

(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 267 498 A1

4(51) C 08 F 8/30
A 61 K 47/00
C 07 D 475/08

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 08 F / 308 898 0	(22)	11.11.87	(44)	03.05.89
(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD				
(72)	Schulz, Burkhard, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Reinisch, Gerhard, Prof. Dr. Dipl.-Chem.; Tschiersch, Bruno, Dr. rer. nat. habil.; Winterfeld, Gisela, Dr. rer. nat., DD				
(54)	Verfahren zur Bindung von Methotrexat an Maleinsäureanhydrid-Copolymere				

(55) Methotrexat, Maleinsäureanhydrid-Copolymere, Polymere Cytostatika, polymergebundenes Methotrexat, Polymermodifizierung, Antikrebsmittel

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von an Maleinsäureanhydrid-Copolymere gebundenem Methotrexat mit verbesserten Wirkungseigenschaften. Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Bindung von Methotrexat an Maleinsäureanhydrid-Copolymeren zu schaffen, dessen Produkte wasserlösliche untoxische polymere Cytostatika sind. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß ein wasserlösliches alternierendes Maleinsäureanhydrid-Propen-Copolymeres in einem für Methotrexat geeignetes Lösungsmittel mit Methotrexat, gegebenenfalls unter Zusatz eines Acylierungskatalysators, zur Reaktion gebracht wird. Das Polymer-Wirkstoffkonjugat wird in einem geeigneten Fällungsmittel gefällt, nach dem Trocknen in das Natriumsalz und anschließend durch Neutralisation und pH-Werteinstellung auf 7,4 in die Säureform überführt. Die Polymere weisen in vivo gute cytotoxische Wirkung gegen das Melanom-B16-Tumor auf.

Patentanspruch:

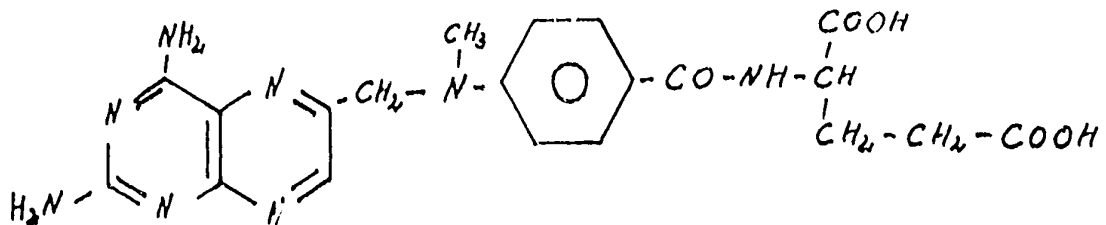
1. Verfahren zur Bindung von Methotrexat an Maleinsäureanhydrid-Copolymere, dadurch gekennzeichnet, daß 1 bis 20 Mol wasserlösliches Maleinsäureanhydrid-Propen-Copolymer mit Molmassen 20000 bis 1000000 g Mol⁻¹ in für Methotrexat geeigneten organischen Lösungsmitteln mit 1 Mol Methotrexat, wobei die Methotrexat-Konzentration $1 \cdot 10^{-2}$ bis $3 \cdot 10^{-2}$ Mol l⁻¹ beträgt, bei Temperaturen von 343K bis 373K und in einer Zeit von 8 bis 20 Stunden zur Reaktion gebracht, isoliert, in das Natriumsalz und anschließend durch Neutralisation in die Säureform überführt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Polymer nach der Reaktion mit Methotrexat in einem geeigneten Fällungsmittel, vorzugsweise Chloroform und/oder Diethylether gefällt, getrocknet, in wäßriger NaHCO₃-Lösung gelöst, mit 0,1 N wäßriger Salzsäure der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und anschließend das Wasser entfernt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Lösungsmittel für Methotrexat Dimethylacetamid und/oder Dimethylformamid eingesetzt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Acylierungskatalysator Dimethylaminopyridin in Konzentrationen von 10^{-4} bis 10^{-6} Mol Mol⁻¹ Methotrexat angewendet wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bindung von Methotrexat an Maleinsäureanhydrid-Copolymere, das zur Synthese neuer Cytostatika, welche verbesserte Wirkungseigenschaften besitzen und in der Humanmedizin einsetzbar sind, verwendet werden kann.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bekannt, daß das Cytostatikum Methotrexat (Formel I) an verschiedene natürliche oder synthetische Polymerträger kovalent gebunden werden kann, wodurch sich verschiedene applikative Vorteile ergeben.



Die Anknüpfung an die Makromoleküle ist dabei sowohl über die NH₂-Gruppen des Pteridinringes wie auch über die COOH-Gruppen der Glutaminsäure des Methotrexats prinzipiell möglich.

Während durch die Verwendung von Dextranen und Polypeptiden ein Depoteffekt erzielbar ist, werden mit Poly(L-lysin) und Immunglobulinen gegen Methotrexat resistente Zellen bzw. bestimmte Gewebe spezifisch einer Buchhandlung zugänglich. J. M. WHITLEY; B. C. F. CHU und J. GALIVAN: Biomedical and dental applications of polymers S. 41. Polymer Science and Technology Vol. 14 Ed. by G. G. GEBELEIN und F. F. KÖLLITZ; Plenum Press, New York, London 1981

Die Bindung von Methotrexat an monoklonale Antikörper erlaubt dagegen die selektive Behandlung bestimmter Krebszellen R. W. BALDWIN und M. GARNETT: UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. New Ser. 27, 215 (1985).

Der Nachteil der bisher bekanntgewordenen Lösungen besteht darin, daß sie bei guten vitro-Ergebnissen einen deutlichen Aktivitätsverlust bei in vivo-Tests aufweisen. Außerdem sind die eingesetzten natürlichen Polymerträger in der Regel aufwendig in der Gewinnung und dadurch zum Teil sehr kostspielig.

Es wurde auch versucht, durch Verwendung leichter zugänglicher synthetischer Polymerer diese Mängel zu umgehen. Dabei ergaben Polyvinylalkohol und Polyethylenimin keine befriedigende Wirksamkeit der Polymer-Wirkstoff-Konjugate. Divinylether-Maleinsäureanhydrid-Copolymere erwiesen sich als zu toxisch, obwohl letzterer Polymerträger selbst antineoplastische Aktivität besitzt L. GROS; H. RINGSDORF und H. SCHUPP: Angew. Chem. 93, 311 (1981).

Neben dem Wirkungsverlust in vivo und toxischen Nebenwirkungen ist die Erzielung einer Wasserlöslichkeit der Polymer-Wirkstoff-Konjugate ein weiteres noch nicht voll beherrschtes Problem. Die Wasserlöslichkeit der Polymerträger wird durch die Anbindung des wasserunlöslichen Methotrexats deutlich herabgesetzt, wodurch die Applikation der Substanzen erschwert ist.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Bindung von Methotrexat an Maleinsäureanhydrid-Copolymere zu schaffen, dessen Produkte wasserlösliche, untoxische polymere Cytostatika mit verbesserten Wirkungseigenschaften sein sollen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, ein Syntheseverfahren zu entwickeln, bei dem Methotrexat an Maleinsäureanhydrid-Copolymere direkt über die NH_2 -Gruppen des Pteridinringes gebunden wird und dessen Punkt ein wasserlöslicher Polymer mit antineoplastischer Wirkung sein soll.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß wasserlösliches Maleinsäureanhydrid-Propen-Copolymer in einem für Methotrexat geeigneten Lösungsmittel, vorzugsweise Dimethylacetamid oder Dimethylformamid, gelöst und mit Methotrexat, gegebenenfalls unter Zusatz von 10^{-4} bis 10^{-6} Mol eines Acylierungskatalysators pro Mol Methotrexat, zur Reaktion gebracht wird. Das Polymer-Wirkstoff-Konjugat wird in einem geeigneten Fällungsmittel, vorzugsweise Chloroform oder Ether oder Mischungen aus Chloroform und Ether, ausgefällt, abgesaugt und getrocknet. Nach dem Trocknen wird das Produkt in einer wäßrigen Natriumhydrogencarbonat-Lösung gelöst, mit verdünnter Salzsäure auf den pH-Wert 7,4 eingestellt und das Wasser sowie das nicht umgesetzte Methotrexat nach üblichen Methoden entfernt.

Es entsteht ein weißes bis gelbes Pulver, welches gut wasserlöslich ist und in vivo antineoplastische Wirksamkeit aufweist. Der Gehalt des Produktes an Methotrexat wird durch das Molverhältnis Anhydrid zu Methotrexat in der Reaktionslösung durch die Reaktionstemperatur sowie -zeit festgelegt und kann in üblicher Weise über diese Größen gezielt eingestellt werden.

Es ist für die Aufarbeitung und Anwendung des Produktes von Vorteil, wenn die Reaktion so durchgeführt wird, daß der Umsatzgrad des Methotrexats über 50%, vorzugsweise über 80% liegt. So erwiesen sich für das erfindungsgemäße Verfahren bei Anhydrid-Methotrexat-Mol-Verhältnissen von 20:1 bis 1:1 Reaktionstemperaturen zwischen 70 und 100°C und Reaktionszeiten von 8 bis 20h als günstig für die Erzielung von Wirkstoffgehalten des Produktes zwischen 5 und 45Ma.-%. Die Konzentration des Methotrexats in der Reaktionslösung wird durch seine Löslichkeit in dem verwendeten Lösungsmittel bestimmt und kann in weiten Grenzen variiert werden. Bei Verwendung von Dimethylacetamid werden gute Ergebnisse mit Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-2}$ bis $3 \cdot 10^{-2}$ Mol/l erreicht.

Die Molmassen der Maleinsäureanhydrid-Propen-Copolymere können zwischen 20000 und 1000000g/Mol liegen, ihr Methotrexat-Gehalt kann zwischen 5 und 45Ma.-%, vorzugsweise aber 20-30Ma.-%, betragen.

Es ist ein wesentliches Merkmal der Erfindung, daß nach der Umsetzung mit Methotrexat das Polymer zunächst in das Natriumsalz und durch anschließende Neutralisation in die freie Säure überführt werden muß.

Erfolgt die Salzbildung nicht, reichen die Wasserlöslichkeit und damit verbunden die in vivo-Wirksamkeit nicht aus. Zwar zeigt das Natriumsalz eine gute antineoplastische Aktivität, jedoch werden in allen Tests vorzeitige Todesfälle der Versuchstiere beobachtet, die eine gewisse Toxizität der Verbindung anzeigen. Dies wird mit der Säureform der Polymeren vermieden. Es muß als überraschend gewertet werden, daß die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Polymer-Wirkstoff-Konjugate in vivo verglichen mit freiem Methotrexat eine bessere Wirkung gegenüber dem soliden Modelltumor B 16-Melanom aufweisen.

Dagegen wird gegenüber der Leukämie P388 eine dem freien Wirkstoff angenäherte Wirkung beobachtet.

Die Wirkung der Methotrexat enthaltenden Maleinsäureanhydrid-Copolymere ist völlig unerwartet, da die Verbindung mit monomerem Maleinsäureanhydrid keine antineoplastische Aktivität aufweist. Es ist der besondere Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens, daß gleichzeitig mit Methotrexat andere Verbindungen, welche geeignete funktionelle Gruppen besitzen, gebunden werden können. Solche Verbindungen können weitere Pharmaka oder Suchgruppen zur Erhöhung der Organ- bzw. Gewebespezifität sein.

Die folgenden Ausführungsbeispiele erläutern die Erfindung ohne sie einzuschränken.

Ausführungsbeispiele

Durchführung der Tests

Als Tiermaterial wurden MDF-1-Mäuseböckchen aus der Zucht des Zentralinstituts für Krebsforschung der AdW der DDR, Berlin-Buch, verwendet. Als Testtumoren wurden die Leukämie P388 und das Melanom B 16 gewählt.

Bei P388 bekam jedes Tier etwa 5×10^5 Zellen o. p. gespritzt und beim B 16-Melanom 0,1 ml eines homogenisierten Tumorbreies. Das B 16-Melanom wächst auch bei i. p.-Applikation in soliden Zellverbänden.

Als Parameter zur Einschätzung der Wirksamkeit der Substanzen wurde die Verlängerung der Überlebenszeit gegenüber Tumorträgern ohne Substanzgabe gewählt. Als Vergleichspräparat diente Methotrexat der Fa. Lachema, Brno, ČSSR.

Beispiel 1:

0,7g (5m Mol) Maleinsäureanhydrid-Propen-Copolymer und 0,45g (1m Mol) Methotrexat werden in 50ml Dimethylacetamid gelöst, 0,1g Dimethylaminopyridin als Acylierungskatalysator zugesetzt und die homogene Lösung 16h bei 80°C gerührt. Anschließend wird in 500 ml trockenes Chloroform gefällt, abgesaugt und in Vakuum bei 50°C getrocknet.

1,0g des Produktes wird in 10%iger NaHCO_3 -Lösung gelöst und tropfenweise mit 0,1N HCl-Lsg. der pH-Wert der Lösung auf 7,4 eingestellt. Das Wasser wird am Rotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand im Vakuum getrocknet.

Der Wirkstoffgehalt des Produktes ist 28Ma.-%.

Tabelle 1 zeigt eine dem Methotrexat analoge Wirkung bei der Leukämie P388. Aus Tabelle 2 geht die gute Wirkung des Produktes gegenüber dem Melanom B 16 hervor, die über der des Methotrexats liegt.

Beispiel 2:

Die Umsetzung wird wie in Beispiel 1 durchgeführt, jedoch nach der Auflösung in NaHCO_3 -Lösung ohne Neutralisation eingeeengt und getrocknet.

Wie aus den Tabellen 1 und 2 hervorgeht, treten bei der Testung vorzeitige Todesfälle auf, die auf eine höhere Toxizität hinweisen.

Beispiel 3:

Die Umsetzung wird wie in Beispiel 1 durchgeführt, aber das nach dem Fällen in Chloroform isolierte Produkt für den Test verwendet. Es ist nicht wasserlöslich und weist im Test deutlich toxische Nebeneffekte auf.

Beispiel 4:

Die Reaktion wird wie in Beispiel 1 durchgeführt, aber anstelle des Copolymeren das monomere Maleinsäureanhydrid eingesetzt. Wie aus den Tabellen 1 und 2 ersichtlich, weist dieses niedermolekulare Produkt keine antineoplastische Wirkung auf.

Tabelle 1 Mittlere Überlebenszeit (in Tagen) von BDF₁-Mäusen nach i.p. Injektion von P 388 und Behandlung

Dosis mg/MTX/kg/Injektion	2,5	15	20	40
Tag der Applikation nach Tumorinkubation	1-4	1	1	1
Probe				
Kontrolle	9	10	10	10
MTX ^{a)}	16	12	13	14
1	16	12	15	—
2	16	10 ^{b)}	14	4 ^{b)}
3	14	12	5 ^{b)}	5 ^{b)}
4	10	11	10	10

a) MTX: Methotrexat

b) vorzeitige Todesfälle

Tabelle 2 Mittlere Überlebenszeit (in Tagen) von BDF₁-Mäusen nach B 16 — Melanom — Inkubation und Behandlung

Dosis mg MTX/KG/Injektion	2,5	10	10	20
Tag der Applikation nach Tumorinkubation	1, 3, 4, 7-10	1, 5, 9	1	1
Probe				
Kontrolle	25	18	21	21
MTX ^{a)}	20	21	24	22
1	26	29	42	29
2	28	—	32 ^{b)}	27 ^{b)}
3	5 ^{b)}	—	27	13 ^{b)}
4	—	18	—	—

a) MTX: Methotrexat

b) vorzeitige Todesfälle