

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A61K 47/48

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98806340.9

[43]公开日 2000 年 7 月 19 日

[11]公开号 CN 1260725A

[22]申请日 1998.5.8 [21]申请号 98806340.9

[30]优先权

[32]1997.5.9 [33]EP [31]97107657.5

[86]国际申请 PCT/EP98/02701 1998.5.8

[87]国际公布 WO98/51349 德 1998.11.19

[85]进入国家阶段日期 1999.12.17

[71]申请人 公众权益基金会德国癌症研究中心

地址 联邦德国海德保

[72]发明人 H·辛恩 H-H·施仁克

W·梅尔-伯斯特 E·弗雷

G·斯泰尔

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 吴亦华

权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 包含叶酸拮抗物和载体的结合物

[57]摘要

本发明涉及包含叶酸拮抗物的 D-对映体及载体的结合物。此外,本发明涉及 这种结合物的制备方法及其用途。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

- 1、包含叶酸拮抗物的 D-对映体及载体的结合物。
- 2、根据权利要求 1 的结合物，其中，叶酸拮抗物包含蝶啶、对氨基苯甲酸和 D-氨基酸衍生物中的一种或多种。
- 3、根据权利要求 2 的结合物，其中，D-氨基酸为谷氨酸。
- 4、根据权利要求 3 的结合物，其中，叶酸拮抗物为 D-氨甲蝶呤或 D-氨蝶呤。
- 5、根据权利要求 1-4 任一项的结合物，其中，结合物具有几种叶酸拮抗物。
- 6、根据权利要求 1-5 任一项的结合物，其中，载体为一种不被看作对身体来说是异物的天然蛋白质或一种聚醚。
- 7、根据权利要求 6 的结合物，其中，蛋白质为血清清蛋白质。
- 8、根据权利要求 6 的结合物，其中，聚醚为聚乙二醇。
- 9、根据权利要求 1-8 任一项的结合物，其中，存在几种载体。
- 10、根据权利要求 1-9 任一项的结合物，其中，在叶酸拮抗物与载体间存在连接物。
- 11、根据权利要求 10 的结合物，其中，连接物可在细胞中裂解。

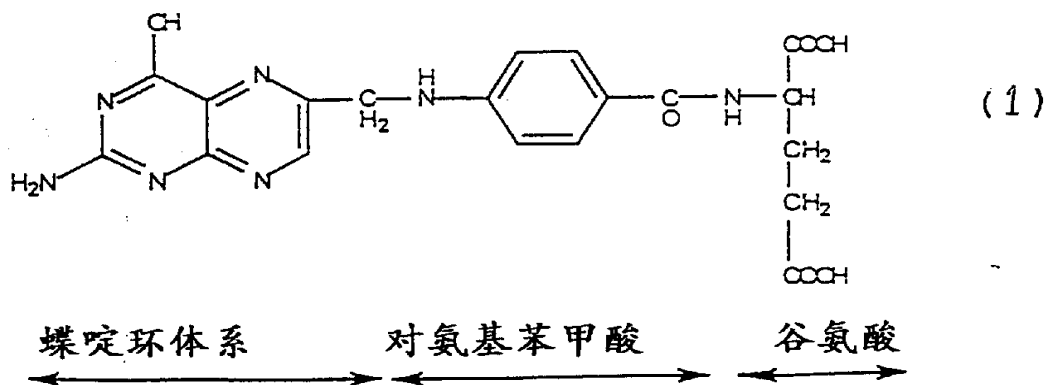
12、根据权利要求 11 的结合物，其中，连接物包含偶氮基团。

13、权利要求 1-12 任一项的结合物的制备方法，其中，将叶酸拮抗物、载体和任选的连接物共价键合。

14、权利要求 1-12 任一项的结合物在治疗肿瘤疾病、炎性疾病和/或自身免疫性疾病中的用途。

包含叶酸拮抗物和载体的结合物

叶酸是一种存在于自然界中的化合物，因其在细胞中可用于甲基转移，所以对于细胞生长非常重要。叶酸具有下述结构式：



但是，在细胞中仅发现这些对映体形式中的 L-对映体，因而，仅仅是这种形式而非 D-对映体具有所述叶酸的作用。其原因在于，叶酸在细胞中是通过叶酸盐受体吸收的，而所述受体仅吸收叶酸的 L-对映体，不吸收其 D-对映体。

叶酸拮抗物为由叶酸衍生出的化合物，其在其靶区域，即在细胞中会对叶酸起拮抗作用。因此，叶酸拮抗物是以 L-对映体存在，而非以 D-对映体存在。

叶酸拮抗物的实例是氨蝶呤和氨甲蝶呤，氨甲蝶呤 (Amethopterin) 也被称为氨甲蝶呤 (Methotrexat)。

氨甲蝶呤即氨甲蝶呤的 L-对映体通常用于治疗肿瘤和炎症。然而,

由于氨甲蝶呤也会被健康组织吸收并对其产生毒性，这成为其主要的副作用。DE-A-41 22 210.5 描述了氨甲蝶呤与清蛋白质的结合物，肿瘤能比健康组织更好地吸收这种结合物，因此毒性相对较小。尽管如此，人们仍希望具有更低副作用的试剂。

因而，本发明的目的是提供一种用于治疗患病组织，特别是肿瘤的试剂，该试剂具有最弱的副作用。

本发明的目的可通过权利要求中所述的主体实现。

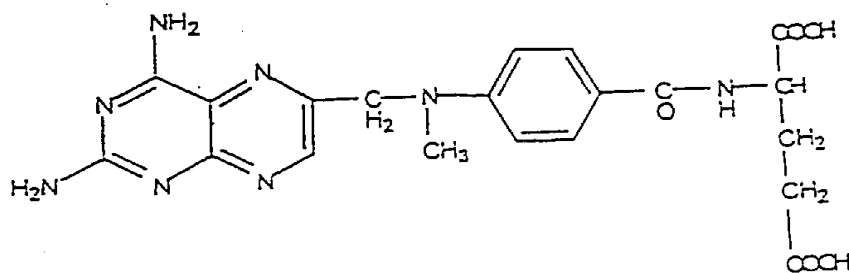
因此，本发明的主题是一种包含叶酸拮抗物的 D-对映体和载体的结合物。

本发明基于发明人的如下发现：在具有载体的结合物中的叶酸拮抗物的 D-对映体首选被患病的组织吸收，特别是被肿瘤吸收，并在其中显示出抗病作用。此外，本申请人认识到，当叶酸拮抗物的 D-对映体单独存在，即不以本发明的结合物存在时，并不会对健康组织有副作用。

术语“结合物”是指，叶酸拮抗物与载体例如通过酰胺和/或酯键和/或通过连接物共价键合。

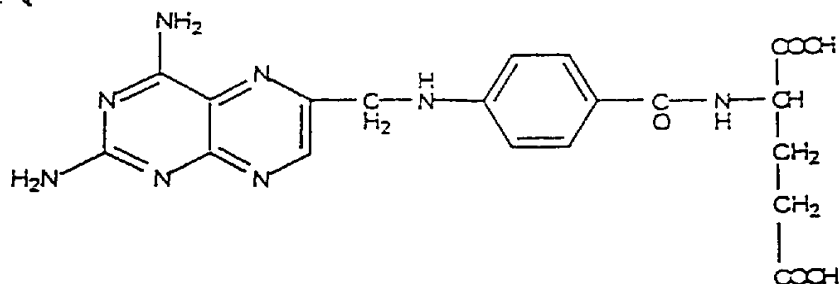
术语“叶酸拮抗物的 D-对映体”包含任何一种从叶酸衍生的化合物，只要其可用作叶酸的拮抗物并以 D-对映体形式存在。作为组分，叶酸拮抗物的 D-对映体包含蝶啶，特别是蝶呤、对氨基苯甲酸和 D-氨基酸，特别是 D-谷氨酸，所述 D-谷氨酸相对于叶酸中存在的组分已化学变化即改性。这种变化例如是取代，例如由 C₁-C₄ 烷基，特别是甲基，卤原子，如 F、Cl、Br、I，OH 和 NH₂ 基团取代 H 原子；由上述烷基，NH₂ 基团，H 和卤素原子取代 OH 基团；以及由上述烷基，OH 基团，H 和卤原子取代 NH₂ 基团。此外，谷氨酸的一个或两个酸基团可以酸衍生物形式存在，例如以酯或酰胺形式存在。一种或多种上述变化可存在于用于本发明的叶酸拮抗物中。

优选地，叶酸拮抗物为 D-氨甲蝶呤(以下称之为 D-氨甲蝶呤)



(2),

D-氨蝶呤



(3)

和 D-e, t-FMTX (一种氨甲蝶呤的类似物, 其中, 谷氨酸 (Glu) 被 D-赤、苏-4-氟-Glu 代替)。

一个或多个叶酸拮抗物可存在于本发明的结合物中。如果存在几种叶酸拮抗物, 那么, 它们相互间可相同或不同。

术语“载体”包含任一种适用于将结合物积聚于患病组织如肿瘤或炎性病灶中的化合物。这种载体的实例为不被看作对身体来说是异物的蛋白质, 和聚醚。

蛋白质优选以天然形式存在。在天然形式中, 蛋白质并不具有任何分子间和/或分子内的交联。有利地, 蛋白质的分子量可高达 100,000 道尔顿, 特别是 30,000 至 100,000 道尔顿。此外, 优选蛋白质为人蛋白质。蛋白质的实例为: 清蛋白质、血纤维蛋白质原、转铁蛋白质、免疫球蛋白和脂蛋白质, 优选人清蛋白质。也可以采用上述蛋白质的片段。此外, 与已知的蛋白质序列和/或其片段相比, 该蛋白质序列和/或其片段可改变一个或多个氨基酸。

聚醚的实例为聚乙二醇, 特别是分子量为 100-20,000 道尔顿的聚乙二醇。优选地, 聚乙二醇在其端部的羟基被 C_1 - C_{12} 烷基, 特别是甲基醚化或酯化。

本发明的结合物可具有一种或多种, 特别是两种上述载体。如果存在多种载体, 则这些载体可相同或不同。如果存在几种聚醚, 选择这

些聚醚以使所有聚醚的分子量为约 20,000 道尔顿或更大是有利的。

在本发明的结合物中，叶酸拮抗物可直接与载体共价键合，或者经连接物进行键合，即连接物存在于载体与叶酸拮抗物之间。所有可连接叶酸拮抗物和载体的化合物均适于作为连接物。

优选地，连接物可在细胞中分裂。术语“细胞”包含单个的细胞和细胞群体。前者的实例为不以群体存在的内原细胞。细胞群体包含组织、器官和肿瘤。

上述类型的连接物是本领域技术人员公知的。本领域技术人员也已知多种因素，例如酶能引起某些化学键在细胞中裂解。因此，本领域技术人员可以构造出可以在细胞中被分裂的连接物。特别优选的是，这种连接物包含偶氮基团。特别优选的连接物具有下述结构：



其中

R 为有机基团，优选芳基，特别优选亚苯基或其衍生物，Y 选自基团 C(O)、S(O)₂、P(O)OH 和 As(O)OH。

优选的连接物的上述结构相应于在本发明结合物中连接物所具有的结构。此外，至少当 R 为亚苯基或其衍生物时，该结构包含一种活性化合物，其特别适用于治疗肿瘤、炎症和自身免疫疾病。在连接物分裂和可能的话仍连接在连接物上的蛋白质降解之后，该化合物显示其完全活性。

本发明的结合物可通过使叶酸拮抗物与载体及任选的连接物共价键合而产生。适宜的方法及必要的材料是本领域技术人员公知的。

当叶酸拮抗物具有至少一个羧基时，例如，通过谷氨酸提供的那些，则结合物可这样制备，通过使叶酸拮抗物与碳化二亚胺及羧基琥珀酰亚胺转化成活性琥珀酰亚氨基酯，再使其与载体反应。在结合物具有几个叶酸拮抗物的时候，琥珀酰亚氨基酯的制备过程可共同进行或分开进行。

叶酸拮抗物与碳化二亚胺和羟基琥珀酰亚胺的转化反应可在极性非质子传递溶剂中进行，优选二甲基甲酰胺(DMF)。叶酸拮抗物:碳化二亚胺:羟基琥珀酰亚胺的摩尔比为约 1:1.5:10。然后，使所形成的琥珀酰亚氨基酯与载体在缓冲水溶液，优选碳酸氢钠水溶液中与载体例如清蛋白质反应。载体浓度为约 10 至 70mg/ml。以这种方式活化的羧基可与载体的 OH 和 NH 基团反应，从而形成酰胺键或酸酯键，获得本发明的结合物。该结合物可纯化几次，例如采用超滤法，最后可进行无菌过滤，从而，使其可备用。

本发明的结合物的特征在于，它们在患者的循环中可保留很长时间。此外，它们会积聚在病变组织中，特别是肿瘤和炎症病灶中。此外，本发明的结合物的特征还在于，它们比起由 DE-A-41 22 210.5 已知的具有 L 叶酸拮抗物的结合物，副作用更小，而它们对患病组织的作用，特别是对肿瘤和炎症病灶的作用得以保持。

因而，本发明的结合物特别适用于治疗肿瘤，如血液肿瘤和实体肿瘤，炎症，如风湿性疾病，如慢性多关节炎、牛皮癣和自身免疫性疾病。

通过下述实施例说明本发明。

实施例 1: 本发明的 D-氨甲蝶呤和人血清清蛋白质的结合物的制备

将 D-氨甲蝶呤(D-MTX)溶解于 DMF 中，使其浓度为 20mg/ml。向澄清的黄色溶液中加入 1.5 倍摩尔量的二环己基碳化二亚胺和约 10 倍摩尔量的羟基琥珀酰亚胺。在反应约 12 小时后，完成向琥珀酰亚氨基酯(D-MTX-HSIE)的转化并可通过二环己基脲(DCH)的结晶沉淀量来进行确认。反应的分析监控借助于 TLC 进行。

板: 硅胶 60, 具有荧光指示剂;

展开剂: 乙酸乙酯/甲醇: 75/25

R_f 值: D-MTX 0.0

D-MTX-HSIE 0.35-0.38

将于 DMF 中的 D-MTX-HSIE 的澄清黄色溶液在平稳搅拌下，缓慢地加至蛋白质溶液(50-70mg 人血清清蛋白质，于 0.17M 碳酸氢钠中，pH8.5)中，在一段时间后，形成由未反应的二环己基碳化二亚胺与仍然溶解于 DMF 中的 DCH 组成的混浊物。在反应至少 30 分钟后，通过无菌过滤器(0.22 μ m)分离混浊物，通过超滤法分离 DMF，采用适宜的膜滤器(YM30; Amicon)。

采用 HPLC 进行纯度监控：

预柱： 50 × 4mm Zorbax Diol

柱： 第一柱，Zorbax GF 450

第二柱，Zorbax GF 250

洗脱剂： 0.2M 磷酸盐缓冲液，pH7.4

流速： 1.0ml/分钟

压力： 约 65 巴

获得本发明的 D-氨甲蝶呤与人血清清蛋白质的结合物。

实施例 2：本发明的 D-氨甲蝶呤与人血清清蛋白质的结合物和氨甲蝶呤与人血清清蛋白质结合物的毒性比较

该实验中，采用实施例 1 制备的本发明的 D-氨甲蝶呤与人血清清蛋白质的结合物(D-MTX-HSA)。此外，采用 DE-A-41 22 210.5 所述的氨甲蝶呤与人血清清蛋白质的结合物(MTX-HSA)。

每 5 只健康的 Sprague-Dawley 大鼠各接受 D-MTX-HSA 或 MTX-HSA。在每种情形下，以 2 天间隔注射 4mg 的结合物(基于结合物的 MTX 或 D-MTX 的量)/kg 体重。

结果示于表 1。

表 1

	剂量/kg	MI	DI	SC	WL	死亡
MTX-HSA	2 × 4mg	5	5	5	5	5
D-MTX-HSA	2 × 4mg	0	0	0	0	0

简写：MI：粘膜发炎；DI：腹泻；SC：shaggy coat；WL：减重

从表 1 结果看出，在给药 MTX-HSA 第 3 天起大鼠就产生强烈的副作用。在第 4 天，发现两只大鼠死亡。其它 3 只大鼠因必须忍受强烈的副作用而不得不对其施以安乐死。与此相对照，用本发明的结合物 D-MTX-HSA 给药的大鼠没有产生副作用。

因此，本发明的结合物具有很小的副作用。

实施例 3：本发明的 D-氨甲蝶呤与人血清清蛋白质的结合物和氨甲蝶呤与人血清清蛋白质结合物在治疗肿瘤方面的比较

该实验采用实施例 2 给出的结合物。采用 Walker-256 带癌肉瘤的大鼠。在肿瘤体积为 1000 至 2500mm³ (肿瘤直径 1 × 1 至 1 × 2cm) 的肿瘤移植后第 6 天开始进行治疗。5 只大鼠接受 MTX-HSA (以 2 天的间隔注射 3 次，剂量为 2mg MTX-HSA (以 MTX 量计)/kg 体重)。本发明的 D-MTX-HSA 结合物根据上述模式以双倍的剂量给药。采用这种剂量，MTX-HSA 已显示出显著的副作用，而本发明的结合物 D-MTX-HSA 则没有副作用 (比较实施例 2)。

结果示于表 2。

表 2

采用结合物 MTX-HSA 及本发明的结合物 D-MTX-HSA 治疗肿瘤的结果

	剂量/kg	缓解	复发	SE	死亡
MTX-HSA	3 × 2mg	3	2	3	2
D-MTX-HSA	3 × 4mg	5	0	0	0

简写：SE-副作用；死亡：由肿瘤复发致死

表 2 的结果表明，在 MTX-HSA 组 3 支大鼠肿瘤退化(缓解)。在该组中，2 支大鼠复发，不得不施以安乐死。在 3 支大鼠中显示出副作用。与此相对照，采用本发明的结合物 D-MTX-HSA 治疗的大鼠中，所有大鼠的肿瘤均治愈，并且，尽管采用了与 MTX-HSA 组相比双倍的剂量，但未观察到副作用。

因此，本发明结合物具有最弱的副作用，从而，采用这些结合物可达到优异的肿瘤治疗效果。