

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY 130 458

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 81 02 20 (P. 229779)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 82 08 30

Opis patentowy opublikowano: 1985 12 30

CZYTELNIA

Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Ludowej

Int. Cl.³ A61K 31/495//
A61K 37/12

Twórcy wynalazku: Janusz Boratyński, Andrzej Myc

Uprawniony z patentu: Polska Akademia Nauk,
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej,
Wrocław (Polska)

Sposób wytwarzania nowych koniugatów kwasu 4-amino-N₁₀-metylo-pteroido-glutaminowego z białkiem

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowych koniugatów kwasu 4-amino-N₁₀-metylo-pteroido-glutaminowego (oznaczanego w skrócie MTX) z białkiem. Koniugaty te znajdują zastosowanie jako lek przeciwnowotworowy.

MTX jest silnym inhibitorem syntezy białka i działa niszcząco na komórki. Jest on antymetabolitem kwasu foliowego i jako lek znalazł zastosowanie w terapii wielu chorób nowotworowych (Handb. Exp. Pharm. XXXVIII "Antineoplastic and Immunosuppressive Agents", wydawca A.C. Sartorelli, D.G. Johns, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1975).

Biologiczne właściwości koniugatów - preparatów cytotoksycznych z nośnikami, takimi jak przeciwciała, lektyny, hormony - oddziałującymi z komórkami nowotworowymi zostały zebrane w pracy przeglądowej (J. Nat. Cancer Inst. 61, 657, 1978). W większości przypadków efekty działania koniugatów przedstawiały wyższą wartość w leczeniu niektórych nowotworów niż forma leku nieskoniugowanego.

W literaturze fachowej opisano kilka koniugatów MTX z przeciwciałami (C.R. Acad. Sci. 246, 1626, 1958; Ann. N.Y. Acad. Sci. 186, 270, 1971; Biochem. Soc. Trans. 1, 722, 1973; J. Med. Chem. 20, 950, 1977). Jako czynnika sprzęgającego używano związki karbodiimidowe lub sprzęgano z nośnikami uprzednio dwuazowany MTX. Również dobre efekty terapeutyczne osiągnęto używając innych nośników dla MTX. Opisano koniugaty MTX z polilizyną (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 3867, 1978), z konkanawaliną A (Int. J. Cancer 26, 665, 1980), z polimerami (J. Nat. Cancer Inst. 62, 1261, 1979), z albuminą surowicy wołu (J. Nat. Cancer Inst. 62, 79, 1979) itp.

W doświadczeniach in vitro stwierdzono, że liposomy zawierające MTX zwiększały znacznie powinowactwo leku do komórek białaczkowych (J. Nat. Cancer Inst. 64, 715, 1980).

Nieoczekiwanie okazało się, że bardzo interesujące własności przeciwnowotworowe wykazuje otrzymany sposobem według wynalazku nowy koniugat kwasu 4-amino-N₁₀-metylo-pteroido-glutaminowego z fibrynogenem zarówno pochodzenia ludzkiego, jak i zwierzęcego. Fibrynogen jest rozpuszczalnym białkiem odpowiedzialnym za krzepnięcie krwi. W procesach krzepnięcia przechodzi w nierozpuszczalną fibrynę. Ponadto wykazuje bardzo słabą immunogenność (Fibrynogen s. 277, wyd. Marcel Dekker; N.Y. 1968).

Według wynalazku sposób wytwarzania nowych koniugatów kwasu 4-amino-N₁₀-metylo-pteroido-glutaminowego z białkiem przy użyciu jako czynnika sprzęgającego związków karbodiimidowych polega na tym, że

kwasy 4-amino- N_{10} -metylo-pteroido-glutaminowe sprzęga się z fibrynogenem ludzkim lub zwierzęcym poddany częściowej hydrolizie za pomocą kwasu organicznego, zwłaszcza kwasu mrówkowego w temperaturze 60-100°C. Podhydrolizowany fibrynogen dializuje się następnie tak długo do wody, aby jego pH wzrosło powyżej 3. Według wynalazku, reakcję sprzęgania prowadzi się w środowisku wodnym w obecności rozpuszczalnych w tym środowisku karbodiimidów, przy czym korzystne jest poddawanie mieszaniny reakcyjnej wielokrotnemu działaniu ultradźwięków.

W wyniku reakcji otrzymuje się żółtomleczną zawiesinę o wagowym stopniu podstawienia MTX: fibrynogen w zakresie 1:5-20, którą dializuje się następnie do wody przez około 50 godzin i w tej postaci stosuje się do testów biologicznych.

Przeprowadzone badania na myszach CDF z białaczką P388 wykazały, iż koniugat otrzymany sposobem według wynalazku, podany dootrzewnowo w dawkach 10 i 20 mg (w przeliczeniu na wolny MTX) na kilogram wagi maszy przedłuża średni czas przeżycia zwierząt odpowiednio 35 i 30% w stosunku do grupy myszy, którym podawano wolny MTX.

Niżej podany przykład wyjaśnia bliżej sposób według wynalazku nie ograniczając jednak jego zakresu.

P r z y k ł a d: A. Przygotowanie fibrynogenu do sprzęgania. 160 mg fibrynogenu wołowego (firma Bio-med, Polska) rozpuszcza się w 4,5 ml 75% kwasu mrówkowego i ogrzewa przez 25 minut w temperaturze 100°C, a następnie dializuje do wody dejonizowanej przez 48 godzin, tak aby pH próbki wynosiło 4.

B. Sprzęganie z MTX. Bezpośrednio przed rozpoczęciem reakcji sprzęgania pH próbki fibrynogenu przygotowywanego jak w punkcie A, doprowadza się do 5.9 za pomocą 0.05 M NaOH. W otrzymanym roztworze rozpuszcza się 15 mg MTX (Werfft-Chemie, Austria). Roztwór umieszcza się w łaźni wodnej o temperaturze 20°C i dodaje małymi porcjami 26 mg chlorowodoru 1-etylo-3-(3-dwumetyloaminopropyl)karbodiimidu (firmy Serva, RFN). Podczas reakcji koniugowania próbkę przez 6 godzin poddaje się wielokrotnemu jednogodzinowemu działaniu ultradźwięków w sonifikatorze DZ-11. Otrzymaną żółtomleczną zawiesinę dializuje się przez 48 godzin do wody dejonizowanej.

Uzyskany produkt stanowi żółtomleczną zawiesinę o wagowym stopniu podstawienia MTX: fibrynogen 1:8

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania nowych koniugatów kwasu 4-amino- N_{10} -metylo-pteroido-glutaminowego z białkiem przy użyciu jako czynnika sprzęgającego związków karbodiimidowych, z n a m i e n n y t y m, że kwas 4-amino- N_{10} -metylo-pteroido-glutaminowy sprzęga się z fibrynogenem ludzkim lub zwierzęcym, uprzednio hydrolizowanym.

2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że stosuje się fibrynogen poddany częściowej hydrolizie za pomocą kwasu organicznego, korzystnie kwasu mrówkowego w temperaturze 60-100°C i następnie dializowany do pH powyżej 3.

3. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że reakcję sprzęgania prowadzi się w środowisku wodnym w obecności rozpuszczalnych w tym środowisku karbodiimidów.

4. Sposób według zastrz. 1 lub 3, z n a m i e n n y t y m, że mieszaninę reakcyjną poddaje się działaniu ultradźwięków.