(19)

SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 940733 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 940733

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
A61K 47/48
C07D305/14

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **07.06.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **16.02.1994**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **16.02.1994**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **07.06.1993 PCT/EP1993/001433**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

19.06.1992 GB 9213077

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Pharmacia & Upjohn S. p.A.,** Via Robert Koch, 1.2., 20152 Milano, ITALIA, (IT)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Mongelli, Nicola,** Milano, ITALIA, (IT)
2 • **Angelucci, Francesco,** Milano, ITALIA, (IT)
3 • **Pesenti, Enrico,** Italia, ITALIA, (IT)
4 • **Suarato, Antonino,** Milano, ITALIA, (IT)
5 • **Biasoli, Giovanni,** Italy, ITALIA, (IT)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab, Iso Roobertinkatu 4 - 6 A, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Polymeerisitoutuneet paklitakselijohdannaiset

Polymerbundna paklitaxelderivat

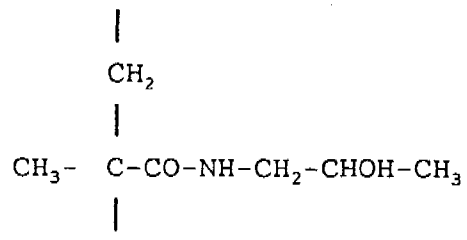
Polymeerisitoutuneet paklitakselijohdannaiset

Keksintö koskee polymeerisitoutunutta paklitakselia (paclitaxel) ja polymeerisitoutuneita paklitakselijohdannaisia, joilla on kasvaimia estävä aktiivisuus, menetelmää niiden valmistamiseksi ja niitä sisältäviä farmaseuttisia koostumuksia.

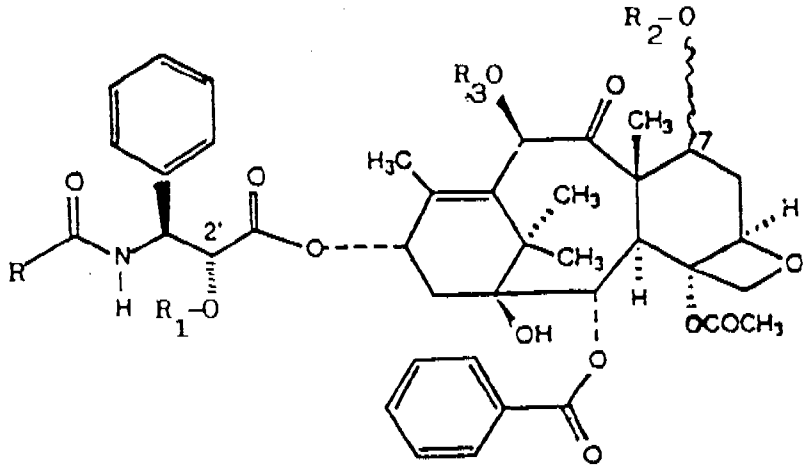
Paklitakseli (useissa julkaisuissa myös nimellä taksoli) on diterpeenien taksaaniperheen jäsen, joka on eristetty ja karakterisoitu *Taxus brevifolia L.*:n kaarnauutteesta, tunnetaan myös muita paklitakselianalogeja ja ne on valmistettu puolisynteettisesti lähtemällä 10-deasetyylibaccatin III:sta, joka on uutettu *Taxus baccata L.*:n neulasista, katso Wain *et al.*, JACS, 93, 2325 (1971) ja Lovelle *et al.*, Proc.Am.Assoc.Cancer Res., 31, s. 417 (1990). Näiden yhdisteiden on osoitettu omaavan tehokkaan kasvaimia estävän aktiivisuuden mutta ne ovat erittäin huonosti veteen liukenevia ja niiden annostamiseen injektiolla tai intravenoosilla infuusiolla käytettäessä kantoaineena *Cremofor EL*:ää (TM) liittyy myös eräitä myrkyllisiä sivuvaikutuksia.

Keksintö koskee kaavan I mukaista polymeerikonjugaattia, joka koostuu pääasiallisesti:

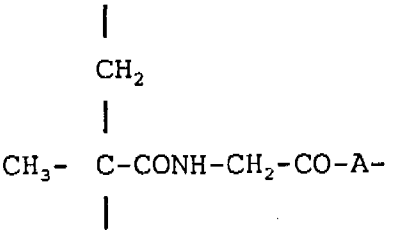
90-99,9 mooliprosenttisesti yksiköistä, joilla on kaava:



0,1-5 mooliprosenttisesti yksiköistä, joita kuvaa kaava

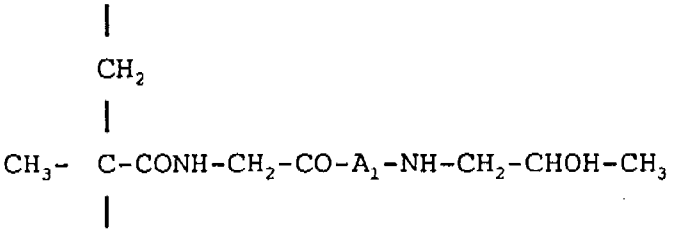


jossa toinen ryhmistä R_1 ja R_2 on kopolymeeritähde, jonka kaava on



ja toinen on vetyatomi,

0-9,9 mooliprosenttisesti yksiköistä, joilla on kaava



jossa R on fenyyli tai tert.-butoksiryhmä, R_3 on H tai asetyyliryhmä ja A ja A_1, jotka voivat olla samanlaiset tai erilaiset, tarkoittavat yksinkertaista kemiallista sidosta, aminohappotähdettä tai peptidiväliryhmää, joka on βAla, Gly, Phe-Gly, Phe-Phe-, Leu-Gly, Val-Ala, Phe-Ala, Leu-Phe, Leu-Ala, Phe-Leu-Gly, Phe-Phe-Leu, Leu-Leu-Gly, Phe-Tyr-Ala, Phe-Gly-Phe, Phe-Phe-Gly, Phe-Leu-Gly-Phe, Gly-Phe-Leu-Gly-Phe, Gly-βAla, Phe-Gly-βAla, Phe-Phe-βAla, Leu-Gly-βAla, Val-Ala-βAla, Phe-Ala-βAla, Leu-

Phe-βAla, Leu-Gly-βAla, Phe-Leu-Gly-βAla, Phe-Phe-Leu-βAla, Leu-Leu-Gly-βAla, Phe-Tyr-Ala-βAla, Phe-Gly-Phe-β, Phe-Phe-Gly-βAla, Phe-Leu-Gly-Phe-βAla tai Gly-Phe-Leu-Gly-Phe-βAla.

Vielä erityisemmin keksintö koskee paklitakselin ja paklitakselijohdannaisten polymeerisia konjugaatteja, joilla on parannettu liukoisuus veteen ja alentunut myrkyllisyys.

Mieluimmin yksiköiden, jotka sisältävät paklitakselia ja paklitakselijohdannaisia, mooliprosentti on 0,5 - 2, vielä mieluummin paklitakselipitoisuus polymeerissä on 2 - 10 % (paino/paino), kaikkein edullisimpia ovat yhdisteet, joissa pitoisuus on 4 - 7 % (paino/paino). Aaltoviiva tarkoittaa, että happi, joka sitoutuu paklitakselirakenteen asemaan 7, voi olla molemmissa konfiguraatioissa, t.s. β (luonnolllinen) tai α.

Mieluimmin R tarkoittaa fenyyliryhmää, R_3 on asetyyliryhmä ja A on Phe-Leu-Gly- tai Phe-Leu-Gly-βAla-tähde. Kaikilla aminohappotähteillä on luonnollinen L-konfiguraatio. Edullisen suoritusmuodon mukaan polymeerikonjugaatti on 1-metakryloyyliamino-2-hydroksipropaanin, (metakryloyyli-glysyyli-fenyylialanyyli-leusyyli-glysyyli)-3-amino-2-hydroksipropaanin ja 2'-(metakryloyyli-glysyyli-fenyyli-alanyyli-leusyyli-glysyyli-β-alanyyli)paklitakselin kopolymeeri.

Prosenttipitoisuus (paino/paino) määritettiin entsymaattisen hydrolyysin jälkeen HPLC-menetelmällä analogisesti julkaisussa Cancer Treatment Rep. 71 (1), s. 53-59, esitetyn kanssa.

Entsymaattinen hydrolyysi

1 ml:aan hiiren tai ihmisen plasmaa lisättiin erilaiset konsentraatiot polymeerisitoutunutta paklitakselia ja so-

pivan ajan (24, 48, 72, 96 tuntia) kuluttua kerättiin 100 µl ja varastoitiin -70 °C:ssa kunnes käsittelyä jatkettiin.

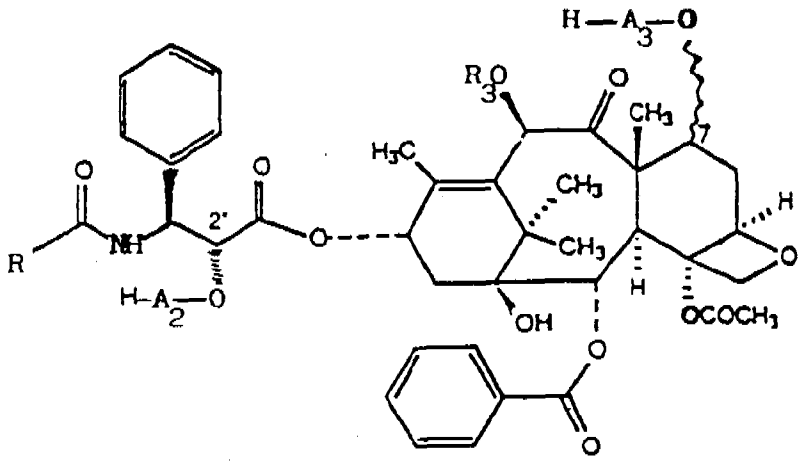
Uuttomenetelmä

Näytteet uutettiin lisäämällä 75 µl 0,5 M tetra-butyyliammoniumfosfaattia (TBAP), 1250 µl CH_3CN:ää ja 150 µl 5 M NaCl:ää ja ravistettiin voimakkaasti 20 minuuttia 4 °C:ssa. Sen jälkeen näytteet sentrifugoitiin 15 000 x g 10 minuuttia ja supernatantit kerättiin ja haihdutettiin käyttäen suurtyhjösentrifuugia. Näytteet otettiin talteen lisäämällä 500 µl MeOH:H_2O-seosta (75:25, til./til.) ja injektoitiin HPLC:hen paklitakselin kokonaispitoisuusprosentin laskemiseksi.

HPLC-systeemi

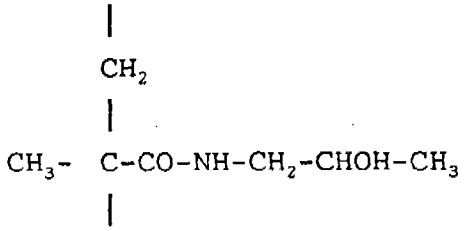
Kolonni:	*Nova Pak* C_{18} (Waters) 3,9 x 300 mm
Virtausnopeus:	1,5 ml/min
Detektori:	UV 231 nm
Injektio:	20 µl
Liikkuva faasi:	57,5 % H_2O, jonka pH 2
	42,5 % CH_3CN

Keksintö koskee myös menetelmää polymeerikonjugaatin valmistamiseksi, jossa menetelmässä kaavan II mukainen yhdiste

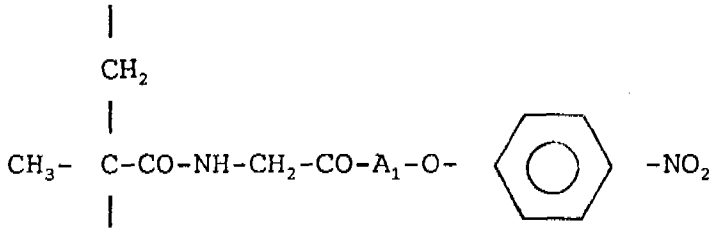


(II)

jossa toinen ryhmistä A_2 ja A_3 on kemiallinen sidos ja toinen on A, ja A, R ja R_3 tarkoittavat samaa kuin edellä, saatetaan reagoimaan aktivoidun polymeerin kanssa, joka koostuu ensi sijassa 90-99,9 mooliprosenttisesti yksiköistä, joilla on kaava:



ja 10-0,1 mooliprosenttisesti yksiköistä, joilla on kaava



jossa A_1 tarkoittaa samaa kuin edellä, ja sen jälkeen muodostunut polymeerikonjugaatti käsitellään 2-hydroksipropyyliamiinilla.

Reaktio kaavan II mukaisten yhdisteiden ja aktivoidun polymeerin välillä suoritetaan mieluimmin vedettömässä, polaarisessa orgaanisessa liuottimessa, kuten dimetyylisulfoksidissa tai dimetyyliformamidissa, mukana käytetään mahdollisesti orgaanista tai epäorgaanista emästä, kuten alkalista karbonaattia, dimetyyliaminopyridiiniä tai tri-

etyyliamiinia. Reaktio voi tavallisesti kestää 1 - 24 tuntia.

Reaktio suoritetaan tavan mukaan lämpötilassa, joka on 15 °C:sta 40 °C:seen, mieluimmin huoneen lämpötilassa. Alkalinen karbonaatti on esimerkiksi alkalimetallikarbonaatti tai maa-alkalimetallikarbonaatti.

Jotkut kaavan II mukaisista lähtöaineista ovat tunnettuja yhdisteitä, kuten paklitakseli tai paklitakselianalogit, tai ne voidaan valmistaa lähtemällä tunnetuista yhdisteistä.

Esimerkiksi 7-*epi*-johdannaiset voidaan valmistaa keittämällä palautusjäähdyttäen tolueenissa paklitakselia tai sen analogeja emäksen (Na_2CO_3:n tai diatsabisykloundekeenin) läsnäollessa.

Toiset kaavan II mukaiset yhdisteet ovat uusia, erityisesti sellaiset, joissa A_3 on βAla-tähde, ja sellaiset, joissa joko A_2 tai A_3 tarkoittaa edellä tähteelle A määriteltyä di-, tri- tai tetra-peptidiväliryhmää, ja kuuluvat keksinnön piiriin.

Kaavan II mukaiset yhdisteet, joissa A_2 ei ole yksinkertainen kemiallinen sidos, voidaan valmistaa saattamalla paklitakseli tai paklitakselianalogi reagoimaan suojatun aminohapon tai peptidin kanssa kondensaatioreagenssin läsnäollessa ja mukana käytetään lisäksi katalyyttiä tai reaktio suoritetaan ilman sitä, mieluimmin huoneen lämpötilassa, jonka jälkeen suojaryhmä poistetaan tunnetuilla menetelmillä.

Kondensaatio voidaan suorittaa myös käyttämällä aktivoituja estereitä, kuten peptidin tai aminohapon *para*-nitrofenyyliesteriä. Sopivia kondensaatioreagensseja ovat karbodi-imidit, kuten disykloheksyylikarbodi-imidi (DCC).

Sopivia katalyyttejä ovat 4-dimetyyliaminopyridiini (DMAP), pyridiini tai trietyyliamiini.

Voidaan käyttää erilaisia tunnettuja aminosuojaryhmiä ja lähtöaineina voidaan käyttää kaupallisesti saatavissa olevaa suojattua aminohappoa tai peptidejä. Voidaan käyttää aminohappoja tai peptidejä, jotka on suojattu *t*-BOC:llä, trityylillä, FMOC:llä tai karbobentsyylioksilla (CBZ). Edullisia ovat aminohappo tai peptidit, jotka on suojattu *t*-BOC-, trityyli- tai FMOC-ryhmillä.

Kaavan II mukaiset yhdisteet, joissa A_3 ei ole yksinkertainen kemiallinen sidos, voidaan valmistaa suojaamalla tai blokkaamalla 2'-hydroksiryhmä, jonka jälkeen 7-asemassa oleva hydroksyyli esteröidään ja sitten poistetaan 2'-suoja- tai blokkaava ryhmä.

Vielä mieluummin kaavan II mukaiset yhdisteet, joissa A_3 on Gly- tai βAla-tähde, valmistetaan saattamalla paklitakseli reagoimaan 2-3 ekvivalentin kanssa N-suojattua aminohappoa 2',7-disubstituoidun paklitakselin tuottamiseksi, jonka jälkeen 2'-asemassa oleva aminohappo lohkaistaan pois ja sitten poistetaan suojaus 7-asemassa olevasta aminohaposta.

Reaktio paklitakselin ja suojatun aminohapon välillä suoritetaan käyttäen mukana kondensaatioainetta ja katalyyttiä, kuten edellä määriteltyjä.

2'-aminohapon poislohkaisu suoritetaan säätämällä 2',7-(aminohappo)paklitakseliliuoksen pH arvoon 7-7,4, esimerkiksi sekoittamalla 2',7-di(aminohappo)paklitakseli fosfaattipuskuriin pH-arvossa 7-7,4 tai käyttäen hiukan ylimäärin $NaHCO_3$:a.

Aminohapon suojauksen poistaminen tapahtuu tunnetulla aminohapon suojauksen poistomenetelmällä, kuten lievällä

happokäsittelyllä, esimerkiksi etikkahapolla, tai pelkistäen.

Näin esimerkiksi paklitakselin annetaan reagoida 2-3 mooliekvivalentin kanssa N-suojattua aminohappoa (*t.*-BOC-, CBZ- tai FMOC-suojattu) metyleenikloridissa DCC:n ja katalyyttisen määrän 4-dimetyyliaminopyridiiniä läsnäollessa. Tällä tavalla suojattu aminohappo liitetään 2'- ja 7-asemaan. Paklitakselin 2',7-bis-aminohappojohdannaisen annetaan seistä $NaHCO_3$:n läsnäollessa H_2O/MeOH-seoksessa 2-5 tuntia, jolloin selektiivinen suojauksen poisto 2'-asemasta tapahtuu ja saadaan paklitakselin 7-substituoitu johdannainen. Suojaryhmät poistetaan sopivalla suojauksen poistoaineella (esim. hapolla, heikolla emäksellä tai hydraamalla).

Aktivoitu polymeeri on synteettinen, vesiliukoinen polymeeri, joka valmistetaan kopolymeroimalla N'-(2-hydroksipropyyli)metakryyliamidi N-metakryloyyli-oligopeptidien p-nitrofenyyliestereiden kanssa, kuten kuvataan julkaisuissa US-A-4062831 ja US-A-4097470.

Kaavan I mukaisilla polymeerikonjugaateilla ja kaavan II mukaisilla uusilla paklitakselijohdannaisilla on hyvä liukoisuus veteen, bioyhteensopivuus ja paklitakseli tai paklitakselijohdannainen vapautuu niistä plasmaan tai soluihin tunkeutumisen jälkeen oligopeptidivälіryhmien lohkeamisella.

Biologinen aktiivisuus

Mikrotubuliinin yhteenkerääntymis- ja hajoamiskoe

Vasikanaivotubuliini valmistettiin kerääntymis-hajoamismenetelmän kahdella syklillä (Shelanski M.L., Gaskin F. ja Cantor C.R., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 70, 765-768, 1973) ja varastoitiin nestemäisessä typessä MAB:ssä (0,1 M MES, 2,5 mM EGTA, 0,5 mM $MgSO_4$, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, pH 6,4).

Kaikki kokeet suoritettiin proteiinilla, jota oli varastoitu alle 4 viikkoa.

Ennen jokaista koetta tubuliinia pidettiin 30 minuuttia 4 °C:ssa.

Yhteenkerääntymistä seurattiin menetelmällä, jonka ovat esittäneet Gaskin *et al.* (Gaskin F., Cantor C.R., Shelanski M.L., J.Molec.Biol. 89, 737-758, 1974). Kyvetti (sivu 1 cm), joka sisälsi tubuliinia (1 mg/ml) ja 1 mM GTP:tä, siirrettiin 37 °C:seen ja suoritettiin jatkuvat sameusmittaukset aallonpituudella 340 nm käyttäen *Perkin-Elmer 557 Double Wavelength Double Beam*-spektrofotometriä, joka oli varustettu automaattisella rekisteröintilaitteella ja termostaattisesti säädetyllä näytekammiolla.

30 minuutin kuluttua lisättiin 4 mM $CaCl_2$:ta ja depolymeroitumista mitattiin 10 minuutin ajan vähentyneenä sameutena. Säännöllisin, 15 minuutin väliajoin testattavien yhdisteiden mitatut annokset lisättiin ja muutokset sameudessa todettiin. Tulokset on ilmoitettu uudelleenpolymeroitumisprosenttina, jonka testattavat yhdisteet aikaansaivat. Tulokset on esitetty taulukossa I.

Lääkkeen herkkyyskoe *in vitro*

Eksponentiaalisesti kasvavat *B16-F10*-hiiren melanoomasolut ympättiin 24-koloisiin levyihin (Costar) ($2x10^4$/ml) *RPMI 1649*-kasvatusalustaan, johon oli lisätty 10 % lämpöinaktivoitua vasikan sikiöseerumia ja 2 mM glutamiinia. Testattavien yhdisteiden mitatut konsentraatiot lisättiin välittömästi ymppäyksen jälkeen. Solun kasvun estyminen arvioitiin laskemalla solut *Coulter counter*-laitteella 72 tuntia inkuboinnin jälkeen. Jokaista testattavan yhdisteen konsentraatiota kohti käytettiin kolme rinnakkaista viljelmää. Testattavien yhdisteiden monistumista estävä aktiivisuus (antiproliferative activity) laskettiin annos-vastaavuus-käyrästä ja ilmoitettiin IC_{50}-arvona (annos, joka aiheuttaa 50%:isen inhibition solun kasvussa käsitellyissä viljelmissä suhteessa käsittelemättömiin kontrolleihin). Tulokset on esitetty taulukossa I.

Taulukko I

Yhdiste valmistettu	Tubuliinikeräytymis- %		IC_{50} (µM)
	0,5 µM	5 µM	
Esimerkissä 1	0	15	19
Esimerkissä 9	79	145	47
Esimerkissä 3	46	86	23
Esimerkissä 4	0	10	11
Esimerkissä 6	0	10	51
Vertailuyhdiste: Paklitakseli	41	96	39

Esimerkissä 6 valmistettu kopolymeeri-paklitakseli testattiin *in vivo B16-F10*-hiiren melanoomaa vastaan verrattuna paklitakselia.

Hiiret

C57B16-naarashiiret saatiin Charles River'ilta, Italiasta. Eläimet olivat 8-10 viikon ikäisiä kokeen alkaessa.

Lääkeaineet

Rajoittuneen vesiliukoisuutensa vuoksi paklitakseli liuotettiin kantoaineeseen, jossa oli 50 % polyoksityloitua risiiniöljyä (*Cremophor EL*) ja 50 % etanolia, jonka jälkeen laimennettiin 5%:isella glukoosiliuoksella haluttuihin konsentraatioihin. Liuos on hiukan samea ja lyhyen ajan kuluttua havaittiin saostumista.

Esimerkin 6 yhdiste liukeni helposti 5%:iseen glukoosiin ja muodostunut liuos oli kirkas pitkän aikaa (yli 2 tuntia). Lopulliset konsentraatiot olivat suhteessa yhdisteen paklitakselipitoisuuteen (4 % kaikesta).

Kasvain

Käytettiin hiiren melanomaa *B16F10*. Suspensio, jossa oli 10^5 kasvainsolua 0,2 ml:ssa, injektoitiin subkutaanisesti hiirten kylkeen.

Kasvaimen koko mitattiin tulkilla ja kasvaimen paino laskettiin kaavalla:

$$\frac{a^2 + b}{2}$$

Lääkkeiden annostaminen

Paklitakseli annettiin intraperitoneaalisesti sen huonosta liukoisuudesta ja kantoaineen myrkyllisyydestä johtuen.

Esimerkin 6 yhdiste injektoitiin intravenoosisti. Molempia yhdisteitä annostettiin päivinä 1., 5. ja 9. kasvaimen siirrostamisen jälkeen.

Taulukossa 2 esitetyt tulokset osoittavat, että keksinnön mukainen yhdiste on aktiivisempi kuin paklitakseli.

Polymeerikonjugaatin annos on suhteessa paklitakaselipitoisuuteen.

Taulukko 2

Yhdiste	Annos (mg/kg)	Kasvain-inhibitio (%)	Myrkyllisyys
Kontrolli	-	-	-
Paklitakseli	14,6	53	0/10
	22	38	0/10
	33	92	1/7
Esim.6 yhdiste	14,6	77	0/9
	22	79	0/10

Myrkyllisyys: myrkytykseen kuolleiden hiirien lukumäärä.

Myrkyllisyys-määritys tehtiin silloin, kun hiiret kuolivat ennen kontrollia tai kun havaittiin merkittävä painon alentuminen ja/tai pernan ja/tai maksan koon pienenemi-nen.

Edellä esitetyistä tuloksista voidaan nähdä, että keksinnön mukaisilla polymeerikonjugaateilla on erinomainen kasvaimia estävä aktiivisuus. Tästä syystä nämä yhdisteet ovat käyttökelpoisia kasvaimia estävinä aineina, johtuen alhaisemmasta myrkyllisyydestä ja lisääntyneestä vesiliu-

koisuudesta verrattuna paklitakseliin tai sen johdannaiseen. Esimerkkejä kasvaimista, joita voidaan hoitaa, ovat esimerkiksi sarkoomat, syöpä, lymfoomat, neuroblastoomat, melanooma, myelooma, Wilms'in kasvain, leukemiat ja rauhassyöpä.

Keksinnön mukaisten polymeerikonjugaattien parantunut liukoisuus ja alentunut myrkyllisyys merkitsevät sitä, että ne ovat sopiva intravenoosiin injektioon tai infuusioon. Annos riippuu potilaan iästä, painosta ja vasteesta. Annos voi olla 1 mg:sta/painokilo 1 g:aan/painokilo, mieluimmin se on 4-800 mg/painokilo. Tyypilliset valmisteet sisältävät polymeerisitoutunutta paklitakselia/polymeerisitoutunutta paklitakselijohdannaista määrän, joka vastaa 0,5, 1,5, 10, 20, 25 tai 50 mg:aa aktiivista paklitakselia/paklitakselijohdannaista.

Polymeerikonjugaatit voidaan valmistaa kuten farmaseuttiset koostumukset yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän kantoaineen tai laimennusaineen kanssa. Mitä tahansa sopivaa kantoainetta tai laimennusainetta voidaan käyttää. Liuokset intravenoosiin injektioon tai infuusioon voivat sisältää kantoaineena tai laimennusaineena esimerkiksi steriiliä vettä, tai mieluimmin ne voivat olla steriilien, vesipitoisten tai isotonisten suolaliuosten muodossa.

Seuraavat esimerkit kuvaavat keksintöä.

Esimerkki 1

1-metakryloyyliamino-2-hydroksipropaanin, 1-(metakryloyyli-glysyyli-fenyylialanyyli-leusyyli-glysyyli)amino-2-hydroksipropaanin ja 2'-(metakryloyyli-glysyyli-fenyylialanyyli-leusyyli-glysyyli)paklitakselin kopolymeeri

Liuokseen, jossa oli 1,4 g 1-metakryloyyliamino-2-hydroksipropaanin ja N-(metyleenikarbonyyli-Phe-Leu-Gly-4-nit-

rofenoksi)metakryyliamidin kopolymeeria, joka valmistettiin julkaisun J.Kopecek *et al.*, Makromol.Chem. 177, s. 2833 (1976) mukaisesti, 15 ml:ssa vedetöntä dimetyyliformamidia, lisättiin 100 mg paklitakselia ja 15 mg dimetyyliaminopyridiiniä. Keltaista liuosta sekoitettiin 8 tuntia huoneen lämpötilassa vedettömissä olosuhteissa. Sen jälkeen reaktioastiaan lisättiin tipoittain 2-hydroksipropyyliamiinia (0,2 ml) ja sen jälkeen koko seosta sekoitettiin 30 minuutin ajan. Reaktioliuos sammutettiin 0,3 ml:lla jääetikkaa, konsentroitiin tyhjössä pieneen tilavuuteen, jonka jälkeen se kaadettiin 200 ml:aan asetonia. Sekoitettiin 30 minuuttia, jonka jälkeen sakka suodatettiin ja pestiin asetonilla, saatiin 1,25 g otsikossa mainittua yhdistettä. Paklitakseli-pitoisuus oli 4,5 % (arvioitu entsymaattisella hydrolyysi- ja HPLC-analyysillä). Reagoimaton paklitakseli otettiin talteen asetoniliuoksesta.

Esimerkki 2

2'-(N-trityyli-fenyylialanyyli-leusyyli-glysyyli)paklitakseli

Liuokseen, jossa oli 170 mg paklitakselia 16 ml:ssa asetonitriiliä, lisättiin 24 mg dimetyyliaminopyridiiniä ja 150 mg N-trityyli-fenyylialanyyli-leusyyli-glysiini-4-nitrofenyyliesteriä. Keltaista liuosta sekoitettiin 20 tuntia huoneen lämpötilassa, jonka jälkeen se haihdutettiin tyhjössä kuiviin. Jäännös kromatografoitiin piihappogeelillä eluointiaineena etyyliasetaatin ja heksaanin 35:25-seos, saatiin 380 mg otsikossa mainittua yhdistettä.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0,82 (d,J=6,4 Hz,3H,δ-Leu), 0,85 (d,J=6,7 Hz,3H,δ-Leu), 1,15 (s,3H,16), 1,26 (s,3H, 17), 1,2-1,6 (m,3H,β+β+γ-Leu), 1,69 (s,3H,19), 1,85 (s, 1H,OH-1), 1,89 (m,1H,6β), 1,96 (d,J=1,2 Hz,3H,18), 2,14 (dd,J=5,9 Hz,J=13,5 Hz,1H,β-Phe), 2,24 (s,3H,CH_3C-10), 2,2-2,7 (m,5H,CH_2-14+OH-7+6α+βPhe+NH-Phe), 2,47 (s,3H,

CH_3CO-4), 3,50 (m,1H,α-Phe), 3,74 (dd,J=4,7 Hz,J=18,2 Hz, 1H,α-Gly), 3,80 (m,1H,α-Leu), 3,83 (d,J=7,0 Hz,1H,3), 4,17 (dd,J=7,0 Hz,J=18,2 Hz,1H,α'-Gly), 4,22, 4,33 (kaksi d:tä,J=8,5 Hz,2H,CH_2-20), 4,46 (m,1H,7), 4,97 (dd,J=2,2 Hz,J=9,9 Hz,1H,5), 5,44 (d,J=2,3 Hz,1H,2'), 5,71 (d,J=7,0 Hz,1H,2), 5,97 (dd, J=4,7 Hz,J=7,0 Hz,1H,NH-Gly), 6,07 (dd,J=2,3 Hz,J=9,4 Hz,1H,3'), 6,2-6,3 (m,2H,13+10), 6,8-9,2 (m,30H,6-Ph), 6,95 (d,J=6,7 Hz,1H,NH-Leu), 8,00 (d, J=9,4 Hz,1H,NH-4').

Esimerkki 3

2'-(fenyylialanyyli-leusyyli-glysyyli)paklitakseli

Yhdiste 2'-(N-Trit-Phe-Leu-Gly)paklitakseli (250 mg) liuotettiin seokseen, jossa oli jääetikkaa (22 ml) ja vettä (6 ml), ja koko liuosta sekoitettiin 1 tunti huoneen lämpötilassa. Liuottimet haihdutettiin tyhjössä kuiviin, jäännöstä sekoitettiin dietyylieetterin ja heksaanin 1:1-seoksen kanssa 30 minuuttia ja suodatettiin, saatiin 160 mg otsikossa mainittua yhdistettä.

FAB-MS: m/z 1171 $[M+H]^+$, 1112 M-CH_3COOH + 2H, 1051, 1024, 911, 603, 569, 509.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$):δ 0,88 (d,J=6,4 Hz,3H,δLeu), 0,92 (d=6,4 Hz,3H,δ'Leu), 1,13 (s,3H,16), 1,16 (s,3H,17) 1,4-2,0 (m,4H,β+β'+γLeu+6β), 1,69 (s,3H,19), 1,91 (d,J=1,2 Hz,3H,18),2,16 (dd,J=6,0 Hz,J=13,8 Hz,1H,14), 2,23 (s,3H, $COCH_3$-10), 2,4-2,6 (m,3H,6α+14+βPhe), 2,53 (s,3H,$COCH_3$-4), 2,90 (dd,J=4,1 Hz,J=13,5 Hz,1H,β'-Phe), 3,49 (dd,J=4,1 Hz,J=9,1 Hz,1H,αPhe), 3,82 (d,J=7,3 Hz,1H,3), 3,9-4,1 (m, 2H,α+α'Gly), 4,22, 4,33 (kaksi d:tä,J=8,7 Hz,2H,CH_2-20), 4,27 (m,1H,α-Leu), 4,44 (dd,J=6,4 Hz,J=10,8 Hz,7), 4,98 (dd,J=2,4 Hz,J=9,7 Hz,5), 5,61 (d,J=3,2 Hz,1H,2'), 5,70 (d,J=7,3 Hz,1H,2), 6,12 (dd,J=3,2 Hz,J=9,4 Hz,1H,3'), 6,21 (m,1H,13), 6,28 (s,1H,10), 6,8-8,2 (m,21H,4-Ph+NH-Leu), 7,87 (d,J=9,4 Hz,1H,NH-4').

Esimerkki 4

1-metakryloyyliamino-2-hydroksipropaanin, 1-(metakryloyyli-glysyyli)amino-2-hydroksipropaanin ja 2'-(metakryloyyli-glysyyli-fenyylialanyyli-leusyyli-glysyyli)paklitakselin kopolymeeri

Liuokseen, jossa oli 1 g 1-metakryloyyliamino-2-hydroksipropaanin ja N-(metyleenikarbonyyli-4-nitrofenoksi)metakryyliamidin kopolymeeria, joka oli valmistettu julkaisun P.Rejmanova *et al.*, Makromol.Chem. 178, s. 2159-2168, mukaisesti, 10 ml:ssa vedetöntä dimetyyliformamidia, lisättiin 100 mg 2'-Phe-Leu-Gly-paklitakselia ja 10 mg dimetyyliaminopyridiiniä. Keltaista liuosta sekoitettiin 2 tuntia huoneen lämpötilassa vedettömissä olosuhteissa. Sen jälkeen reaktioliuokseen lisättiin 2-hydroksipropyyliamiinia (0,15 ml) ja koko liuosta sekoitettiin 30 minuuttia. Reaktioliuos sammutettiin 0,2 ml:lla jääetikkaa, konsentroitiin tyhjössä pieneen tilavuuteen, jonka jälkeen kaadettiin 200 ml:aan asetonia. Seosta sekoitettiin 1 tunti, sakka suodatettiin ja pestiin asetonilla, saatiin 960 mg otsikossa mainittua yhdistettä. Paklitakselipitoisuus oli 6 % (arvioitu entymaattisella hydrolyysi- ja HPLC-analyysillä).

Esimerkki 5

1-metakryloyyliamino-2-hydroksipropaanin, 1-(metakryloyyli-glysyyli)amino-2-hydroksipropaanin ja 2'-(metakryloyyli-glysyyli)paklitakselin kopolymeeri

Liuokseen, jossa oli 1,6 g 1-metakryloyyliamino-2-hydroksipropaanin ja N-(metyleenikarbonyyli-4-nitrofenoksi)metakryyliamidin kopolymeeria 16 ml:ssa vedetöntä dimetyyliformamidia, lisättiin 100 mg paklitakselia ja 20 mg dimetyyliaminopyridiiniä. Keltaista liuosta sekoitettiin 20 tuntia huoneen lämpötilassa, jonka jälkeen lisättiin 2-hydroksipropyyliamiinia (0,2 ml) ja koko liuosta sekoitettiin 30 minuuttia. Reaktioliuos sammutettiin 0,3 ml:

lla jääetikkaa, konsentroitiin tyhjössä pieneen tilavuuteen, jonka jälkeen kaadettiin 200 ml:aan asetonia. Seosta sekoitettiin 1 tunti, sakka suodatettiin ja pestiin asetonilla, saanto oli 1440 mg otsikossa mainittua yhdistettä. Paklitakselipitoisuus oli 2,75 % paino/paino.

Esimerkki 6

1-metakryloyyliamino-2-hydroksipropaanin, 1-(metakryloyyli-glysyyli-fenyylialanyyli-leusyyli-glysyyli)amino-2-hydroksipropaanin ja 2'-(metakryloyyli-glysyyli-fenyylialanyyli-leusyyli-glysyyli-β-alanyyli)paklitakselin kopolymeeri

Liuokseen, jossa oli 620 mg 1-metakryloyyliamino-2-hydroksipropaanin ja N-(metyleenikarbonyyli-Phe-Leu-Gly-4-nitrofenoksi)metakryyliamidin kopolymeeria 6 ml:ssa vedetöntä dimetyyliformamidia, lisättiin 62 mg 2'-(β-alanyyli)paklitakselia, joka valmistettiin julkaisun N.F.Magri *et al.* J.Nat.Products 51, 298-306, 1988, mukaan, ja 10 mg dimetyyliaminopyridiiniä. Keltaista liuosta sekoitettiin 5 tuntia huoneen lämpötilassa vedettömissä olosuhteissa. Sen jälkeen lisättiin 2-hydroksipropyyliamiinia (0,1 ml) ja koko liuosta sekoitettiin 30 minuuttia. Reaktioliuos sammutettiin 0,15 ml:lla jääetikkaa, konsentroitiin alennetussa paineessa pieneen tilavuuteen ja kaadettiin 150 ml:aan asetonia. Seosta sekoitettiin 1 tunti, sakka suodatettiin ja pestiin asetonilla, saanto oli 5,85 mg otsikossa mainittua yhdistettä. Paklitakselipitoisuus oli 4 % paino/paino.

Esimerkki 7

2'7-di(karbobentsyylioksi-β-alanyyli)paklitakseli

Liuokseen, jossa oli 200 mg paklitakselia 15 ml:ssa asetonitriiliä, lisättiin 400 mg N,N'-disykloheksyylikarbodi-imidiä, 200 mg karbobentsyylioksi-β-alaniinia ja 60 mg dimetyyliaminopyridiiniä. Reaktioseosta sekoitettiin 20

tuntia, sakka suodatettiin ja liuotin haihdutettiin tyhjössä kuiviin. Jäännös kromatografoitiin piihappogeelillä eluointiaineena etyyliasetaatin ja heksaanin 1:1-seos, saatiin 300 mg otsikossa mainittua yhdistettä.
FAB-MS: m/z 1264 $[M+H]^+$, 1204, 1130, 1070.

Esimerkki 8

7-(karbobentsyylioksi-β-alanyyli)paklitakseli

Liuokseen, jossa oli 171 mg 2',7-di(karbobentsyylioksi-β-alanyyli)paklitakselia 60 ml:ssa metanolia, lisättiin 30 mg natriumbikarbonaattia ja 7 ml vettä. Reaktioseosta sekoitettiin 3 tuntia huoneen lämpötilassa. Metanoli haihdutettiin ja tuote uutettiin etyyliasetaatilla. Liuotin haihdutettiin tyhjössä kuiviin, saatiin 134 mg otsikossa mainittua yhdistettä.

Esimerkki 9

7-(β-alanyyli)paklitakseli

Liuokseen, jossa oli 135 mg 7-(karbobentsyylioksi-β-alanyyli)paklitakselia 20 ml:ssa metanolia ja 13 ml:ssa muurahaishappoa, lisättiin 200 mg 5%:ista Pd/C-katalyyttiä. Reaktioseosta sekoitettiin 6 tuntia huoneen lämpötilassa. Katalyytti suodatettiin pois, pestiin metanolilla ja liuottimet haihdutettiin kuiviin tyhjössä. Jäännös liuotettiin 8 ml:aan metanolia ja saostettiin 150 ml:lla dietyylieetteriä, saatiin 85 mg otsikossa mainittua yhdistettä.
FAB-MS: m/z 925 $[M+H]^+$, 947 $[M+Na]^+$.
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1,14 (s,3H,CH_3-16), 1,20 (s,3H, CH_3-17), 1,79 (s,3H,CH_3-19), 1,85 (s,3H,CH_3-18), 2,17 (s, 3H,CH_3CO-10), 2,2-2,6 (m,6H,CH_2-14+CH_2-6+$OCOCH_2\underline{CH_2}NH_2$), 2,42 (s,3H,$CH_3CO$-4), 3,0-3,2 (m,2H,$OCOCH_2\underline{CH_2}NH_2$), 3,90 (d,J=6,8 Hz,1H,3), 4,18, 4,31 (kaksi d:tä,J=8,2 Hz,2H,CH_2-20), 4,80 (d,J=3,2 Hz,1H,2'), 4,91 (d,J=8,5 Hz,1H,5), 5,62 (dd,J= 10,2 Hz,J=7,0 Hz,1H,7), 5,66 (d,J=6,8 Hz,1H,2), 5,81 (dd,

J=2,9 Hz,J=9,1 Hz,1H,3'), 6,17 (m,1H,13), 6,19 (s,1H,10), 7,3-8,2 (m,16H,NH-4'+3-Ph).

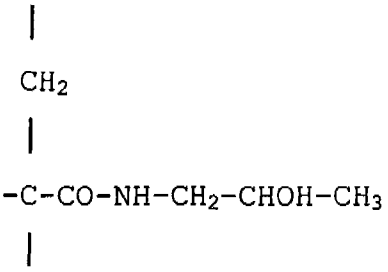
Esimerkki 10

1-metakryloyyliamino-2-hydroksipropaanin, 1-(metakryloyyli-glysyyli-fenyylialanyyli-leusyyli-glysyyli)-amino-2-hydroksipropaanin ja 7-(metakryloyyli-glysyyli-fenyylialanyyli-leusyyli-glysyyli-β-alanyyli)paklitakselin kopolymeeri

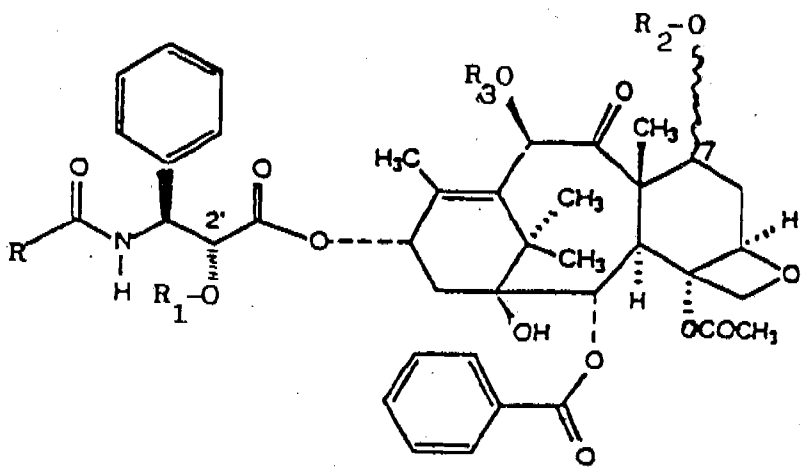
Liuokseen, jossa oli 1500 mg 1-metakryloyyliamino-2-hydroksipropaanin ja N-(metyleenikarbonyyli-Phe-Leu-Gly-4-nitrofenoksi)metakryyliamidin kopolymeeria 13 ml:ssa vedetöntä dimetyyliformamidia, lisättiin 135 mg 7-(β-alanyyli)paklitakselia ja 20 mg dimetyyliaminopyridiiniä. Keltaista liuosta sekoitettiin vedettömissä olosuhteissa 5 tuntia huoneen lämpötilassa. Sen jälkeen lisättiin 2-hydroksipropyyliamiinia (0,2 ml) ja koko liuosta sekoitettiin 30 minuuttia. Reaktioliuos sammutettiin 0,3 ml:lla jääetikkaa, konsentroitiin tyhjössä pieneen tilavuuteen ja kaadettiin 250 ml:aan asetonia. Seosta sekoitettiin 1 tunti, sakka suodatettiin ja pestiin asetonilla, saatiin 1520 mg otsikossa mainittua yhdistettä. Paklitakselipitoisuus oli 7,8 % paino/paino.

Patenttivaatimukset

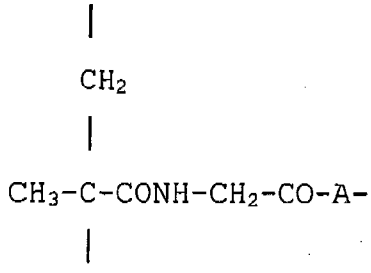
1. Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisen polymeerikonjugaatin valmistamiseksi, joka polymeerikonjugaatti muodostuu 90-99,9 mooliprosenttisesti yksiköistä, joilla on kaava



0,1-5 mooliprosenttisesti yksiköistä, joita kuvaa kaava

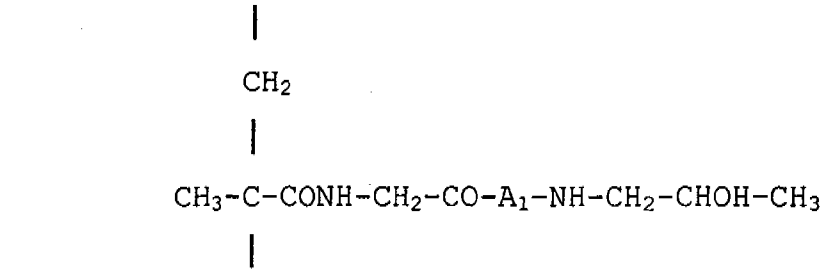


jossa toinen ryhmistä R_1 ja R_2 on kopolymeeritähde, jonka kaava on

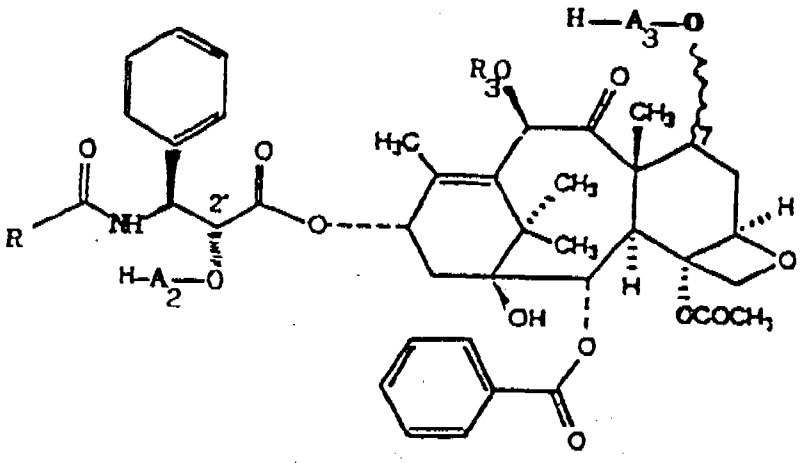


ja toinen on vetyatomi,

0-9,9 mooliprosenttisesti yksiköistä, joilla on kaava



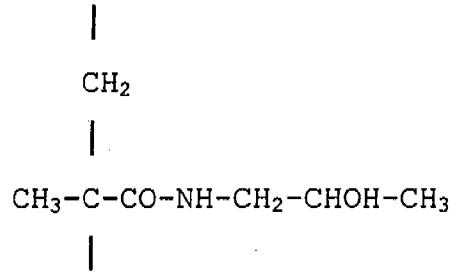
jossa R on fenyyli tai tert.-butoksiryhmä, R_3 on H tai asetyyliryhmä, A ja A_1, jotka voivat olla samanlaiset tai erilaiset, tarkoittavat yksinkertaista kemiallista sidosta, aminohappotähdettä tai peptidiväliryhmää, joka on βAla, Gly, Phe-Gly, Phe-Phe-, Leu-Gly, Val-Ala, Phe-Ala, Leu-Phe, Leu-Ala, Phe-Leu-Gly, Phe-Phe-Leu, Leu-Leu-Gly, Phe-Tyr-Ala, Phe-Gly-Phe, Phe-Phe-Gly, Phe-Leu-Gly-Phe, Gly-Phe-Leu-Gly-Phe, Gly-βAla, Phe-Gly-βAla, Phe-Phe-βAla, Leu-Gly-βAla, Val-Ala-βAla, Phe-Ala-βAla, Leu-Phe-βAla, Leu-Gly-βAla, Phe-Leu-Gly-βAla, Phe-Phe-Leu-βAla, Leu-Leu-Gly-βAla, Phe-Tyr-Ala-βAla, Phe-Gly-Phe-βAla, Phe-Phe-Gly-βAla, Phe-Leu-Gly-Phe-βAla tai Gly-Phe-Leu-Gly-Phe-βAla, **tunnettu** siitä, että kaavan II mukainen yhdiste



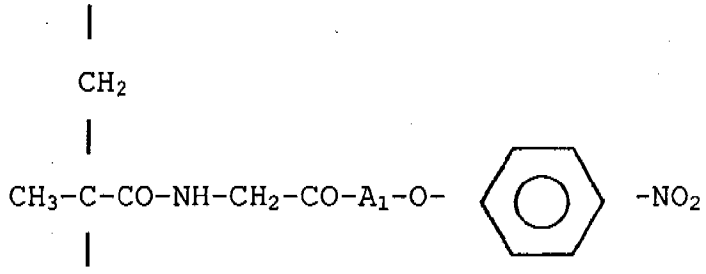
(II)

jossa toinen ryhmistä A_2 ja A_3 on kemiallinen sidos ja toinen on A, ja A, R ja R_3 tarkoittavat samaa kuin edellä, saatetaan

reagoimaan aktivoidun polymeerin kanssa, joka koostuu 90-99,9 mooliprosenttisesti yksiköistä, joilla on kaava



ja 10-0,1 mooliprosenttisesti yksiköistä, joilla on kaava



jossa A_1 tarkoittaa samaa kuin edellä, ja sen jälkeen muodostunut polymeerikonjugaatti käsitellään 2-hydroksipropyyliamiinilla.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että valmistetaan polymeerikonjugaatti, jossa R tarkoittaa fenyyliryhmää, R_3 on asetyyliryhmä ja A on Phe-Leu-Gly- tai Phe-Leu-Gly-βAla-tähde.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että valmistetaan polymeerikonjugaatti, joka on 1-metakryloyyliamino-2-hydroksipropaanin, (metakryloyyli-glysyyli-fenyylialanyyli-leusyyli-glysyyli)-3-amino-2-hydroksipropaanin ja 2'-(metakryloyyli-glysyyli-fenyyli-alanyyli-leusyyli-glysyyli-β-alanyyli)paklitakselin kopolymeeri.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että reaktio suoritetaan vedettömässä polaarisessa liuottimessa lämpötilassa, joka on 15 °C:sta 40 °C:seen, reaktioaika on 1 - 24 tuntia ja mukana käytetään orgaanista tai epäorgaanista emästä.

5. Patenttivaatimuksessa 1 määritellyn kaavan II mukainen yhdiste, **tunnettu** siitä, että A_2 tarkoittaa di-, tri- tai tetrapeptidiväliryhmää, kuten patenttivaatimuksessa 1 tähteelle A määriteltyä.

6. Menetelmä patenttivaatimuksessa 5 määritellyn kaavan II mukaisen yhdisteen valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että paklitakseli tai paklitakselianalogi saatetaan reagoimaan halutun suojatun aminohapon tai peptidin kanssa kondensaatioaineen läsnäollessa tai käytetään aktivoituja estereitä yhdessä lisätyn katalyytin kanssa tai ilman sitä, jonka jälkeen suojaryhmät poistetaan.

7. Patenttivaatimuksessa 1 määritellyn kaavan II mukainen yhdiste, **tunnettu** siitä, että A_3 tarkoittaa βAla- tai di-, tri- tai tetra-peptidiväliryhmää, kuten patenttivaatimuksessa 1 tähteelle A määriteltyä.

8. Menetelmä patenttivaatimuksessa 7 määritellyn kaavan II mukaisen yhdisteen valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että joko

(i) paklitakselin 2'-hydroksiryhmä suojataan tai blokataan ja 7-asemassa oleva hydroksyyli esteröidään, jonka jälkeen 2'-suojaryhmä tai -blokkaava ryhmä poistetaan, tai

(ii) paklitakseli saatetaan reagoimaan 2-3 moolin kanssa haluttua N-suojattua aminohappoa 2',7-disubstituoidun takso-

lin tuottamiseksi, 2'-asemassa oleva aminohappo lohkaistaan pois, jonka jälkeen 7-aseman aminohapon suojaus poistetaan.



Missing part

Hak.n:o 940783

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer, utläggnings- och patentskrifter:

FI

CH

DE

DK

FR

GB

NO

SE

US

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

Käännä Vänd

EP 93-187647 A61K 31/00

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Chemical Abstracts 87:168497
— " — 115:189568
— " — 116:41793
— " — 116:221409

23/4-02 Lat

Allekirjoitus