



AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 07 F / 260 723 1

(22) 09.03.84

(44) 22.05.85

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1086 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD

(72) Schröder, Hans-Peter, Dr. rer. nat., DD; Tonew, Marion, Dr. sc. nat., DD; Tonew, Emil, Dr. med. habil., BG; Heyn, Bodo, Dr. sc. nat., DD

(54) Verfahren zur Herstellung einer cis-diammin-Platin(II)-Komplexlösung

(57) Die Erfindung beinhaltet ein Verfahren zur Herstellung einer cis-diammin-Platin(II)-Komplexlösung, wobei das Ziel darin besteht, eine cis-diammin-Platin(II)-Komplexlösung zu erhalten, die gute antivirale Eigenschaften mit deutlich verbesserter Zellverträglichkeit verbindet. Diese Aufgabe wird in der Weise gelöst, daß cis-diammin-dichloro-Platin(II), vorwiegend in der festen kristallinen Form, in nahezu beliebigen Konzentrationen in frisch gereinigtem, destilliertem Dimethylsulfoxid bei Temperaturen im Bereich der flüssigen Phase in Lösung gebracht wird und anschließend die so erhaltene, gleichgewichtsbedingte Lösung nach 2 Tagen bis 360 Tagen mit wäßrigen physiologischen Medien im Verhältnis 1:50 bis 1:50 000 verdünnt wird.

Erfindungsansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung einer cis-diammin-Platin(II)-Komplexlösung aus festem, kristallinem cis-diammin-dichloro-Platin(II) (kurz: cis-DDP), **gekennzeichnet dadurch**, daß man cis-DDP in nahezu beliebigen Konzentrationen in frisch gereinigtem, destilliertem Dimethylsulfoxid bei Temperaturen im Bereich der flüssigen Phase löst, die so erhaltene gleichgewichtsbedingte Lösung nach 2 Tagen bis 360 Tagen mit wäßrigen physiologischen Medien im Verhältnis 1:50 bis 1:50000 verdünnt und diese Lösung unmittelbar zum Einsatz bringt.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß man cis-DDP in einer Konzentration von $c = 50 \text{ mmol/l}$ in Dimethylsulfoxid bei einer Temperatur von 25°C löst, die so erhaltene gleichgewichtsbedingte Komplexlösung nach 2 Tagen bis 120 Tagen mit wäßrigen physiologischen Medien im Verhältnis 1:200 verdünnt und die Lösung unmittelbar zum Einsatz bringt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer cis-diammin-Platin(II)-Komplexlösung, einer Verbindung, deren potentiell Einsatzgebiet in der Bekämpfung von Viruserkrankungen liegt.

Als Anwendungsgebiet der Erfindung ist somit die pharmazeutische Forschung und Industrie anzusehen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Cis-diammin-Dichloro-Platin(II) — cis-DDP — als Prototyp der bekannten cis-diammin-Platin(II)-Komplexlösungen ist ein klinisch eingeführtes Cancerostatikum, vorzugsweise zur Behandlung von Urogenital- und Tumoren im Kopf-/Halsbereich. Die cis-DDP-Synthese selbst ist frei von Schutzrechten; es sind jedoch Patente zu besonderen Applikationsformen dieses Wirkstoffes bekannt (so z. B. DD 142293, DD 157762).

Die immunsuppressive Wirkung von cis-DDP bei der Behandlung bösartiger Geschwülste schränkt die Fähigkeit des Körpers zur Abwehr von Sekundärinfektionen ein und kann den Verlauf einer Krebstherapie ungünstig beeinflussen.

Bekannt ist seit M. J. Cleare „Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy“, Springer New York (1974) weiterhin die antileukämische Unwirksamkeit und eine hohe Toxizität von Umsetzungsprodukten des mit zyklischen Aminen substituierten cis-DDP (genauer: des cis-diammin-Platin(II)-Neutralkomplexes), vorzugsweise von cis-diammin-dichloro-Platin(II), mit Dimethylsulfoxid (kurz: DMSO).

Bekannt ist seit dem systematischen Untersuchungen von E. Tonew u. a., Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 250 (1981) 417 ff., die gute antivirale in vitro-Wirkung des cis-diammin-Platin(II)-Neutralkomplexes. Zum antiviralen Verhalten und zur Zellverträglichkeit der bisher bekannten cis-diammin-Platin(II)-Komplexlösungen waren bis dato nur vereinzelte, wenig systematische Untersuchungen bekannt geworden (L. Kutinova u. a., Neoplasma [Brat.] 19 [1972] 453 ff.; L. Kutinova u. a., Arch. ges. Virusforsch. 39 [1972] 196 ff.; H. C. Harder, Recent Results in Cancer Research [1974] 98 ff.; J. J. Roberts u. a., Biochimie 60 [1978] 869 ff.; W. Achterrath u. a., Firmenschrift der Bristol-Meyers GmbH [1979]; P. Carde u. a., Int. J. Radiation Oncol. Biol. Phys. 7 [1981] 929 ff.; L. C. Erickson u. a., Cancer Res. 41 [1981] 2791 ff.; G. Laurent u. a., Cancer Res. 41 [1981] 3347 ff. und H. H. Kohl u. a., Chem. Biol. Interaction 24 [1979] 209 ff.). Von diesen Autoren wird die hohe, gegenüber verschiedenartigen Zellen unterschiedliche Toxizität von cis-DDP-Lösungen im wäßrigen System herausgestellt.

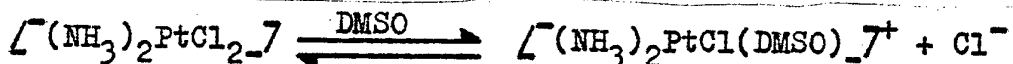
Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, eine cis-diammin-Platin(II)-Komplexlösung zu erhalten, die gute antivirale Eigenschaften mit deutlich verbesserter Zellverträglichkeit verbindet.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung einer cis-diammin-Platin(II)-Komplexlösung zu entwickeln, das zu einer Wirkstofflösung führt, die gute antivirale Eigenschaften mit deutlich verbesserter Zellverträglichkeit kombiniert und so die Nachteile der bisher bekannten cis-diammin-Platin(II)-Komplexlösungen vermeidet.

Auf an sich bekannte Weise wurde zunächst gefunden, daß nach Lösen von festem cis-diammin-dichloro-Platin(II) (kurz: cis-DDP) in gereinigtem Dimethylsulfoxid (DMSO) der Wirkstoff cis-DDP eine chemische Reaktion mit dem Solvens eingeht. Die diesem Phänomen zugrunde liegende chemische Reaktion läßt sich durch das Schema



beschreiben.

Lösungen von cis-DDP in DMSO verändern in Abhängigkeit vom Alter der Lösungen ihre elektrische Leitfähigkeit. Das Gleichgewicht ist nach 12 Stunden weitgehend eingestellt. Eine geringfügige Verschiebung auch nach dieser Zeit zeigt aber weitere zeitabhängige chemische Veränderungen an.

Auch hochdruckflüssigkeitschromatografische — HPLC — Untersuchungen belegen, daß cis-DDP beim Auflösen in DMSO rasch eine chemische Reaktion mit dem Solvens eingeht. Nach 16 Stunden bis 20 Stunden ist die mit dieser Methode nachweisbare Veränderung noch nicht vollständig beendet.

Es wurde weiter gefunden, daß nach Ausführung folgender Verfahrensschritte

- Lösung von cis-DDP aus der festen, kristallinen Form in nahezu beliebigen Konzentrationen in frisch gereinigtem, destilliertem DMSO bei Temperaturen im Bereich der flüssigen Phase, vorzugsweise bei einer Temperatur von 25°C , und
- anschließendem Verdünnen der so erhaltenen gleichgewichtsbedingten Lösung nach 2 Tagen bis 360 Tagen, vorzugsweise nach 2 Tagen bis 120 Tagen, mit wäßrigen, physiologischen Medien im Verhältnis 1:50 bis 1:50000, vorzugsweise im Verhältnis 1:200,

eine cis-diammin-Platin(II)-Komplexlösung erhalten wird, die unter Beibehaltung der antiviralen Wirkung überraschend eine im Vergleich zum System cis-DDP/ H_2O erhöhte Zellverträglichkeit aufweist (siehe auch Tabelle 1).

Durch Leitfähigkeitsmessung oder HPLC wird hierbei geprüft, daß die verfahrensgemäß bereitete cis-diammin-Platin(II)-Komplexlösung vorliegt.

Die virostatistische Aktivität der verfahrensgemäß bereiteten cis-diammin-Platin(II)-Komplexlösung ist, wie vergleichende Untersuchungen zeigen, ebenso hoch wie die von cis-DDP bei gleicher Konzentration in anderen Medien, vorzugsweise in Wasser oder in Dimethylformamid. Auf Grund der besseren Zellverträglichkeit von cis-diammin-Platin(II)-Komplexlösungen sind im Vergleich zu den Systemen in Wasser oder Dimethylformamid hier jedoch höhere Wirkstoffkonzentrationen einsetzbar, wie Tabelle 1 ausweist.

Vergleichende Untersuchungen haben weiterhin gezeigt, daß von DMSO in einer Konzentration von 0,5% in proteinfreier Hankslösung keine antivirale Wirkung ausgeht.

Die verfahrensgemäß bereitete cis-diammin-Platin(II)-Komplexlösung hat den Vorteil, daß

- sie bei deutlich verbesserter Zellverträglichkeit sich in bezug auf ihre antiviralen Eigenschaften auf dem gleichen Niveau befindet, wie die bekannten cis-DDP-Wirkstofflösungen (Wasser, Dimethylformamid) und
- dieser positive Effekt über einen langen Zeitraum (Prüfung erfolgte bis zu 360 Tagen) ohne Verlust ununterbrochen erhalten bleibt.

Ausführungsbeispiel

I.1. Bereitung der cis-diammin-Platin(II)-Komplexlösung

Festes, kristallines cis-DDP wird in gereinigtem DMSO — sowie für Vergleichszwecke in Dimethylformamid — bei 25°C gelöst; c = 50 mmol/l. Diese Stammlösungen werden nach dem Ansetzen unter Lichtausschluß bei 4°C aufbewahrt.

Aus diesen Stammlösungen wird nach 2 Tagen bis 360 Tagen, bevorzugt nach 2 Tagen bis 120 Tagen, eine Verdünnung in physiologischen Medien 1:200 oder mehr vorgenommen, so daß z. B. die DMSO-Konzentration 0,5% oder weniger beträgt. In der für Vergleichszwecke wäßrigen Stammlösung (c = 50 mmol/l) ist die Substanz suspendiert, da die Löslichkeit des Wirkstoffes in Wasser 1 mg/ml = 3,3 mmol/l beträgt.

I.2. Darlegung der Eigenschaften der verfahrensgemäß hergestellten Komplexlösung

— Prüfung auf antivirale Wirkung

Zellkulturen, Züchtung, verwendete Medien, Virusstämme und Titerbestimmungen wie auch die Versuchsdurchführungen entsprechen den Angaben in M. Tonew u. a., Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 249 (1981) 269 ff. sowie in M. Tonew u. a., Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 249 (1981) 421 ff.

— Prüfung auf zytotoxische Wirkung

Die angegebenen cis-diammin-Platin(II)-Komplexlösungen wurden aus den entsprechenden Stammlösungen in Erhaltungsmedien mit einem beliebigen Serum, vorzugsweise mit 2% Kälberserum, verdünnt und unmittelbar danach auf 2 Tage alte Monolayerkulturen aufgetragen:

Die Zellen wurden mikroskopisch auf morphologische Veränderungen kontrolliert. Es wurden die Konzentrationen als maximal tolerierte Dosen (MTD) angegeben, die am 2. bzw. 5. Beobachtungstag gegenüber den unbehandelten Zellkontrollen keine zytotoxische Veränderung hervorriefen.

— Untersuchungen zur antiviralen Aktivität von cis-DDP; Wirkung auf extrazelluläres Virus in proteinfreien Medien

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Inaktivierung verschiedener Viren in Abhängigkeit vom Alter der Stammlösung in verschiedenen Lösungsmitteln dargestellt.

Eine frisch bereitete Lösung von cis-DDP (c = 250 µmol/l) in proteinfreier Hankslösung erwies sich unabhängig vom Lösungsmittel für L- wie auch für FL-Zellen immer als stark zytotoxisch, obwohl die Einwirkungszeit auf Zellkulturen bei dieser Versuchsanordnung nur ca. 1 Stunde (Virusadsorption nach der Virusinaktivierung) bei Zimmertemperatur betrug, da dann eine weitere Verdünnung im Verhältnis 1:5 durch Zugabe von Erhaltungsmedien erfolgte.

Eine gealterte, verfahrensgemäß hergestellte Komplexlösung war jedoch noch in einer Konzentration von 250 µmol/l verträglich und inaktivierte VSV, Vaccinia wie auch Adenovirus Typ 5 in dieser wie auch in wesentlich geringeren Dosen.

— Untersuchungen zur Stabilität der biologischen Wirkung einer verfahrensgemäß bereiteten cis-diammin-Platin(II)-Komplexlösung

Eine verfahrensgemäß bereitete cis-diammin-Platin(II)-Komplexlösung wurde in den aus Tabelle 3 ersichtlichen Zeitabständen unter weiterer Verdünnung auf antivirale Wirkung untersucht. In einem Zeitraum von 9 Monaten hat sich die Effektivität bezüglich der Inaktivierung von Vaccinia-, Vesikularstomatitis- wie auch Adenovirus Typ 5 nahezu unverändert erhalten.

Tabelle 1

Verträglichkeit von cis-diammin-Platin(II)-Komplexlösung für Hühnerembryonal- und L-Zellen in Abhängigkeit vom Lösungsmittel und vom Alter der Stammlösung nach weiterer Verdünnung in Erhaltungsmedium mit 2% Kälberserum

Lösungsmittel	Aufbewahrungsdauer der Stammlösung b. 4°C	Maximal verträgliche Dosis am 5. Beobachtungstag nach Wirkstoffzugabe in µmol/l	
	Tage	Hühnerembryonalzellen	L-Zellen
verfahrensgemäß bereitete cis-diammin-Platin(II)-Komplexlösung	0	31,25	7,8
	1	62,5	62,5
	3	125,0	125,0
	5	250,0	250,0
System cis-DDP/Wasser	0	15,6	7,8
	1	15,6	7,8
	3	31,25	15,6
	5	31,25	15,6
System cis-DDP/Dimethylformamid	0	31,25	7,8
	8	31,25	7,8

Tabelle 2

Antivirale Wirkung von cis-diammin-Platin(II)-Komplexlösung in Abhängigkeit vom Lösungsmittel und vom Alter der Stammlösung (c = 50 mmol/l)

Virus	Lösungsmittel	Aufbewahrungsdauer d. Stammlösung bei 4 °C Tage	Titerreduktion nach einstündiger Behandlung des extrazellulären Virus in Prozent zur Kontrolle ¹⁾ Substanzkonzentration in µmol/l	
			250	25
Vaccinia	DMSO ²⁾	0	100/toxisch	68
		3	95	36
		7	100	91
		45	100	98
	Aqua dest.	0	98	78
		3	80	65
		7	99	47
		120	99	97
	DIFO	20	toxisch	100
		45	toxisch	98
VSV	DMSO ²⁾	0	toxisch	99,89
		8	99,99	99,98
		60	99,98	99,0
		120	toxisch	93,20
	Aqua dest.	60	toxisch	99,53
		120	toxisch	93,20
	DIFO	0	toxisch	99,53
		8	toxisch	99,82
		60	toxisch	93,20
		120	toxisch	99,82
Adeno Typ 5	DMSO ²⁾	0	toxisch	93,20
		40	99,78	99,32
	Aqua dest.	120	toxisch	99,84
		120	toxisch	90,26

1) Berechnung: Bei Vacciniavirus aus der Differenz der plaquebildenden Einheiten, bei den anderen Viren aus der Differenz der TCID₅₀.

2) DMSO wie verfahrensgemäß beschrieben

Tabelle 3

Antivirale Wirkung einer verfahrensgemäß bereiteten cis-diammin-Platin(II)-Komplexlösung (c = 50 mmol/l) in Abhängigkeit vom Alter

Virus	Konzentration µmol/l	Einstündige Einwirkung auf zellfreies Virus in proteinfreier Lösung; Titerdifferenz zur unbehandelten Kontrolle in Prozent			
		6 Wochen	3 Monate	6 Monate	9 Monate
Vaccinia	250	100	100	100	100
	25	87	74	77	69
VSV	250	99,99	99,99	99,99	99,99
	25	99,98	99,72	98,26	99,68
Adeno Typ 5	250	99,9	99,97	99,9	99,82
	25	0	nicht signifikant	0	98,2