käyttää yhdessä mui-
20 den kasvainterapian muotojen kanssa, kuten leikkaushoidon
tai eri aineilla suoritettun kemoterapian yhteydessä.

 Näitä kasvaimia estäviä menetelmiä voidaan käyttää
myös sellaisen kasvainten kuin retikuloendoteelisyövän
etäispesäkkeiden leviämistä estämään. Ennaltaehkäisevää
25 esikäsitteilyä platina(II)komplekseilla tai näitä komplek-
seja sisältävillä liposomeilla voidaan käyttää rokotuksen
tapaan estämään etäispesäkkeiden leviämistä.

 Platina(II)nelikoordinaattikompleksit valmistettiin
käyttäen raseemista (isomeereiksi erottamatonta) DACH:ta,
30 trans-RR-DACH:ta tai trans-SS-DACH:ta. Havaittiin, että
trans-RR-DACH:ta tai trans-SS-DACH:ta ja kaksi hydrofobis-
ta ligandia sisältävät platinakompleksit assimiloituivat
tehokkaammin liposomeihin kuin analogiset kompleksit, jot-
ka sisälsivät raseemista DACH:ta.

35 Näitä platinakomplekseja sisältävien liposomien

havaittiin olevan stabiileja vesiliuoksessa, ei-myrkyllisiä munuaisille, ja aktiivisia hiirileukemia L1210 vastaan.

Keksinnön mukaisesti valmistettujen platinakompleksien rakenneosat antavat kompleksille huomattavaa liukoisuutta (normaalisti enemmän kuin noin 5,0 mg/ml) metanoliin tai kloroformiin ympäristön lämpötiloissa ja huomattavaa liukenemattomuutta (alle noin 0,5 mg/ml) vesiliuoksiin ympäristön lämpötiloissa.

Karboksylaattomonoanionin R_1 tai R_2 sisältäessä tiettyjä hydrofobisia radikaaliryhmiä havaittiin, että Pt-kompleksien tehokas assimiloituminen fosfolipidiliposomeihin riippui ryhmien R_3 ja R_4 ominaisuuksista. Esimerkiksi kun R_3 oli 1,2-diaminosykloheksaani (DACH), voivat aminoryhmät olla useissa suhteellisissa stereokemiallisissa konfiguraatioissa, cis, trans-RR ja trans-SS (jolloin näiden seosta sanotaan raseemiseksi). Hydrofobisen radikaaliryhmän ollessa yhdeksän hiiliatomia sisältävä haaraketjuinen alkyyli, kuten ryhmässä neodekanoaatto ($C_{10}H_{20}O_2$, empiirinen kaava), raseemista DACH:ta tai trans-RR-DACH:ta sisältävän platina(II)kompleksin assimiloitumistehokkuus oli maksimaalista (100 %). Täten noin 6 - noin 12 hiiliatomia sisältävät suoraketjuiset tai haaraantuneet alkyyli-radikaaliryhmät antavat mille tahansa DACH:ta sisältävälle Pt(II)kompleksille ominaisuuksia tehokkaaseen fosfolipidiliposomiassimilaatioon.

Tässä kuvattuja platina(II)komplekseja sisältäviä liposomeja voidaan valmistaa erilaisista amfipaattisista aineista mukaan lukien luonnolliset tai synteettiset fosfolipidit. Liposomien valmistamisessa käyttökelpoisia fosfolipidejä on lukuisia, eikä niitä ole tyhjentävästi lueteltu tässä, sillä ne ovat yleensä alalla hyvin tunnettuja. Nämä fosfolipidit käsittävät lesitiinin, fosfatidyylietanoliamiinin, lysolesitiinin, lysofatidyylietanoliamiinin, fosfatidyyliiseriinin, fosfatidyyli-inositolin, sfing-

gomyeliinin, kardiolipiinin, fosfatidiinihapon ja kerebro-
sidit, mutta eivät rajoitu näihin. Keksinnön mukaisesti
valmistettujen platinakompleksien kanssa käytettäväksi
edullisimmat fosfolipidit käsittävät dimyristoyylifosfati-
5 dyyliglyserolin (DMPG) ja dimyristoyylifosfatidyylikolii-
nin (DMPC). Liposomien valmistamiseksi fosfolipideihin ja
platina(II)komplekseihin voidaan sisällyttää vähäisissä
suhteissa vaihdellen alle 1 %:sta noin 50 %:iin kolestero-
lia. Suhde 3:7 on havaittu edulliseksi, mutta ei rajoitta-
10 vaksi DMPG:n ja DMPC:n yhdistelmälle, vaikkakin välillä
1:10 - 10:1 olevia suhteita pidetään tyydyttävinä. Plati-
na(II)kompleksin ja fosfolipidin suhdetta välillä noin
1:10 - noin 1:30 pidetään yleensä tyydyttävinä, vaikka
tähänastisissa tutkimuksissa käytettiin pääasiassa suhdet-
15 ta 1:15.

Keksinnön mukaisesti valmistettujen platinakomplek-
sien kantajina voidaan käyttää joko unilamellaarisia tai
multilamellaarisia tai muita liposomeja. Multilamellaari-
set liposomit asetetaan nykyään etusijalle, sillä kyseiset
20 platina(II)kompleksit ovat oleellisesti veteen liukenemat-
tomia ja ne näyttävät assimiloituvan liposomilamellin fos-
folipidikaksoiskerroksiin.

Kyseiset fosfolipidejä ja keksinnön mukaisesti val-
mistettuja platinakomplekseja sisältävät liposomit (Pt-
25 liposomit) ovat käyttökelpoisia estämään sekä kasvainten
kasvua että niiden etäispesäkkeiden leviämistä.

Tällaisia Pt-liposomeja voidaan antaa ruoansulatus-
kanavan ulkopuolisesti, paikallisesti tai suun kautta.
Näiden Pt-liposomien annostuksia suun kautta tai ruoan-
30 sulatuskanavan ulkopuolisesti välillä noin 2,5 -25 mg/kg
elopaino pidetään riittävinä useimmissa tiloissa. Hoidet-
taessa ihmistä, jolla on kasvain, kulloinkin käytettävät
annostukset voivat vaihdella tapauskohtaisesti riippuen
potilaan tilasta, kasvaimen tyypistä ja laajuudesta ja
35 nimenomaisen Pt-liposomin myrkyllisyydestä.

Farmaseuttisen koostumuksen sisältämä liposomaalisen platinan määrä ja hoitomenetelmässä käytetty annostus vaihtelevat tapauskohtaisesti riippuen potilaiden tilasta, hoidettavan kasvaimen laadusta, liposomaalisen platinan kasvaimia estävästä vaikutuksesta ja sen liukoisuus- ja myrkyllisyysominaisuuksista jne. Liposomaalista platinaa voidaan antaa myös yhdessä muiden kasvaimia estävien aineiden kanssa yhdistettynä terapeuttisena hoitomenetelmänä.

Ruoansulatuskanavan ulkopuolinen lääkkeen antaminen voi tapahtua vatsaontelonsisäisesti, ihonalaisesti, keuhkopussinsisäisesti, intratekaalasti, virtsaputken-sisäisesti, suonensisäisesti, valtimonsisäisesti, lihaksensisäisesti tai intralymfaattisesti. Tällainen ruoansulatuskanavan ulkopuolinen lääkkeenanto käsittää ensisijaisesti Pt-liposomisuspensiot farmaseuttisesti hyväksyttävissä liuoksissa, kuten steriileissä isotonisissa vesiliuoksissa. Näitä suspensioita voidaan saada täysin valmistettuina tai niitä voidaan valmistaa esivalmistetuista aineosista. Kuten tunnettua alan ammattimiehille, Pt-liposomeja voidaan valmistaa pelletteinä tai jauheina. Näitä pellettejä tai jauheita voidaan sekoittaa farmaseuttisesti hyväksyttäviin liuoksiin muodostamaan suspensioita ruoansulatuskanavan ulkopuolista lääkkeenantoa varten.

Pt-liposomien paikallinen käyttö voi käsittää farmaseuttisia koostumuksia, kuten suspensioita, voiteita tai linimenttejä, joita voidaan saada täysin valmistettuina tai valmistaa Pt-liposomijauheista tai -pelleteistä. Tällainen paikallinen lääkeanto voi tapahtua syöpäisten vammakohtien sijaintipaikkojen, kuten epiteelin tai limakalvon läheisyyteen.

Pt-liposomien antamiseen suun kautta liittyy mielellä Pt-liposomijauheen tai -pellettien kapselointi, jolloin Pt-liposomit ovat paljolti suojattuja vatsan ja suoliston sulattavalta vaikutukselta ennen vapautumistaan

kapseloinnista.

Haluttaessa Pt-liposomit voidaan valmistaa esimerkiksi muita kasvaimien hoidossa käytettäviä terapeuttisia aineita tai liposomin stabiloinnissa auttavia antioksidantteja sisältäviksi.

Keksinnön mukaisesti valmistettujen kompleksien käyttö, erityisesti liposomien ainesosana, keskittyy kasvaimen kasvun estämiseen ja kasvainten etäispesäkkeiden leviämisen estämiseen. Esimerkiksi isännältä identifioidaan ensin kasvaintyyppiä, jonka tiedetään yleensä sisältävän soluja, joiden kasvua platina(II)kompleksit usein estävät. Kasvaimen kasvua isännässä voidaan estää antamalla isännälle kyseisiä platinaa sisältäviä liposomeja.

Samoin voidaan estää kasvainten etäispesäkkeiden leviämistä isännässä. Isäntä, jolla on itäispesäkkeitä muodostavia tai mahdollisesti etäispesäkkeitä muodostavia kasvaimia, joiden tiedetään olevan usein platina(II)komplekseille herkkää tyyppiä, identifioitaisiin ensin. Kyseisten platinaa sisältävien liposomien antaminen tälle isännälle auttaa estämään etäispesäkkeiden leviämistä.

Seuraavat esimerkit esitetään valaisemaan keksintöä yksityiskohtaisemmin, niiden ei ole tarkoitus rajata keksintöä ellei toisin mainita saatteena olevissa patenttivaatimuksissa.

Esimerkki 1

Materiaalit ja analyysit

K_2PtCl_4 hankittiin AESARilta (Johnson Matthey, Inc., Seabrook, NH). 1,2-diaminosykloheksaani (DACH) hankittiin Aldrich Chemical Co:lta, Milwaukee, WI, trans-RR-Dach ja trans-SS-DACH Mortol Thiokolilta, Inc., Danvers, MO, ja neodekaanihappo Exxon Chemical Co:lta, Houston, Texas. Platinakompleksien alkuaineanalyysit suoritettiin Integral Microanalytical Laboratories, Inc:in, Raleigh, NC ja Robertson Laboratory, Inc:in, Florham Park, N.J., toimes-

ta. Kompleksien (KBr-pelletteinä) infrapunaspektrit mitattiin välillä 600 - 4 000 cm^{-1} käyttäen Nicolet 6000 Fourier-muuntoinfrapunaspektrofotometriä.

Tässä tutkimuksessa käytetyt kromatografisesti puhtaat (ohutlevykromatografia) dimyristoyylyfosfatidyylioliini (DMPC) ja dimyristoyylyfosfatidyylylglyseroli (DMPG) saatiin Avanti Polar Lipidsiltä (Birmingham, AL). Kolesteroli hankittiin Sigma Chemical Co:lta (St.Louis,MO).

Esimerkki 2

10 Cis-bis-neodekanoaatto-DACH-platina(II):n synteesi

Tämä yhdiste syntetisoitiin käyttäen monivaihemenetelmää, kuten raseemiselle DACH:lle kuvanneet Khokhar et al.[Inorg. Chem. Acta Bioinorganic Section V 108 (1985) 63]: 0,96 g DACH:ta lisättiin suodatettuun K_2PtCl_4 :n vesiliuokseen (3,5 g 50 ml:ssa H_2O :ta) ja seosta sekoitettiin 6 - 8 tuntia huoneen lämpötilassa. Cis-bis-dikloori-DACH-Pt(II):n sisältävä kiinteä aine poistettiin suodattamalla ja pestiin H_2O :lla, metanolilla ja lopuksi asetonilla. Kun lopputuote oli kuivattu vakuuissa, saannon laskettiin olevan 56 %. Seuraavaksi 1,0 g cis-bis-dikloori-DACH-Pt(II):ta suspendoitiin 20 ml:aan H_2O :ta ja lisättiin AgSO_4 :n vesiliuosta (0,75 g 150 ml:ssa H_2O :ta), jolloin saatiin vesiliukoinen sulfaatto-DACH-Pt. H_2O . Reaktioseosta sekoitettiin pimeässä 24 tunnin ajan ja saostunut AgCl poistettiin suodattamalla. Keltainen liuos haihdutettiin kuiviin 45 - 50 $^{\circ}\text{C}$:ssa alipaineessa ja keltainen tuote kuivattiin edelleen vakuuissa P_2O_5 :llä. Sulfaatto-DACH-Pt(II). H_2O :n saanto oli 90 %.

Edellä kuvatulla tavalla valmistettua raseemista sulfaatto-DACH-platina(II):ta (0,423 g) liuotettiin 10 ml:aan vettä. Neodekaanihapon kaliumsuolaa (0,420 g) lisättiin tähän liuokseen ja reaktioseosta sekoitettiin 30 minuutin ajan huoneen lämpötilassa. Saatiin kumimainen massa, jota uutettiin kloroformilla ja kloroformiute kuivattiin kidevedettömällä MgSO_4 :llä. MgSO_4 erotettiin suo-

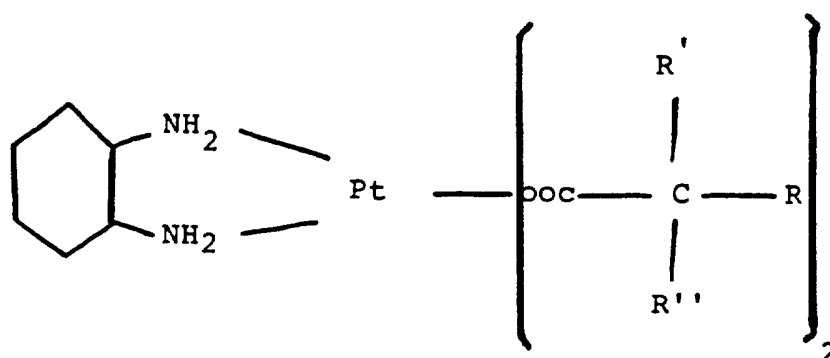
dattamalla ja suodos haihdutettiin kuiviin. Saatiin vaalea kiinteä tuote, joka kuivattiin vakuuissa P_2O_5 :llä. Tätä lopputuotetta säilytettiin 0 °C:ssa.

Lopputuotteen alkuaineanalyysi oli: C 48,30 %, H 8,10 % ja N 3,92 %. Lasketut alkuainearvot yhdisteelle, jolla oli empiirinen kaava $C_{26}H_{52}N_2O_4Pt$, ovat: C 47,93 %, H 8,00 % ja N 4,30 %.

Cis-bis-neodekanoaatto-DACH-platina(II):n rakennekaava on seuraava:

10

15



20

jossa R, R', R'' voi olla: CH₃, C₂H₅ tai C₃H₇, mikä antaa karboksylaattoradikaaliryhmän, jonka empiirinen kaava on C₁₀H₁₉O₂ (MW = 172).

Cis-bis-neodekanoaatto-DACH-platina(II) oli erittäin liukoinen metanoliin ja kloroformiin ja veteen liukenevaton.

25

Yllä kuvattu menettely suoritettiin trans-RR-DACH:lla cis-bis-neodekanoaatto-DACH-platina(II):n trans-RR-isomeerin tuottamiseen. Cis-bis-neodekanoaatto-RR-DACH-platina(II):n analyysi oli: CcC 47,74 %, G 8,16 % ja N 3,98 % (teoreettisesti C 47,93 %, H 8,00 % ja N 4,30 %).

30

Esimerkki 3

Cis-bis-n-dekyyli-iminodiasetaatto-DACH-platina(II):n synteesi

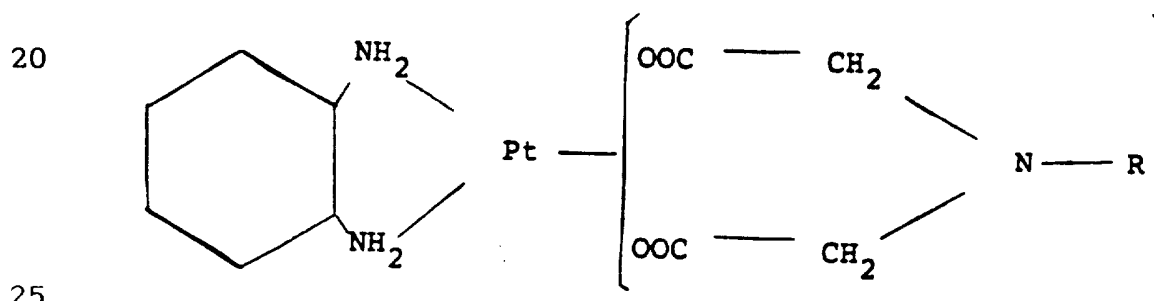
35

Sulfaatto-DACH-platina(II).H₂O:ta (0,423 g), joka oli valmistettu kuten on kuvattu esimerkissä 2, liuotettiin 10 ml:aan H₂O:ta. N-dekyyli-iminodietikkahapon nat-

riumsuola valmistettiin in situ lisäämällä NaOH:ta (0,08 g) n-dekyyli-iminodietikkahappoon (0,273 g) 50 ml:ssa vettä. Tässä natrium-n-dekyyli-iminodiasetaaton vesiliuos lisättiin sulfaatto-DACH-platinaliuokseen ja sekoitettiin 30 minuutin ajan huoneen lämpötilassa. Tuloksena saatu liuos haihdutettiin kuiviin pyöröhaihduttimella 40 °C:ssa alipaineessa. Näin saatu keltainen kiinteä aine liuotettiin metyylialkoholiin ja suodatettiin Celitellä. Keltainen suodos haihdutettiin kuiviin pyöröhaihduttimella alipaineessa. Saatiin keltainen kiteinen tuote, joka edelleen puhdistettiin 1-propanolista, saanto 80 %.

Tuotteen alkuaineanalyysi osoitti: C 39,28 %, H 7,12 % ja N 6,68 %. Teoreettinen koostumus yhdisteelle, jonka empiirinen kaava on $C_{20}H_{39}N_3O_4 \cdot 2H_2O$, oli C 38,95 %, H 7,02 % ja N 6,81 %. Kompleksin (KBr-pelletteinä) infrapunaspektri/C=O 1580 cm^{-1} ja C-O 1410 cm^{-1} .

Cis-bis-n-dekyyli-imino-diasetaatto-DACH-platina(II):n rakennekaava on seuraava:



jossa R = n-dekyyli.

Cis-bis-n-dekyyli-iminodiasetaatto-DACH-platina(II) on erittäin liukoinen metanoliin ja kloroformiin ja veteen liukenematon. Yllä kuvattu synteesimenettely suoritettiin trans-RR-DACH:lla cis-bis-n-dekyyli-iminodiasetaatto-DACH-Pt(II):n trans-RR-isomeerin tuottamiseksi. Cis-bis-n-dekyyli-iminodiasetaatto-trans-RR-DACH-PT(II):nanalyysi oli: C 38,60 %, H 6,87 % ja N 6,82 % (teoreettisesti C 38,95 %, H 7,02 % ja N 6,81 %).

Yllä kuvattu yhdiste edustaa rakennetta, jossa

aiemmin kuvatun yleisen rakenteen radikaalit R_1 ja R_2 ovat liittyneet yhdeksi ryhmäksi, jossa karboksylaattomonoanionit ovat liittyneet toisiinsa yhdistävällä N-atomilla, jossa on hydrofobinen alkyyli substituentti.

5

Esimerkki 4

Platinaa sisältävät liposomit (L-PT)

Yllä olevien kuvausten multilamellaarisia lipidi-rakkuloita (MLV) tai assimiloituneita platinakomplekseja (PT) sisältäviä liposomeja valmistettiin kuten aiemmin on kuvattu muilla yhdisteillä [Lopez-Berestein et al., Clin. Exp. Metastasis V 2 (4) (1984) 127 - 137 ja Lopez-Berestein et al., J. Inf. Dis. V 147 (1983) 937 - 945]. Lyhyesti sanottuna lipidien kloroformiliuoksia (halutussa moolisuhteessa) ja PT:tä sekoitettiin lipidi-PT-suhteessa 15:1 ja kloroformi haihdutettiin pyöröhaihduttimella (Buchi, Brinkmann Instruments, Westbury, NY). Saatu kuiva PT:n sisältävä lipidifilmi dispergoitiin sitten vesiliuokseen (0,9-%:inen NaCl:n vesiliuos) käsin voimakkaasti ravistamalla. Suspensiota sentrifugioitiin sen jälkeen 20 30 000 g:llä 45 minuutin ajan, supernatantti heitettiin pois ja PT:n sisältävä pelletti suspendoitiin uudelleen 0,9-%:iseen NaCl-liuokseen.

MLV:tä tai platinakomplekseja sisältäviä liposomeja voidaan valmistaa myös lipidistä ja platinayhdistettä sisältävästä kylmäkuivatusta jauheesta. Lipidi ja platinayhdiste liuotetaan yllä kuvatuissa suhteissa tertiaariseen butanoliin (sp. 26 °C), joka on hydrofobinen liuotin. Liuos kylmäkuivataan ja saadaan valkea jauhe. Platinayhdisteen sisältävää MLV:tä muodostuu lisättäessä 0,9-%ista NaCl:n vesiliuosta kylmäkuivattuun jauheeseen kevyesti käsin ravistamalla.

Esimerkki 5

Kapseloitumistehokkuuden (EE) ja stabiilisuuden laskeminen

35

Alkuaineplatina (Pt) määritettiin liposomisuspen-

siosta ja pelletistä röntgenfluoresenssillä, kuten aiemmin raportoitu [Seifert et al., Proc. Amer. Ass'n. Cancer Res. V 20 (1979) 168] Department of Analytical Chemistry, The University of Texas Medical School, Houston, TX. toimesta.

5 Platinakompleksin määrä määritettiin supernatantista ultraviolettii(UV)spektrofotometrisesti aallonpituudella 224 nm. EE laskettiin aluksi seuraavilla kahdella kaavalla:

1. $EE = Pt \text{ pelletissä} / \text{kokonais-pt alkuperäisessä liposomisuspensiossa}$

10 2. $EE = \text{alunperin lisätty kokonais-Pt} - Pt \text{ supernatantissa} / \text{alunperin lisätty kokonais-Pt}$

Koska näillä kahdella menetelmällä saadut tulokset olivat erittäin vertailukelpoisia ja jälkimmäinen menetelmä vaatii ainoastaan UV-spektrofotometrisen Pt-määrittymisen, laskettiin useimmat EE-määrittymiset jälkimmäisellä menetelmällä.

15

Eri liposomi-Pt-valmisteiden (L-PT) stabiilisuus 0,9-%:isessa NaCl-liuoksessa 4 °C:ssa ja 50-%:isessa ihmis-AB-seerumissa 0,9-%:isessa NaCl-liuoksessa 37 °C:ssa määritettiin käyttäen seuraavaa kaavaa:

20

$$\frac{\text{Stabiilisuus ajan-} \quad \% \text{ EE ajankohtana } x \text{ tuntia}}{\text{kohtana } x \text{ tuntia} \quad \% \text{ EE ajankohtana } 0 \text{ tuntia}} \times 100$$

25 Stabiilisuusmäärittymissä käytetyt EE-arvot saatiin mittaamalla Pt supernatanteista UV-spektrofotometrisesti (0,9-%:inen NaCl-liuos) tai röntgenfluoresenssillä (50-%:inen ihmis-AB-seerumi). Stabiilisuus 0,9-%:isessa NaCl-liuoksessa määritettiin 14. päivään asti lukien alkuperäisestä valmistuksesta. Lisäksi L-PT-valmisteita tutkittiin mikroskooppisesti 14. päivänä rakkuloiden morfologian tarkistamiseksi. Stabiilisuus 50-%:isessa ihmis-AB-seerumissa määritettiin 18. tuntiin asti lukien inkuboinnista.

30

Eri cis-platina-analogeja kapseloitiin DMPC:DMPG 7:3:sta koostuviin multilamellaarisiin rakkuloihin. Pt-

35

neodekanoaatto-raseeminen-DACH:n, Pt-neodekanoaatto-trans-RR-DACH:n ja Pt-n-dekyyli-iminodiasetaatto-raseeminen-DACH:n kompleksien kapseloitumistehokkuudet esitetään alla olevassa taulukossa 1.

5

Taulukko 1

L-PT:n kapseloitumistehokkuus käyttäen eri analogeja

	platina-analogi	kapseloitumistehokkuus ¹ , %
10	Pt-neodekanoaatto-raseeminen-Dach-seos	99
	Pt-neodekanoaatto-trans-RR-DACH	99
15	Pt-n-dekyyli-iminodiasetaatto-raseeminen-DACH-seos	100
20	Pt-n-dekyyli-iminodiasetaatto-trans-RR-DACH	98

¹Vähintään kolmen kokeen keskiarvo. Liposomikoostumus : DMPC:DMPG 7:3

25

Analogisissa kokeissa (ei esitetty) yksin DMPC:llä, yksin DMPG:llä, yksin kolesterolilla ja DMPC:llä ja DMPG:llä yhdistettyinä muissa pitoisuuksissa kolesterolin kanssa tai ilman ei ilmennyt parempaa kapseloitumistehokkuutta ja useimmiten ilmeni merkittävästi vähentynyt EE.

30

Esimerkki 6

L-PT:n stabiilisuus vesiliuoksessa

Valmisteita suspendoitiin 0,9-%:iseen suolaliuokseen ja inkuboitiin 4 °C:ssa 14 päivän ajan. Liposomikoostumuksia havainnoitiin valomikroskooppisesti ja suolaliuoksen sisältämä vapaan PT:n määrä määritettiin. PT:tä sisältävät ja DMPG:stä ainoana fosfolipidinä koostuvat liposomit osoittivat merkittävää mikroskooppisesti määritettyä rakenteen hajoamista. Vapaa PT määritettiin ja stabiilisuus laskettiin liposomeihin jääneen PT:n prosentti-

40

osuutena. Näiden mittausten tulokset esitetään alla taulukossa 2.

Taulukko 2

L-PT:n stabiilisuus suolaliuoksessa 14. päivänä¹

5

platina-analogi	stabiilisuus, %
-----------------	-----------------

10

Pt-neodekanoaatto-raseeminen-DACH	100
Pt-neodekanoaatto-trans-RR-DACH	99
Pt-iminodiasetaatto-raseeminen-DACH	100
Pt-iminodiasetaatto-trans-RR-DACH	100

¹Liposomikoostumus : DMPC:DMPG 7:3

15

Esimerkki 7

Eri L-PT-analogien in vivo kasvaimia estävä vaikutus L1210-leukemiaan

20

Eri L-PT-analogien kasvaimia estävää vaikutusta L1210-hiirileukemiaan tutkittiin L1210-BDF₁-hiirimallilla (25). BDF₁-hiiret hankittiin Charles Riveriltä (Wilmington, MA). 6 -8 hiiren ryhmiin, jotka hiiret painoivat 18 - 22 g, istutettiin ip 1 x 10⁶ L1210-leukemiasolua päivänä 0. L1210-soluja säilytettiin DBA₂-hiirissä eri kokeiden viikottaisin välein. Kaikki L-PT-valmisteet injektoidiin ip 0,1 - 0,3 ml:n tilavuuksissa 24 tuntia kasvaimen istutuksen jälkeen. Valmiste annettiin yksittäisenä injektiona päivänä 1. Käytettiin CDDP-annosta, joka aiemmissa kokeissa oli antanut tuloksena maksimaalisen kasvaimia estävän vaikutuksen. Kliinistä käyttäytymistä ja eloonjääntiaikoja tarkkailtiin, kunne kaikki eläimet olivat kuolleet. Tulokset ilmoitettiin prosentteina T/C (hoidettujen hiirien keskimääräinen eloonjääntiaika/kontrollihiirien keskimääräinen eloonjääntiaika x 100) ja pitkän aikavälin eloonjääneiden lukumääränä. Enemmän kuin 30 päivää ja 60 päivää

25

30

35

eläneitä hiiriä pidettiin pitkän aikavälin eloonjääneinä yksittäisen ja vastaavasti moninkertaisen injektion aika-
taululle. Kaikki L-PT-valmisteet, joiden kasvaimia estävää
vaikutusta testattiin, valmistettiin steriileissä olosuh-
teissa koepäivänä. CDDP:hen (% T/C = 175) verrattuina L-
PT-analogeilla esiintyi ekvivalentti tai lievästi korkeam-
paa kasvaimia estävää vaikutusta, poikkeuksena L-PT,
n-dekyyli-iminodiasetaatto-raseeminen-DACH = 150 ja n-de-
kyyli-iminodiasetaatto-trans-RR-DACH = 162). Nämä tulok-
set on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3

Cis-platinan ja eri liposomi-platina-analogien¹ kas-
vaimia estävä vaikutus L1210-leukemiaan³

platina-analogi	annos ⁴ mg/kg	% T/C ²
Pt-neodekanoaatto-raseeminen-DACH	50	187
Pt-neodekanoaatto-trans-RR-DACH	25	175
Pt-n-dekyyli-iminodiasetaatto-raseeminen-DACH	25	150
Pt-n-dekyyli-iminodiasetaatto-trans-RR-DACH	25	162
cis-platina (CDDP) ⁵	10	175

¹ liposomikoostumus : DMPC:DMPG 7:3

² hoidettujen hiirien mediaani eloonjäänti
kontrollihiirien mediaani eloonjäänti $\times 100$

³ 1×10^6 L1210-solua istutettu ip päivänä 1

⁴ käsittely : ip päivänä 1

⁵ liuotettuna suolaliuokseen, 1 mg/ml

Esimerkki 8

L-PT-neodekanoaatto-raseeminen-DACH:n in vivo
kasvaimia estävä vaikutus hiiren M5076-retikulo
endoteelisyövän maksan etäispesäkkeisiin
L-PT:n mahdollista kasvaimia estävää vaikutusta

maksan etäispesäkkeisiin testattiin käyttämällä L-PT-neodekanoaatto-raseeminen-DACH:ta, joka oli valmistettu, kuten on kuvattu esimerkissä 5, ja hiiren M5076-retikuloendoteelisyöpää, joka on yksinomaan maksan etäispesäkkeitä muodostava kasvain.

L-PT-neodekanoaatto-raseeminen-DACH oli aktiivisempi kuin cis-platina hoidettaessa todettuja maksan M5076-etäispesäkkeitä käyttäen kahta eri kasvaimen istutusmäärää ja antoaikataulua (taulukot 4 ja 5). L-PT-neodekanoaatto-raseeminen-DACH (25 mg/kg päivinä 8, 12 ja 16) antoi tuloksena enemmän kuin kaksinkertaisen vähenemisen maksan etäispesäkkeiden lukumäärässä verrattuna cis-platinaan (7,5 mg/kg päivinä 8, 12 ja 16) päivänä 30 10^5 M5076 solun suonensisäisen istutuksen jälkeen (maksan etäispesäkkeiden lukumäärän keskiarvo $\pm$ SD = 39 ± 21 L-PT:lle versus 114 ± 38 cis-platinalle) (taulukko 4). L-PT-neodekanoaatto-raseeminen-DACH (25 mg/kg päivinä 4, 8 ja 12) antoi tuloksena maksan M5076-etäispesäkkeiden täydellisen estymisen päivänä 45 10^4 M5076-solun istutuksen jälkeen, kun taas cis-platinalla (7,5 mg/kg päivinä 4, 8 ja 12) hoidetuista eläimistä 4/6:lla oli 175 tai enemmän maksan etäispesäkkeitä (taulukko 5).

L-PT-neodekanoaatto-raseeminen-DACH oli tehokas M5076-retikuloendoteelisyövän maksan etäispesäkkeiden ennaltaehkäisyssä. L-PT-neodekanoaatto-raseeminen-DACH (37,5 mg/kg päivänä -1) antoi tuloksena maksan etäispesäkkeiden lukumäärän viisinkertaisen vähenemisen päivänä 21 10^4 M5076-solun suonensisäisen istutuksen jälkeen (istutus päivänä 0) tai hoitamattomiin eläimiin (maksan etäispesäkkeiden lukumäärän keskiarvo $\pm$ SD = 52 ± 20 L-PT:lle, 256 ± 54 cis-platinalle ja 226 ± 21 kontrollille) (taulukko 6).

Taulukko 4

M5076-retikuloendoteelisyövän maksan etäispesäkkeiden hoito L-PT-neodekanoaatto-raseeminen-DACH:lla*

5	hoito	annos	aikataulu	maksan etäispesäkkeiden lukumäärä päivänä 30, keskiarvo $\pm$ SD
		mg/kg	päivä	
10	cis-platina	7,5	8, 12, 16	114 $\pm$ 38
	L-PT-neodeka- noaatto-rasee-			
15	minen-DACH	25	8, 12, 16	39 $\pm$ 21

20 *10 kpl:een ryhmiin C57BL/6-hiiriä istutettiin suonensi-
säisesti 10^5 M5076-solua päivänä 0. Eläimiä hoidettiin päi-
vinä 8, 12 ja 16 cis-platinalla tai L-PT-neodekanoaatto-
raseeminen-DACH:lla. Hoitamattomien eläinten mediaani-
eloonjäänti oli 19 päivää. Hoidetut eläimet tapettiin päi-
vänä 30, maksat paloiteltiin, asetettiin Bouinin fik-
satiiviin ja laskettiin maksakasvainkolonioiden lukumäärä.

Taulukko 5

M5076-retikuloendoteelisyövän maksan etäispesäkkeiden hoito L-PT-neodekanoaatto-raseeminen-DACH:lla*

30	hoito	annos	aikataulu	maksan etäispesäkkeiden lukumäärä päivänä 45, keskiarvo $\pm$ SD
		mg/kg	päivä	
35	cis-platina	7,5	4, 8, 12	0,0,175,>200,>200,>200
40	L-PT-neodeka- noaatto-rasee- minen-DACH	25	4, 8, 12	0, 0, 0, 0, 0, 1

* 6 kpl:een ryhmiin C57BL/6-hiiriä istutettiin suonensisäisesti 10^4 M5076-solua päivänä 0. Eläimiä hoidettiin päivinä 4, 8 ja 12 cis-platinalla tai L-PT-neodekanoaattoraseeminen-DACH:lla. Hoitamattomien eläinten mediaanieloonjäänti oli 30 päivää. Hoidetut eläimet tapettiin päivänä 45, maksat paloiteltiin, asetettiin Bouinin fiksatiiviin ja laskettiin maksakasvainkolonioiden lukumäärä. Kaksi cis-platinalla hoidetuista eläimistä kuoli ennen päivää 45, L-PT:llä käsitellystä ryhmästä sen sijaan ei kuollut yhtään.

- 5 Taulukko 6
M5076-retikuloendoteelisyövän maksan etäispesäkkeiden ennaltaehkäisy L-PT-neodekanaatto-raseeminen-DACH:lla*

10	hoito	annos mg/kg	aikataulu päivä	maksan etäispesäkkeiden lukumäärä päivänä 21, keskiarvo $\pm$ SD
15	ei hoitoa	--	--	226 $\pm$ 21
	cis-platina	10	-1	256 $\pm$ 54
20	L-PT-neodekanaatto-raseeminen-DACH	37,5	-1	52 $\pm$ 20

- 25 *6 kpl:een ryhmiä C57BL/6-hiiriä hoidettiin päivänä -1 cis-platinalla tai L-PT-neodekanaatto-raseeminen-DACH:lla. Eläimiin istutettiin suonensisäisesti 10^4 M5076-solua päivänä 0. Hoitamattomien eläinten mediaanieloon-
30 jäänti oli 21 päivää. Hoidetut eläimet tapettiin päivänä 21, maksat paloitteltiin, asetettiin Bouinin fiksaatiiviin ja laskettiin kasvainkolonioiden lukumäärä.

Esimerkki 9

- 35 Cis-bis-neodekanaatto-cis-diamiiniplatina(II):n valmistus
Cis-diamiini-dijodiplatina-(II)-(NH₃)₂-Pt-I₂ valmistettiin ensin seuraavalla menetelmällä:
40 K₂PtCl₄ (5g) liuotettiin veteen (20 ml). Lisättiin KI:n (3g) vesiliuosta ja saatiin tummanruskea liuos. Seokseen lisättiin väkevää ammoniakkin vesiliuosta (2 ml) ja sekoitettiin 2 - 3 tuntia huoneen lämpötilassa. Seos suodatettiin ja kiinteä aine pestiin ylimäärällä vettä, etanolia ja eetteriä. Tuote kuivattiin P₂O₅:llä vakuumissa.

Saanto 4,5 g (77 %).

Otsikon yhdiste valmistettiin sitten seuraavasti:

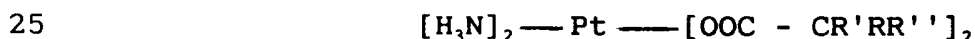
$(\text{NH}_3)_2\text{-Pt-I}_2$ (1,0 g) suspendoitiin veteen (50 ml) ja lisättiin AgNO_3 :n vesiliuos (0,68 g 20 ml:ssa H_2O :ta).

5 Reaktioseosta sekoitettiin pimeässä yön yli huoneen lämpötilassa. AgI -sakka suodatettiin ja suodos konsentroitiin pyöröhaihduttimella. Konsentroituu liuokseen lisättiin in situ valmistettua natriumneodekanoaattiliuosta (0,688 g neodekaanihappoa 20 ml:ssa metanolia ja 4 ml 1N NaOH :ta).

10 Reaktioseosta sekoitettiin yön yli huoneen lämpötilassa. Keltainen reaktioseos haihdutettiin kuiviin 40 °C:ssa alipaineessa käyttäen pyöröhaihdutinta. Saatiin kumimainen tuote, jota uutettiin kloroformilla ja kloroformiute kuivatettiin kidevedettömällä MgSO_4 :llä. MgSO_4 erotettiin suodattamalla ja suodos haihdutettiin kuiviin alipaineessa käyttäen pyöröhaihdutinta. Saatiin kermanvärinen kiinteä aine, joka kuivatettiin P_2O_5 :llä vakuumissa. Lopputuote säilytettiin 0 °C:ssa.

20 Lopputuotteen alkuaineanalyysi oli C 41,58, H 8,03 ja N 4,45 %. $\text{C}_{20}\text{H}_{44}\text{N}_{24}\text{Pt}$:lle lasketut arvot ovat C 42,00, H 7,7 ja N 4,90 %.

Cis-bis-neodekanoaatto-cis-diamiini-platina(II):n rakennekaava on seuraava:



jossa R, R' ja R'' voi olla CH_3 , C_2H_5 tai C_3H_7 , niin että tuloksena on karboksylaattoradikaaliryhmä, jonka empiirinen kaava on $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}_2$ (MW = 171).

30 Cis-bis-neodekanoaatto-cis-diamiiniplatina(II) on erittäin liukoista kloroformiin, metanoliin ja muihin tavanomaisiin orgaanisiin liuottimiin, mutta veteen liukene-maton.

Esimerkki 10

35 Cis-bis-neodekanoaatto-bis-sykloheksyyliamiini

platina(II)dihydraatin valmistus

Seurattiin esimerkin 9 menetelmää käyttäen sykloheksyyliamiiniligandia ammoniakkin asemesta. Kompleksi on erittäin liukoista kloroformiin, metanoliin ja muihin orgaanisiin liuottimiin, mutta veteen liukenematonta.

Alkuaineanalyysi $C_{32}H_{64}N_2O_4 \cdot 2H_2O$:lle:

Laskettu: C 49,71 H 8,80 N 3,62 %

Saatu: C 49,31 H 8,39 N 3,16 %

Cis-bis-neodekanoaatto-bis-sykloheksyyliamiiniplatina(II):n rakennekaava on seuraava:



jossa R, R', R'' voi olla CH_3 , C_2H_5 tai C_3H_7 , niin että tuloksena on karboksylaattoradikaaliryhmä, jonka empiirinen kaava on $C_{10}H_{19}O_2$ (MW = 171).

Esimerkki 11

Cis-bis-neodekanoaattoetyleenidiamiini platina(II). H_2O :n valmistus

Cis-dijodietyleenidiamiiniplatina(II) valmistettiin ensin esimerkissä 1 esitetyllä menetelmällä käyttäen etyleenidiamiiniligandia ammoniakkin asemesta, jolloin tuote saatiin 96 %:n saannoin.

Sulfaattoetyleenidiamiiniplatina(II). H_2O valmistettiin seuraavalla menetelmällä:

Cis-bis-dijodietyleenidiamiiniplatina(II) (3,9 g) suspendoitiin 10 ml:aan H_2O :ta ja lisättiin $AgSO_4$:n vesiliuosta (2,2 g 200 ml:ssa H_2O :ta). Reaktioseosta sekoitettiin yön yli pimeässä huoneen lämpötilassa. AgI poistettiin suodattamalla ja keltainen suodos haihdutettiin kuiviin 40 - 45 °C:ssa alipaineessa käyttäen pyöröhaihdutinta. Lopputuote kuivattiin P_2O_5 :llä vakuuissa. Tuotesaanto oli 2,35 g (81 %).

Otsikon yhdiste valmistettiin sitten seuraavasti:

Sulfaattoetyleenidiamiiniplatina(II). H_2O (0,369 g)

liuotettiin H₂O:hon (20 ml) ja lisättiin in situ valmistet-
tua natriumneodekanaaattiliuosta (0,344 g neodekaanihappoa
20 ml:ssa metanolia ja 2 ml 1N NaOH:ta. Reaktioseosta se-
koitettiin 2 - 3 tuntia huoneen lämpötilassa. Reaktioseos
5 haihdutettiin kuiviin 40 - 45 °C:ssa alipaineessa käyttäen
pyöröhaihdutinta. Saatiin kumimainen tuote, jota uutet-
tiin kloroformilla ja kloroformiute kuivattiin kidevedet-
tömällä MgSO₄:llä. MgSO₄ erotettiin suodattamalla ja suodos
haihdutettiin kuiviin alipaineessa käyttäen pyöröhaihdu-
10 tinta. Lopputuote kuivattiin P₂O₅:llä vakuumissa. Tuote
säilytettiin 0 °C:ssa.

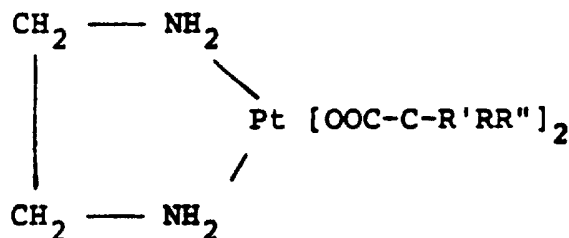
Alkuaineanalyysi C₂₂H₄₆N₂O₄Pt.H₂O:lle:

Laskettu: C 42,86 H 7,79 N 4,54 %

Saatu: C 43,07 H 7,32 N 4,71 %

15 Cis-bis-neodekanaattoetyleenidiamiiniplatina(II)
on erittäin liukoista kloroformiin, metanoliin ja muihin
orgaanisiin liuottimiin, mutta veteen liukenematonta.

Cis-bis-neodekanaattoetyleenidiamiiniplatina(II):n
rakennekaava on seuraava:



25 jossa R, R', R'' voi olla CH₃, C₂H₅ tai C₃H₇, niin että tu-
loksena on karboksylaattoradikaaliryhmä, jonka empiirinen
kaava on C₁₀H₁₉O₂ (ME = 171).

Esimerkki 12

30 Cis-bis-neodekanaatto-bis-isopropyliamiini
platina(II):n valmistus

Cis-bis-neodekanaatto-bis-isopropyliamiinipla-
tina(II) ja sulfaatto-bis-isopropyliamiiniplatina(II)
valmistettiin ensin esimerkin 11 menetelmällä käyttäen
35 isopropyliamiiniligandia etyleenidiamiinin asemesta.

Otsikon yhdiste valmistettiin sitten seuraavasti:

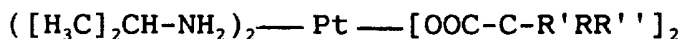
Sulfaatto-bis-isopropyyliamiiniplatina(II)·H₂O (0,427 g) liuotettiin H₂O:hon (50 ml) ja lisättiin in situ valmistettua natriumdekanoaattiliuosta (0,344 g neodekaanihappoa 20 ml:ssa metanolia ja 2 ml 1N NaOH:ta). Reaktioseosta sekoitettiin 2 - 3 tuntia huoneen lämpötilassa. Reaktioseos haihdutettiin kuiviin 40 - 45 °C:ssa alipaineessa käyttäen pyöröhaihdutinta. Saatiin kumimainen massa, jota uutettiin kloroformilla ja kloroformiuute kuivatettiin kidevedettömällä MgSO₄:llä. MgSO₄ erotettiin suodattamalla ja suodos haihdutettiin kuiviin alipaineessa käyttäen pyöröhaihdutinta. Tuote kuivattiin P₂O₅:llä vakuumissa. Lopputuote säilytettiin 0 °C:ssa.

Alkuaineanalyysi C₂₆H₅₆N₂O₄Pt:lle:

Laskettu: C 47,63 H 8,53 N 4,26 %

Saatu: C 47,74 H 8,47 N 3,93 %

Cis-bis-neodekanoaatto-bis-isopropyyliamiiniplatina(II):n rakennekaava on seuraava:



jossa R, R', R'' voi olla CH₃, C₂H₅ tai C₃H₇, niin että tuloksena on karboksylaattoradikaaliryhmä, jonka empirinen kaava on C₁₀H₁₉O₂ (MW = 171).

Cis-bis-neodekanoaatto-bis-isopropyyliamiiniplatina(II) on erittäin liukoista kloroformiin, metanoliin ja muihin orgaanisiin liuottimiin, mutta veteen liukenematon.

Esimerkki 13

Cis-bis-dekanoaatto-trans-R,R-1,2-diaminosykloheksaaniplatina(II):n valmistus

Sulfaatto-trans-R,R-1,2-diaminosykloheksaaniplatina(II)·H₂O (0,423 g) liuotettiin H₂O:hon (20 ml) ja lisättiin in situ valmistettua natriumdekanoaattoliuosta (0,344 g dekaanihappoa 20 ml:ssa metanolia ja 2 ml 1N NaOH:ta). Reaktioseosta sekoitettiin 2 - 3 tuntia huo-

neen lämpötilassa. Reaktioseos haihdutettiin kuiviin 40 - 45 °C:ssa alipaineessa käyttäen pyöröhaihdutinta. Saatiin kiinteä aine, jota uutettiin kloroformilla ja kloroformiute kuivattiin kivedettömällä MgSO_4 :llä. MgSO_4 poistettiin suodattamalla ja suodos haihdutettiin kuiviin alipaineessa käyttäen pyöröhaihdutinta. Tuote kuivattiin P_2O_5 :llä vakuumissa. Lopputuote säilytettiin 0 °C:ssa.

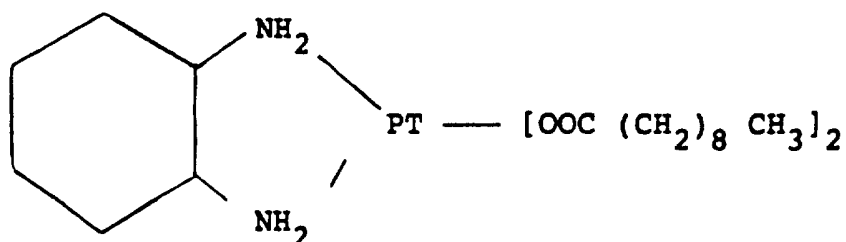
Alkuaineanalyysi $\text{C}_{26}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_4\text{Pt}\cdot\text{H}_2\text{O}$:lle:

Laskettu: C 46,59 H 8,06 N 4,18 %

Saatu: C 45,94 H 7,87 N 4,31 %

Cis-bis-dekanoaatto-trans-R,R-1,2-diaminosykloheksaaniplatina(II) on erittäin liukoista kloroformiin ja muihin orgaanisiin liuottimiin, mutta veteen liukenematon.

Cis-Bis-dekanoaatto-trans-R,R-1,2-diaminosykloheksaaniplatina(II):n rakennekaava on seuraava:



Esimerkki 14

Cis-bis-neopentanoaatto-trans-R,R-1,2-diaminosykloheksaaniplatina(II)

Sulfaatto-trans-R,R-1,2-diaminosykloheksaaniplatina(II)· H_2O (0,423 g) liuotettiin veteen (20 ml) ja lisättiin in situ valmistettua bariumneopentanoaattiliuosta (0,204 g neopentaanihappoa 5 ml:ssa metanolia ja 0,3 g $\text{Ba}(\text{OH})_2\cdot 8\text{H}_2\text{O}$:ta 50 ml:ssa H_2O :ta yhdistettyinä). Reaktioseosta sekoitettiin 2 - 3 tuntia huoneen lämpötilassa. Reaktioseos haihdutettiin kuiviin 40 - 45 °C:ssa alipaineessa käyttäen pyöröhaihdutinta. Jäännöstä uutettiin metanolilla, suodatettiin ja suodos haihdutettiin kuiviin. Saatua kiinteää ainetta uutettiin edelleen kloroformilla.

Kloroformiuute haihdutettiin kuiviin ja saatiin kermanvärinen tuote. Tuote kuivattiin P_2O_5 :llä vakuuissa.

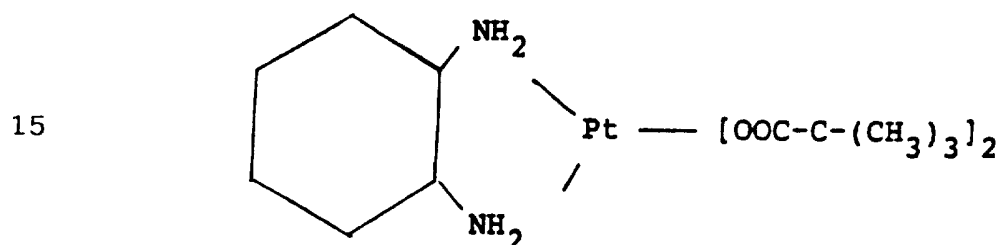
Alkuaineanalyysi $C_{16}H_{32}N_2O_4Pt \cdot 2H_2O$:lle:

Laskettu: C 35,00 H 6,57 N 5,11 %

5 Saatu: C 35,16 H 6,17 N 5,27 %

Cis-bis-neopentanoaatto-trans-R,R-1,2-diaminosykloheksaaniplatina(II) on erittäin liukoista kloroformia, metanoliin ja muihin tavanomaisiin orgaanisiin liuottimiin.

10 Cis-bis-neopentanoaatto-trans-R,R-1,2-diaminosykloheksaaniplatina(II):n rakennekaava on seuraava:



20 Esimerkki 15

Lipofiilisten cis-platina-analogien kapseloitumis-
tehokkuus ja kasvaimia estävä vaikutus

25 Esimerkeissä 9 - 14 valmistettujen yhdisteiden kapseloitumistehokkuutta liposomeihin testattiin esimerkissä 5 kuvatuilla menetelmillä. Näitä liposomeihin kapseloituneita yhdisteitä testattiin niiden optimiannoksen ja tehokkuuden in vivo kasvainten kasvua estävinä aineina määrittämiseksi, kuten on kuvattu esimerkissä 7. Taulukon 7 arvot ilmoittavat mittaustulokset.

Taulukko 7 Liposomeihin assimiloituneiden lipofiilisten cis-platina-
analogien kapseloitumistehokkuus ja kasvaimia estävä vaikutus

yhdiste	kapseloitumis- tehokkuus	optimi- annos mg/kg	% T/C L1210 ip/ip yksittäinen annos
cis-bis-neodekanoatto-cis-diamiiniplatina-(II)	95 %	50	200
cis-bis-neodekanoatto-bis-sykloheksyyliamiiniplatina-(II)	89 %	100	125
cis-bis-neodekanoattoetyleenidiamiiniplatina-(II)	82 %	75	144
cis-bis-neodekanoatto-bis-isopropyliamiiniplatina-(II)	87 %	100	150
cis-ois-dekanoatto-trans-R,R-1,2-diaminosykloheksaaniplatina-(II)	96 %	50	187
cis-bis-neopentanoatto-trans-R,R-1,2-diaminosykloheksaaniplatina-(II)	93 %	25	170

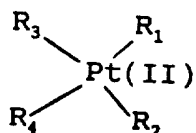
Esimerkki 16

In vitro sytotoksisuus ihmisen pahanlaatuisille
solulinjoille

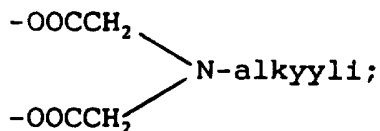
Cis-bis-neodekanoatto-1,2-diaminosykloheksaanipla-
5 tina(II):ta testattiin liposomaalisessa muodossa kolmea
ihmisen paksunsuolen syövän pahanlaatuista solulinjaa
(LoVo, SW620 ja SW403) vastaan käyttäen kolonioiden muo-
dostuksen inhibitioanalyysiä. Lääkepitoisuus, josta seura-
si 10-%:inen inhibitio kolonioiden muodostuksessa (IC_{50}),
10 vaihteli välillä 4 - 8 μM . Cis-platinnan IC_{50} näille samoil-
le solulinjoille vaihteli välillä 3 - 7 μM .

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä kasvaimenvastaisessa kemoterapiassa
 käyttökelpoisen hydrofobisen platina(II)nelikoordinaatti-
 5 kompleksin valmistamiseksi, jolla on kaava

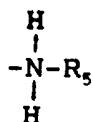


- 10 jossa R_1 ja R_2 merkitsevät kumpikin alkyylikarboksylaattoja,
 jossa alkyyyliryhmä on hydrofobinen radikaali $(CH_2)_n CRR'R''$,
 jossa n on 0 - 8 ja R , R' ja R'' , jotka voivat olla samat
 tai erilaiset, merkitsevät kukin alkyyyliryhmää, tai R_1 ja
 R_2 ovat liittyneet toisiinsa muodostaen dikarboksylaatti-
 15 toryhmän, johon on liittynyt hydrofobinen radikaali ja
 jolla on kaava



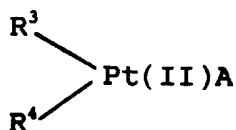
20

ja R_3 ja R_4 merkitsevät kumpikin ryhmää



25

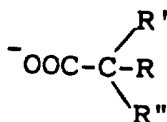
- jossa R_5 on vety, alkyyli tai sykloalkyyli, tai R_3 ja R_4
 ovat liittyneet yhteen muodostaen noin 3 - 7 hiiliatomia
 sisältävän sykloalkyyli-1,2-diaminoryhmän tai noin 2 - 12
 hiiliatomia sisältävän alkyyli-1,2-diaminoryhmän, ja joka
 30 kompleksi on oleellisesti liukoinen metanoliin tai kloro-
 formiin ja oleellisesti liukenematon veteen, t u n n e t
 t u siitä, että dinitraatto- tai sulfaatto-1,2-diaminoal-
 kaaniplatina(II)kompleksi, jolla on kaava



35

jossa A tarkoittaa sulfaattianionia tai kahta nitraatti-anionia, saatetaan reagoimaan radikaaleja R_1 ja R_2 vastaavien karboksylaattomonoanionien tai, R_1 ja R_2 :n ollessa liittyneinä toisiinsa, vastaavan karboksylaattodianionin
 5 alkalimetalli- tai maa-alkalimetallisuolan kanssa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R_1 ja R_2 ovat kumpikin 6 - 20 hiiliatomia sisältävä alkyylikarboksylaatto, joka edullisesti sisältää haarautuneita ketjuja ja on edullisimmin neodekanaatto, jolla on kaava
 10



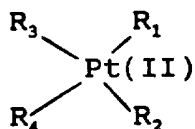
15 jossa R on alkyyli ja R' ja R'' ovat metyyli, etyyli tai propyyli ja niissä olevien hiiliatomien summa on 8.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lähtöaineen platina(II)neli-koordinaattikompleksin valmistuksessa käytetään sulfaatto-
 20 trans-R,R-1,2-diaminoalkaaniplatina(II)kompleksia.

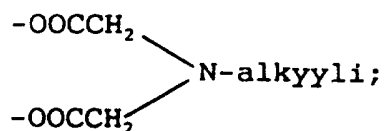
4. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R_3 ja R_4 ovat liittyneet yhteen muodostaen sykloheksyyli-1,2-diaminoryhmän.

Patentkrav

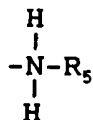
1. Förfarande för framställning av vid antitumör
kemoterapi användbart hydrofobt platina(II)fyrkoordinat-
komplex med formeln



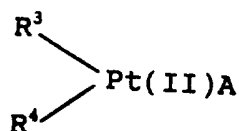
vari R_1 och R_2 vardera betecknar alkylkarboxylato, vari
alkylgruppen är en hydrofob radikal $(CH_2)_n CRR'R''$, vari n är
0 - 8 och R , R' och R'' , vilka kan vara samma eller olika,
betecknar vardera en alkylgrupp, eller R_1 och R_2 är bundna
vid varandra och bildar en karboxylatogrupp, vid vilken en
hydrofob radikal är bunden och vilken har formeln



och R_3 och R_4 vardera betecknar en grupp



vari R_5 är väte, alkyl eller cykloalkyl, eller R_3 och R_4 är
bundna vid varandra och bildar en cykloalkyl-1,2-diamino-
grupp med ca 3 - 7 kolatomer eller en alkyl-1,2-diamino-
grupp med ca 2 - 12 kolatomer, och vilket komplex är vä-
sentligen lösligt i metanol eller kloroform och väsentli-
gen olösligt i vatten, k ä n n e t e c k n a t därav,
att ett dinitrato- eller sulfato-1,2-diaminoalkanplatina-
(II)komplex med formeln



vari A betecknar en sulfatanjon eller två nitratanjoner,
omsätts med ett salt av en alkalimetall eller alkalisk
jordartsmetall med karboxylatanjoner, som motsvarar radi-

kalerna R_1 och R_2 , eller då R_1 och R_2 är bundna vid varandra, med motsvarande karboxylatodianjon.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att R_1 och R_2 vardera är alkyl-
5 karboxylato, som innehåller 6 - 20 kolatomer och som före-
trädesvis innehåller förgrenade kedjor och som mest före-
trädesvis är neodekanato med formeln



vari R är alkyl och R' och R'' är metyl, etyl eller propyl
och summan av kolatomerna i dessa är 8.

15 3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2,
k ä n n e t e c k n a t därav, att man som utgångsmateri-
al vid framställning av platina(II)fyrkoordinatkomplexet
använder ett sulfato-trans- R,R -1,2-diaminoalkanplatina-
(II)komplex.

20 4. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 3,
k ä n n e t e c k n a t därav, att R_3 och R_4 är bundna vid
varandra och bildar en cyklohexyl-1,2-diaminogrupp.