

(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **267 497 A1**4(51) C 08 B 31/00
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 B / 308 900 8

(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 Polysaccharide

(55) polymere Cytostatika, Methotrexat, Polysaccharide, polymeranaloge Umsetzung, Antikrebsmittel

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bindung von Methotrexat an Polysaccharide. Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Polymerfixierung von Methotrexat an Polysaccharide zu schaffen, dessen Produkte wasserlösliche untoxische polymere Cytostatika sind. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß ein wasserlösliches Kartoffelstärkehydrolyseprodukt in einem für Methotrexat geeigneten Lösungsmittel unter der katalytischen Wirkung von Dimethylaminopyridin und Dicyclohexylcarbodiimid mit Methotrexat zur Reaktion gebracht wird. Der Methotrexatgehalt wird dabei so eingestellt, daß die Wasserlöslichkeit des Trägers erhalten bleibt. Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist seine gute Produzierbarkeit und die hohe Wasserlöslichkeit des Produkts bei guter antineoplastischer Aktivität in vivo.

Patentanspruch:

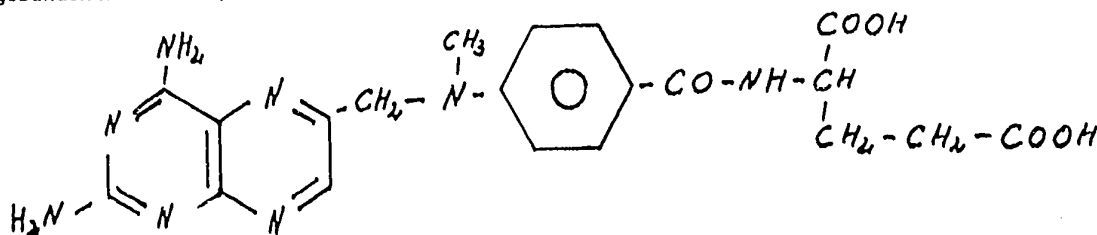
1. Verfahren zur Bindung von Methotrexat an Polysaccharide, dadurch gekennzeichnet, daß wasserlösliches Kartoffelstärkehydrolyseprodukt in für Methotrexat geeigneten organischen Lösungsmitteln mit Methotrexat, bei Molverhältnissen Monomereinheit Polysaccharid zu Methotrexat von 10:1 bis 5:1, wobei die Methotrexatkonzentration im Lösungsmittel $1 \cdot 10^{-2}$ bis $5 \cdot 10^{-2} \text{ Mol l}^{-1}$ beträgt, in Gegenwart von 10^{-3} bis 10^{-5} Mol Dimethylaminopyridin und mindestens 1 Mol Dicyclohexylcarbodiimid bezogen auf 1 Mol Methotrexat zu Reaktion gebracht wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Lösungsmittel für Methotrexat Dimethylacetamid und/oder Dimethylformamid und/oder Dimethylsulfoxid eingesetzt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktion 1 bis 5 Stunden bei 273 bis 278K und nachfolgend 5 bis 10 Stunden bei 343 bis 373K durchgeführt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Polymerfixierung von Methotrexat an Polysaccharide, das zur Synthese neuer Cytostatika mit verbesserten Eigenschaften verwendet werden kann, welche in der Humanmedizin einsetzbar sind.

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 prinzipiell sowohl über die NH_2 -Gruppen des Pteridinringes wie auch über die COOH -Gruppen der Glutaminsäure des Methotrexats 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 Behandlung zugänglich

(J. M. WHITLEY; B. C. F. CHU und J. GALIVAN.

Biomedical and dental applications of polymers: Polymer Science and Technology Vol 14 Ed. by G. G. GEBELEIN und F. F. KOBLITZ: 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 in 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 z. T. sehr kostspielig.

Es wurde auch versucht, durch Verwendung leichter zugänglich synthetischer Polymerer diese Mängel zu umgehen. Dabei ergaben Polyvinylalkohol und Polyethylenimin keine befriedigende Wirksamkeit der Polymer-Wirkstoff-Konjugate. 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 Substanz erschwert ist.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein gut reproduzierbares Verfahren zur Polymerbindung von Methotrexat an Polysaccharide 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 reversibel an Polysaccharide fixiert wird und dessen Produkte wasserlösliche Polymere mit antineoplastischer Aktivität sind. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß ein wasserlösliches Kartoffelstärkehydrolyseprodukt in einem für Methotrexat geeigneten Lösungsmittel, vorzugsweise Dimethylacetamid, Dimethylformamid oder Dimethylsulfoxid mit Methotrexat unter Zusatz von 10^{-3} bis 10^{-5} Mol eines Acylierungskatalysators, vorzugsweise Dimethylaminopyridin und

mindestens 1 Mol eines wasserentziehenden Mittels, vorzugsweise Dicyclohexylcarbodiimid pro Mol Methotrexat umgesetzt wird.

Der Gehalt des Produktes an Methotrexat wird durch das Molverhältnis Monomerbaustein zu Methotrexat in der Reaktionslösung, durch die Reaktionstemperatur sowie -zeit festgelegt und kann in üblicher Weise über diese Größe gezielt eingestellt werden.

Es ist für die Aufarbeitung und Anwendung des Produktes von Vorteil, wenn die Reaktion so durchgeführt wird, daß der Umsetzungsgrad des Methotrexats über 50%, vorzugsweise über 80% liegt. Dazu ist es günstig, die Reaktion zunächst bei 0 bis 5°C, 1 bis 5 Stunden durchzuführen und anschließend bei 70 bis 100°C vorzugsweise 80°C 5 bis 10 Stunden zu vervollständigen.

Die Konzentration des Methotrexats in der Reaktionslösung kann in weiten Grenzen variiert werden. Bei Verwendung von Dimethylsulfoxid werden gute Ergebnisse mit Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-2}$ bis $5 \cdot 10^{-2}$ Mol/l erreicht bei Molverhältnissen Monomereinheit Polysaccharid zu Methotrexat von 10:1 bis 5:1.

Die wasserlöslichen Polymer-Wirkstoff-Konjugate besitzen antineoplastische Aktivität. Es muß als überraschendes Ergebnis gewertet werden, daß durch die Polymerfixierung die Wirksamkeit des Methotrexats gegenüber dem soliden Modelltumor Melanom B 16 verglichen mit dem freien Wirkstoff erhöht ist.

Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist seine gute Reproduzierbarkeit und die hohe Wasserlöslichkeit des Produkts.

Die Verwendung biologisch abbaubarer natürlicher Polymerer (z. B. Polysaccharide) bringt den Vorteil, daß die Wirkstofffreisetzung durch den Bioabbau zusätzlich gesteuert werden kann und die weitgehend untoxischen Abbauprodukte ausgeschieden werden.

Das folgende Ausführungsbeispiel erläutert die Erfindung ohne sie einzuschränken.

Ausführungsbeispiel

Durchführung des Tests

Als Tiermaterial wurden BDF₁-Mäuseböckchen aus der Zucht des Zentralinstituts für Krebsforschung der AdW der DDR, Berlin-Buch, verwendet. Als Testtumoren wurden die Leukämie P 388 und das Melanom B 16 gewählt. Bei P 388 bekam jedes Tier etwa 5×10^5 Zellen i. 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

0,45g (1 mMol) Methotrexat und 1,135g Kartoffelstärkehydrolyseprodukt (DP30) werden in 50 ml Dimethylsulfoxid gelöst, auf 0°C gekühlt, 0,21g Dicyclohexylcarbodiimid und 0,1g Dimethylaminopyridin hinzugegeben und 3h geschüttelt. Anschließend wird 3h bei Raumtemperatur und 3h bei 80°C gerührt.

Der gebildete Harnstoff wird abfiltriert und das Polymer in Chloroform gefällt. Das getrocknete Pulver wird mit Wasser aufgenommen, filtriert und das Wasser im Rotationsverdampfer abdestilliert.

Der Wirkstoffgehalt des Produktes beträgt 25 Ma.-%. Die Wirksamkeit gegenüber P 388 ist verglichen mit freiem Methotrexat geringer, die gegenüber dem B 16-Melanom enthält die Tabelle.

Wird ein Gemisch aus Kartoffelstärke und Methotrexat gleicher Zusammensetzung (25 Ma.-% Methotrexat) zum Test eingesetzt, bleibt die Wirkung des freien Methotrexats unbeeinflusst (Probe 2 der Tabelle).

Tabelle

Mittlere Überlebenszeit (in Tagen) von BDF₁-Mäusen nach i. p. Injektion von B 16 und Behandlung

Dosis mg/kg/Injektion	20	40
Tag der Applikation nach Tumorinkubation Probe	1	1
Kontrolle	21	21
Methotrexat	26	26
1	31	30
2	25	24