



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

253069

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 07 F 15/00

(22) Přihlášeno 09 11 84

(21) PV 8539-84

(40) Zveřejněno 12 03 87

(45) Vydáno 16 05 88

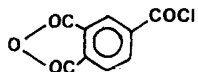
(75)

Autor vynálezu

DROBNÍK JAROSLAV doc. RNDr. CSc., NOSKOVÁ DAGMAR RNDr.,
RYPÁČEK FRANTIŠEK RNDr. CSc., METALOVÁ MARIE ing.,
SAUDEK VLADIMÍR RNDr. CSc., PRAHA

(54) Makromolekulární protirakovinné léčivo obsahující platínu a způsob jeho výroby

Makromolekulární protirakovinné léčivo, jehož hydroxylové skupiny bočních řetězců polymeru, mající charakter primárních, sekundárních nebo terciárních alkoholů, jsou zcela nebo částečně esterifikovány karboxylem v poloze 1,2,4-trikarboxybenzenu, přičemž na karboxylech v poloze C1 a C2 je vázán atom platiny s koordinačně vázanými aminoligandami. Způsob výroby protirakovinného léčiva spočívá v tom, že polymer nesoucí alkoholické skupiny je acylován chloridem anhydridu kyseliny trimelitové vzorce II



(II)

v následujícím stupni se anhydrid hydrolyzuje a na vzniklé vicinální karboxyly se váže atom platiny, nesoucí aminoligand.

Vynález se týká makromolekulárního protirakovinného léčiva, obsahujícího platinu a způsob jeho výroby.

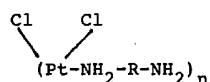
Protirakovinná léčiva, která zásahem do genetického aparátu nebo způsobu přeměny látek potlačují růst rakovinných buněk (cytostatika), mají vesměs nežádoucí účinky na zdravé buňky a orgány. Vývoj nových chemických struktur cytostatik směřuje ke zvětšení poměru účinku na rakovinnou k účinku na zdravou buňku.

Tento poměr však není závislý jen na struktuře, ale také na koncentraci cytostatika, které přichází do styku s oběma typy buněk. Posunout koncentrační poměr směrem k vyšší koncentraci v okolí nádorových buněk se snaží různé metody aplikace cytostatik. Tak například se používá injekce do tepny, zásobující nádor krví, při ascitických formách nádorů se podávají cytostatika intraperitoneálně, při nádorech močového měchýře se roztokem cytostatika plní přímo močový měchýř, používají se implantáty, obsahující cytostatikum zaváděné do blízkosti tumoru a podobně.

Tyto metody však mají použití jen ve speciálních případech. Obecnější použití by měla cytostatika s dostatečně velkou molekulou, která by měla omezený prostup biologickými bariérami. Tím by se například zamezilo rychlému vylučování močí, což vyvolává nutnost častého podávání a kromě toho je příčinou poškození ledvin.

Byly vyvinuty na polymer vázané formy různých cytostatik, například adriamycinu, cyklofosfamidů, metotrexátu, cytosinarabinosidu a podobně. Pokusy o přípravu polymerních cytostatik obsahující platinu nebyly však úspěšné, protože platina v nich vázaná nemohla reagovat se složkami nádorových buněk způsobem, který je nezbytný pro její protinádorové působení.

Tak například C.E. Carraher jr. popsal polymer, ve kterém je atom platiny zabudován do hlavního řetězce polymerů tvořeného diaminy, obecného vzorce



nebo platinový derivát, kde aminoligandem je poly-bis(methylamino)phosphazen, polyvinylamin, kopolymer polyvinylamidu s vinylsulfonátem, nebo polyethylenimin.

Kromě výše zmíněné nevýhodné reaktivity atomu platiny mají tyto polymery další nevýhodu v rezistenci k biologické degradaci. Jejich podávání pacientům by vyvolalo nebezpečí hromadění v těle.

Autoři vynálezu nyní zjistili, že je možné připravit makromolekulární látku, která v biologickém prostředí zvolna uvolňuje nízkomolekulární koordinační komplex platiny, který může vstupovat do buněk a působit tak, že vyvolává protirakovinný účinek.

Předmětem vynálezu je makromolekulární látka, vyznačená tím, že hydroxylové skupiny bočních řetězců polymeru, vybraného ze skupiny zahrnující polyaminokyseliny, polysacharidy, polyamidy obsahující alfa-hydroxykyseliny, mající charakter primárních, sekundárních nebo terciárních alkoholů, jsou zcela nebo částečně esterifikovány karboxylem v poloze C4 1,2,4-trikarboxybenzenu, přičemž na karboxylech v poloze C1 a C2 je vázán atom platiny s koordinačně vázanými aminoligandami, které jsou představovány dvěma molekulami monoaminu ze skupiny amoniak, alkylamin, kde alkyl je tvořen lineárním nebo rozvětveným řetězcem, obsahujícím 1 až 6 atomů uhlíku nebo cykloalkylaminem, kde cykloalkyl je tvořen 4 až 7 atomy uhlíku nebo diaminem, jehož uhlíkový řetězec má lineární nebo větvenou strukturu obsahující 1 až 6 atomů uhlíku nebo 1,2-diaminocykloalkylem, kde cykloalkyl je tvořen kruhovou strukturou obsahující 4 až 7 atomů uhlíku nebo diaminem obecného vzorce I



kde R je cykloalkylen o počtu uhlíkových atomů 4 až 7 a $m = 0, 1$ nebo 2 a $n = 1$ nebo 2.

Předmětem vynálezu je dále způsob výroby makromolekulárního léčiva vyznačený tím, že polymer nesoucí výše uvedené alkoholické skupiny je acylován chloridem anhydridu kyseliny trimelitové vzorce II



v následujícím stupni se anhydrid hydrolyzuje a na vzniklé vicinální karboxyly se váže atom dvoumocné platiny nesoucí výše uvedené aminoligandy.

Výhodou makromolekulární látky podle vynálezu je to, že může být připraven z makromolekul, které po odštěpení platinového komplexu jsou v těle plně rozloženy a stráveny, dále to, že molekulová hmotnost může být přizpůsobena požadavkům terapie, dále to, že oddělování nízkomolekulárního komplexu může být do značné míry regulováno, dále to, že odštěpovaný komplex může být vybrán ze sloučenin, jejichž protinádorová aktivita byla již prokázána.

Výhodou makromolekulární látky podle vynálezu je také to, že nízkomolekulární účinný komplex platiny je v těle od makromolekuly odštěpován, za přispění enzymů nebo i bez jejich účasti, což je dáno hydrolýzou esterové vazby mezi hydroxyly na bočních řetězcích polymeru a karboxylem kyseliny trimelitové (1,2,4-trikarboxybenzeny). Výhodou je dále to, že stabilita a tudíž rychlost hydrolýzy se dá snadno regulovat charakterem a okolím zúčastněných hydroxylů na polymeru.

Výhodou makromolekulární látky podle vynálezu je dále to, že aminoligand se dá vybrat ze skupiny prověřených a osvědčených aminoligand z hlediska lékové účinnosti, neboť způsob vazby na polymer a rychlost odštěpování není v povaze aminoligandu závislý.

Výhodou makromolekulární látky podle vynálezu je dále to, že může být připravena z makromolekul, které po odštěpení platinového komplexu jsou v těle kompletně rozloženy a stráveny a není tedy nebezpečí jejich hromadění a s tím spojených nežádoucích účinků ohrožujících pacienta.

Výhodou je dále to, že molekulová hmotnost může být podřízena zájmům terapie a že makromolekula může obsahovat ještě další chemické skupiny, které požadovaným způsobem ovlivňují pohyb makromolekuly v těle a pozitivně její terapeutickou účinnost.

Předmět vynálezu je dokumentován následujícími příklady, aniž je jimi omezen.

P ř í k l a d 1

1,5 g poly N-(2-hydroxyethyl)-D,L-aspartamidu bylo rozpuštěno v 45 ml N,N-dimethylacetamidu, přidáno 1,05 g chloridu anhydridu kyseliny trimelitové a 10 ml pyridinu. Směs byla míchána při teplotě místnosti 48 hodin. Poté přidáno 10 ml konc. kyseliny octové a směs lita pomalu do 750 ml vychlazeného acetonu. Sraženina promyta acetonem, rozpuštěna v 25 ml vody, pH upraveno na 5,0 pomocí hydroxidu sodného (NaOH) 1 ml.l⁻¹ a dialyzováno proti deionizované vodě 4 dny. Objem dialyzátu upraven na 25 ml při vlnové délce 283 nm dále kalibrační křivky stanoveno množství navázaného 1,2,4-trikarboxybenzeny. Bylo dosaženo 43% substituce hydroxylových skupin. Do vodného roztoku bylo přidáno 75 ml roztoku 1,4 g trans-1,2-diaminocyklohexan-

-dinitroplatnatého komplexu ve vodě. Směs byla míchána 72 hodin ve tmě při teplotě místnosti. Poté byla dialyzována proti deionizované vodě 7 dní. Po dialýze byl objem upraven na 40 ml, obsah platiny stanoven neutronovou aktivační analýzou a obsah 1,2,4-trikarboxybenzeny změřen spektroskopicky ve vzorku, který byl naředěn 5% roztokem jodidu draselného a ponechán stát 8 hodin. Bylo zjištěno, že koncentrace platiny je $56,4 \text{ mmol.l}^{-1}$ a koncentrace celkového 1,2,4-trikarboxybenzeny $89,1 \text{ mmol.l}^{-1}$, sušina 67,3 mg/ml. Vysušený polymer byl podroben elementární analýze a stanoveno složení, které je v tabulce 1.

P ř í k l a d 2

1,7 g poly N-(2-hydroxypropyl)-D,L-aspartamidu bylo rozpuštěno v 45 ml N,N-dimethylacetamidu, přidáno 2,1 g chloridu anhydridu kyseliny trimelitové a 10 ml pyridinu. Směs byla míchána při teplotě místnosti 48 hodin a polymer dále zpracován jako v příkladu 1. Bylo dosaženo 39,5 % acylace a alkoholových skupin. K roztoku polymeru vyčištěného dialýzou přidáno 50 ml vodného roztoku 1,04 g trans-1,2-diaminocyklohexan-dinitratoplatnatého komplexu. Po 72 hodinách byla směs dialyzována a analyzována jako v příkladu 1. Složení produktu je v tab. 1.

P ř í k l a d 3

1,7 g poly N-(2-hydroxyethyl)-L-glutaminu bylo zpracováno jako v příkladu 1. Acylace alkoholových skupin proběhla do 3 %. Proto bylo použito 1,56 g trans-1,2-diaminocyklohexandinitroplatnatého komplexu v 75 ml vody. Výsledný produkt měl složení jak uvedeno v tabulce 1.

P ř í k l a d 4

1,9 g poly N-(2-hydroxypropyl)-L-glutaminu bylo zpracováno jako v příkladu 2. Bylo dosaženo 18 % acylace alkoholových skupin. Pro vazbu platiny bylo použito 0,72 g trans-1,2-diaminocyklohexandinitratoplatnatého komplexu v 35 ml vody. Složení produktu viz tabulka 1.

P ř í k l a d 5

1,5 g inulinu přesráženého acetonem a vysušeného bylo rozpuštěno v 25 ml N,N-dimethylacetamidu. Bylo přidáno 2 g chloridu anhydridu trimelitové kyseliny a 8 ml pyridinu. Po 48 hodinách míchání za teploty místnosti byl roztok přesrážen desetinasobným množstvím acetonu. Produkt byl rozpuštěn ve fosfátovém pufru o pH 5 a dialyzován proti deionizované vodě. Po upravení objemu na 25 ml bylo nalezeno spektrofotometricky 2 mmoly zbytku trikarboxybenzeny v celkovém množství. Bylo přidáno ekvimolární množství trans-1,2-diaminocyklohexan-dinitroplatnatého komplexu a po dvou dnech opět dialyzováno. Složení produktu viz tabulka 1.

P ř í k l a d 6

1,5 g polyamidu o složení $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH.CO}(\text{CHOH})_4\text{CO}_n$ připraveného kondenzací 1,2-diaminoethanu a kyseliny slizové (galaktarové) bylo rozpuštěno v 45 ml N,N-dimethylacetamidu a zpracováno jako v příkladu 5. Složení produktu viz tabulka 1.

P ř í k l a d 7

Polymer nesoucí zbytky trikarboxybenzeny byl připraven jako v příkladu 1 a reagován s 100 ml vodného roztoku obsahujícího 1,14 g diamindinitratoplatnatého komplexu. Další postup byl stejný jako v příkladu 1. Složení produktu viz tabulka 1.

P ř í k l a d 8

Polymer nesoucí zbytky trikarboxybenzeny byl připraven jako v příkladu 1 a reagován se 100 ml vodného roztoku obsahujícího 1,22 g etylendiamindinitratoplatnatého komplexu. Po zpracování jako v příkladu 1 byl získán produkt, jehož složení je v tabulce 1.

P ř í k l a d 9

Polymer nesoucí zbytky trikarboxybenzenů byl zpracován jako v příkladu 1 a reagován s 100 ml vodného roztoku obsahujícího 1,45 g trans-(1-aminomethyl-1-amino)cyclohexan-dinitratoplatnatého komplexu. Bylo ponecháno reagovat jako v příkladu 1. Analýza produktu je v tabulce 1.

P ř í k l a d 10

Polymer nesoucí zbytky trikarboxybenzenů byl zpracován jako v příkladu 1 a reagován se 100 ml vodného roztoku obsahujícího 1,4 g cis-/bis(isopropylamin)dinitroplatnatého komplexu a ponecháno reagovat jako v příkladu 1. Analýza produktu je v tabulce 1.

Tabulka 1

Složení roztoku polymerů po dialýze a zahuštění, připravených podle příkladů 1 až 10

Příklad	Aminoligand vázaný na atom platiny	Složení sušina %	roztoku obs.Pt mmol/l	Zastoupení monomerů ^{a)}			Elementární analýza			
				základní mol.%	TMA mol.%	mol.%	C %	H %	N %	Pt %
1	1,2-diaminocyklohexan (trans) (DACH)	6,73	56,4	57,1	15,7	27,1	42,6	4,65	11,0	16,34
2	DACH	6,23	46,5	60,5	15,6	23,9	44,8	5,06	10,8	14,54
3	DACH	7,42	54,1	64,8	12,7	22,5	44,9	5,17	11,1	14,23
4	DACH	6,00	33,5	82,1	3,1	14,8	47,4	6,25	12,1	10,90
5	DACH	5,30	33,5	77,2	5,6	17,2	40,1	5,30	1,77	12,33
6	DACH	5,50	30,4	69,7	10,5	19,8	39,9	5,05	6,28	10,78
7	NH ₃	4,10	42,7	57,1	13,6	29,2	37,23	4,45	12,14	20,35
8	1,2-diaminoetan	4,40	36,4	57,1	17,6	25,2	40,8	4,54	11,5	16,15
9	1-aminometyl-1-aminocyklohexan	5,10	45,8	57,1	12,5	30,4	42,6	4,76	10,8	17,34
10	isopropylamin	3,20	21,6	57,1	22,3	20,6	43,7	5,09	11,07	13,18

a) Uvádí se nesubstituovaný monomer jako základní, monomer acylovaný 1,2,4-trikarboxybenzenem jako TMA a monomer substituovaný 1,2,4-trikarboxybenzenem, na který je vázán atom platiny s aminoligandem jako Pt.mol.% je počet daného monomeru na 100 monomerních jednotek.

P ř í k l a d 11

Samcům SPF-myši o hmotnosti 20 g ± 1 g byl intraperitoneálně vpraven roztok polymeru připraveného podle příkladu 2 příslušně naředěného 5% roztokem glukózy. Myši byly chovány standardním způsobem a sledován úhyn. Úhyn v závislosti na dávce je v tabulce 2.

Tabulka 2

Úhyn samců SPF myši v závislosti na dávce (vyjádřené v μ molech Pt na kg živé hmotnosti) polymeru připraveného podle příkladu 2.

Dávka μ mol/kg	počet v pokusech	uhynulo	% úhynu
168	6	6	100
121	6	3	50
84	6	1	17
42	6	0	0

P ř í k l a d 12

Samcům SPF-myší o hmotnosti 20 g $\pm$ 0,8 g bylo do ocasní žíly podáno

- a) 0,7 umolu trans-1,2-diaminocyklohexanu-trimelitátopleťnatého komplexu v 0,2 ml 5% glukózy,
- b) 0,4 umolu cis-diamindichloropleťnatého komplexu ve 0,2 ml fyziologického roztoku,
- c) 0,9 umolu platiny v podobě produktu příkladu 3 v 0,2 ml 5% glukózy.

V určitých časových intervalech byla zvířata utrácena a odebrány vzorky krve, ledvin, jater, sleziny a svalů. Byla stanovena sušina a obsah platiny. Výsledky jsou v tabulce 3.

Tabulka 3
Obsah platiny v ppm v sušině

	Látka a			Látka b			Látka c		
	1 h	6 h	24 h	4 h	8 h	28 h	1 h	6 h	24 h
Krev	13,9	6,56	3,71	3,1	3,2	3,8	249	97,2	34,9
Ledvina	27,1	12,4	24,1	13,2	31,6	52,9	13,1	11,9	57,1
Játra	8,9	13,9	10,1	16,1	8,7	95,5	12,7	12,0	98,1
Slezina	5,2	3,2	9,5	7,8	6,3	67,1	2,8	6,0	65,1
Sval	3,2	2,3	2,3	2,0	6,0	8,6	2,0	1,6	16,8

Na distribuci se příznivě projevuje makromolekulární charakter, zejména dlouhodobou hladinou v krvi a nízkou hladinou v ledvinách.

P ř í k l a d 13

Myším samcům DBA/2-J bylo naočkováno intraperitoneálně (ip) 10^5 buněk leukémie P 388. Byly rozděleny na 4 skupiny: Kontrola - neošetřené, TMA - kterým byl aplikován 1,2-diaminocyklohexantrimelitátopleťnatý komplex v 5% glukóze upravené hydrouhličitánem sodným na pH = 7,2, P1 - kterým byl aplikován polymer připravený podle příkladu 1, a P3 - kterým byl aplikován polymer připravený podle příkladu 3. V obou případech byly polymery ředěny vodou pro injekce. Bylo sledováno přežití ve dnech a hodnoceno v % kontroly jako ILS. Výsledky jsou v tabulce 4.

P ř í k l a d 14

Myším samicím H bylo intraperitoneálně (ip) aplikováno 0,2 ml exsudátu obsahujícího 2×10^7 buněk ascitického nádoru. Kontrolní skupina byla ponechána bez ošetření, skupině P1 byl podán polymer z příkladu 1, skupině P2 polymer, připravený podle příkladu 2 a skupině CDDP byl aplikován roztok cis-diamindichloropleťnatého komplexu (cis-platina) ve fyziologickém roztoku. Každá skupina čítala 20 zvířat. 10 bylo utráceno 10. den po podání a stanovena buněčnost exsudátu centrifugací v kapiláře (ascitokryt) a hmotnost exsudátu. Další skupina 10 zvířat byla ponechána na přežití. Výsledky jsou vyjadřovány v % kontroly. Jsou uvedeny v tab. 5.

Tabulka 4

Účinek preparátů na leukémii P 388 hodnocení podle délky přežití. Preparáty ip v den 1.

Skupina	Dávka $\mu\text{mol}/\text{Pt/kg}$	Průměrné přežití	ILS %
Kontrola	0	20,6 d	100,0
P1	61,5	43,2	209,7
P1	30,7	47,6	231,1
P3	20,5	46,0	223,3
P3	10,2	35,4	171,8
Kontrola	0	20,0	100,0
TMA	38,6	36,26	181,3
TMA	19,3	49,0	245,0

Tabulka 5

Účinek preparátů na ascitické nádory u samic myši H. Podtržené hodnoty jsou statisticky průkazné ($p < 0,01$).

Skupina	Dávka $\mu\text{mol/kg}$	Aplikace	Hmotnost ^{a)}	Ascitokryt	Přežití
Ehrlichův ascitický tumor					
P1	51,5	ip	<u>27</u>	<u>20</u>	107
P1	25,6	ip	123	<u>56</u>	132
P2	46,6	ip	<u>16</u>	<u>12</u>	68
P2	23,3	ip	133	<u>68</u>	95
P2	11,6	ip	156	66	112
cDDP	16,7	ip	<u>30</u>	<u>15</u>	107
cDDP	8,3	ip	<u>70</u>	<u>50</u>	127

Tabulka 5 (pokračování)

Skupina	Dávka $\mu\text{mol Pt/kg}$	Aplikace	Hmotnost ^{a)}	Ascitokryt	Přežití
Ascitický myší sarkom S 37					
P1	68,4	ip	<u>16</u>	<u>2,5</u>	55
P1	34,2	ip	<u>32</u>	<u>20</u>	88
cDDP	16,7	ip	<u>25</u>	<u>6</u>	99
cDDP	8,3	ip	98	<u>50</u>	100

a) Hmotnost ascitu velmi kolísá a má tendenci se zvětšovat, neboť hlavním vedlejším účinkem platinových cytostatik je narušení bilance tekutin a elektrolytů, projevující se nadměrným pitím a spojené se změnou funkce ledvinových tubulů.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Makromolekulární protirakovinné léčivo obsahující platinu, vyznačené tím, že hydroxylové skupiny bočních řetězců polymeru, vybraného ze skupiny zahrnující polyaminokyseliny, polysacharidy, polyamidy obsahující alfa-hydroxykyseliny, mající charakter primárních, sekundárních nebo terciárních alkoholů, jsou zcela nebo částečně esterifikovány karboxylem v poloze C4 1,2,4-trikarboxybenzenu, přičemž na karboxylech v poloze C1 a C2 je vázán atom platiny s koordinačně vázanými aminoligandami, které jsou představovány dvěma molekulami monoaminu

ze skupiny amoniak, alkylamin, kde alkyl je tvořen lineárním nebo rozvětveným řetězcem obsahujícím 1 až 6 atomů uhlíku nebo cykloalkylaminem, kde cykloalkyl je tvořen 4 až 7 atomy uhlíku nebo diaminem, jehož uhlíkový řetězec má lineární nebo větvenou strukturu obsahující 1 až 6 atomů uhlíku nebo 1,2-diaminocykloalkylem, kde cykloalkyl je tvořen kruhovou strukturou obsahující 4 až 7 atomů uhlíku nebo diaminem obecného vzorce I



kde R je cykloalkylen o počtu uhlíkových atomů 4 až 7 a $m = 0, 1$ nebo 2 a $N = 1$ nebo 2.

2. Způsob výroby makromolekulárního léčiva podle bodu 1, vyznačený tím, že polymer, nesoucí výše uvedené alkoholické skupiny je acylován chloridem anhydridu kyseliny trimelitové vzorce II



v následujícím stupni se anhydrid hydrolyzuje a na vzniklé vicinální karboxyly se váže atom dvoumocné platiny nesoucí výše uvedené aminoligandy.