

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-501859

(P2005-501859A)

(43) 公表日 平成17年1月20日(2005.1.20)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07D 211/46	C O 7 D 211/46	4 C O 5 4
A61K 9/127	A 6 1 K 9/127	4 C O 7 6
A61K 31/555	A 6 1 K 31/555	4 C O 8 6
A61P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A61P 43/00	A 6 1 P 43/00 1 O 5	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 126 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-522518 (P2003-522518)	(71) 出願人	503083166
(86) (22) 出願日	平成14年8月21日 (2002.8.21)		イサム・リサーチ・デベロップメント・カンパニー・オブ・ザ・ヘブル・ユニバーシテイ・オブ・エルサレム
(85) 翻訳文提出日	平成16年2月17日 (2004.2.17)		イスラエル91390エルサレム・ギバトラム・エドモンドサフラキヤンパス・ハイテクパーク
(86) 国際出願番号	PCT/IL2002/000687	(74) 代理人	100060782
(87) 国際公開番号	W02003/017998		弁理士 小田島 平吉
(87) 国際公開日	平成15年3月6日 (2003.3.6)	(72) 発明者	バレンホルツ, イエチエズケル
(31) 優先権主張番号	60/314, 115		イスラエル・93707エルサレム・ナベシヤ・ナンストリート18
(32) 優先日	平成13年8月23日 (2001.8.23)	(72) 発明者	ギブソン, ダン
(33) 優先権主張国	米国 (US)		イスラエル・93548エルサレム・ナシユシヨンストリート1
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 白金錯体及びガンの処置におけるそれらの使用

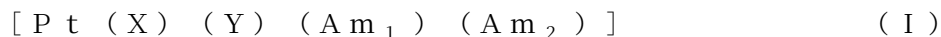
(57) 【要約】

本発明は、アミンリガンドの少なくとも1つが非一平面状複素環式脂肪族アミンである新規な白金錯体に関する。白金錯体はトランス又はシス立体配置にあることができ、治療的活性を有することが見出された。かくして本発明は新規な白金錯体、それらを含む製薬学的組成物及びそれらの他の使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一般式 (I) :



[式中:

—X及びYは、同一もしくは異なることができ、ハロゲン、カルボキシレート、ホスフェート又はサルフェート基を示し;

—Am₁ はアンモニア、第一級アミン、第二級アミン、非—平面状複素環式脂肪族アミン又は複素環式芳香族アミンから選ばれるアミンを示し;

—Am₂ は非—平面状複素環式脂肪族アミンを示す]

10

の白金錯体であって、但し、該錯体がシス立体配置にある場合、Am₁ 及び Am₂ は同時にピペリジンを示すことはできない白金錯体。

【請求項 2】

各モノマー単位が、独立してAm₁ を介して、Am₂ を介して、該Am₁ 又はAm₂ に連結したリンカーを介してあるいは該Am₁ とAm₂ から生成する環式環を介して他のPt—錯体に結合している請求項 1 で定義されているPt—錯体であるダイマー形態の請求項 1 の錯体。

【請求項 3】

該X及びYが同一もしくは異なり、クロリド又はヨウダイドを示す請求項 1 又は 2 の錯体。

20

【請求項 4】

該X及びYが両方ともクロリドを示す請求項 3 の錯体。

【請求項 5】

該Am₁ がアンモニアを示す請求項 1～4 のいずれか 1 つの錯体。

【請求項 6】

該Am₁ がメチルアミン、エチルアミン、n—プロピルアミン、イソプロピルアミン、n—ブチルアミン、n—ヘキシルアミン、n—ヘプチルアミン又はn—ノニルアミンから選ばれる第一級アミンを示す請求項 1～4 のいずれか 1 つの錯体。

【請求項 7】

該Am₁ がジメチルアミン、ジエチルアミン、ジプロピルアミン、ジブチルアミンから選ばれる第二級アミンを示す請求項 1～4 のいずれか 1 つの錯体。

30

【請求項 8】

該Am₁ がピペラジン、2—メチルピペラジン、ピペリジン、2—、3—もしくは4—ヒドロキシピペリジン、4—ピペリジノーピペリジン、ピロリジン、4—(2—ヒドロキシエチル) ピペラジン及び3—アミノピロリジンから選ばれる非—平面状複素環式脂肪族アミンを示す請求項 1～4 のいずれか 1 つの錯体。

【請求項 9】

該Am₁ がピリジン、2—、3—もしくは4—アミノピリジン、2—、3—もしくは4—ピコリン、キノリン、3—もしくは4—アミノキノリン、チアゾール、イミダゾール、3—ピロリン、ピラジン、2—メチルピラジン、4—アミノキナルジンから選ばれる複素環式芳香族アミンを示す請求項 1～4 のいずれか 1 つの錯体。

40

【請求項 10】

該Am₂ がピペラジン、2—メチルピペラジン、ピペリジン、2—、3—もしくは4—ヒドロキシピペリジン、4—ピペリジノーピペリジン、ピロリジン、4—(2—ヒドロキシエチル) ピペラジン及び3—アミノピロリジンから選ばれる非—平面状複素環式アミンを示す請求項 1～9 のいずれか 1 つの錯体。

【請求項 11】

トランス立体配置にある請求項 10 の錯体。

【請求項 12】

—トランス—[PtCl₂(NH₃)(ピペリジン)] ;

50

ートランスー [PtCl₂ (NH₃) (4-ヒドロキシピペリジン)] ;
 ートランスー [PtCl₂ (NH₃) (4-ピペリジノーピペリジン)] ;
 ートランスー [PtCl₂ (NH₃) (4, 4'-ビピペリジン)] ;
 ートランスー [PtCl₂ (4-ピコリン) (ピペリジン)] ;
 ートランスー [PtCl₂ (ピペリジン)₂] ;
 ートランスー [PtCl₂ (NH₃) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (イソプロピルアミン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (n-ブチルアミン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (n-ノニルアミン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (ピペリジン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (4-ピコリン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (ピペラジン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (NH₃) [4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン]] · HCl ;

10

から選ばれる請求項 11 の錯体。

【請求項 13】

シス立体配置にある請求項 10 の錯体。

【請求項 14】

シスー [PtCl₂ (NH₃) (ピペリジン)] 又はシスー [PtCl₂ (NH₃) (ピペラジン)] · HCl から選ばれる請求項 13 の錯体。

20

【請求項 15】

正に帯電している請求項 1～10 のいずれか 1 つの錯体。

【請求項 16】

該リンカーが 4, 7, 10-トリオキサ-1, 13-トリデカン鎖を含んでなる請求項 2 の錯体。

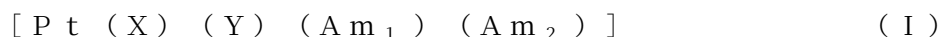
【請求項 17】

ビスー [{トランス, トランスー (PtCl₂ ピペラジン)₂ } (4, 7, 10-トリオキサ-1, 13-トリデカンジアミン)] · 2HCl である請求項 16 の錯体。

【請求項 18】

製薬学的に許容され得る担体ならびに活性成分として一般式：

30



[式中、

ーX 及び Y は、同一もしくは異なることができ、ハロゲン、カルボキシレート、ホスフェート又はサルフェート基を示し；

ーAm₁ はアンモニア、第一級アミン、第二級アミン、非一平面状複素環式脂肪族アミン又は複素環式芳香族アミンから選ばれるアミンを示し；

ーAm₂ は非一平面状複素環式脂肪族アミンを示す]

の白金錯体であって、但し、該錯体がシス立体配置にある場合、Am₁ 及び Am₂ は同時にピペリジンを示すことはできない白金 (Pt) 錯体の治療的に有効な量を含んでなる製薬学的組成物。

40

【請求項 19】

活性成分がダイマー形態の該 Pt 錯体であり、そこにおいて各モノマー単位は、独立して Am₁ を介して、Am₂ を介して、該 Am₁ 又は Am₂ に連結したリンカーを介してあるいは該 Am₁ と Am₂ から生成する環式環を介して他の Pt-錯体に結合している請求項 18 で定義されている Pt-錯体である請求項 18 の組成物。

【請求項 20】

活性成分が、X 及び Y が同一もしくは異なり、クロリド又はヨウダイドを示す該 Pt 錯体である請求項 18 又は 19 の組成物。

【請求項 21】

活性成分が、X 及び Y が両方ともクロリドを示す該 Pt 錯体である請求項 20 の組成物。

50

【請求項 2 2】

活性成分が、該 Am_1 がアンモニアを示す該 Pt 錯体を含んでなる請求項 1 8 ～ 2 1 のいずれか 1 つの組成物。

【請求項 2 3】

活性成分が、 Am_1 がメチルアミン、エチルアミン、 n -プロピルアミン、イソプロピルアミン、 n -ブチルアミン、 n -ヘキシルアミン、 n -ヘプチルアミン又は n -ノニルアミンから選ばれる第一級アミンを示す該 Pt 錯体を含んでなる請求項 1 8 ～ 2 1 のいずれか 1 つの組成物。

【請求項 2 4】

活性成分が、 Am_1 がジメチルアミン、ジエチルアミン、ジプロピルアミン、ジブチルアミンから選ばれる第二級アミンを示す該 Pt 錯体を含んでなる請求項 1 8 ～ 2 1 のいずれか 1 つの組成物。 10

【請求項 2 5】

活性成分が、 Am_1 がピリジン、2-、3-もしくは4-アミノピリジン、2-、3-もしくは4-ピコリン、キノリン、3-もしくは4-アミノキノリン、チアゾール、イミダゾール、3-ピロリン、ピラジン、2-メチルピラジン、4-アミノキナルジンから選ばれる複素環式芳香族アミンを示す該 Pt 錯体を含んでなる請求項 1 8 ～ 2 1 のいずれか 1 つの組成物。

【請求項 2 6】

活性成分が、 Am_1 がピペラジン、2-メチルピペラジン、2-ピラゾリン、ピペリジン、2-、3-もしくは4-ヒドロキシピペリジン、4-ピペリジノーピペリジン、ピロリジン、4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン又は3-アミノピロリジンから選ばれる非-平面状複素環式脂肪族アミンを示す該 Pt 錯体を含んでなる請求項 1 8 ～ 2 1 のいずれか 1 つの組成物。 20

【請求項 2 7】

活性成分が、 Am_2 がピペラジン、2-メチルピペラジン、2-ピラゾリン、ピペリジン、2-、3-もしくは4-ヒドロキシピペリジン、4-ピペリジノーピペリジン、ピロリジン、4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン又は3-アミノピロリジンから選ばれる非-平面状複素環式脂肪族アミンである該 Pt 錯体を含んでなる請求項 1 8 ～ 2 6 のいずれか 1 つの組成物。 30

【請求項 2 8】

活性成分がトランス立体配置にある該 Pt 錯体を含んでなる請求項 1 8 ～ 2 6 のいずれか 1 つの組成物。

【請求項 2 9】

該活性成分が、

- トランス— $[PtCl_2(NH_3)(\text{ピペリジン})]$;
- トランス— $[PtCl_2(NH_3)(4\text{-ヒドロキシピペリジン})]$;
- トランス— $[PtCl_2(NH_3)(4\text{-ピペリジノーピペリジン})]$;
- トランス— $[PtCl_2(NH_3)(4, 4'\text{-ビピペリジン})]$;
- トランス— $[PtCl_2(4\text{-ピコリン})(\text{ピペリジン})]$; 40
- トランス— $[PtCl_2(\text{ピペリジン})_2]$;
- トランス— $[PtCl_2(NH_3)(\text{ピペラジン})] \cdot HCl$;
- トランス— $[PtCl_2(\text{イソプロピルアミン})(\text{ピペラジン})] \cdot HCl$;
- トランス— $[PtCl_2(n\text{-ブチルアミン})(\text{ピペラジン})] \cdot HCl$;
- トランス— $[PtCl_2(n\text{-ノニルアミン})(\text{ピペラジン})] \cdot HCl$;
- トランス— $[PtCl_2(\text{ピペリジン})(\text{ピペラジン})] \cdot HCl$;
- トランス— $[PtCl_2(4\text{-ピコリン})(\text{ピペラジン})] \cdot HCl$;
- トランス— $[PtCl_2(\text{ピペラジン})(\text{ピペラジン})] \cdot HCl$;
- トランス— $[PtCl_2(NH_3)[4\text{-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン}]] \cdot HCl$;

から選ばれる請求項 28 の組成物。

【請求項 30】

該活性成分がシス立体配置にある請求項 18～26 のいずれか 1 つの組成物。

【請求項 31】

シスー $[PtCl_2(NH_3)(\text{ピペリジン})]$; シスー $[PtCl_2(NH_3)(\text{ピペラジン})]$ から選ばれる請求項 30 の組成物。

【請求項 32】

該リンカーが 4, 7, 10-トリオキサ-1, 13-トリデカン鎖を含んでなる請求項 19 の組成物。

【請求項 33】

ビスー $[\{ \text{トランス, トランス-}(PtCl_2 \text{ ピペラジン})_2 \} (4, 7, 10\text{-トリオキサ-1, 13-トリデカンジアミン})] \cdot 2HCl$ である請求項 32 の組成物。

【請求項 34】

該 Pt 錯体と DNA の間の付加物の形成を含んでなる治療的効果を達成するための請求項 18～33 のいずれか 1 つの組成物。

【請求項 35】

望ましくない細胞増殖の阻害を含んでなる治療的効果を達成するための請求項 18～33 のいずれか 1 つの組成物。

【請求項 36】

望ましくない細胞のアポトーシスを誘導するための請求項 35 の組成物。

【請求項 37】

リボソーム内に充填される請求項 18～36 のいずれか 1 つの組成物。

【請求項 38】

必要のある患者に治療的効果を達成するのに十分な量の Pt-錯体を投与することを含んでなり、Pt 錯体が一般式 (I) :



[式中:]

—X 及び Y は、同一もしくは異なることができ、ハロゲン、カルボキシレート、ホスフェート又はサルフェート基を示し;

—Am₁ はアンモニア、第一級アミン、第二級アミン、非—平面状複素環式脂肪族アミン又は複素環式芳香族アミンから選ばれるアミンを示し;

—Am₂ は非—平面状複素環式脂肪族アミンを示し、

但し、該錯体がシス立体配置にある場合、Am₁ 及び Am₂ は同時にピペリジンを示すことはできない]

から成る、治療的効果を達成するための方法。

【請求項 39】

該 Pt-錯体がダイマーの形態にあり、そこにおいて各モノマー単位は、独立して Am₁ を介して、Am₂ を介して、該 Am₁ 又は Am₂ に連結したリンカーを介してあるいは該 Am₁ と Am₂ から生成する環式環を介して他の錯体に結合している Pt-錯体である請求項 38 の方法。

【請求項 40】

X 及び Y が同一もしくは異なり、クロリド又はヨウダイドを示す Pt 錯体を該患者に投与する請求項 38 又は 39 の方法。

【請求項 41】

X 及び Y が両方ともクロリドを示す請求項 40 の方法。

【請求項 42】

Am₁ がアンモニアを示す Pt 錯体を該患者に投与する請求項 38～41 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 43】

Am₁ がメチルアミン、エチルアミン、n-プロピルアミン、イソプロピルアミン、n-

10

20

30

40

50

ブチルアミン、*n*-ヘキシルアミン、*n*-ヘプチルアミン又は*n*-ノニルアミンから選ばれる第一級アミンを示すPt錯体を該患者に投与する請求項38～41のいずれか1つの方法。

【請求項44】

Am₁がジメチルアミン、ジエチルアミン、ジプロピルアミン、ジブチルアミンから選ばれる第二級アミンを示すPt錯体を該患者に投与する請求項38～41のいずれか1つの方法。

【請求項45】

Am₁がピリジン、2-、3-もしくは4-ピコリン、キノリン、3-もしくは4-アミノキノリン、チアゾール、2-、3-もしくは4-アミノピリジン、イミダゾール、3-ピロリン、ピラジン、2-メチルピラジン又は4-アミノキナルジンから選ばれる複素環式芳香族アミンを示すPt錯体を該患者に投与する請求項38～41のいずれか1つの方法。

【請求項46】

Am₁がピペラジン、2-メチルピペラジン、ピペリジン、2-、3-もしくは4-ヒドロキシピペリジン、4-ピペリジノーピペリジン、ピロリジン、4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン及び3-アミノピロリジンから選ばれる非平面状複素環式アミンを示すPt錯体を該患者に投与する請求項38～41のいずれか1つの方法。

【請求項47】

Am₂がピペラジン、2-メチルピペラジン、ピペリジン、2-、3-もしくは4-ヒドロキシピペリジン、4-ピペリジノーピペリジン、ピロリジン、4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン又は3-アミノピロリジンから選ばれる非平面状複素環式アミンを示す請求項46の方法。

【請求項48】

該錯体がトランス立体配置にある請求項38～47のいずれか1つの方法。

【請求項49】

ートランスー [PtCl₂ (NH₃) (ピペリジン)] ;
 ートランスー [PtCl₂ (NH₃) (4-ヒドロキシピペリジン)] ;
 ートランスー [PtCl₂ (NH₃) (4-ピペリジノーピペリジン)] ;
 ートランスー [PtCl₂ (NH₃) (1, 4'-ビピペリジン)] ;
 ートランスー [PtCl₂ (4-ピコリン) (ピペリジン)] ;
 ートランスー [PtCl₂ (ピペリジン)₂] ;
 ートランスー [PtCl₂ (NH₃) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (イソプロピルアミン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (*n*-ブチルアミン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (*n*-ノニルアミン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (ピペリジン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (4-ピコリン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (ピペラジン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (NH₃) [4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン]] · HCl ;

から選ばれる白金錯体を該患者に投与することを含んでなる請求項48の方法。

【請求項50】

該錯体がシス立体配置にある請求項38～47のいずれか1つの方法。

【請求項51】

該錯体がシスー [PtCl₂ (NH₃) (ピペリジン)] ; シスー [PtCl₂ (NH₃) (ピペラジン)] から選ばれる請求項50の方法。

【請求項52】

該リンカーが4, 7, 10-トリオキサー1, 13-トリデカン鎖を含んでなる請求項39の方法。

【請求項 53】

治療的に有効な量のビスー [{トランス, トランスー (PtCl₂ ピペラジン)₂ } (4, 7, 10-トリオキサー-1, 13-トリデカンジアミン)] · 2HCl を患者に投与する請求項 52 の方法。

【請求項 54】

該 Pt 錯体と DNA の間の付加物の形成を含んでなる治療的效果を達成するための請求項 38～53 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 55】

望ましくない細胞増殖の阻害を含んでなる治療的效果を達成するための請求項 38～53 のいずれか 1 つの方法。

10

【請求項 56】

望ましくない細胞のアポトーシスを誘導するための請求項 55 の方法。

【請求項 57】

該 Pt 錯体をリボソーム内に充填する請求項 38～56 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 58】

抗ガン剤として用いるための請求項 1～17 のいずれか 1 つで定義されている白金錯体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は新規な白金錯体及びそれらの使用に関する。

20

【背景技術】

【0002】

シスプラチン、シスー [PtCl₂ (NH₃)₂] は多様な充実性腫瘍の処置において最も広く用いられる 3 つの臨床的薬剤の 1 つである (非特許文献 1)。それは DNA に、主に同じ鎖上の 2 つの隣接するグアニンに不可逆的に結合し、DNA における屈曲を誘導し、それがシスプラチン-改変 DNA に結合する細胞タンパク質により認識されることにより腫瘍細胞を殺すと思われる (非特許文献 2)。アポトーシス及び結果としての細胞死の誘導を担うのは Pt-DNA 付加物である (非特許文献 3)。精巣及び卵巣腫瘍を含む種々の腫瘍性疾患の処置におけるその有効性にかかわらず、その臨床的有用性は低い溶解度、毒性及び特に腫瘍の耐性により制限される (非特許文献 4)。カルボプラチン (Pt (CBDCA) (NH₃)₂, CBDCA = 1, 1-シクロブタンジカルボキシレート) のような第二世代薬剤は腎毒性の低下を示すが、おそらくそれらがシスプラチンが生成すると同じ範囲の DNA 付加物を生成するという事のために、腫瘍の耐性を克服できない (非特許文献 5)。

30

【0003】

耐性の克服は新規な白金薬剤の開発における主な目標の 1 つであり、従って古典的な構造-活性関連性 (SAR) から離れる新規な化合物が設計され、合成され、スクリーニングされてきた (非特許文献 6)。Cleare 及び Hoeschle により最初に公式化された (formulated) SAR は医化学者に、シス立体配置における 2 個の不活性リガンド及び 2 個の半-不安定離脱基を有する中性白金 (II) 錯体の製造に彼らの努力を向けるように影響を与えた (非特許文献 7)。

40

【0004】

2 個の離脱基のシス立体配置がシス-ジアミンジクロロ白金 (シス-DDP) の抗-腫瘍活性に必須であることは一般的に受け入れられた。これは、Am₁、Am₂ = NH₃ 又は平面状アミンリガンド、例えばキノリン、チアゾール、ピリジン又はベンゾチアゾールであるトランス-PtCl₂ (Am₁) (Am₂)、(例えばトランス-[PtCl₂ (NH₃) (ピリジン)]、トランス-[PtCl₂ (NH₃) (チアゾール)]、トランス-[PtCl₂ (NH₃) (キノリン)] 及びトランス-[PtCl₂ (NH₃) (ベンゾチアゾール)]) における 1 個もしくは両方の NH₃ リガンドの置き換えがトランス形の細胞毒性を実質的に強化することを farrell 等が報告するまで 20 年以上もの間

50

の状況であった（非特許文献8）。

【0005】

さらに Navarro-Ranniger 及び共同研究者等は、トランス- $\text{PtCl}_2[\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2][\text{NH}(\text{CH}_3)_2]$ が興味深い薬理学的性質を有することを示し（非特許文献9）、Natile 等はトランス- PtCl_2 （イミノエーテル） $_2$ もいくつかのヒトガン系に対して活性であることを報告した（非特許文献10）。臨床試験の2期にある非-古典的錯体の他の例は、四重に帯電したカチオンである3核Pt錯体 BR3464 である（非特許文献11）。

【0006】

非-古典的白金化合物の重要性は、シスプラチン及びカルボプラチンにより形成される付加物と別個の範囲のDNA付加物を形成するようにそれらが設計され、従ってそれらが後天的Pt耐性を妨げることができるという事実による（非特許文献12）。 10

【0007】

一般にトランス-ジアミンジクロロ白金（II）類似体は、それらのシスの相手より低い水溶液中における溶解度を有し、限られたバイオアベイラビリティを生ずる。水溶解度を向上させる1つの方法は錯体に電荷を加えることによる方法である。Farrell 等は、トランス- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(\text{Am}_1)]$ （ Am_1 = 平面状リガンド）の型の化合物の劣った水溶解度の克服においていくらかの努力をしたが、 NH_3 及び平面状リガンドのトランス配向及び四角形-平面状物（square-planar entity）の電気的中性を保持した。トランス-白金錯体、トランス- $[\text{PtCl}(\text{PyAc-N}, \text{O})(\text{NH}_3)]$ （PyAc = ピリジン-2-イルアセテート、N-ドナーはトランス）及びそのシス異性体が合成され、トランス異性体は類似錯体、トランス- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(\text{Am}_1)]$ （ Am_1 = 平面状リガンド）と比較して水中における溶解度の向上を示した（約4~5ミリモル L^{-1} ）（非特許文献13）。他方、Farrell 等により、及びまたHollis 等により製造される白金錯体のカチオン性電荷は金属中心上にあり、アニオン性クロドリガンドの1つの中性リガンドによる置換から生ずる（非特許文献14）。 20

【非特許文献1】

Jamieson, E. R. & Lippard, S. J. 著, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. Chem. Rev. 1999; 99(9); 2467-2498 30

【非特許文献2】

Kartalou, M. & Essigmann, J. M. 著, Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins, Mutat. Res. 2001, 478, 1-2, 1-21

【非特許文献3】

Gonzalez, V. M.; Fuertes, M. A.; Alonso C.; Perez J. M. 著, Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? Mol. Pharmacol. 2001, 59, 4, 657-63 40

【非特許文献4】

Kartalou M, Essigmann JM. 著, Mechanisms of resistance to cisplatin. Mutat. Res. 2001, 478, 1-2, 23-43

【非特許文献5】

Cornelison, T. L. & Reed, E. 著, Nephrotoxicity and Hydration Management for Cisplatin, Carboplatin, and Ormaplatin, Gynecol. Onc. 1993, 50, 2, 147-158

【非特許文献6】

Wong, E. & Giandomenico, C. M. 著, Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs Chem. Rev. 1999; 99 (9); 2451-2466

【非特許文献7】

Cleare, M. J. ; Hoeschele, J. D. 著, Studies on the antitumor activity of group VIII transition metal complexes. part I. Platinum (II) complexes. Bioinorg. Chem. 1973, 2, 187-210

【非特許文献8】

Bierbach, U. ; Qu, Y. ; Hambley, T. W. ; Peroutka, J. ; Nguyen, H. L. ; Doedee, M. ; Farrell, N. ; Synthesis, Structure, Biological Activity, and DNA Binding of Platinum (II) Complexes of the Type trans- [PtCl₂(NH₃)L] (L=Planar Nitrogen Base). Effect of L and Cis/Trans Isomerism on Sequence Specificity and Unwinding Properties Observed in Globally Platinated DNA. Inorg. Chem. 1999; 38, 15, 3535-3542

【非特許文献9】

Montero, E. I. ; Diaz, S. ; Gonzalez-Vadillo, A. M. ; Perez, J. M. ; Alonso, C. & Navarro-Ranninger, C. 著, Preparation and characterization of novel trans- [PtCl₂(2) (amine) (isopropylamine)] compounds: cytotoxic activity and apoptosis induction in ras-transformed cells, J. Med. Chem. 1999, 42, 20, 4264-4268

【非特許文献10】

Coluccia, M. ; Nassi, A. ; Boccarelli, A. ; Giordano, D. ; Cardellio, N. ; Locker, D. ; Leng, M. ; Sivo, M. ; Intini, F. P. ; & Natile, G. 著, In vitro and in vivo antitumour activity and cellular pharmacological properties of new platinum-iminoether complexes with different configuration at the iminoether ligands, J. Inorg. Biochem. 1999, 77, 1-2, 31-35

【非特許文献11】

John D. Roberts, John Peroutka and Nicholas Farrell 著, Cellular pharmacology of polynuclear platinum anti-cancer agents, J. Inorg. Biochem. 1999, 77, 1-2, 51-57

【非特許文献12】

Kelland, L. R; Sharp, S. Y. ; O'Neill, C. F. ; Raynaud, F. I. ; Beale, P. J. & Judson, I. 著, Mini-review: discovery and development of platinum complexes designed to circumvent cisplatin resistance, J. Inorg. Biochem. 1999, 77, 1-2, 111-115

10

20

30

40

50

【非特許文献13】

Biervach, U. ; Sabat, M. ; Farrell, N. 著, Inversion of the Cis Geometry Requirement for Cytotoxicity in Structurally Novel Platinum (II) Complexes Containing the Bidentate N, O-Donor Pyridin-2-yl-acetate, Inorg. Chem. 2000; 39 (9) ; 1882-1890

【非特許文献14】

Hollis, L S ; Amundsen, A R ; Stern, E W. 著, Chemical and biological properties of a new series of cis-diammineplatinum (II) antitumor agents containing three nitrogen donors: cis-[Pt (NH₃)₂ (N-donor) Cl]⁺, Journal of Medicinal Chemistry, January 1989, Volume 32, Issue 1, pages 128-136 10

【発明の開示】

【0008】

発明の概略

本発明は、その側面の第1に従い、一般式 (I) :

[Pt (X) (Y) (Am₁) (Am₂)] (I) 20

[式中:

—X及びYは、同一もしくは異なることができ、ハロゲン、カルボキシレート、ホスフェート又はサルフェート基を示し;

—Am₁ はアンモニア、第一級アミン、第二級アミン、非—平面状複素環式脂肪族アミン又は複素環式芳香族アミンから選ばれるアミンを示し;

—Am₂ は非—平面状複素環式脂肪族アミンを示す]

を有する新規な白金錯体 (Pt—錯体) であって、但し、該錯体がシス立体配置にある場合、Am₁ 及びAm₂ は同時にピペリジンを示すことはできない白金錯体に関する。

【0009】

本発明のPt—錯体はダイマーの形態にあることができ、そこにおいて各モノマー単位は、独立してAm₁ リガンドを介して又はAm₂ リガンドを介して又は該Am₁ もしくはAm₂ に連結したリンカーを介して他のPt—錯体に結合した定義されている通りのPt—錯体である。 30

【0010】

他の側面に従い本発明は、製薬学的に許容され得る担体ならびに活性成分として一般式:

[Pt (X) (Y) (Am₁) (Am₂)]

[式中:

—X及びYは、同一もしくは異なることができ、ハロゲン、カルボキシレート、ホスフェート又はサルフェート基を示し;

—Am₁ はアンモニア、第一級アミン、第二級アミン、非—平面状複素環式脂肪族アミン又は複素環式芳香族アミンから選ばれるアミンを示し; 40

—Am₂ は非—平面状複素環式脂肪族アミンを示す]

のPt錯体であって、但し、該錯体がシス立体配置にある場合、Am₁ 及びAm₂ は同時にピペリジンを示すことはできないPt錯体の治療的に有効な量を含む製薬学的組成物に関する。

【0011】

製薬学的組成物はモノマーの形態における、又は上記で定義したダイマーの形態における本発明のPt—錯体を含むことができる。

本発明は、必要のある患者に治療的効果を達成するのに十分な量の白金錯体 (モノマー又はダイマーの形態における) を投与することを含み、Pt錯体が一般式 (I) :

[Pt (X) (Y) (Am₁) (Am₂)] (I)

[式中：

—X及びYは、同一もしくは異なることができ、ハロゲン、カルボキシレート、ホスフェート又はサルフェート基を示し；

—Am₁はアンモニア、第一級アミン、第二級アミン、非—平面状複素環式脂肪族アミン又は複素環式芳香族アミンから選ばれるアミンを示し；

—Am₂は非—平面状複素環式脂肪族アミンを示し、

但し、該錯体がシス立体配置にある場合、Am₁及びAm₂は同時にピペリジンを示すことはできない]

を含む治療的効果を達成するための方法にも関する。

10

【0012】

図の簡単な説明

図1A～1Bは、C-26ガン細胞（図1A）又はOV-1063ガン細胞（図1B）によるシスプラチン（—？—）；トランスプラチン（—：—）；トランス—[PtCl₂（4-ピコリン）（ピペリジン）]（—ハ—）；トランス—[PtCl₂（4-ピコリン）（ピペラジン）]・HCl（—：—）及びトランス—[PtCl₂（NH₃）（ピペリジノーピペリジン）]・HCl（—o—）の吸収を示す。Pt含有量は原子吸光分析法（AAS）により決定された。

【0013】

図2A～2Bは、C-26ガン細胞（図2A）又はOV-1063ガン細胞（図2B）におけるシスプラチン（—？—）；トランスプラチン（—：—）；トランス—[PtCl₂（4-ピコリン）（ピペリジン）]（—ハ—）；トランス—[PtCl₂（4-ピコリン）（ピペラジン）]・HCl（—：—）及びトランス—[PtCl₂（NH₃）（ピペリジノーピペリジン）]・HCl（—o—）のDNA白金化レベルを示す。Pt含有量は原子吸光分析法（AAS）により決定された。

20

【0014】

図3は、シスプラチン（—：—）；トランスプラチン（—ハ—）；トランス—[PtCl₂（NH₃）（ピペラジン）]・HCl（—：—）；トランス—[PtCl₂（4-ピコリン）（ピペラジン）]・HCl（—x—）及びトランス—[PtCl₂（NH₃）（ピペリジノーピペリジン）]・HCl（—？—）により改変された種々の濃度のDNAへのEtBr蛍光の依存性を示す。データ点は三重に測定され、それは平均で±3%変動した。

30

【0015】

図4は、IC₅₀値のトランス—[PtCl₂（4-ピコリン）（ピペリジン）]（6.5 μM, trans—[PtCl₂（4-pic）（pip）]）、トランス—[PtCl₂（4-ピコリン）（ピペラジン）]・HCl（それぞれ7.5 μM又は6.5 μM, trans—[PtCl₂（4-pic）（pz）]・HCl）、トランス—[PtCl₂（NH₃）（ピペリジノーピペリジン）]・HCl（それぞれ4 μM又は6 μM, trans—[PtCl₂（NH₃）（pip o—pip）]・HCl）又はシスプラチン（それぞれ2 μM又は1 μM）で処理されたOV-1063細胞における、未処理の（標準細胞）と比較されるキャスパーゼ-3活性を示す。薬剤—処理された細胞及び標準の細胞の両方を次いで回収し、溶解し、キットの案に記載されている通り、指示される長さの時間の後に検定した。

40

【0016】

図5は、シスプラチン（—？—）；トランスプラチン（—：—）；トランス—[PtCl₂（NH₃）（ピペリジン）]（—ハ—）；及びトランス—[PtCl₂（NH₃）（ピペラジン）]・HCl（—：—）へのユビキチンの結合曲線を示す。

【0017】

図6は、C-26結腸ガンが接種され、本明細書下記に記載されるスケジュールに従って処置された雌のBALB/Cマウスにおける、シス—DDP（—：—）と比較されるトラ

50

ンスー $[PtCl_2(NH_3)(\text{ピペリジノーピペリジン})] \cdot HCl$ (—：—) の抗腫瘍活性を示す。

発明の詳細な記述

本発明は、Pt-錯体中に非-平面状複素環式脂肪族アミンリガンドが含まれることが、例えばガン処置の分野において治療的利点を有するという驚くべき発見に基づく。本発明に従うPt-錯体は少なくとも1個の非-平面状複素環式アミンリガンドを含み、それは柔軟性であり且つ水素結合ドナーを有し、それは他の物質と、例えばDNAと相互作用して損傷を形成することができる。リガンドは、得られる錯体の速度論及び細胞毒性に影響するのに十分に嵩高いこともできる。

【0018】

かくして本発明はその側面の1つに従い、一般式 (I) :



[式中:

—X及びYは、同一もしくは異なることができ、ハロゲン、カルボキシレート、ホスフェート又はサルフェート基を示し;

—Am₁ はアンモニア、第一級アミン、第二級アミン、非-平面状複素環式脂肪族アミン又は複素環式芳香族アミンから選ばれるアミンを示し;

—Am₂ は非-平面状複素環式脂肪族アミンを示す]

の白金錯体 (Pt-錯体) であって、但し、該錯体がシス立体配置にある場合、Am₁ 及びAm₂ は同時にピペリジンを示すことはできない白金錯体を提供する。

【0019】

本明細書で用いられる「Pt-錯体」という用語は、その最も広い意味において、2個のアミン-含有リガンドを含み、少なくとも1個のリガンドが非-平面状複素環式脂肪族アミンであるいずれのPt-錯体をも指す。これらの錯体はシス及びトランス位置異性体の両方を含む (但し、錯体がシス立体配置にある場合、2個のアミンリガンドは同時にはピペリジンを示さない)。Pt-錯体は、金属中心として配位されたPt (II) 又は配位されたPt (IV) を含むことができる。さらにPt-錯体はダイマーの形態にあることができ、そこにおいて各モノマー単位は、独立してそのアミンリガンドの1つを介して直接、あるいは該Am₁ 又はAm₂ に連結したリンカーを介して他のPt-錯体に結合している上記で定義されたPt-錯体であり、2個のアミンリガンドは一緒になって、窒素結合を介してそれぞれのPt金属と配位するピペリジン環のような環式環を形成することもできる。

【0020】

好ましい態様に従うと、X及びYは同一もしくは異なり、クロリド又はヨウダイドを示し、より好ましくはX及びYは両方ともクロリドを示す。

【0021】

本発明に従うと、Am₁ はアンモニア; これらに限られるわけではないがメチルアミン、エチルアミン、n-プロピルアミン、イソプロピルアミン、n-ブチルアミン、n-ヘキシルアミン、n-ヘプチルアミン又はn-ノニルアミンのような第一級アミン; これらに限られるわけではないがジメチルアミン、ジエチルアミン、ジプロピルアミン、ジブチルアミンのような第二級アミン; これらに限られるわけではないがピペラジン、2-メチルピペラジン、ピペリジン、2-、3-もしくは4-ヒドロキシピペリジン、4-ピペリジノーピペリジン、ピロリジン、4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン及び3-アミノピロリジンのような非-平面状複素環式脂肪族アミン; あるいはこれらに限られるわけではないがピリジン、2-、3-もしくは4-アミノピリジン、2-、3-もしくは4-ピコリン、キノリン、3-もしくは4-アミノキノリン、チアゾール、イミダゾール、3-ピロリン、ピラジン、2-メチルピラジン、4-アミノキナルジンのような複素環式芳香族アミンを示すことができる。

【0022】

本発明に従うAm₂ は非-平面状複素環式アミン、例えばこれらに限られるわけではない

10

20

30

40

50

がピペラジン（本明細書で時々「p z」の略字により言及される）、2-メチルピペラジン、ピペリジン（本明細書で時々「p i p」の略字で言及される）、2-、3-もしくは4-ヒドロキシピペリジン、4-ピペリジノーピペリジン（本明細書で時々「p i p-p i p」の略字により言及される）、ピロリジン、4-（2-ヒドロキシエチル）ピペラジン及び3-アミノピロリジンである。

【0023】

上記で示した通り、本発明のPt-錯体は上記で定義した一般式（I）を有する錯体のすべての位置異性体を指す。1つの側面に従うと、Pt-錯体はトランス立体配置にある。特定の例には：

- トランス— [PtCl₂ (NH₃) (ピペリジン)] ; 10
- トランス— [PtCl₂ (NH₃) (4-ヒドロキシピペリジン)] ;
- トランス— [PtCl₂ (NH₃) (4-ピペリジノーピペリジン)] ;
- トランス— [PtCl₂ (NH₃) (4, 4'-ビピペリジン)] ;
- トランス— [PtCl₂ (4-ピコリン) (ピペリジン)] ;
- トランス— [PtCl₂ (ピペリジン)₂] ;
- トランス— [PtCl₂ (NH₃) (ピペラジン)] · HCl ;
- トランス— [PtCl₂ (イソプロピルアミン) (ピペラジン)] · HCl ;
- トランス— [PtCl₂ (n-ブチルアミン) (ピペラジン)] · HCl ;
- トランス— [PtCl₂ (n-ノニルアミン) (ピペラジン)] · HCl ;
- トランス— [PtCl₂ (ピペリジン) (ピペラジン)] · HCl ; 20
- トランス— [PtCl₂ (4-ピコリン) (ピペラジン)] · HCl ;
- トランス— [PtCl₂ (ピペラジン) (ピペラジン)] · HCl ;
- トランス— [PtCl₂ (NH₃) [4-（2-ヒドロキシエチル）ピペラジン]] · HCl ;

が含まれる。

【0024】

さらに別の側面に従うと、錯体はシス立体配置にある。特定のシス異性体にはシス— [PtCl₂ (NH₃) (ピペリジン)] 又はシス— [PtCl₂ (NH₃) (ピペラジン)] · HClが含まれるがこれらに限られない。

【0025】

上記で示した通り、非-平面状複素環式アミンリガンドは柔軟性であり且つDNAと相互作用して損傷を形成することができる水素結合ドナーを有し、得られる錯体の速度論及び細胞毒性に影響するのに十分に嵩高い。さらに、ピペラジンのようなアミンリガンドのいくつかは錯体に正の電荷を与え、かくして十分な水溶解度及びDNAのようなポリアニオン性分子との錯体の迅速な相互作用を保証する。

【0026】

錯体はダイマーの形態にあることもできる。従って、2個のPt-錯体が原子価結合、各Pt-錯体のアミン置換基の間で形成される環式環（例えば一緒になってピペラジン環を形成する）を介して、あるいは各錯体のAm₁又はAm₂リガンドに連結するリンカーにより会合する。リンカーの制限ではない例には短いポリエチレングリコール鎖（PEG） 40、短いジアミノアルカン類（例えば1, 6-ジアミノヘキサン、1, 8-ジアミノオクタン）が含まれる。リンカーに関する特定の例は4, 7, 10-トリオキサー1, 13-トリデカン鎖であり、2個のPt-錯体がこのリンカーにより会合している1つの特定のダイマーはビス— [{トランス, トランス— (PtCl₂ ピペラジン)₂ } (4, 7, 10-トリオキサー1, 13-トリデカンジアミン)] · 2HClである。

【0027】

本発明は、製薬学的に許容され得る担体ならびに活性成分として上記で定義した本発明のPt-錯体の治療的に有効な量を含む製薬学的組成物にも関する。

【0028】

本発明のPt-錯体は優れた医学的慣習に従い、個々の患者の臨床的状态、投与の部位及 50

び方法、投与のスケジュール、患者の年齢、性別、体重及び医療実施者に既知の他の因子を考慮して、投与され、投薬される (administered and dosed)。本明細書の目的のための治療的に「有効な量」は、かくして当該技術分野において既知の考察により決定される。その量は、本発明の活性成分を用いて処置される疾患状態からの生存率の向上又はより迅速な回復あるいは疾患状態と関連する症状の改善もしくは除去ならびに当該技術分野における熟練者により適した尺度として選ばれる他の指標を含むがこれらに限られない改善を達成するのに有効でなければならない。

【0029】

有効量は典型的には適切に設計される臨床試験（投薬量範囲研究）において決定され、当該技術分野における熟練者は有効量を決定するためにそのような試験をいかにして適切に行なうかを知っているであろう。一般的に既知の通り、有効量は P t -錯体の、例えば P t -DNA 付加物を形成するための DNA への親和性、体内における P t -錯体の分布プロファイル、多様な薬理学的パラメーター、例えば体内における半減期を含む多様な因子、もしあるとしたら望ましくない副作用、年齢及び性別などのような因子に依存する。 10

【0030】

P t -錯体の送達のために多くの投与様式を用いることができ、これらは当該技術分野において既知の通り、種々の担体、添加剤、エキサiserなどの使用を必要とするであろう。

【0031】

明らかに、本発明に従って用いられる製薬学的に許容され得る担体は一般に、それらが P t -錯体の所望の治療効果を邪魔しないかもしくは妨げず且つ本発明の P t -錯体と反応しない程度までの不活性無毒性固体もしくは液体充填剤、希釈剤又はカプセル封入材料を指す。 20

【0032】

P t -錯体を経口的に、皮下的に又は静脈内、動脈内、筋肉内、腹腔内及び鼻内投与ならびに包膜内投与及び輸液法による投与を含む非経口的に投与することができる。さらに、肺への吸入器を介する送達のために P t -錯体をクロロフルオロカーボンもしくはヒドロフルオロカーボンプロペラント中に懸濁させることができる。あるいはまた、P t -錯体をマトリックス（ラクトースなど）又は担体（例えばリポソームなど）中で調製することができ、それは経口的、舌下的又は座薬による送達を可能にするであろう。

【0033】

投薬は 1 回の投薬又は数日間に及ぶ複数回の投薬であることができる。処置は一般に疾患経過の長さ及び活性成分の有効性及び処置されている患者の種に比例する長さを有する。さらに、本発明の P t -錯体の投与は断続的であるか、あるいは漸次的又は連続的、一定の又は制御された割合における患者への投与であることができる。本明細書に記載される白金化合物を用いる治療的処置のための宿主又は患者は一般に哺乳類、例えば人間、犬及びネズミ類などである。 30

【0034】

本発明の P t -錯体を非経口的に投与する場合、それは一般に注入可能な単位投薬量の形態で調製されるであろう（溶液、懸濁剤、乳剤）。注入に適した製薬学的調剤には無菌の水溶液もしくは分散液及び無菌の注入可能な溶液もしくは分散液への再構築のための無菌の粉剤が含まれる。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、脂質ポリエチレングリコールなど）、それらの適した混合物及び植物油を含有する溶媒又は分散媒であることができる。綿実油、ごま油、オリーブ油、大豆油、コーン油、ひまわり油又はピーナッツ油ならびにエステル、例えばミリスチン酸イソプロピルのような非水性ビヒクルを本発明の P t -錯体のための溶媒系として用いることもできる。 40

【0035】

さらに、抗微生物性防腐剤、酸化防止剤及び緩衝剤を含む本発明の P t -錯体含有組成物の安定性、無菌性及び等張性を増強する種々の添加剤を加えることができる。種々の抗バクテリア剤及び抗菌・カビ剤、例えばパラベン類、クロロブタノール、フェノール、ソル 50

ビン酸などにより微生物の作用の防止を確実にすることができる。

【0036】

本発明の製薬学的組成物を必要のある患者に経口的に投与することもできる。錠剤、懸濁剤、溶液、乳剤、カプセル、粉剤、シロップなどにおいて活性化合物を投与するような通常の方法が有用である。それを経口的又は静脈内に送達し且つその生物学的活性を保持する既知の方法が好ましい。

【0037】

1つの好ましい態様に従うと、本発明のP_t-錯体はリポソームにより閉じ込められるか又はその上に充填される。本明細書で用いられる「リポソーム」という用語は、自然に又は自然にではなく小胞を生ずることができるリポソーム-形成性脂質、例えば少なくとも1個のアシル基が複雑なリン酸エステルにより置き換えられているグリセリドであるリン脂質のすべての球又は小胞を含む。

10

【0038】

「充填される」又は「閉じ込められる」という用語は、リポソームの内部に閉じ込められるか、リポソームの表面に露出されるかもしくは存在するか、リポソームの膜内に埋め込まれることを意味する。

【0039】

本発明に従うリポソームはいずれの既知のリポソーム形成性脂質からも形成され得る。本明細書で用いられる場合、「リポソーム-形成性脂質」という用語は、特徴的に異なる性質、例えば親水性と疎水性の両方を有する基又はそのような分子の混合物を含有し、その水性媒体中の分散液においてリポソーム性小胞を形成する生理学的に許容され得る両親媒性物質を示す。リポソームは1種の両親媒性物質から、又はそのような物質の混合物から成ることができる。

20

【0040】

両親媒性物質には中でもリン脂質、スフィンゴ脂質、糖脂質、例えばセレブロシド及びガングリオシド、PEG化脂質(PEGylated lipids)及びステロール類、例えばコレステロール及び他が含まれる。本発明の方法による使用のために、通常既知のいずれのリポソーム-形成性脂質も適している。脂質の源又はその合成法は重要ではない：改変されたもしくは改変されない自然に存在するいずれかの脂質又は合成ホスファチドを用いることができる。

30

【0041】

好ましいリポソーム-形成性両親媒性物質は天然、半-合成又は完全に合成の分子；負に又は正に帯電した脂質、場合によりコレステロールのようなステロールと；及び／又はPEG化脂質のようなリポポリマーと組み合わされていることができるリン脂質又はスフィンゴ脂質である。

【0042】

本発明により用いられるリポソームを、種々の生物学的流体(biological fluids)を含むいずれかの特定の貯蔵体(reservoir)の必要条件に適合させて作ることができ、それは凝集又はクロマトグラフィー分離なくそれらの安定性を保持し、それにより注入される流体中に十分に分散され且つ懸濁されたままである。その場の流動性は組成、温度、塩分、二価カチオン及びタンパク質の存在の理由で変化する。他の溶媒又は界面活性剤と一緒に又はそれらなしでリポソームを用いることができる。

40

【0043】

本発明に従う好ましいリン脂質の組み合わせには(HSPC)：コレステロール：PEG²⁰⁰⁰-DSPCの混合物(HSPCは水素化大豆ホスファチジルコリンを指し、PEG²⁰⁰⁰-DSPCはPEG²⁰⁰⁰が頭基(head group)に結合したジステアロイル-ホスファチジル-エタノールアミンを指す)、あるいはまたジアシルグリコールPEG(2個のステアロイルアシル鎖を有する)又はコレステロール-PEGが含まれる。

【0044】

50

本発明の組成物は治療的効果を達成することを目的とし、治療的効果は本発明の Pt 錯体と DNA のような核酸分子の間の付加物の形成を含む。治療的効果は望ましくない細胞増殖の阻害又は望ましくない細胞のアポトーシスの誘導を含むことができる。

【0045】

かくして本発明の組成物を、望ましくない細胞増殖と関連する疾患状態の処置又は予防のために用いることができる。本明細書で用いられる「処置又は予防」という用語は、疾患状態と関連する望ましくない症状の改善に、そのような症状が起こる前にそれらの発現を妨げるのに、疾患の進行を遅らせるのに（病気の組織の増殖の速度から明らかになり得る）、症状の悪化を遅らせるのに、軽快期の開始を増進させるのに、疾患の進行性慢性期において引き起こされる不可逆的な損傷を遅らせるのに（例えば自己免疫疾患において）、該進行性期の開始を遅らせるのに、重度を低くするか又は疾患を治癒させるのに、生存率を向上させるか又はより急速な回復を達成するのに、あるいは疾患が起こるのを妨げるのに、あるいは上記の2つもしくはそれより多くの組み合わせのために有効である本発明の組成物の治療的量の投与を指す。

10

【0046】

かくして本発明は治療的効果を達成するための方法にも関し、その方法は必要のある患者に該治療的効果の達成に十分な量の本発明に従う白金錯体を投与することを含む。1つの態様に従うと、本発明の Pt-錯体は抗-ガン剤として用いられる。

【0047】

ここで以下の制限ではない実施例により本発明をさらに説明する。前記の記述は本発明のいくつかの特定の態様のみを詳細に記載しているが、本発明はそれらに制限されないことならびに特許請求の範囲により定義される本発明の範囲及び精神から逸脱することなく、形式及び詳細において他の変動が可能であり、それらは明細書の開示内に含まれるとして読まれるべきであることが当該技術分野における熟練者により理解されるであろう。

20

特定の態様の詳細な記述

【実施例1】

【0048】

ー化学合成

（1）ピペリジン含有 Pt 錯体の合成

トランス-[PtCl₂(NH₃)(R)] の製造のための一般的方法

30

以下の記述において、Rは下記のピペリジン誘導体のいずれか1つを指す：ピペリジン、4-ヒドロキシピペリジン、4-ピペリジノーピペリジン、1, 4'-ビスピペリジン。さらなる参照のために、得られる誘導体を括弧内の参照番号により同定する。

【0049】

シス-ジアミンジクロロ白金 (II) (300 mg, 1 ミリモル) を 30 mL の二回蒸留水 (double distilled water)、DDW 中に懸濁させた。2 当量 (eq.) のピペリジン誘導体を加え、懸濁液を 85 °C に 3 時間加熱した。この時間の間に黄色の懸濁液は無色透明の溶液に変わった（いくつかの場合には黒色沈殿が生成した）。反応混合物を室温に冷却し、濾過し、1 mL の濃 HCl を滴下した。温度を 90 °C に 6 時間上げ、その間に黄色の生成物、トランス-[PtCl₂(NH₃)(ピペリジン誘導体)] が沈殿した。反応混合物を室温で 4 時間放置し、その後黄色の生成物を濾過により集め、40 mL の DDW、10 mL の EtOH 及び 40 mL のジエチルエーテルで洗浄した。

40

トランス-[PtCl₂(NH₃)(ピペリジン)] (1) : 収率 86.9% . 分析 (C₅H₁₄Cl₂N₂Pt) C, H, N. ¹⁹⁵Pt NMR (δ, DMF) : -2167 ppm.

トランス-[PtCl₂(NH₃)(4-ヒドロキシピペリジン)] (2) : 収率 80.0% . 分析 (C₅H₁₄Cl₂N₂OPt) C, H, N. ¹⁹⁵Pt NMR (δ, DMF) : -2172 ppm.

トランス-[PtCl₂(NH₃)(4-ピペリジノーピペリジン)] (3) : 収率 78

50

． 5 % ． 分析 (C₁₀ H₂₄ Cl₃ N₃ Pt) C, H, N, ¹⁹⁵Pt NMR (δ, H₂O) : -2170 ppm.

トランスー [PtCl₂ (NH₃) (4, 4'-ビペリジン)] (4) : 収率 85.9 % ． 分析 (C₁₀ H₂₄ Cl₃ N₃ Pt) C, H, N, ¹⁹⁵Pt NMR (δ, H₂O) : -2175 ppm.

トランスー [PtCl₂ (4-ピコリン) (ピペリジン)] の製造のための方法 (5)

K₂PtCl₄ (200 mg, 0.482 ミリモル) を 30 mL の DDW 中に溶解した。4-ピコリン (2.5 当量, 117.3 μL; 1.2 ミリモル) を加え、混合物を室温で終夜攪拌した。黄色の沈殿、シスー [PtCl₂ (4-ピコリン)₂] [¹⁹⁵Pt NMR (DMF) = -1964 ppm] を濾過により集め、50 mL の DDW 及び 40 mL のジエチルエーテルで洗浄した。シスー [PtCl₂ (4-ピコリン)₂] (226 mg, 0.5 ミリモル) を 40 mL の DDW 中に 2 当量のピペリジン (99 μL, 1 ミリモル) と一緒に懸濁させ、懸濁液を 80 °C に 3 時間加熱した。溶液は透明且つ無色に変わり、黒色の沈殿がいくらか生成した。反応混合物を室温に冷まし、沈殿した材料を濾過した。無色の濾液に 1 mL の濃 HCl を加え、混合物を 90 °C に加熱した。加熱を 6 時間保持し、その間に黄色の沈殿が生成した。反応混合物を室温に冷まし、沈殿 (180 mg) を集め、50 mL の DDW、10 mL の EtOH 及び 30 mL のジエチルエーテルで洗浄した。

【0050】

収率 : 81 % ． 分析 (C₁₁ H₁₈ Cl₂ N₂ Pt) : C, H, N, ¹⁹⁵Pt NMR (δ, DMF) : -2087 ppm.

トランスー [PtCl₂ (ピペリジン)₂] の製造のための方法 (6)

K₂PtCl₄ (415 mg, 1 ミリモル) を 50 mL の DDW 中に溶解し、それに (1.330 グラム, 8 ミリモル) の KI を加え、赤色の溶液を室温で 20 分間攪拌した。攪拌されている溶液に (202 μL, 2 ミリモル) のピペリジンをゆっくり加えた。室温で 1 時間攪拌した後、黄色の沈殿を集め、50 mL の DDW 及び次いで 50 mL のエーテルで洗浄した。シスー [PtI₂ (Pip)₂] (300 ミリグラム, 0.484 ミリモル) を 20 mL の DMF 中に取り上げ、164.5 ミリグラム (0.97 ミリモル) の AgNO₃ 及び (98 μL, 1.94 ミリモル) を加え、混合物を室温で終夜攪拌した。沈殿を濾過した後、溶液を蒸発乾固した。ゴムに 20 mL の DDW を加え、30 分間攪拌した。不溶性の材料を濾過し、2 mL の濃 HCl を加えた。酸性化された溶液を 90 °C に 5 時間温めた。室温に冷却した後、黄色の沈殿を集め、50 mL の DDW 及び 40 mL のエーテルで洗浄した。

トランスー [PtCl₂ (ピペリジン)₂] (6) : 収率 : 91 % ． 分析 (C₁₀ H₂₂ Cl₂ N₂ Pt) : C, H, N, ¹⁹⁵Pt NMR (δ, DMF) : -2080 ppm.

シスー [PtCl₂ (NH₃) (ピペリジン)] の製造のための方法 (7)

K₂PtCl₄ (415 mg, 1 ミリモル) を 50 mL の DDW 中に溶解し、8 当量の KI (1.328 g, 8 ミリモル) を加えた。混合物を室温で 15 分間攪拌し、次いで 2 当量のピペリジン (198 μL, 2 ミリモル) をゆっくり加えた。混合物を室温で 1 時間攪拌し、その間に黄色の沈殿が生成した。沈殿を集め、50 mL の DDW 及び 20 mL の (1:1) アセトン:ジエチルエーテル混合物で十分に洗浄した。乾燥後、黄色の沈殿 (500 mg, 0.8 ミリモル) を 20 mL の DDW 及び 40 mL のエタノールの混合物中に懸濁させ、それに 1 mL の過塩素酸 (70 %) を加えた。懸濁液を室温で 8 日間攪拌した。この期間の間に、黄色の沈殿は褐色に変わった。褐色の沈殿を濾過により集め、40 mL の DDW 及び 20 mL のアセトン:ジエチルエーテル (1:1) で洗浄した。乾燥後、沈殿を 20 mL の DDW 中に再懸濁させ、0.5 mL の 25 % NH₄OH を滴下し、混合物を 24 時間激しく攪拌し、その間に褐色の沈殿は黄色に変わった。黄色の沈殿を集め、50 mL の DDW 及び 10 mL のアセトン-ジエチルエーテルで十分に洗浄し、連続的吸引により乾燥した。生成物は混合シスーアミン-ピペリジン-ジヨード白金 (II) と

して分析された [^{195}Pt NMR (δ , DMF) = -3260 ppm]。

【0051】

シス-アミン-ピペリジン-ジヨード白金 (II) (300 mg, 0.54 ミリモル) を 20 mL の DDW 中に懸濁させ、2 当量の AgNO_3 (184.9 mg, 1.08 ミリモル) を加えた。懸濁液を暗所で 24 時間激しく攪拌した。 AgI 沈殿を濾過し、水性濾液を 50 mL の容器に移し、それに 0.5 g の KCl を加えた。無色の溶液は黄色がかり、ジクロロ-ジアミン白金 (II) 生成物が沈殿し始めた。室温で 4 時間の後、黄色がかった沈殿 (260 mg) を集め、50 mL の DDW で十分に洗浄し、100 mL のジエチルエーテルで洗浄することにより乾燥した。

シス- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(\text{ピペリジン})]$ (7) の全体的収率: 69%。分析 ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{Pt}$) C, H, N. ^{195}Pt NMR (δ , DMF): -2159 ppm.

(2) ピペラジン錯体の合成

本明細書で示す研究の 1 つの目的は、水溶性であり、DNA と迅速に反応し且つシスプラチン及びトランスプラチンにより形成されるものと異なる DNA との付加物を形成することができる白金錯体を設計し且つ製造することであった。これはリガンドとしてピペラジンを有するいくつかの追加のトランス- Pt 誘導体の設計及び合成に導いた。このリガンドは、それが錯体に正の電荷を与え、かくして十分な水溶解度及び迅速なポリアニオン性 DNA との相互作用を保証するであろう故に選ばれた; それは、柔軟性であり且つ DNA と相互作用して損傷を形成することができる水素結合ドナーを有する非-平面状複素環式アミンリガンドであり; 且つそれは速度論及び細胞毒性に影響するのに十分に嵩高い。

トランス- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(\text{ピペラジン})] \cdot \text{HCl}$ (8)

シス-ジアミン-ジクロロ白金 (II)、(300 mg, 1 ミリモル) を 30 mL の DMF 中に溶解し、2 当量 (372.52 mg, 2 ミリモル) の 1-ピペラジincarボン酸 tert-ブチル及び 2 当量 (339.76 mg, 2 ミリモル) の AgNO_3 を攪拌しながら同時に加えた。暗所で室温において 24 時間攪拌を続けた。セライト焼結ガラスを介して沈殿を濾過し、濾液を減圧下で蒸発乾固した。得られるゴムを 30 mL の DDW 中に溶解し、2 mL の濃 HCl を加え、反応混合物を室温で 24 時間攪拌した。着色沈殿を除去し、溶液を 85~90 °C に 60 分間加熱した。室温に冷却した後、反応混合物を濾過し、濾液を 0 °C に 72 時間冷却した。黄色の沈殿を濾過し、10 mL の氷-冷 DDW 及び 30 mL のジエチルエーテルで洗浄した。乾燥後、黄色の生成物 (300 mg) を所望のトランス-アミン-ピペラジン-ジクロロ白金 (II) (8) の塩酸塩として分析した。

トランス- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(\text{ピペラジン})] \cdot \text{HCl}$ (8) 収率: 74%。分析 $\text{C}_4\text{H}_{14}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{PtH}_2\text{O}$ に関する計算値: C, 11.34%; H, 3.81%; N, 9.92%。測定値: C, 11.27%; H, 3.56%; N, 9.86%。 ^{195}Pt -NMR (δ , H_2O): -2177 ppm.

トランス- $[\text{PtCl}_2(\text{Am}_1)(\text{ピペラジン})] \cdot \text{HCl}$ の製造のための一般的方法
以下の記述において Am_1 は下記のアミンのいずれか 1 つを指す: n-ブチルアミン、イソプロピルアミン、4-ピコリン、ピペリジン、ピペラジン。

【0052】

中間体シス- $[\text{PtI}_2(1\text{-ピペラジンカルボン酸 tert-ブチル})_2]$ の合成: テトラクロロ白金酸カリウム (1 g, 2.4 ミリモル) を 40 mL の DDW 中に溶解し、8 当量 (3.2 g, 19.27 ミリモル) の KI を加えた。混合物を室温で 15 分間攪拌した。2 当量 (0.9 g, 4.8 ミリモル) の 1-ピペラジンカルボン酸 tert-ブチルを加え、混合物を室温で 1 時間激しく攪拌した。この時間中ずっと、所望のジヨードジアミン白金 (II) が沈殿していた。黄色の沈殿を濾過により集め、50 mL の DDW で洗浄し、吸引により乾燥した。

シス- $[\text{PtI}_2(1\text{-ピペラジンカルボン酸 tert-ブチル})_2]$: 収率: 89%, ^{195}Pt -NMR (δ , DMF): -3264 ppm.

シス- $[\text{PtI}_2(1\text{-ピペラジンカルボン酸 tert-ブチル})_2]$ (411 mg, 0.48 ミリモル)

10

20

30

40

50

5ミリモル)を暗所で15mLのDMF中に溶解し、2当量(169.88mg, 1ミリモル)のAgNO₃を2当量の対応するアミン(98.83μLのn-ブチルアミン、85.17μLのイソプロピルアミン、97.4μLの4-ピコリン、99μLのピペリジン又は186mgの1-ピペラジンカルボン酸tert-ブチル)と同時に加えた。暗所で室温において24時間攪拌を続けた。セライト焼結ガラスを介して沈殿を濾過した。濾液を減圧下で蒸発乾固した。得られるゴムを30mLのDDW中に溶解し、2mLの濃塩酸を加え、反応混合物を室温で24時間攪拌した。着色沈殿を除去し、溶液を85~90℃に60分間加熱した。室温に冷却した後、反応混合物を濾過し、濾液を0℃に24時間冷却した。黄色の沈殿を濾過し、20mLの水-冷DDW及び30mLのジエチルエーテルで洗浄した。乾燥後、黄色の生成物を所望のトランス-ジアミン-ジクロロ白金(II)錯体の塩酸塩として分析した。

トランス-[PtCl₂(イソプロピルアミン)(ピペラジン)]・HCl(9): 収率 71%, ¹⁹⁵Pt-NMR(δ, H₂O): -2226ppm.

トランス-[PtCl₂(n-ブチルアミン)(ピペラジン)]・HCl(10): 収率 67%, ¹⁹⁵Pt-NMR(δ, H₂O): -2221ppm.

トランス-[PtCl₂(n-ノニルアミン)(ピペラジン)]・HCl(11): 収率 77%, ¹⁹⁵Pt-NMR(δ, H₂O): -2236ppm.

25.06%, H: 3.82%, N: 8.55%, ¹⁹⁵Pt-NMR(δ, H₂O): -2086ppm.

トランス-[PtCl₂(ピペリジン)(ピペラジン)]・HCl(12): 収率 56%, ¹⁹⁵Pt-NMR(δ, H₂O): -2230ppm.

トランス-[PtCl₂(4-ピコリン)(ピペラジン)]・HCl(13): 収率 61.2%, 分析 C₁₀H₁₈Cl₃N₃Ptに関する計算値: C: 24.99%, H: 3.56%, N: 8.74%, 測定値: C: 25.06%, H: 3.82%, N: 8.55%,

トランス-[PtCl₂(ピペラジン)(ピペラジン)]・HCl(14): 収率 83%, ¹⁹⁵Pt-NMR(δ, H₂O): -2238ppm.

トランス-[PtCl₂(NH₃)[4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン]]・HCl(15): 収率 83%, ¹⁹⁵Pt-NMR(δ, H₂O): -2238ppm.

シス-[PtCl₂(NH₃)(ピペラジン)]・HClの製造のための方法(16)

テトラフェニルホスホニウムトリクロロモノアミン-白金(II)(300mg, 0.45ミリモル)を10mLの1:1アセトン/DDW混合物中に溶解した。オレンジ色の溶液に1当量(77.53mg, 0.45ミリモル)の1-ピペラジンカルボン酸tert-ブチルを加えた。密閉容器中で室温において7日間混合物を攪拌した。減圧下で溶液を蒸発乾固した後、黄色の固体を10mLの無水エタノール中に取り上げ、0.5mLの濃塩酸を加え、混合物を終夜放置した。黄色の沈殿を濾過により集め、10mLのエタノールで洗浄した。

シス-[PtCl₂(NH₃)(ピペラジン)]・HCl: 収率 58%, ¹⁹⁵Pt-NMR(δ, H₂O): -2187ppm.

【実施例2】

【0053】

—生物学的アッセイ

細胞培養

Hadassah University病院で樹立されたヒト卵巣ガン細胞系(OV-1063)及びヒト結腸ガン細胞系(C-26)を、10%FCS、抗生物質及びグルタミンが補足されたRPMI-1640培地中に保持した。すべての培養培地成分はBiological Industries(Beit-HaEmek, Israel)から購入された。両細胞系は37℃において水-ジャケット付きCO₂インキュベーター中で保持された。

【0054】

10

20

30

40

50

さらに3対のシスプラチン感受性及び耐性のガン細胞系 (A 2 7 8 0 / A 2 7 8 0 c i s R、4 1 M、/ 4 1 M c i s R及びC H 1 / C H 1 c i s R)を用いた⁽¹⁵⁾。これらの細胞系の対はシスプラチンに対する耐性の既知の主要な機構のすべてを包含することに基づいて選ばれた: 4 1 M c i s Rは主に薬剤輸送の低下を介して耐性であり⁽¹⁶⁾、C H 1 c i s Rは強化されたDNA修復/寛容性 (t o l e r a n c e) を介して耐性であり⁽¹⁷⁾、A 2 7 7 8 0 c i s Rは吸収の減少、強化されたDNA修復/寛容性及びG S H量の増加の組み合わせを介して耐性である⁽¹⁸⁾。

薬剤

シスプラチン及びトランスプラチンは (S i g m a, S t L o u i s, M O, U S A) により供給された。すべての薬剤は実験の直前に正常食塩水中に溶解された。

10

細胞生存のメチレンブルーアッセイ

合成された錯体の細胞毒性をメチレンブルー (M B) 染色アッセイにより調べた⁽¹⁹⁾。2 0 0 μ lの培地中の指数関数的に成長する細胞の決められた (f i x e d) 数を96穴平底プレート中にプレーティングした。調べられる錯体のそれぞれに関し、4個のウェルを用いた。培養中で24時間の後、未処理の細胞を含有する各ウェルに20 μ lの種々の濃度の錯体を加えた。標準に正常食塩水を加えた。細胞を錯体に4、24又は72時間暴露した。決められた時間の間の暴露の最後に、処理された細胞ならびに平行標準細胞を洗浄し、実験の終止まで新しい培地中でインキュベーションを続けた。72時間の成長の後、50 μ lの2.5%グルタルアルデヒドを各ウェルに15分間加えることにより細胞を固定した。固定された細胞を新しい脱イオン水で10回及びホウ酸塩緩衝液 (0.1 M, p H = 8.5) で1回濯ぎ、乾燥し、M B (0.1 Mホウ酸塩緩衝液中の1%溶液の100 μ l, p H = 8.5) を用い、室温で1時間染色した。染色された細胞を脱イオン水を用いて十分に濯ぎ、非-細胞-結合色素を除去し、次いで乾燥した。固定された細胞に結合したM Bを、37°Cにおいて200 μ lの0.1 N H C lと一緒に1時間インキュベーションすることにより抽出し、各ウェルにおける色素の正味の光学濃度 (O D) を平板分光光度計 (L a b s y s t e m s M u l t y s k a n B I C H R O M A T I C, F i n l a n d) により620 nmにおいて決定した。

20

【0055】

96穴プレートを用いるM B法の利点は、細胞増殖の速度及び生存についての広範囲の実験を多数のデータ点を用いて行なう可能性であり、その方法では種々の実験的錯体に関して細胞が同じプレートにおいて生育され、正確に同じ条件で検定される。細胞生存の評価に関するM Bアッセイの妥当性は、M B比色アッセイとコロニー形成単位アッセイの結果の間の高い関連性により支持される⁽²⁰⁾。

30

マイクロ培養テトラゾリウム (M T S) アッセイ及び細胞生存

合成された錯体の細胞毒性をM T S法⁽²¹⁾によっても調べた。従って化合物を対応する細胞系と一緒に24時間インキュベーションし、化合物処理した培養における細胞生存を評価した。

白金錯体細胞内蓄積測定

細胞を播種してから48時間後に錯体の1つを培養培地に加えた。24時間の暴露の後、錯体を除去し、細胞を氷-冷P B Sで2回洗浄し、ペレット化した。細胞 (1 * 10⁶ 個) を乾燥し、65% H N O₃ (B D H, E n g l a n d) 中で10分間加熱することにより鉍物化した⁽²²⁾。試料を脱イオン水中に溶解し、各試料を2種の希釈において無炎Z e e m a n原子吸光分析計 (F A A S) により測定した。キャリブレーションカーブは、m lあたりに50~250 n gの白金の範囲の濃度を有する5つの標準のK₂ P t C l₄ 貯蔵溶液を含んだ。1 * 10⁶ 個の細胞当たりのピコモルの白金として白金含有量を表した。

40

F A A SによるP t-D N A付加物の決定

細胞を播種してから48時間後に薬剤の1つを培養培地に加えた。24時間の暴露の後、錯体を除去し、細胞を氷-冷P B Sで2回洗浄し、ペレット化した。白金-含有材料 (2 * 10⁶ 個の細胞) からのD N Aを、Q I A a m p D N A B l o o d K i t (Q I

50

AGEN, Germany) により、製造者の指示に従って細胞ペレットから抽出した。260 nmにおける吸光度により溶離物中のDNAの濃度を測定することによって、DNA収量を決定した。各試料から単離されたDNAは平均で $50 \pm 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。純度は260 nmにおける吸光度対280 nmにおける吸光度の比を計算することにより決定される；DNAの精製の程度は平均して95%であった。

EtBr 蛍光による Pt-DNA 付加物の決定

ヒト成長ホルモンをコードする遺伝子を含むするプラスミド (4.8 kbp) であるプラスミド pS16-hGH を以前に記載されている通りに調製した⁽²³⁾。SYBR Green I 蛍光色素 (Molecular Probes, Eugene, OR) での後染色 (post-staining) を用いるアガロースゲル (1%) 電気泳動により、新しく調製されたDNAを分析した。スーパーコイルプラスミドの定量的分析⁽²⁴⁾を行い、プラスミドDNAが85~90%スーパーコイル形態にあることを示した。UV-分光分析は、いずれのDNAバッチ中にもタンパク質又はRNA汚染が存在しないことを示した。260 nmにおける吸光度対280 nmにおける吸光度の比は常に1.8~1.9であった。

【0056】

37℃において暗所で24時間、10 mM NaClO₄ (pH 7.0) 中でDNAを白金錯体により改変した。EtBr 蛍光の測定をLS50Bルミネセンス分光分析器 (Perkin Elmer, Norwalk, CT) 上で行なった。EtBr の存在下において白金により改変されたDNAの蛍光測定を、546 nm (スリット10 nm) の励起波長及び590 nm (スリット10 nm) の発光波長を用い、25℃において行なった。濃度はDNAに関して $0.01 \text{ mg}/\text{ml}$ 及びEtBrに関して $0.04 \text{ mg}/\text{ml}$ であり、それらはDNAにおけるEtBrのすべての挿入部位の飽和に相当する。

アポトーシスの評価

2つの方法によりアポトーシスを評価した：

(1) メロシアニン 540 (MC 540) (Molecular probes, Oregon, USA) 及び4', 6-ジアミジノー2-フェニルインドンジヒドロクロリド (DAPI) (Molecular probes, Oregon, USA) を用いるC-26及びOV-1063細胞の染色により。このアッセイは、アポトーシスの開始からすぐ後にホスファチジルセリン (PS) が原形質膜の内面から細胞表面に転位するという観察に基づく。この時点に、PSに強い親和性を有するMC 540を用いて染色することにより、PSを容易に検出することができる⁽²⁵⁾。二重鎖DNAを優先的に染色するDAPIを用いる染色により、クロマチン凝縮 (chromatin condensation) を評価した。以下の実験において、 5×10^5 個の細胞を含む試料を、ガラスのカバースリップで覆われた6穴プレート上で培養した。IC₅₀の錯体で細胞を処理した後、細胞をPBSで洗浄し、2.5 µlのMC 540 ($1 \text{ mg}/\text{ml}$) を含む500 µlのPBS中で、暗所において2分間インキュベーションした。その後、細胞をPBSで洗浄し、4%ホルムアルデヒドで固定し、300 µlのDAPI ($3 \mu\text{M}$) で染色した。その後ガラスのカバースリップをガラススライド上に置き、蛍光共焦点顕微鏡 (fluorescence confocal microscope) を用いて写真撮影した。

【0057】

(2) EnzChek™ Caspase-3アッセイキット (Molecular probes, Eugene, OR) により。このキットは、カスパーゼ-3及び他のDEV D-特異的プロテアーゼ活性 (例えばカスパーゼ-7) における向上に関して検定することにより、アポトーシスの検出を可能にする。アッセイのための基礎はローダミン 110 ビス- (N-CBZ-アスパルチル-L-グルタミル-L-バリル-アスパラギン酸アミド) (Z-DEV D-R110) である。この基質はR110のアミノ基のそれぞれに共有結合したDEV Dペプチドを含むローダミン 110 (R110) のビスアミド誘導体である。酵素的に切断されると、非-蛍光性ビスアミド基質が蛍光性R

10

20

30

40

50

110に転換され、それを485±10nmにおける励起及び535±10nmにおける発光検出を用いて蛍光マイクロプレートリーダーにより定量することができる。

【0058】

簡単に記載すると、C-26及びOV-1063細胞をIC50のトランス-[PtCl₂(4-ピコリン)(ピペリジン)](5)(それぞれ4.5μM及び6.5μM)及びトランス-[PtCl₂(4-ピコリン)(ピペラジン)・HCl](12)(それぞれ5μM及び7.5μM)を用いて5又は16時間処理した。次いで「誘導された」細胞及び「標準」細胞の両方を回収し、溶解した。96穴プレートにおいて50μgの細胞質ゾルタンパク質を用いて(55分間のインキュベーション)及び25μMの最終的濃度のZ-DEVD-R110基質を用いて、キットの案に記載されている通り、酵素反応を行な

10

生体内毒性及び抗腫瘍効果

トランス-白金(II)誘導体、トランス-[PtCl₂(NH₃)(4-ピペリジノ-ピペリジン)](3)を、シス-DDPと比較されるその毒性及び抗腫瘍有効性に関して評価した。

毒性

トランス-[PtCl₂(NH₃)(4-ピペリジノ-ピペリジン)]の毒性を8週齢の雌のBALB/Cマウスについて評価し、シス-DDPと比較した。種々の濃度におけるこの新規な錯体及びシス-DDPを静脈内に、週間隔で3回注入し、動物の体重及び生存

20

抗腫瘍有効性

雌のBALB/Cマウス(17~20gの体重範囲内)に1×10⁶個のC-26結腸ガンを腹腔内に注入した。トリパンプル排除によると、これらの細胞の生存率は>90%であった。

【0059】

トランス-[PtCl₂(NH₃)(ピペリジノ-ピペリジン)]・HCl(3)の治療的有効性を研究し、シス-DDPと比較した。腫瘍の接種から後の3日に処置を開始し、週間隔で合計3回の注入のために2回繰り返した。

結果

Pt錯体の溶解度

劣ったバイオアベイラビリティを生ずる中性のジアミンジクロロ白金(II)化合物の低い溶解度は、一般式[PtCl₂(Am)(Pz)]・HClの正に帯電した錯体の設計及び合成に関する理由の1つであった。本明細書で示される化合物は、シスプラチンの場合の6.3mM及びトランスプラチンの場合の0.8mMと比較して20mMの範囲内の溶解度を有し、それらの中性の相手より可溶性であることが示された。例えばトランス-[PtCl₂(4-ピコリン)(ピペラジン)]・HCl(13)はDDW(37℃において)中で7.5mg/ml(18.0mM)の溶解度を示した。

30

生物学的活性

試験管内成長阻害

合成されたトランス及びシス錯体の抗腫瘍活性を評価するために、C-26及びOV-1063細胞をこれらの錯体と一緒に4、24又は72時間インキュベーションした。MB細胞毒性アッセイは、トランスプラチンの1個の(NH₃)又は両方の置き換えがC-26及びOV-1063ガン細胞系の両方において、新規なトランス-PtCl₂化合物の細胞毒性を有意に(4倍より高く)増強することを明らかにした(表1)。

40

【0060】

【表1】

表1: シスプラチン及びトランスプラチンと比較される錯体のC-26細胞及びOV-1063細胞に対するIC₅₀

	C-26 細胞				OV-1063 細胞			
	錯体番号	IC ₅₀ , μM 4時間	IC ₅₀ , μM 24時間	IC ₅₀ , μM 72時間	IC ₅₀ , μM 4時間	IC ₅₀ , μM 24時間	IC ₅₀ , μM 72時間	
シスプラチン		1.5±1.3	0.6±0.1	0.2±0.2	2.0±0.5	0.7±0.2	0.5±0.2	
トランスプラチン		64.0±2.0	46.0±3.1	41.0±1.7	81.0±4.3	73.0±5.1	52.0±3.2	
トランス-[PtCl ₂ (4-ヒコリン)(ヒヘリジン)]	5	4.5±0.7	2.5±0.7	1.75±1.0	6.5±0.7	6.0±1.4	4.5±2.1	
トランス-[PtCl ₂ (NH ₃)(4-ヒコリン)]		12.0±1.2	11.0±2.0	11.0±1.1	18.0±3.7	16.0±3.5	14.0±2.3	
トランス-[PtCl ₂ (NH ₃)(ヒヘリジン)]	1	8.5±2.0	7.7±2.0	7.0±2.5	11.0±2.0	9.5±1.7	8.7±1.4	
トランス-[PtCl ₂ (4-ヒコリン)(ヒヘリジン)]・HCl	13	5.5±1.0	4.5±0.75	3.5±0.8	7.4±1.5	6.0±1.0	5.1±0.9	
シス-[PtCl ₂ (NH ₃)(4-ヒコリン)]		5.1±1.2	4.7±2.4	3.7±1.6	6.0±2.2	5.1±1.9	4.0±1.7	
シス-[PtCl ₂ (NH ₃)(ヒヘリジン)]	7	2.6±1.7	2.1±1.2	1.3±0.7	4.2±1.7	3.1±1.2	2.6±0.7	
トランス-[PtCl ₂ (NH ₃)(4-ヒヘリジン/ヒヘリジン)]・HCl	3	2	0.7	0.4	4.5	1.7	0.9	
シス-[PtCl ₂ (NH ₃)(ヒヘリジン)]・HCl	15	>10	>10	5	NA	NA	NA	

^a μ MにおけるIC₅₀, 少くとも2回の実験からの平均 $\pm$ SD

10

20

30

40

50

【0061】

1個のNH₃基を芳香族—平面状アミン(4-ピコリン)で置き換えてトランス-[PtCl₂(NH₃)(4-ピコリン)]を得るか、又は脂肪族非—平面状アミン(ピペリジン)で置き換えてトランス-[PtCl₂(NH₃)(ピペリジン)](1)を得ること

は、トランスプラチンと比較して細胞毒性活性を増強した（表1）。錯体（1）が〔トランスー〔PtCl₂（NH₃）（4-ピコリン）〕誘導体より細胞毒性であることに注目すべきであり、それは立体的に妨げられたアミンリガンドによりトランス位の活性化が達成され得ることを示唆している。4-ピコリンの芳香環の平面状水素と対照的に、反対の方向に向いている水素原子のために、ピペリジンは4-ピコリンより立体的に妨げられており、それは細胞毒性活性と関連し得る。

【0062】

さらに、トランスー〔PtCl₂（NH₃）（4-ピコリン）〕中の第2のNH₃をピペリジンで置き換えて混合トランスー〔PtCl₂（4-ピコリン）（ピペリジン）〕（5）を得ることは、化合物の細胞毒性を2～3倍（by a factor of 2-3）増強した（表1）。この観察は、錯体（5）のより高く立体的に妨げられた構造により説明され得る。トランスー〔PtCl₂（4-ピコリン）（ピペリジン）〕はシスプラチンより3倍活性が低く、トランスー〔PtCl₂（4-ピコリン）（ピペリジン）〕のより高いIC₅₀値は、図1A及び1Bにおいて示されるより少量のPt-DNA付加物と一致している。

【0063】

トランス形の立体的に妨げられた化合物の細胞毒性をそれらのシスの相手、シスー〔PtCl₂（NH₃）（4-ピコリン）〕及びシスー〔PtCl₂（NH₃）（ピペリジン）〕（7）の細胞毒性と比較した。新しいトランスーPt錯体中の1個のNH₃の置き換えの効果と対照的に、シスプラチンの1個のNH₃の芳香族-平面状アミンリガンド（4-ピコリン）又は脂肪族非-平面状アミン（ピペリジン）による類似の置き換えは、シスプラチン自身に比較してより低い細胞毒性活性を生じた。錯体シスー〔PtCl₂（NH₃）（ピペリジン）〕は、白金薬剤耐性を妨げるために設計され、現在臨床試験下にある新規な立体的に妨げられた抗-腫瘍化合物である新しい活性なシスー〔Pt（NH₃）（2-ピコリン）〕（AMD473）への類似体である⁽²⁶⁾。

【0064】

いくつかのピペラジン-含有Pt錯体の、シスプラチン感受性及び耐性ガン細胞系への細胞毒性も決定された。特定のには3対のシスプラチン感受性及び耐性ガン細胞系（A2780/A2780cisR、41M/41McisR及びCH1/CH1cisR）を用いた。

【0065】

錯体を上記の細胞系と一緒に24時間インキュベーションし、化合物処理した培養中の細胞生存を、前に報告した（マイクロ培養テトラゾリウム）MTS法により評価した。IC₅₀研究の結果を表2A～2Bに示す。

【0066】

【表2】

表2A いくつかのピペリジン(pip)含有錯体に関して得られたIC₅₀平均値(μM)
(括弧内の数字は耐性因子を示す)

	A2780	A2780cisR	CH1	CH1cisR	41M	41McisR
トランス-PtCl ₂ (4-pic)(pip)	9±1	135±7 (15)	26±3	169±9 (6.5)	35±4	210± (6.0)
トランス-PtCl ₂ (NH ₃)(4-pip))Cl ₂	5±0.7	20±2 (4.0)	15±2	94±6 (6.3)	27±2	150±8 (5.5)
トランス-PtCl ₂ (pip) ₂	15±2	250±12 (16.7)	35±2	280±12 (8)	50±3	300±25 (6)
シス-PtCl ₂ (pip) ₂	15±2	250±12 (16.7)	32±2	280±12 (8)	50±3	300±25 (6)
シス-PtCl ₂ (NH ₃)(pip)	26±3	234±17 (9)	36±4	263±17 (7.3)	64±5	315±24 (4.9)
トランスプラチン	>200	>200	>200	>200	>200	>200
シスプラチン	2.2	38	6	23	26	107

10

20

【 0 0 6 7 】

【 表 3 】

表2B いくつかのピペラジン-(pz)含有錯体に関して得られたIC₅₀平均値(μM)

	A2780	A2780cisR	CH1	CH1cisR	41M	41McisR
トランス-[PtCl ₂ (NH ₃)(pz)]・HCl	5±1	44±4 (8.8)	12±3	34±4 (2.8)	52±5	155±12 (3.0)
トランス-[PtCl ₂ (NBA)(pz)]・HCl	16±2	28±2 (1.8)	17±2	19±3 (1.1)	32±5	48±3 (1.5)
トランス-[PtCl ₂ (IPA)(pz)]・HCl	14±1	30±2 (2.1)	10±1	50±3 (5.0)	38±3	122±8 (3.2)
トランス-[PtCl ₂ (4-pic)(pz)]・HCl	10±3	24±3 (2.4)	16±2	42±3 (2.6)	45±3	147±10 (3.3)
トランス-[PtCl ₂ (pip)(pz)]・HCl	18±2	64±5 (3.6)	22±3	85±7 (3.9)	37±4	118±9 (3.2)
トランス-[PtCl ₂ (pz)(pz)]・HCl	17±3	43±3 (2.5)	26±2	53±3 (2.0)	43±3	153±10 (3.6)
シス-[PtCl ₂ (NH ₃)(pz)]・HCl	10±1	25±2 (2.5)	28±2	56±3 (2.0)	46±3	112±12 (2.4)
トランス-PtCl ₂ (NH ₃) ₂	>200	>200	>200	>200	>200	>200
シス-PtCl ₂ (NH ₃) ₂	2.2±0.6	38±3 (17.3)	6±1	23±3 (3.8)	26±2	107±8 (4.1)

10

20

30

40

50

【0068】

NBA = n-ブチルアミン、IPA = イソプロピルアミン、4-pic = 4-メチルピリジン、pip = ピペリジン、pip-pz = ピペラジン。括弧内の数字は耐性因子 (IC₅₀ 耐性 / IC₅₀ 感受性) である。

【0069】

SARに関して言うと、トランスプラチンの1個もしくは両方のアミンリガンドをピペラジンで置き換えることは、トランスプラチンに対して抗腫瘍活性を顕著に向上させ、正に帯電した非-平面状アミンリガンド (ピペラジン) がトランス形を活性化できることを示している。これらの細胞毒性研究の最も衝撃的な特徴は、強化されたDNA修復/寛容性及び増加したGSH量を介して耐性であるA2780cisR細胞系に対し、錯体が少なくともシスプラチンと同様に活性であることである。特に注目できることは、すべての3つの細胞系に対するトランス-[PtCl₂(NBA)(pz)]・HCl (10) の非常に低い耐性因子 (RF) であり (RF < 2)、シスプラチン耐性の有効な妨害を示している。

【0070】

これらのトランスプラチン錯体の抗-腫瘍活性の向上に関する可能な説明は、立体的に妨げられたリガンドがチオールによる解毒を低下させ得ることである。生物学的 (biological) なチオール及びチオエーテル (タンパク質及びペプチド) に対する反応性の低下は有益であると考えられ、それは生物学的硫黄含有リガンドとのシスプラチンの反応が後天的な耐性及び薬剤の毒性の副作用の源にあると思われるからである。

細胞の薬剤吸収及びDNA白金化

腫瘍細胞における薬剤蓄積を決定するために、C-26及びOV-1063細胞を細胞毒性化合物、トランス-[PtCl₂(4-ピコリン)(ピペリジン)](5)及びトランス-[PtCl₂(4-ピコリン)(ピペラジン)・HCl](13)に24時間暴露し、同じ条件下におけるシスプラチン及びトランスプラチンの薬剤吸収と比較した。原子吸光分析法(AAS)により、細胞と関連するPt含有量を測定した。図1Aにおいて示される通り、両細胞系においてトランス-[PtCl₂(4-ピコリン)(ピペリジン)](5)は非常に有効に細胞に浸透することが見出された(シスプラチンより6-倍高い)。

【0071】

また図1Bにおいて示される通り、トランスプラチンと比較して、トランス-[PtCl₂(4-ピコリン)(ピペリジン)](5)の浸透はOV-1063細胞において7-倍高く、C-26細胞において30-倍高い。トランス-[PtCl₂(4-ピコリン)(ピペリジン)](5)の蓄積の時間-依存性増加は、薬剤暴露の4(データは示されていない)~24時間の間、観察された。細胞におけるPtの時間-依存性蓄積はIC₅₀値における低下と一致する(表1)。トランス-[PtCl₂(4-ピコリン)(ピペラジン)]・HCl(13)は両細胞系において最も高い浸透値を示した(シスプラチンと比較して22-倍高い)(図1A及び1B)。

【0072】

細胞DNAの白金化を決定するために、C-26細胞及びOV-1063細胞をこれらのトランスプラチン錯体に4時間又は24時間暴露し、シスプラチンと比較し、AA分光計により白金DNA含有量を測定した。トランス-[PtCl₂(4-ピコリン)(ピペリジン)]のDNA白金化はC-26細胞及びOV-1063細胞においてCis-Ptのそれと同じであり、トランス-[PtCl₂(4-ピコリン)(ピペラジン)]・HCl錯体からDNAに挿入された(intercalated with DNA)Pt分子の値は両細胞系においてCis-Ptのそれより7-倍高かった(図2A及び2B)。

【0073】

コウシ胸腺DNAの白金化の形成も調べた。この目的のために、コウシ胸腺DNAを種々の化合物(表3)と一緒にインキュベーションし、そこにおいて以下のパラメーターを決定した：

$t_{1/2} - 10 \text{ mM NaClO}_4$ 中で37℃、 $r_i = 0.08$ における、ディファレンシャルパルスポーラログラフィー(differential pulse polarography)により決定されるコウシ胸腺DNAへの化合物の結合の半時間(half time)(分における)；

$\Delta \Delta \epsilon_{\text{max}} -$ 約275nmにおける正のCDバンドの極大、標準及び白金化コウシ胸腺DNAの間の差； $\Delta T_m -$ 非白金化及び白金化コウシ胸腺DNAの融解温度における差； 巻き戻し-付加物当たりの巻き戻し角； %IEC/付加物-鎖間架橋の頻度。

【0074】

【表4】

表3 : DNA結合

	t _{1/2} (分)	$\Delta\Delta\epsilon_{\max}$, r _b =0,05	$\Delta T_{m,(0.C),r_b=0,05}$		巻き戻し	%IEC/ 付加物
			0,01M Na+	0,2 M		
シス-[PtCl ₂ (NH ₃)(pip)]	113	0.93	-2.5	-6.0	13.2°	5
シス-[PtCl ₂ (NH ₃)(pz)]	35		3.5	-4.5	13°	6
トランス-[PtCl ₂ (NH ₃)(pip)]	113	0.15	+7.6	-1.9	52.8°	26
トランス-[PtCl ₂ (NH ₃)(pz)]	20	0.01	6.3	-1.9	26.4°	13
トランス-[PtCl ₂ (4-pic)(pip)]	260	0.04	+5.5	+0.5	11°	2
トランス-[PtCl ₂ (4-pic)(pz)]	12	-0.30	+4.7	-3.5	17°	6
シス-[PtCl ₂ (NH ₃)(pic)]	21	0.92	+1.6	-4.8	12°	4
トランス-[PtCl ₂ (NH ₃)(4-pic)]	50	-0.29	+7.2	+0.6	39.6°	40
トランス-[PtCl ₂ (NH ₃) ₂]	100	-0.34	+8.7	+0.6	9.4°	12
シス-[PtCl ₂ (NH ₃) ₂]	100	1.27	-2.6	-4.0	13°	6

10

【0075】

20

わかる通り、両ピペラジーン及びピペリジン含有錯体はシスプラチンより有意に高い速度でDNAに結合する。

EtBr蛍光によるDNA付加物の分析

蛍光性プローブとしてEtBrを用い、白金(II)化合物の付加物によりDNAにおいて誘導される攪乱を区別した⁽¹⁴⁾。挿入によるEtBrの結合は、Cis-Ptの結合と同様に二官能基性付加物の形成により化学量論的に遮断され、それは蛍光強度を失わせる。他方、一官能基性付加物の形成はEtBr蛍光をわずかに低下させるのみである。

【0076】

トランス-[PtCl₂(4-ピコリン)(ピペラジン)]・HClにより改変されたDNAのDNA白金化測定は、二官能基性付加物の形成と一致する蛍光における有意な低下を示した。他方、トランス-[PtCl₂(4-ピコリン)(ピペリジン)]の付加物による蛍光強度の低下はシスプラチンのそれより小さく、しかしながらトランスプラチンのそれより大きかった。最良の付加物はトランス-[PtCl₂(NH₃)(ピペリジノーピペリジン)]・HClを用いて形成された(表4及び又図3)。

30

【0077】

【表5】

表4: 種々の白金錯体の浸透及びPt-DNA付加物の形成

名前	細胞への浸透(ピコモル Pt/1*10 ⁶ 細胞) 24時間		Pt-DNA 付加物(ピコモル Pt/50μg DNA) 24時間	
	C-26	OV-1063	C-26	OV-1063
シス-DDP	2244	194	149	107
トランス-DDP	384	474	0	0
トランス-[PtCl ₂ (4-pic)(pip)]	14974	2092	51	41
トランス-[PtCl ₂ (4-pic)(pz)]・HCl	54461	12307	297	205

10

20

30

40

50

【0078】

かくして引き出される結論は、トランスー [PtCl₂(4-ピコリン)(ピペリジン)] が一官能基性付加物及び又、DNA中へのEtBrの挿入を阻害し、従ってEtBr蛍光強度を低下させることができる二官能基性付加物を形成するということであった。

【0079】

さらに、トランスー [PtCl₂(NH₃)(ピペリジノーピペリジン)]・HCl (3) と一緒に24時間インキュベーションされたDNAはEtBr蛍光における有意な低下を示した(シスプラチンのそれよりわずかに大きい)(図4)。錯体(3)とシス-DDPの間の差は低濃度においてより大きく、それは錯体(3)がDNAへのより高い親和性を有することを示唆している。シスー [PtCl₂(NH₃)(ピペラジン)]・HCl (8) の付加物による蛍光強度の低下はシスプラチンのそれに類似していた(図4)。

アポトーシスの評価

プログラミングされた細胞死としても知られるアポトーシスは、多細胞生物における細胞数の調節ならびに腫瘍進行、神経変性障害及びウィルス感染を含む種々の疾患の病因に含まれる。通常は正常な細胞の原形質膜の内側のリーフレットに閉じ込められている脂質であるホスファチジルセリン(PS)がほとんどの細胞型において示された。アポトーシスを経る細胞においては、PSがアポトーシスの初期の段階に外側の原形質膜リーフレットに輸送される(exported)。処理されたC-26及びOV-1063細胞におけるPS露出を、PSへの強い親和性を有するMC 540を用いる染色により検出し、二本鎖DNAを優先的に染色するDAPIを用いる染色によりクロマチン凝縮を評価した。

【0080】

赤く着色されない未処理細胞(結果は示されていない)と対照的な細胞膜における赤い蛍光の出現及び核の緑の蛍光の増加により証明される通り、トランスー [PtCl₂(4-ピコリン)(ピペリジン)] 処理されたOV-1063細胞においてはアポトーシスの顕著な特徴が観察された。この染色の結果は、OV-1063細胞の大部分が6.5μMのトランスー [PtCl₂(4-ピコリン)(ピペリジン)] で処理されてから5時間後にアポトーシス的であるように見えることを示した。C-26細胞の細胞表面は、未処理細胞において赤い蛍光がないこと(結果は示されていない)と対照的に、4.5μMのトランスー [PtCl₂(4-ピコリン)(ピペリジン)] で処理されてから5時間後にわずかに赤く蛍光性となる(結果は示されていない)。

【0081】

近年、プロテアーゼのキャスパーゼ(CED-3/ICE)ファミリーのメンバーがアポトーシスと関連する複雑な生化学的現象の決定的な媒介物質であることが見出された⁽²⁷⁾。特に、ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)、タンパク質キナーゼCδ及びアクチンを含む複数の異なるタンパク質を切断するキャスパーゼ-3の活性化は

、アポトーシスの開始に重要であることが示された⁽²⁸⁾。かくしてトランスー [PtCl₂ (4-ピコリン) (ピペリジン)] 処理されたC-26及びOV-1063細胞においてカスパーゼ-3の活性化を測定した。6.5 μMのトランスー [PtCl₂ (4-ピコリン) (ピペリジン)] 又は7.5 μMのトランスー [PtCl₂ (4-ピコリン) (ピペラジン)]・HClで5時間処理されたOV-1063細胞がカスパーゼ-3を活性化することが見出された(未処理の細胞と比較して処理された細胞における蛍光の約2倍の増加)。さらに、トランスー [PtCl₂ (4-ピコリン) (ピペリジン)] 又はトランスー [PtCl₂ (4-ピコリン) (ピペラジン)]・HClを用いるOV-1063細胞の16時間の処理の後、未処理の細胞と比較して処理された細胞において蛍光が3倍増加した(示されていない)。

10

【0082】

観察された蛍光シグナルがカスパーゼ-3の活性化の故であることを確かめるために、カスパーゼ-3様プロテアーゼの可逆的Ac-DEVD-CHO阻害剤を標準及び処理試料に加えた。Ac-DEVD-CHO阻害剤で処理された試料において蛍光シグナルにおけるものすごい低下が見出され(示されていない)、それはカスパーゼ-3の特異的活性化を証明している。4.5 μMのトランスー [PtCl₂ (4-ピコリン) (ピペリジン)] で処理されたC-26細胞において蛍光シグナルは見出されなかった。

【0083】

シスプラチンで処理されたOV-1063又はC-26細胞がアポトーシスを経るか否かを決定するために、これらの細胞系をそれぞれ2 μM又は1.5 μMで5又は16時間処理した。シスプラチン処理されたOV-1063細胞又はC-26細胞において蛍光シグナルは見出されなかった。これらの発見は、シスプラチンで処理されたL1210細胞においてアガロースゲル電気泳動により検出される分解DNAがないことを示したL. Szmigiero et al. のデータと一致している⁽²⁹⁾。それは結腸ガン細胞が、アポトーシスを阻害する単数もしくは複数の可溶性因子を分泌することによって⁽³⁰⁾ 及び結腸ガン細胞をアポトーシスから防御するc-キットの異常な活性化によって自己防衛することを示したいくつかの発見とも一致した。

20

タンパク質結合

静脈内に投与されるほとんどの白金(II)誘導体は24時間以内にタンパク質結合となるので、2種のモデルタンパク質、ユビキチン(MW 8565)及び心臓ミオグロビン(MW 16951)のPt錯体への結合速度を決定した。この目的のために、白金錯体とタンパク質の間の1:1反応を10mMリン酸塩緩衝液、pH 6.4中で1~2mM濃度において、37℃で行なった。タンパク質結合速度を反応混合物について直接、エレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)により測定した。図5は、中性のトランスーPtCl₂ (NH₃) (ピペリジン)がタンパク質に迅速に結合し、結合速度に関してシスプラチン及びトランスプラチンが続くが、帯電したピペラジン錯体はタンパク質に有意に結合しないことを示している。DNAへの非常に迅速な結合とタンパク質への遅く且つ無効な結合の組み合わせは、白金に基づく抗腫瘍薬剤の非常に望ましい性質である。

30

毒性

トランスー [PtCl₂ (NH₃) (ピペリジノーピペリジン)]・HCl及びシス-D DPが5mg/kgの濃度において無毒性であり、トランスー [PtCl₂ (4-ピコリン) (ピペラジン)]・HClが20mg/kgの濃度において無毒性であることが見出された。

40

生体内抗腫瘍効果

雌のBALB/Cマウス(17~20グラムの体重範囲内)に1*10⁶個のC-26結腸ガンを腹腔内注入した。トリパンプル排除によると、これらの細胞の生存率は>90%であった。

【0084】

トランスー [PtCl₂ (NH₃) (ピペリジノーピペリジン)]・HClの治療的有効

50

性を研究し、シスプラチンと比較した。処置は上記のスケジュールに従って行なわれた。結果を表5及び図6に示す。

【0085】

【表6】

表5：処置の第1のスケジュールにおける抗腫瘍効果

処置	投薬量 (mg/kg)	投薬量 (ミレル/kg)	マウス数	生存 (日)	寿命の延長 (%)
標準			7	11,5±0,5	
シスプラチン	5	16,6	8	24±5	108
トランス-[PtCl ₂ NH ₃ (pip-pip)]・HCl	5	10,3	8	24±3	108

10

【実施例3】

【0086】

ーリポソーム調剤

トランス-[PtCl₂(NH₃)(ピペリジノーピペリジン)]・HClを含有する立体的に安定化されたリポソーム(SSL)の調製及び分析

トランス-[PtCl₂(NH₃)(ピペリジノーピペリジン)]・HClを含有するSSLの調製

トランス-[PtCl₂(NH₃)(ピペリジノーピペリジン)]・HCl(10mg/ml)を0.9% NaCl中に65℃で溶解し、この温度で1時間放置した。脂質(HSPC:コレステロール:PEG²⁰⁰⁰-DSPC 51:44:5)をエタノール中に溶解した。このエタノール性溶液を薬剤混合物に加えることにより、脂質を水和させた。最終的な脂質濃度は、65℃において25%エタノール中で150mg/ml(15%)であった。混合物を65℃で1時間攪拌し続け、次いで200nmの孔径を有する25mmのポリカーボネートフィルターを介し、Lipex押出し機(Northern Lipids Inc. Vancouver, Canada)を用いて65℃で5回押出し、続いて100nmの孔径のポリカーボネートフィルターを介して11回押出した。寸法をそろえられた(sized)リポソーム(~100nm)を室温に冷ました。冷ます間、重質の沈殿が生成し、上澄み液を集めた。次いで上澄み液を4℃に終夜冷却し、再び上澄み液を集めた。上澄み液を集め、10%スクロース及び1mM NaClを含有する10mMヒスチジン緩衝液(pH=6.5)に対して、100体積の緩衝液に対して合計で5回及び200体積に対して1回、4℃で透析した。これらの条件下で、緩衝液との完全な平衡が起こるはずである。最終的なリポソーム分散液は半透明白色であった。

30

トランス-[PtCl₂(NH₃)(ピペリジノーピペリジン)]・HClを含有するSSLの分析

CoulterモデルN4 SD(Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA)を用い、動的光散乱(DLS)により、リポソームをそれらの寸法分布に関して25℃で分析した。

【0087】

リン脂質(PLs)の濃度を脂質リン含有量により調べた(修正Bartlett法)

(31)。

【0088】

無炎Zeeman原子吸光分析計(FAAS)により、リポソーム中の白金濃度を測定した。白金濃度は、mLあたりに50~250ngの白金の範囲の濃度を有するK₂PtC

50

14 貯蔵溶液の5つの標準を含むキャリブレーションカーブに従って計算された。

【0089】

トランスー [PtCl₂ (NH₃) (ピペリジノーピペリジン)]・HCl を含有する SSL を以下のパラメーターにより分析した：寸法—102 nm；調製物中のトランスー [PtCl₂ (NH₃) (ピペリジノーピペリジン)]・HCl の濃度：1 mM；調製物中の脂質の濃度：94 mM；及びカプセル封入のパーセンテージ（リポソーム中の Pt / Pl 比／初期 Pt / Pl 比 x 100）8 %。

トランスー [PtCl₂ (NH₃) (ピペリジノーピペリジン)]・HCl SSL からの Pt 放出の分析

硫黄含有グルタチオン (GSH) は白金との反応性が高いことが知られている。従ってリポソームからの白金の放出実験のためにそれを選択した。その白金との迅速な反応及び ¹⁹⁵Pt-NMR 上で誘導されるその硫黄の結合による強い化学シフトは、問題の範囲において我々がジアミンジクロロ白金のみを検出することを可能にするであろう。正に帯電した活性誘導体はトランスー [PtCl₂ (NH₃) (ピペリジノーピペリジン)]・HCl (3) であった。

【0090】

すべての NMR スペクトルは Varian Inova 500 MHz 分光計上で 5 mm のスイッチ可能なプローブを用いて記録された。¹⁹⁵Pt-NMR スペクトルは外部標準として HCl 中の K₂PtCl₄ (-1624 ppm) に関連付けられた。

¹⁹⁵Pt-NMR 実験

NMR 管中の 0.5 mL のリポソーム懸濁液 (0.5 mg/mL) に 2 当量のグルタチオン (GSH) を加え、懸濁液を 2 分間激しく振盪させた。¹⁹⁵Pt-NMR 試験は、リポソーム内の錯体が無損傷であることを示した (δ = -2134.597 ppm)。試料を 37 °C で放置した。続行 ¹⁹⁵Pt-NMR を 1、2 及び 7 日後に行なった。最初の 2 日間ずっと、白金部分は無損傷であった。第 7 日に行なわれた ¹⁹⁵Pt-NMR は、ジアミンジクロロ白金 (II) 部分に特徴的な化学シフトの全体的消失を明らかにした。

【0091】

白金薬剤の放出への (GSH) の効果を評価するために、GSH なしで上記の実験を繰り返した。¹⁹⁵Pt-NMR は、37 °C において 10 日後でさえ錯体が内部で無損傷であり (δ = -2132.585 ppm)、δ = -2661.428 ppm における少量の生成物があることを明らかにした。

【0092】

要するに結果は、帯電した錯体、トランスー [PtCl₂ (NH₃) (ピペリジノーピペリジン)]・HCl が、シスプラチンと対照的に放出されることを明白に示した。ジアミンジクロロ白金 (II) の特徴的な化学シフトの全体的消失は、配位球中のリガンドが変化したことを意味する。それにもかかわらず、GSH を含まない実験において変化が現れないことは、放出がないことを示す糸口ではない (not a clue for)。そのためには、リポソームの外部における白金部分の存在を証明するために、外部の溶液を濾過し、原子吸光 (AA) 及び (可能なら) ¹⁹⁵Pt-NMR を行わなければならない。

【実施例 4】

【0093】

一四官能基性の正に帯電したピペラジンに基づくビスー白金錯体

非—古典的な白金錯体の合成の努力を続け、四官能基性の正に帯電したビスー白金錯体を以下のスキームに従って合成した：

【0094】

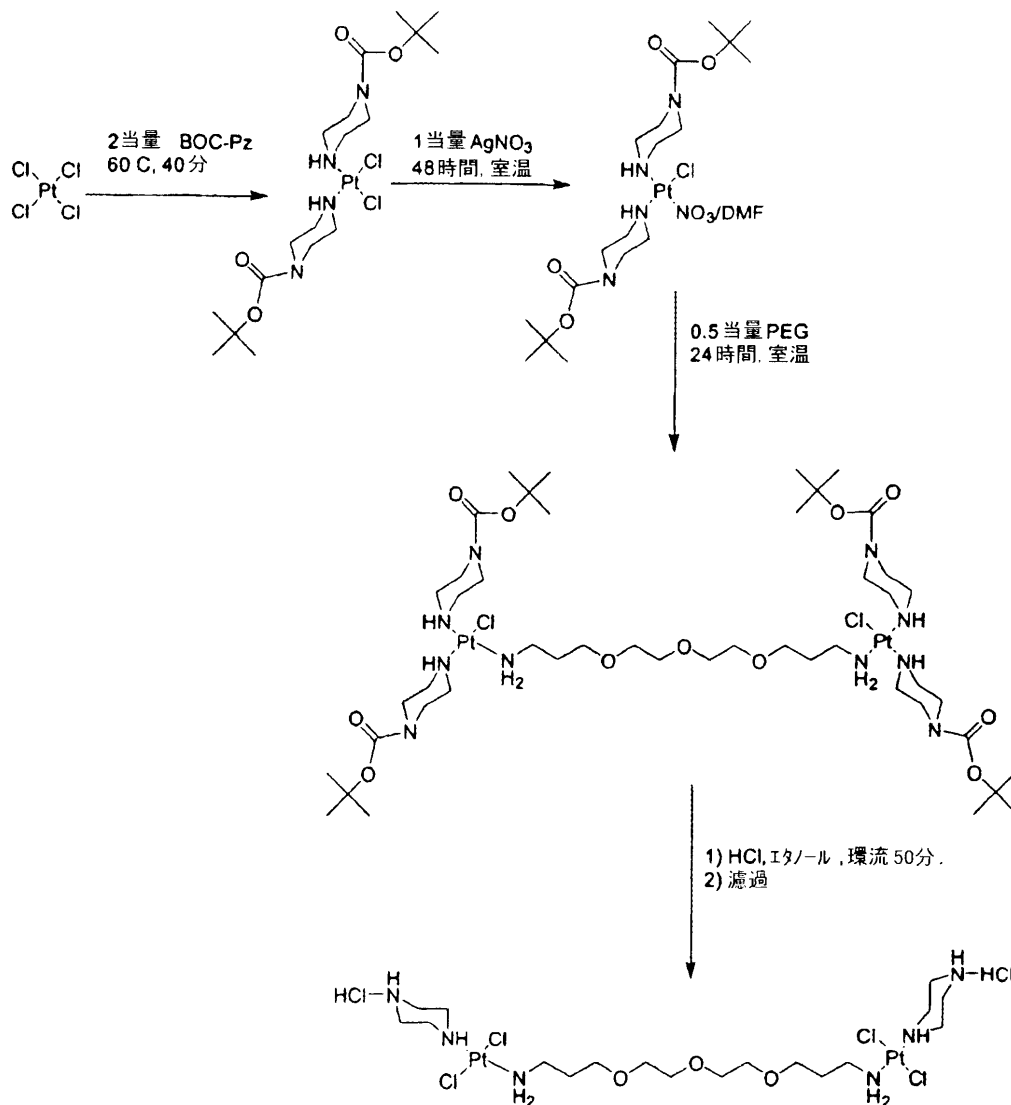
【化 1】

10

20

30

40



10

20

30

40

50

【0095】

シス-PtCl₂(BOC-Pz)₂ (1 g, 2.41ミリモル)を20 mLのDDW中に溶解した。攪拌されている混合物に2当量(0.9 g, 4.84ミリモル)の1-ピペラジンカルボン酸tert-ブチルを加え、混合物を70°Cに加温した。攪拌及び加温を50分間続け、次いで黄色の沈殿を集め、40 mLのDDWで2回洗浄した。乾燥後、¹⁹⁵Pt-NMR (DMF)を用いて且つさらなる精製を用いずに黄色の生成物を分析した。

¹⁹⁵Pt-NMR (DMF) : δ = -2239.4 ppm, -2267.8 ppm

ビス-[{トランス, トランス-(PtCl₂-Pz)₂ } (リンカー)] · 2HClの合成

暗所でシス-PtCl₂(BOC-Pz)₂ (538 mg, 1ミリモル)を50 mLのDMF中に溶解した。攪拌されている黄色の溶液に1当量(169.88 mg, 1ミリモル)の硝酸銀を加え、混合物を室温で48時間攪拌した。¹⁹⁵Pt-NMR (DMF)は、(δ = -2240.477 ppm)における微量の出発材料とともにモノ-ニトラト/DMFモノクロロジアミノ白金(II) (δ = -2002.987 ppm, -2123.995)の生成を示した。この段階にAgCl沈殿を濾過し、0.5当量(110 mg, 0.5ミリモル)の4, 7, 10-トリオキサー-1, 13-トリデカンジアミンを加えた。混合物を暗所で終夜攪拌した。¹⁹⁵Pt-NMR (DMF)はモノクロロトリアミン白金の生成を示した(δ = -2542.974 ppm, -2570.911 ppm)

)。黄色がかった濾液を取り上げ、溶媒を減圧下で蒸発乾固した。ゴムを20 mlのエタノール中に溶解し、1 mLの濃塩酸を加えた。全体が可溶化するまで混合物を室温で攪拌し、次いで50分間温度を上げて還流させた。この時間中ずっと、黄色がかった沈殿が生成していた。反応混合物を室温に冷まし、沈殿を集め、20 mlのエタノールで洗浄し、乾燥した。

^{195}Pt -NMR (H_2O) : $\delta = -2224.396 \text{ ppm}$, 2238.142 ppm , 2248.194 ppm 。

【0096】

【表7】

参 照 文 献

- 1) Jamieson, E. R. & Lippard, S. J.; Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem. Rev.* 1999; 99(9); 2467-2498.
- 2) Kartalou, M. & Essigmann, J. M. Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutat. Res.* 2001, 478, 1-2, 1-21.
- 3) Gonzalez, V. M.; Fuertes, M. A.; Alonso C.; Perez J. M. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol. Pharmacol.* 2001, 59, 4, 657-63. 10
- 4) Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat. Res.* 2001, 478, 1-2, 23-43.
- 5) Cornelison, T. L. & Reed, E. Nephrotoxicity and Hydration Management for Cisplatin, Carboplatin, and Ormaplatin, *Gynecol. Onc.* 1993, 50, 2, 147-158.
- 6) Wong, E. & Giandomenico, C. M.; Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs *Chem. Rev.* 1999; 99(9); 2451-2466. 20
- 7) Cleare, M. J.; Hoeschele, J. D. Studies on the antitumor activity of group VIII transition metal complexes. Part I. Platinum(II) complexes. *Bionorg. Chem.* 1973, 2, 187-210.
- 8) Bierbach, U.; Qu, Y.; Hambley, T. W.; Peroutka, J.; Nguyen, H. L.; Doedee, M.; Farrell, N.; Synthesis, Structure, Biological Activity, and DNA Binding of Platinum(II) Complexes of the Type *trans*-[PtCl₂(NH₃)L] (L = Planar Nitrogen Base). Effect of L and Cis/Trans Isomerism on Sequence Specificity and Unwinding Properties Observed in Globally Platinated DNA. *Inorg. Chem.* 1999; 38 ,15, 3535-3542. 30
- 9) Montero, E. I.; Díaz, S.; González-Vadillo, A. M.; Pérez, J. M.; Alonso, C. & Navarro-Ranninger, C. Preparation and characterization of novel *trans*-[PtCl₂(amine)(isopropylamine)] compounds: cytotoxic activity and apoptosis induction in ras-transformed cells, *J. Med. Chem.* 1999, 42, 20, 4264-4268.
- 10) Coluccia, M.; Nassi, A.; Boccarelli, A.; Giordano, D.; Cardellicchio, N.; Locker, D.; Leng, M.; Sivo, M.; Intini, F. P.; & Natile, G. In vitro and in vivo antitumour activity and cellular pharmacological properties of new platinum-iminoether complexes with different configuration at the iminoether 40

ligands, *J. Inorg. Biochem.* 1999, 77, 1-2, 31-35.

11) John D. Roberts, John Peroutka and Nicholas Farrell Cellular pharmacology of polynuclear platinum anti-cancer agents, *J. Inorg. Biochem.* 1999, 77, 1-2, 51-57.

12) Kelland, L. R.; Sharp, S. Y.; O'Neill, C. F.; Raynaud, F. I.; Beale, P. J. & Judson, I. Mini-review: discovery and development of platinum complexes designed to circumvent cisplatin resistance, *J. Inorg. Biochem.* 1999, 77, I 1-2, 111-115.

13) Bierbach, U.; Sabat, M.; Farrell, N.; Inversion of the Cis Geometry Requirement for Cytotoxicity in Structurally Novel Platinum(II) Complexes Containing the Bidentate N,O-Donor Pyridin-2-yl-acetate *Inorg. Chem.* 2000; 39(9); 1882-1890.

14) Hollis, L S; Amundsen, A R; Stern, E W. Chemical and biological properties of a new series of cis-diammineplatinum(II) antitumor agents containing three nitrogen donors: cis-[Pt(NH₃)₂(N-donor)Cl]⁺, *Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 32, Issue 1, January 1989, Pages 128-136.

15) Kelland, L. R.; Abel, G., McKeage, M. J.; Jones, M.; Goddard, P. .M., Valenti, M.; Murrer, B. .A., Harrap, K. R. Preclinical antitumor evaluation of bis-acetato-ammine-dichloro-cyclohexylamine platinum(IV): an orally active platinum drug. *Cancer Res.* 1993, 53, 2581-2586.

16) Loh, S. Y.; Mistry, P.; Kelland, L. R.; Abel, G.; Harrap, K. R. Reduced drug accumulation as a major mechanism of acquired resistance to cisplatin in a human ovarian carcinoma cell line: circumvention studies using novel platinum (II) and (IV) ammine/amine complexes. *Brit. J. Cancer.* 1992, 66, 1109-1115

17) Goddard, P. M; Orr, R. M.; Valenti, M. R.; Barnard, C. F.; Murrer, B. A.; Kelland, L. R.; Harrap, K. R. Novel *trans*-platinum complexes: comparative in vitro and in vivo activity against platinum-sensitive and resistant murine tumours. *Anticancer Res.* 1996, 16, 33-8

18) Behrens, B. C.; Hamilton, T. C.; Masuda, H.; Grotzinger, K. R.; Whang-Peng, J.; Louie, K. G.; Knutsen, T.; McKoy, W. M.; Young, R. C.; Ozols, R. F. Characterization of a *cis*-diamminedichloroplatinum(II)-resistant human ovarian cancer cell line and its use in evaluation of platinum analogues. *Cancer Res.* 1987,

10

20

30

40

47, 414-418.

19) Gorodetsky, R.; Levy-Acaba, F.; Mou, X.; Vexler, A.M. Combination of cisplatin and radiation in cell culture: effect of duration of exposure to drug and timing of irradiation. *Int. J. Cancer* 1998, 75, 635-642.

20) Gorodetsky, R.; Moy, X.; Pfeffer, M. R.; Peretz, T. ; Levy-Agababa, F.; Vexler, A.M. Sub-additive effect of the combination of radiation and cisplatin in cultured murine and human cell lines. *Isr. J. Med. Sci.* 1995, 31, 175-180.

21) Cory, A H; Owen, T C; Barltrop, J A; Cory, J G Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture, *Cancer Communications, Volume 3, Issue 7, July 1991, Pages 207-212*
Lindauer, E.; Holler, E. Cellular distribution and cellular reactivity of platinum(II) complexes. *Biochem. Pharmacol.* 1996, 52, 7-14.

22) Zuidan, N. J.; Hirsh-Lerner, D.; Margulies, S.; Barenholz, Y. Lamellarity of cationic liposomes and mode of preparation of lipoplexes affect transfection efficiency. *Biochim. Biophys. Acta* 1999, 1419, 207-220.

23) Even-Chen, S.; Barenholz, Y. DOTAP cationic liposomes prefer relaxed over supercoiled plasmide *Boichim. Biophys. Acta* 2000, 1509, 176-188.

24) Reid, S.; Cross, R.; Snow, E. C. Combined Hoechst 33342 and merocyanine 540 staining examine murine B cell cycle stage, viability and apoptosis. *J. Immunol. Methods* 1996, 192, 43-54.

25) Holford, J; Raynaud, F.; Murrer, B. A.; Grimaldi, K; Hartley, J. A.; Abrams, M; Kelland, L. R. Chemical, biochemical and pharmacological activity of the novel sterically hindered platinum co-ordination complex, cis-[amminedichloro(2-methylpyridine)] platinum(II) (AMD473), *Anti-Cancer Drug Des.* 1998, 13, 1,1-18.

26) Thornberry, N.A.; Lazebnic, Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998, 281, 1312-1316.

27) Villa, P.; Kaufmann, S. H.; Earnshaw, W. C. Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem. Sci.* 1997, 22, 388-393.

28) Ciesielska, E.; Studzan, K.; Zyner, E.; Ochocki, J.; Szmigiero, L. DNA

10

20

30

40

damage and apoptosis induction in L1210 cells by diamminedichloroplatinum(II) and its new aminoflavone analogue *Cell.Mol.Biol.Lett.* 2000, 5, 441-450.

29) Liu, W.; Davis, D.W.; Ramirez, K.; McConkey, D.J.; Ellis, L.M. Endothelial cell apoptosis is inhibited by a soluble factor secreted by human colon cancer cells. *Int. J. Cancer* 2001, 92, 26-30.

30) Y. Barenholz, S. Amsalem. In: Liposome Technology 2nd Edn., G. Gregoriadis (Ed.) CRC Press, Boca Raton, 1993, vol. 1, pp: 527-616.

10

【図面の簡単な説明】

【0100】

【図1A】C-26ガン細胞によるシスプラチン；トランスプラチン；トランスー〔PtCl₂〕（4-ピコリン）（ピペリジン）；トランスー〔PtCl₂〕（4-ピコリン）（ピペラジン）・HCl及びトランスー〔PtCl₂（NH₃）（ピペリジノーピペリジン）〕・HClの吸収を示す図。

【図1B】OV-1063ガン細胞によるシスプラチン；トランスプラチン；トランスー〔PtCl₂〕（4-ピコリン）（ピペリジン）；トランスー〔PtCl₂〕（4-ピコリン）（ピペラジン）・HCl及びトランスー〔PtCl₂（NH₃）（ピペリジノーピペリジン）〕・HClの吸収を示す図。

20

【図2A】C-26ガン細胞におけるシスプラチン；トランスプラチン；トランスー〔PtCl₂〕（4-ピコリン）（ピペリジン）；トランスー〔PtCl₂〕（4-ピコリン）（ピペラジン）・HCl及びトランスー〔PtCl₂（NH₃）（ピペリジノーピペリジン）〕・HClのDNA白金化レベルを示す図。

【図2B】OV-1063ガン細胞におけるシスプラチン；トランスプラチン；トランスー〔PtCl₂〕（4-ピコリン）（ピペリジン）；トランスー〔PtCl₂〕（4-ピコリン）（ピペラジン）・HCl及びトランスー〔PtCl₂（NH₃）（ピペリジノーピペリジン）〕・HClのDNA白金化レベルを示す図。

30

【図3】シスプラチン；トランスプラチン；トランスー〔PtCl₂（NH₃）（ピペラジン）〕・HCl；トランスー〔PtCl₂（4-ピコリン）（ピペラジン）〕・HCl及びトランスー〔PtCl₂（NH₃）（ピペリジノーピペリジン）〕・HClにより改変された種々の濃度のDNAへのEtBr蛍光の依存性を示す図。

【図4】IC₅₀値のトランスー〔PtCl₂（4-ピコリン）（ピペリジン）〕、トランスー〔PtCl₂（4-ピコリン）（ピペラジン）〕・HCl、トランスー〔PtCl₂（NH₃）（ピペリジノーピペリジン）〕・HCl又はシスプラチンで処理されたOV-1063細胞における、未処理の（標準細胞）と比較されるカスパーゼ-3活性を示す図。

40

【図5】シスプラチン；トランスプラチン；トランスー〔PtCl₂（NH₃）（ピペリジン）〕；及びトランスー〔PtCl₂（NH₃）（ピペラジン）〕・HClへのユビキチンの結合曲線を示す図。

【図6】C-26結腸ガンが接種され、本明細書上記に記載されるスケジュールに従って処置された雌のBALB/Cマウスにおける、シス-DDPと比較されるトランスー〔PtCl₂（NH₃）（ピペリジノーピペリジン）〕・HClの抗腫瘍活性を示す図。

【図 1 A】

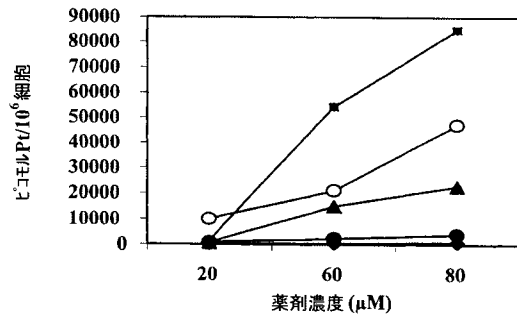


FIG.1A

【図 1 B】

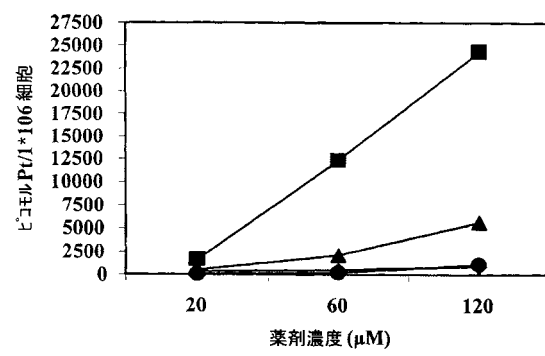


FIG.1B

【図 2 A】

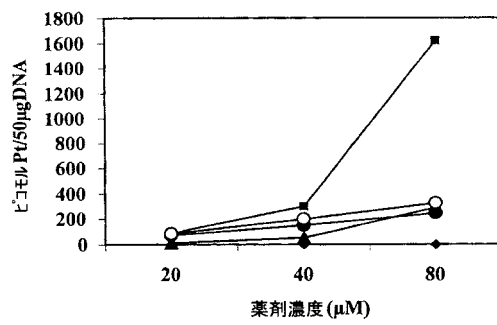


FIG.2A

【図 2 B】

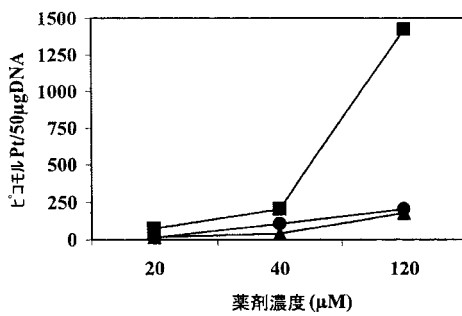


FIG.2B

【図 3】

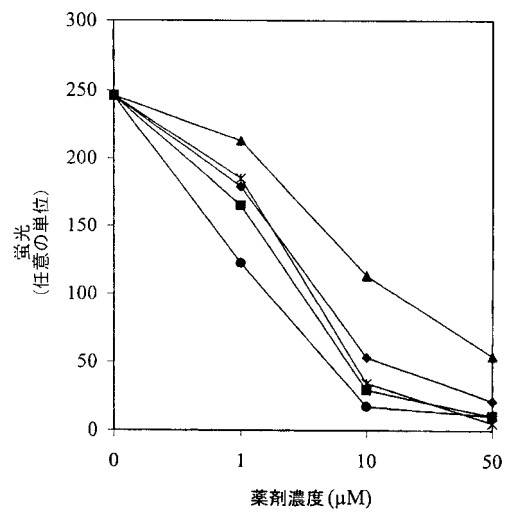


FIG.3

【図 4】

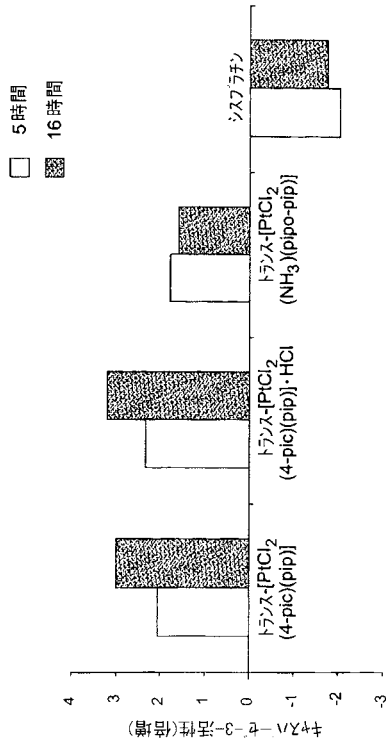


FIG. 4

【図 5】

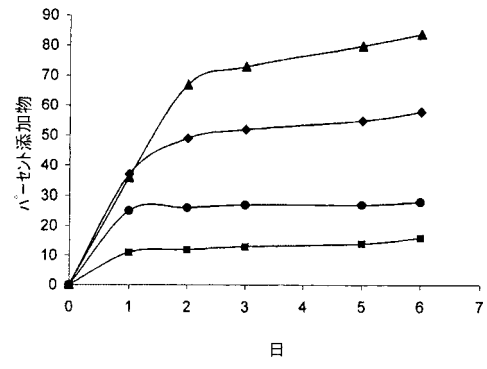


FIG. 5

【図 6】

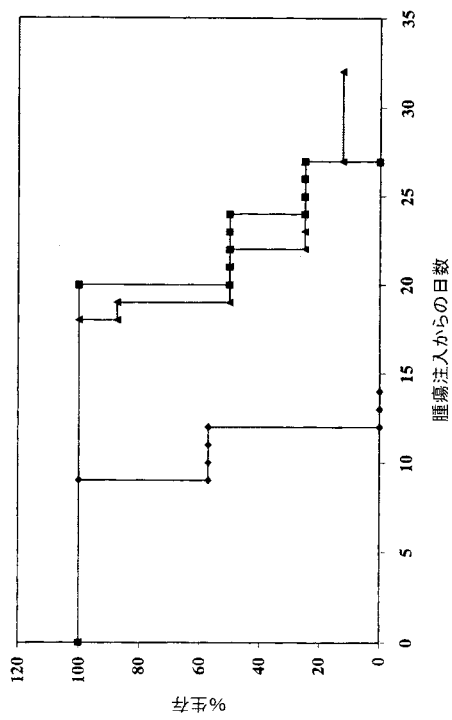


FIG 6

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
6 March 2003 (06.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/017998 A1

(51) International Patent Classification: A61K 31/28, C07F 15/00 (74) Agent: REINHOLD COHN AND PARTNERS; P.O.Box 4060, 61040 Tel Aviv (IL).

(21) International Application Number: PCT/IL02/00687

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GH, GM, GR, GU, HK, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date: 21 August 2002 (21.08.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/314,115 23 August 2001 (23.08.2001) US

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM [IL/IL]; 46 Jabotinsky Street, 92182 Jerusalem (IL).

Published:

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): BARENHOLZ, Yechezkel [IL/IL]; 18 Nave Shanan Street, 93707 Jerusalem (IL). GIBSON, Dan [IL/IL]; 1 Nachshon Street, 93548 Jerusalem (IL). NAJAJREH, Yousef [IL/IL]; A-Sahel Street, I'ayer O'mar Building, Apartment No. 10, Beit Jala (IL). KHAZANOV, Elena [IL/IL]; 18/8 Shderot Ha-Yarkon, 99000 Ramat Beit Shemesh (IL).— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/017998 A1

(54) Title: PLATINUM COMPLEXES AND THEIR USE IN CANCER TREATMENT

(57) Abstract: The present invention concerns novel platinum complexes in which at least one of the amine ligand is a non-planar heterocyclic aliphatic amine. The platinum complexes may be in a trans or cis configuration and were found to possess therapeutic activities. Thus, the present concerns novel platinum complexes, pharmaceutical compositions comprising them and other uses thereof.

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 1 -

PLATINUM COMPLEXES AND THEIR USE IN CANCER TREATMENT

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to novel platinum complexes and their uses.

BACKGROUND OF THE INVENTION AND PRIOR ART

Cisplatin, *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] is one of the three most widely used clinical agents
5 in the treatment of a variety of solid tumors ⁽¹⁾. It is believed to kill tumor cells by
binding irreversibly to the DNA, mainly to two adjacent guanines on the same strand,
inducing a kink in the DNA that is recognized by cellular proteins that bind the
cisplatin-modified DNA ⁽²⁾. It is the Pt-DNA adducts that are responsible for the
induction of apoptosis and eventual cell death ⁽³⁾. Despite its efficacy in the treatment
10 of various neoplastic diseases, including testicular and ovarian tumors, its clinical
utility is restricted by its low solubility, toxicity and especially tumor resistance ⁽⁴⁾.
Second generation drugs such as carboplatin (Pt(CBDCA)(NH₃)₂), CBDCA =
1,1-cyclobutanedicarboxylate) exhibit reduced nephrotoxicity but fail to overcome the
tumor resistance probably due to the fact that they form the same spectrum of DNA
15 adducts as does cisplatin ⁽⁵⁾.

Overcoming the resistance is one of the major goals in the development of
novel platinum drugs and hence new compounds that deviate from the classic
structure-activity relationship (SAR) have been designed, synthesized and screened ⁽⁶⁾.
The SAR, first formulated by Cleare and Hoeschele, influenced medicinal chemists to
20 direct their efforts to the preparation of neutral platinum(II) complexes with two inert
ligands in the *cis* configuration and two semi-labile leaving groups ⁽⁷⁾.

It was generally accepted that a *cis* configuration of the two leaving groups is essential for anti-tumor activity of *cis*-diaminedichloroplatinum (*cis*-DDP). This was the situation for more than two decades until Farrell et. al have reported that replacing one or both NH₃ ligands in *trans*-PtCl₂(Am₁)(Am₂), wherein Am₁, Am₂ = NH₃, or
 5 planar amine ligands such as quinoline, thiazole, pyridine or benzothiazole, (e.g. *trans*-[PtCl₂(NH₃)(pyridine)], *trans*-[PtCl₂(NH₃)(thiazole)], *trans*-[PtCl₂(NH₃)(quinoline)], and *trans*-[PtCl₂(NH₃)(benzothiazole)]) substantially enhances the cytotoxicity of the *trans* geometry⁽⁸⁾.

In addition, Navarro-Ranniger and co-workers demonstrated that
 10 *trans*-PtCl₂[NH₂CH(CH₃)₂][NH(CH₃)₂] has interesting pharmacological properties⁽⁹⁾ and Natile et. al. reported that *trans*-PtCl₂(iminoether)₂ is also active against several human cancer lines⁽¹⁰⁾. Another example of a non-classical complex that is in phase 2 of clinical trials is the trinuclear Pt complex BBR3464 that is a quadruply charged cation⁽¹¹⁾.

15 The importance of the non-classical platinum compounds stems from the fact that they were designed to form a spectrum of DNA adducts that is distinct from that formed by cisplatin and carboplatin and hence they can circumvent acquired Pt resistance⁽¹²⁾.

Generally, *trans*-diaminedichloroplatinum(II) analogues have lower solubility
 20 in aqueous solution than their *cis* counterparts, resulting in limited bioavailability. One way of increasing the aqueous solubility is by adding a charge to the complex. Farrell et al. have put some effort in overcoming the poor water solubility of compounds of the type *trans*-[PtCl₂(NH₃)(Am₁)] (Am₁ = planar ligand), while retaining the *trans* orientation of the NH₃ and the planar ligand and electroneutrality of the square-planar
 25 entity. The *trans*-platinum complex *trans*-[PtCl(PyAc-*N,O*)(NH₃)] (PyAc = pyridin-2-yl acetate, N-donors are *trans*) and its *cis* isomer were synthesized and the *trans* isomer have shown improved solubility (ca. 4-5 mmol L⁻¹) in water, compared to analogous complexes *trans*-[PtCl₂(NH₃)(Am₁)] (Am₁ = planar ligand)⁽¹³⁾. On the other hand, the cationic charges of the platinum complexes prepared by Farrell et al.

WO 03/017998

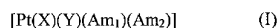
PCT/IL02/00687

- 3 -

and also by Hollis et al. reside on the metal center and result from the substitution of one or the anionic chloride ligands by a neutral ligand ⁽¹⁴⁾.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention concerns, according to a first of its aspects, novel
5 platinum complexes (Pt-complexes) having the general formula (I):

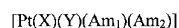


wherein:

- **X** and **Y**, which may be the same or different, represent a halogen, carboxylate, phosphate or sulphate group;
 - 10 - **Am₁** represents an amine selected from ammonia, a primary amine, a secondary amine, a non-planar heterocyclic aliphatic amine or a heterocyclic aromatic amine; and
 - **Am₂** represents a non-planar heterocyclic aliphatic amine,
- with the proviso that when said complex is in a *cis* configuration, **Am₁** and
15 **Am₂** cannot represent simultaneously piperidine.

The Pt-complex of the invention may be in the form of a dimer in which each monomeric unit is a Pt-complex as defined, bound to the other Pt-complex, independently, through the **Am₁** ligand or through the **Am₂** ligand or through a linker connected to said **Am₁** or **Am₂**.

20 According to another aspect, the invention concerns pharmaceutical compositions comprising a pharmaceutically acceptable carrier and as an active ingredient a therapeutically effective amount of a Pt complex of the general formula:



wherein:

- 25 - **X** and **Y**, which may be the same or different, represent a halogen, carboxylate, phosphate or sulphate group;
- **Am₁** represents an amine selected from ammonia, a primary amine, a

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

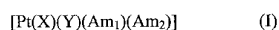
- 4 -

secondary amine, a non-planar heterocyclic aliphatic amine or a heterocyclic aromatic amine; and

- **Am₂** represents a non-planar heterocyclic aliphatic amine, with the proviso that when said complex is in a *cis* configuration, Am₁ and 5 Am₂ cannot represent simultaneously piperidine.

The pharmaceutical composition may comprise the Pt-complex of the invention in the form of a monomer, or in the form of a dimer, as defined above.

- The invention also concerns a method for achieving a therapeutic effect, the method comprising administering to a subject in need an amount of a platinum 10 complex (in the form of a monomer or dimer), the amount being sufficient for achieving said therapeutic effect and the Pt complex comprises the general formula (I):



wherein:

- 15 - **X** and **Y**, which may be the same or different, represent a halogen, carboxylate, phosphate or sulphate group;
- **Am₁** represents an amine selected from ammonia, a primary amine, a secondary amine, a non-planar heterocyclic aliphatic amine or a heterocyclic aromatic amine; and
- 20 - **Am₂** represents a non-planar heterocyclic aliphatic amine, with the proviso that when said complex is in a *cis* configuration, Am₁ and Am₂ cannot represent simultaneously piperidine.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Fig. 1A-1B show uptake by C-26 cancer cells (Fig. 1A) or OV-1063 cancer cells (Fig. 1B) of cisplatin (-?-); transplatin (-⁺-); *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperidine)] (-⁺-); *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperazine)]·HCl (-⁺-) and *trans*-[PtCl₂(NH₃)(piperidino-piperidine)]·HCl (-O-). The Pt content was determined by Atomic Absorption Spectroscopy (AAS).

Fig. 2A-2B show DNA platination levels in C-26 cancer cells (Fig. 2A) or OV-1063 cancer cells (Fig. 2B) of cisplatin (-?-); transplatin (-⁺-); *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperidine)] (-⁺-); *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperazine)]·HCl (-⁺-) and *trans*-[PtCl₂(NH₃)(piperidino-piperidine)]·HCl (-O-). The Pt content was determined by Atomic Absorption Spectroscopy (AAS).

Fig. 3 shows the dependence of EtBr fluorescence on different concentrations of DNA modified by cisplatin (-⁺-); transplatin (-⁺-); *trans*-[PtCl₂(NH₃)(piperazine)]·HCl (-⁺-); *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperazine)]·HCl (-x-) and *trans*-[PtCl₂(NH₃)(piperidino-piperidine)]·HCl (-?-). Data points were measured in triplicate which varied on average by ±3%.

Fig. 4 shows Caspase-3-activity in OV-1063 cells, which were treated with IC₅₀ values of *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperidine)] (6.5 μM, *trans*-[PtCl₂(4-pic)(pip)]), *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperazine)]·HCl (7.5 μM or 6.5 μM, respectively, *trans*-[PtCl₂(4-pic)(pz)]·HCl), *trans*-[PtCl₂(NH₃)(piperidino-piperidine)]·HCl (4 μM or 6 μM, respectively, *trans*-[PtCl₂(NH₃)(pipo-pip)]·HCl) or cisplatin (2 μM or 1 μM, respectively) compared to untreated (control) cells. Both drug-treated and control cells were then harvested, lysed, and assayed after the indicated amount of time, as described in the kit protocol.

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 6 -

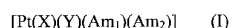
Fig. 5 shows the binding curve of Ubiquitin to cisplatin (-? -); transplatin (-! -); *trans*-[PtCl₂(NH₃)(piperidine)] (-^ -); and *trans*-[PtCl₂(NH₃)(piperazine)]•HCl (-! -).

Fig. 6 shows the antitumor activity of *trans*-[PtCl₂(NH₃)(piperidino-piperidine)]•HCl (-! -) as compared to *cis*-DDP (-! -) in female BALB/C mice inoculated with C-26 colon carcinoma and treated according to the schedule described herein below.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention is based on the surprising finding that inclusion of a non-planar heterocyclic aliphatic amine ligand into a Pt-complex, have therapeutic advantages, e.g. in the field of cancer treatment. The Pt-complex according to the invention includes at least one non-planar heterocyclic amine ligand, which is flexible and has a hydrogen bond donor that can interact with other substances, such as with DNA, to form lesions. The ligand is also bulky enough to affect the kinetics and the cytotoxicity of the resulting complex.

Thus, the present invention provides, according to one of its aspects, a platinum complex (Pt-complex) of the general formula (I):



wherein:

- X and Y, which may be the same or different, represent a halogen, carboxylate, phosphate or sulphate group;
 - Am₁ represents an amine selected from ammonia, a primary amine, a secondary amine, a non-planar heterocyclic aliphatic amine or a heterocyclic aromatic amine; and
 - Am₂ represents a non-planar heterocyclic aliphatic amine,
- with the proviso that when said complex is in a *cis* configuration, Am₁ and Am₂ cannot represent simultaneously piperidine.

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 7 -

The term "**Pt-complex**" as used herein refers in its broadest sense to any Pt-complex comprising two amine-containing ligands, wherein at least one ligand is a non-planar heterocyclic aliphatic amine. These complexes include both the *cis* and *trans* regioisomers (with the proviso that when the complex is in a *cis* configuration, the two amine ligands do not represent simultaneously piperidine). The Pt-complex may include Pt(II) coordinated or Pt(IV) coordinated as the metal center. In addition, the Pt-complex may be in the form of a dimer in which each monomeric unit is a Pt-complex as defined above, bound to the other Pt-complex, independently, through one of its amine ligands, directly, or via a linker connected to said Am₁ or Am₂, the two amine ligands may also form together a cyclic ring, such as a piperazine ring coordinated with each Pt metal through a nitrogen atom.

According to a preferred embodiment, X and Y are the same or different and represent chloride or iodide and more preferably, X and Y both represent a chloride.

According to the invention Am₁ may represent ammonia; a primary amine such as, without being limited thereto, methylamine, ethylamine, n-propylamine, isopropylamine, n-butylamine, n-hexylamine, n-heptylamine or n-nonylamine; a secondary amine such as, without being limited thereto, dimethylamine, diethylamine, dipropylamine, dibutylamine; a non-planar heterocyclic aliphatic amine, such as, without being limited thereto, piperazine, 2-methylpiperazine, piperidine, 2-, 3-, or 4-hydroxypiperidine, 4-piperidino-piperidine, pyrrolidine, 4-(2-hydroxyethyl)piperazine and 3-aminopyrrolidine; or a heterocyclic aromatic amine, such as, without being limited thereto, pyridine, 2-, 3-, or 4-aminopyridine, 2-, 3-, or 4-picoline, quinoline, 3-, or 4-aminoquinoline, thiazole, imidazole, 3-pyrroline, pyrazine, 2-methylpyrazine, 4-aminoquinaldine.

The Am₂ according to the invention is a non-planar heterocyclic amine such as, without being limited thereto, piperazine (referred to herein, at times, by the abbreviation "**pz**"), 2-methylpiperazine, piperidine (referred to herein, at times, by the abbreviation "**pip**"), 2-, 3-, or 4-hydroxypiperidine, 4-piperidino-piperidine (referred to herein, at times, by the abbreviation "**pip-pip**"), pyrrolidine, 4-(2-hydroxyethyl)piperazine and 3-aminopyrrolidine.

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 8 -

As indicated above, the Pt-complexes of the invention refer to all regioisomers of the complexes having the general formula (I) identified above. According to one aspect, the Pt-complexes are in the *trans* configuration. Specific examples include:

- *trans*-[PtCl₂(NH₃)(piperidine)];
- 5 - *trans*-[PtCl₂(NH₃)(4-hydroxypiperidine)];
- *trans*-[PtCl₂(NH₃)(4-piperidino-piperidine)];
- *trans*-[PtCl₂(NH₃)(4,4'-bipiperidine)];
- *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperidine)];
- *trans*-[PtCl₂(piperidine)₂];
- 10 - *trans*-[PtCl₂(NH₃)(piperazine)]•HCl;
- *trans*-[PtCl₂(isopropylamine)(piperazine)]•HCl;
- *trans*-[PtCl₂(n-butylamine)(piperazine)]•HCl;
- *trans*-[PtCl₂(n-nonylamine)(piperazine)]•HCl;
- *trans*-[PtCl₂(piperidine)(piperazine)]•HCl;
- 15 - *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperazine)]•HCl;
- *trans*-[PtCl₂(piperazine)(piperazine)]•HCl;
- *trans*-[PtCl₂(NH₃)[4-(2-hydroxyethyl)piperazine]]•HCl;

According to yet another aspect, the complexes are in a *cis* configuration. Specific *cis* isomers include, without being limited thereto,

20 *cis*-[PtCl₂(NH₃)(piperidine)] or *cis*-[PtCl₂(NH₃)(piperazine)]•HCl.

As indicated above, the non-planar heterocyclic amine ligand is flexible and has a hydrogen bond donor that can interact with the DNA to form lesions and is bulky enough to affect the kinetics and the cytotoxicity of the resulting complex. In addition, some of the amine ligands such as piperazine confer the complex with a

25 positive charge, thus ensuring adequate aqueous solubility and rapid interaction of the complex with polyanionic molecules, such as the DNA.

The complex may also be in the form of a dimer. Accordingly, two Pt-complexes are associated via a valance bond, a cyclic ring formed between the amine substituent of each Pt-complex (e.g. forming together a piperazine ring) or by a

30 linker connected to the Am₁ or the Am₂ ligands of each complex. Non-limiting

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 9 -

examples of linkers include short polyethyleneglycol chains (PEG), short diaminoalkanes (e.g. 1,6-diaminohexane, 1,8-diaminooctane). A specific example for a linker is 4,7,10-trioxa-1,13-tridecane chain and one specific dimer in which the two Pt-complexes are associated by this linker is Bis- $\{[trans, trans-(PtCl_2piperazine)_2]\{4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine\}} \cdot 2HCl$.

The invention also concerns pharmaceutical compositions comprising a pharmaceutically acceptable carrier and as an active ingredient a therapeutically *effective amount* of the Pt-complex of the invention as defined above.

The Pt-complex of the present invention is administered and dosed in accordance with good medical practice, taking into account the clinical condition of the individual patient, the site and method of administration, scheduling of administration, patient age, sex, body weight and other factors known to medical practitioners. The therapeutically "*effective amount*" for purposes herein is thus determined by such considerations as are known in the art. The amount must be effective to achieve improvement including, but not limited to, improved survival rate or more rapid recovery from a disease state treated with the active ingredient of the invention, or improvement or elimination of symptoms associated with the disease state and other indicators as are selected as appropriate measures by those skilled in the art.

The effective amount is typically determined in appropriately designed clinical trials (dose range studies) and the person versed in the art will know how to properly conduct such trials in order to determine the effective amount. As generally known, an effective amount depends on a variety of factors including the affinity of the Pt-complex to, for example, DNA, to form a Pt-DNA adduct, the Pt-complex's distribution profile within the body, a variety of pharmacological parameters such as half life in the body, on undesired side effects, if any, on factors such as age and gender, etc.

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 10 -

Many modes of administration may be employed for the delivery of Pt-complex, and these will necessitate the use of different carriers, adjuvants, elixirs, and the like, as known in the art.

Evidently, the pharmaceutically acceptable carriers employed according to the invention generally refer to inert, non-toxic solid or liquid fillers, diluents or encapsulating material to the extent that they do not hinder or interfere with the therapeutic effect desired of the Pt complex and do not react with the Pt-complex of the invention.

The Pt-complex can be administered orally, subcutaneously or parenterally including intravenous, intraarterial, intramuscular, intraperitoneally and intranasal administration as well as intrathecal and by infusion techniques. Further, the Pt-complex can be suspended in chlorofluorocarbon or hydrofluorocarbon propellants for delivery via inhaler to the lungs. Alternatively, the Pt-complex can be formulated in a matrix (lactose, etc.) or carrier (e.g., liposomes, etc.), which will allow delivery either orally, sublingually or by suppository.

The doses may be single doses or multiple doses over a period of several days. The treatment generally has a length proportional to the length of the disease process and active ingredient effectiveness and the patient species being treated. Further, the administration of Pt-complex of the present invention can be intermittent, or at a gradual, or continuous, constant or controlled rate to a patient. The host or patient for the therapeutic treatment using the platinum compounds described herein generally are mammalian, such as humans, dogs, and rodents, and so forth.

When administering the Pt-complex of the invention parenterally, it will generally be formulated in a unit dosage injectable form (solution, suspension, emulsion). The pharmaceutical formulation suitable for injection includes sterile aqueous solutions or dispersions and sterile powders for reconstitution into sterile injectable solutions or dispersions. The carrier can be a solvent or dispersing medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, lipid polyethylene glycol and the like), suitable mixtures thereof and vegetable

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 11 -

oils. Nonaqueous vehicles such as cottonseed oil, sesame oil, olive oil, soybean oil, corn oil, sunflower oil, or peanut oil and ester, such as isopropyl myristate, may also be used as solvent systems for the Pt-complex of the invention.

Additionally, various additives which enhance the stability, sterility and isotonicity of the Pt-complex containing compositions of the invention, including antimicrobial preservatives, antioxidants and buffers can be added. Prevention of the action of microorganisms can be ensured by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid and the like.

The pharmaceutical composition of the invention may also be administered orally to the subject in need. Conventional methods such as administering the active compound in tablets, suspensions, solutions, emulsions, capsules, powders, syrups and the like are usable. Known techniques which deliver it orally or intravenously and retain the biological activity thereof are preferred.

According to one preferred embodiment, the Pt-complex of the invention is entrapped by or loaded onto a liposome. The term "*liposome*" as used herein includes all spheres or vesicles of liposome-forming lipids that may spontaneously or non-spontaneously vesiculate, for example, phospholipids which are glycerides where at least one acyl group is replaced by a complex phosphoric acid ester.

The term "*loaded*" or "*entrapped*" means either entrapped within the interior of the liposome, exposed or present at the surface of the liposome, embedded in the liposome's membrane.

The liposomes according to the invention may be formed from any known liposome forming lipids. As used herein, the term "*liposome-forming lipid*" denotes any physiologically acceptable amphipathic substance that contains groups with characteristically different properties, e.g. both hydrophilic and hydrophobic properties or a mixture of such molecules, and which upon dispersion thereof in an aqueous medium form liposomal vesicles. The liposomes may be comprised of a single amphipathic substance or from a mixture of such substances.

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 12 -

The amphipathic substance includes, *inter alia*, phospholipids, sphingolipids, glycolipids, such as cerebrosides and gangliosides, PEGylated lipids, and sterols, such as cholesterol and others. Any commonly known liposome-forming lipids are suitable for use by the method of the present invention. The source of the lipid or its method of
5 synthesis is not critical: any naturally occurring lipid, with and without modification, or a synthetic phosphatide can be used.

Preferred liposome-forming amphipathic substances are natural, semi-synthetic or fully synthetic, molecules; negatively or positively charged lipids, phospholipids or sphingolipids, optionally combined with a sterol, such as cholesterol; and/or with
10 lipopolymers, such as PEGylated lipids.

The liposomes employed by the invention can be "tailored" to the requirements of any specific reservoir including various biological fluids, which maintain their stability without aggregation or chromatographic separation, and thereby remain well dispersed and suspended in the injected fluid. The fluidity *in situ* changes due to the
15 composition, temperature, salinity, bivalent ions and presence of proteins. The liposomes can be used with or without any other solvent or surfactant.

A preferred phospholipid combination according to the invention includes a mixture of (HSPC):cholesterol:PEG²⁰⁰⁰-DSPE (HSPC referring to hydrogenated soybean phosphatidylcholine while PEG²⁰⁰⁰-DSPE refers to
20 Di-stearoyl-phosphatidyl-ethanolamine to which PEG²⁰⁰⁰ is bound to the head group) or alternatively, diacylglycerol PEG (having two stearoyl acyl chains) or cholesterol-PEG.

The composition of the invention is intended for achieving a therapeutic effect, the therapeutic effect involving the formation of an adduct between the Pt complex of
25 the invention and a nucleic acid molecule such as a DNA. The therapeutic effect may comprise inhibition of undesired cell proliferation or for induction of apoptosis of undesired cells.

Thus, the composition of the present invention may be used for the treatment or prevention of a disease state, the disease state being associated with undesired cell

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 13 -

proliferation. The term "*treatment or prevention*" as used herein refers to the administering of a therapeutic amount of the composition of the invention which is effective to ameliorate undesired symptoms associated with the disease state, to prevent the manifestation of such symptoms before they occur, to slow down the progression of the disease (As may be evident from rate of proliferation of a diseased tissue), slow down the deterioration of symptoms, to enhance the onset of remission period, slow down the irreversible damage caused in the progressive chronic stage of the disease (for example, in autoimmune diseases), to delay the onset of said progressive stage, to lessen the severity or cure the disease, to improve survival rate or to achieve a more rapid recovery, or to prevent the disease from occurring or a combination of two or more of the above.

Thus, the instant invention also concerns a method for achieving a therapeutic effect, the method comprising administering to a subject in need an amount of a platinum complex according to the invention, the amount being sufficient for achieving said therapeutic effect. According to one embodiment, the Pt-complex of the invention is used as an anti-cancer agent.

The invention will now be further explained by the following non-limiting examples. While the foregoing description describes in detail only a few specific embodiments of the invention, it will be understood by those skilled in the art that the invention is not limited thereto and that other variations in form and details may be possible without departing from the scope and spirit of the invention as defined by the claims, which are to be read as included within the disclosure of the specification.

DETAILED DESCRIPTION OF SPECIFIC EMBODIMENTS

EXAMPLE 1-CHEMICAL SYNTHESIS

(1) Synthesis of Piperidine-containing Pt Complexes

General procedure for preparing *trans*-[PtCl₂(NH₃)(R)]

In the following description R refers to any one of the following piperidine derivatives: piperidine, 4-hydroxypiperidine, 4-piperidino-piperidine,

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 14 -

1,4'-bispiperidine. For further reference, the derivatives obtained will be identified by a reference number appearing in brackets.

Cis-diamminedichloroplatinum(II) (300 mg, 1 mmol) was suspended in 30 mL of double distilled water DDW. Two equivalents (eq.) of the piperidine derivative
 5 were added, and the suspension was heated to 85°C for 3h. During this time the yellow suspension turned to a colorless clear solution (in some cases a black precipitate was formed). The reaction mixture was cooled to r.t., filtered, and 1 mL of concentrated HCl was added dropwise. The temperature was elevated to 90°C for 6 h, during which the yellow product, *trans*-[PtCl₂(NH₃)(piperidine derivative)],
 10 precipitated. The reaction mixture was allowed to stand at r.t. for 4 h, after which the yellow product was collected by filtration and washed with 40 mL of DDW, 10 mL of EtOH, and 40 mL of diethyl ether.

Trans-[PtCl₂(NH₃)(piperidine)] (1): Yield 86.9%. Anal. (C₅H₁₄Cl₂N₂Pt) C, H, N. ¹⁹⁵Pt NMR(δ, DMF): -2167 ppm.

15 *Trans*-[PtCl₂(NH₃)(4-hydroxypiperidine)] (2): Yield 80.0%. Anal. (C₅H₁₄Cl₂N₂OPt) C, H, N. ¹⁹⁵Pt NMR(δ, DMF): -2172 ppm.

Trans-[PtCl₂(NH₃)(4-piperidino-piperidine)] (3): Yield 78.5%. Anal. (C₁₀H₂₄Cl₂N₃Pt) C, H, N. ¹⁹⁵Pt NMR(δ, H₂O): -2170 ppm.

Trans-[PtCl₂(NH₃)(4,4'-bipiperidine)] (4): Yield 85.9%. Anal. (C₁₀H₂₄Cl₂N₃Pt)
 20 C, H, N. ¹⁹⁵Pt NMR(δ, H₂O): -2175 ppm.

Procedure for preparing *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperidine)] (5)

K₂PtCl₄ (200 mg, 0.482 mmol) was dissolved in 30 mL of DDW. 4-Picoline (2.5 eq., 117.3 μL; 1.2 mmol) was added and the mixture stirred overnight at r.t. The yellow precipitate, *cis*-[PtCl₂(4-picoline)₂] [¹⁹⁵Pt NMR(DMF) = -1964 ppm], was
 25 collected by filtration and washed with 50 mL of DDW and 40 mL of diethyl ether. *Cis*-[PtCl₂(4-picoline)₂] (226 mg, 0.5 mmol) was suspended in 40 mL of DDW with 2 eq. of piperidine (99 μL, 1 mmol), and the suspension was heated to 80°C for 3 h. The solution turned clear and colorless with some formation of a black precipitate.

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 15 -

The reaction mixture was allowed to cool to r.t. and the precipitated material was filtered off. To the colorless filtrate, 1 mL of concentrated HCl was added and the mixture was heated to 90°C. The heating was maintained for 6 h during which a yellow precipitate was formed. The reaction mixture was allowed to cool to r.t., and the precipitate (180 mg) was collected and washed with 50 mL of DDW, 10 mL of EtOH, and 30 mL of diethylether.

Yield: 81%. Anal. (C₁₁H₁₈Cl₂N₂Pt): C, H, N. ¹⁹⁵Pt NMR(δ, DMF): -2087 ppm.

Procedure for preparing *Trans*-[PtCl₂(piperidine)₂] (6)

K₂PtCl₄ (415 mg, 1 mmol) was dissolved in 50 mL of DDW to which (1.330 gr, 8 mmol) KI were added and the red solution was stirred at r.t. for 20 minutes. To the stirred solution (202 μL, 2 mmol) of piperidine were added slowly. After 1 hr of stirring at r.t. the yellow precipitate was collected and washed with 50 mL of DDW and then with 50 mL of ether. *Cis*-[Pt₂(Pip)₂] (300 mgs, 0.484 mmol) was taken up in 20 mL DMF and, 164.5 mgs (0.97 mmol) of AgNO₃ and (98 μL, 1.94 mmol) were added and the mixture was stirred overnight at r.t. After filtering off the precipitate the solution was evaporated to dryness. To the gum 20 mL of DDW were added and stirred for 30 minutes. The non-soluble materials were filtered and 2 mL of concentrated HCl were added. The acidified solution was warmed to 90°C for 5 hrs. After cooling to r.t. the yellow precipitate was collected and washed with 50 mL DDW and 40 mL ether.

Trans-[PtCl₂(piperidine)₂] (6): Yield: 91%. Anal. (C₁₀H₂₂Cl₂N₂Pt): C, H, N. ¹⁹⁵Pt NMR(δ, DMF): -2080 ppm.

Procedure for preparing *cis*-[PtCl₂(NH₃)(piperidine)] (7)

K₂PtCl₄ (415 mg, 1 mmol) was dissolved in 50 mL of DDW, and 8 eq. KI (1.328 g, 8 mmol) were added. The mixture was stirred at r.t. for 15 min., and then 2 eq. of piperidine (198 μL, 2 mmol) were added slowly. The mixture was stirred for 1 h at r.t., during which a yellow precipitate was formed. The precipitate was collected and washed thoroughly with 50 mL of DDW, and with 20 mL of a (1:1) acetone: diethyl ether mixture. After drying, the yellow precipitate (500 mg, 0.8 mmol) was

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 16 -

suspended in a mixture of 20 mL of DDW and 40 mL of ethanol, to which 1 mL of perchloric acid (70%) was added. The suspension was stirred at r.t. for 8 days. During this period, the yellow precipitate turned to brown. The brown precipitate was collected by filtration and washed with 40 mL of DDW and 20 mL of acetone:diethylether (1:1). After drying, the precipitate was re-suspended in 20 mL of DDW, 0.5 mL of 25% NH_4OH was added dropwise, and the mixture was vigorously stirred for 24 h, during which the brown-colored precipitate turned to yellow. The yellow precipitate was collected and washed thoroughly with 50 mL of DDW, and 10 mL of acetone-diethyl ether and dried by continuous suction. The product was characterized as the mixed *cis*-amine-piperidine-diiodoplatinum(II) [^{195}Pt NMR(δ , DMF) = - 3260 ppm].

Cis-amine-piperidine-diiodoplatinum(II) (300 mg, 0.54 mmol) was suspended in 20 mL DDW, and 2 eq of AgNO_3 (184.9 mg, 1.08 mmol) were added. The suspension was vigorously stirred in the dark for 24 h. The AgI precipitate was filtered off, and the aqueous filtrate was transferred into a 50-mL vessel, to which 0.5 g of KCl were added. The colorless solution turned yellowish, and the dichloro-diamineplatinum(II) product started precipitating. After 4 h at r.t. the yellowish precipitate (260 mg) was collected and washed thoroughly with 50 mL of DDW and dried by washing with 100 mL of diethyl ether.

Overall yield of *cis*-[$\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(\text{piperidine})$] (7): 69%. Anal. ($\text{C}_5\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{Pt}$) $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{N}_2$. ^{195}Pt NMR (δ , DMF): -2159 ppm.

(2) Synthesis of Pt Piperazine Complexes

One aim of the research presented herein was to design and prepare platinum complexes that are water-soluble, react rapidly with DNA and are able to form adducts with DNA that are different from those formed by cisplatin and transplatin. This led to the design and synthesis of several additional *trans*-Pt derivatives with the piperazine as a ligand. This ligand was chosen since it would confer positive charge to the complex and thus would ensure adequate aqueous solubility and rapid interaction

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 17 -

with the polyanionic DNA; it is a non-planar heterocyclic amine ligand that is flexible and has a hydrogen bond donor that can interact with the DNA to form a lesion; and it is bulky enough to affect kinetics and cytotoxicity.

Trans-[PtCl₂(NH₃)(piperazine)]•HCl (8)

Cis-diammine-dichloroplatinum(II), (300 mg, 1 mmol) was dissolved in 30 mL of DMF and 2 eq. (372.52 mg, 2 mmol) of *tert*-butyl 1-piperazine carboxylate and 2 eq. (339.76 mg, 2 mmol) of AgNO₃ were added simultaneously with stirring. 5 Stirring continued in the dark for 24 h at room temperature. The precipitate was filtered off through a celite sinter glass and the filtrate was evaporated to dryness under reduced pressure. The resulting gum was dissolved in 30 mL of DDW and 2 mL of concentrated HCl were added and the reaction mixture was stirred at r.t. for 24 h. The colored precipitates were removed and the solution was heated to 85-90°C for 10 60 min. After cooling to room temperature the reaction mixture was filtered and the filtrate was chilled to 0°C for 72 h. The yellow precipitate was filtered and washed with 10 mL of ice-cold DDW and 30 mL of diethyl ether. After drying, the yellow product (300 mg) was characterized as the hydrochloride salt of the desired *trans*-ammine-piperazine-dichloroplatinum(II) (8)

15 **Trans-[PtCl₂(NH₃)(piperazine)]•HCl (8)** Yield: 74%. Anal. Calcd. for C₄H₁₄Cl₂N₃Pt•H₂O: C, 11.34%; H, 3.81%; N, 9.92%. Found: C, 11.27%; H, 3.56 %; N, 9.86 %. ¹⁹⁵Pt-NMR(δ, H₂O): -2177 ppm.

General procedure for preparing trans-[PtCl₂(Am1)(piperazine)]•HCl

In the following description Am1 refers to any one of the following amines: 20 n-butyl amine, isopropyl amine, 4-picoline, piperidine, piperazine.

Synthesis of the intermediate *cis*-[PtI₂(*tert*-butyl 1-piperazine carboxylate)₂]: Potassium tetrachloroplatinate (1 g, 2.4 mmol) was dissolved in 40 mL of DDW and 8 eq. (3.2 g, 19.27 mmol) of KI were added. The mixture was stirred at r.t. for 15 min. Two eq. (0.9 g, 4.8 mmol) *tert*-butyl 1-piperazine carboxylate were added and the 25 mixture was vigorously stirred for 1 h at r.t. Throughout this period of time the desired diiododiamineplatinum(II) precipitated. The yellow precipitate was collected by filtration, washed with 50 mL of DDW and dried by suction.

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 19 -

Cis-[PtI₂(*tert*-butyl 1-piperazine carboxylate)₂]: Yield: 89%, ¹⁹⁵Pt-NMR(δ, DMF): -3264 ppm.

Cis-[PtI₂(*tert*-butyl 1-piperazine carboxylate)₂] (411 mg, 0.5 mmol) was dissolved in the dark in 15 mL of DMF and 2 equiv (169.88 mg, 1 mmol) of AgNO₃ were added simultaneously with 2 eq. of the corresponding amine (98.83 μL of n-butylamine, 85.17 μL of isopropylamine, 97.4 μL of 4-picoline, 99 μL of piperidine, or 186 mg *tert*-butyl 1-piperazine carboxylate). Stirring continued in the dark for 24 h at r.t.. The precipitate was filtered off through a celite sinter glass. The filtrate was evaporated to dryness under reduced pressure. The resulting gum was dissolved in 30 mL of DDW and 2 mL of concentrated hydrochloric acid were added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. The colored precipitates were removed and the solution was heated to 85-90°C for 60 min. After cooling to room temperature the reaction mixture was filtered and the filtrate was chilled to 0 °C for 24 hours. The yellow precipitate was filtered and washed with 20 mL of ice cooled DDW and 30 mL of diethylether. After drying, the yellow products were characterized as the hydrochloride salts of the desired *trans*-diamine-dichloroplatinum(II) complex.

Trans-[PtCl₂(isopropylamine)(piperazine)]•HCl (9): Yield 71%, ¹⁹⁵Pt-NMR(δ, H₂O): -2226 ppm.

Trans-[PtCl₂(n-butylamine)(piperazine)]•HCl (10): Yield 67%, ¹⁹⁵Pt-NMR(δ, H₂O): -2221 ppm.

Trans-[PtCl₂(n-nonylamine)(piperazine)]•HCl (11): Yield 77%, ¹⁹⁵Pt-NMR(δ, H₂O): -2236 ppm.

25.06 %, H: 3.82 %, N: 8.55 %, ¹⁹⁵Pt-NMR(δ, H₂O): -2086 ppm.

Trans-[PtCl₂(piperidine)(piperazine)]•HCl (12): Yield 56%, ¹⁹⁵Pt-NMR(δ, H₂O): -2230 ppm.

Trans-[PtCl₂(4-picoline)(piperazine)]•HCl (13): Yield 61.2%, Anal. Calc. For C₁₀H₁₈Cl₃N₃Pt: C: 24.99 %, H: 3.56 %, N: 8.74 %, Found: C: 25.06%, H: 3.82%, N: 8.55%,

WO 03/017998

- 20 -

PCT/IL02/00687

Trans-[PtCl₂(piperazine)(piperazine)]•HCl (14): Yield 83%,
¹⁹⁵Pt-NMR(δ, H₂O): -2238 ppm.

Trans-[PtCl₂(NH₃)[4-(2-hydroxyethyl)piperazine]]•HCl (15): Yield 83%,
¹⁹⁵Pt-NMR(δ, H₂O): -2238 ppm.

5 **Procedure for the preparation of cis-[PtCl₂(NH₃)(piperazine)]•HCl (16)**

Tetraphenylphosphonium trichloro-monoamine-platinum(II) (300 mg, 0.45 mmol) were dissolved in 10 mL of 1:1 acetone/DDW mixture. To the orange-colored solution 1 equiv (77.53 mg, 0.45 mmol) *tert*-butyl 1-piperazine carboxylate was added. The mixture stirred in a closed vessel at r.t. for 7 days. After
 10 evaporating the solution to dryness under reduced pressure the yellow solid was taken in 10 mL of absolute ethanol and 0.5 mL of concentrated hydrochloric acid was added and the mixture was allowed to stand for overnight. The yellow precipitate was collected by filtration and washed with 10 mL of ethanol.

Cis-[PtCl₂(NH₃)(piperazine)]•HCl: Yield: 58%, ¹⁹⁵Pt-NMR(δ, H₂O):
 15 -2187 ppm.

EXAMPLE 2- BIOLOGICAL ASSAYS

Cell cultures

A human ovarian carcinoma cell line (OV-1063), established at the Hadassah University hospital and human colon carcinoma cell line (C-26) were maintained in
 20 RPMI-1640 medium supplemented with 10% FCS, antibiotics and glutamine. All culture medium components were purchased from Biological Industries (Beit-HaEmek, Israel). Both cell lines were maintained at 37°C in a water-jacketed CO₂ incubator.

Further, three pairs of cisplatin sensitive and resistant cancer cell lines
 25 (A2780/A2780cisR, 41M/41McisR and CH1/CH1cisR) were employed ⁽¹⁵⁾. These pairs of cell lines were selected on the basis of encompassing all of the known major mechanisms of resistance to cisplatin: 41McisR being resistant primarily through reduced drug transport ⁽¹⁶⁾, CH1cisR through enhanced DNA repair/tolerance ⁽¹⁷⁾ and

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 21 -

A27780cisR through a combination of decreased uptake, enhanced DNA repair/tolerance and elevated GSH levels ⁽¹⁸⁾.

Drugs

Cisplatin and transplatin were supplied by (Sigma, St Louis, MO, USA). All
5 drugs were dissolved in normal saline immediately before the experiments.

Methylene blue assay of cell survival

Cytotoxicity of the synthesized complexes was tested by the methylene blue
(MB) staining assay ⁽¹⁹⁾. A fixed number of exponentially growing cells in 200µl
medium were plated in 96-microwell, flat-bottomed plates. For each of the complexes
10 tested, 4 well were used. Following 24 hr in culture, 20 µl of different concentration
of the complexes were added to each well containing untreated cells. Normal saline
was added to the controls. Cells were exposed to complexes for 4, 24, or 72 hr. At the
end of exposure for a fixed time interval, the treated cells as well as parallel control
cells were washed and incubation was continued in fresh medium until termination of
15 the experiment. Following 72 hr of growth, cells were fixed by adding 50µl of 2.5%
of glutaraldehyde to each well for 15 min. Fixed cells were rinsed 10 times with fresh
de-ionized water and once with borate buffer (0.1 M, pH=8.5), dried and stained with
MB (100µl of 1% solution in 0.1 M borate buffer, pH=8.5) for 1 hr at room
temperature. Stained cells were rinsed thoroughly with de-ionized water to remove
20 any non-cell-bound die and then dried. The MB bound to the fixed cells was extracted
by incubation at 37°C with 200 µl of 0.1N HCl for 1 hr, and the net optical density
(OD) of the die in each well was determined by a plate spectrophotometer
(Labsystems Multiskan BICHROMATIC, Finland) at 620 nm.

The advantage of the MB method with 96-microwell plates is the possibility of
25 running a wide range of experiments on the rate of cell proliferation and survival
with a large number of data points, where cells are grown in the same plate and
assayed exactly in the same conditions for different experimental complexes. The
validity of the MB assay for evaluating cell survival is supported by the high
correlation between the MB colorimetric assay and colony-forming units assay

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 22 -

results⁽²⁰⁾.Microculture tetrazolium (MTS) assay and cell survival

Cytotoxicity of the synthesized complexes was also tested by the MTS method⁽²¹⁾. Accordingly, the compounds were incubated for 24 hours with the
5 corresponding cell lines and the cell survival in compound-treated cultures was evaluated.

Platinum complex intracellular accumulation measurement

Cells were seeded for 48 hr before one of the complexes was added to the culture medium. After 24 hr of exposure, the complexes were removed and the cells
10 washed twice with ice-cold PBS and pelleted. The cells (1×10^6) were dried and mineralized by heating for 10 min in 65% HNO₃ (BDH, England)⁽²²⁾. Samples were dissolved in de-ionized water and each sample was measured at two different dilutions by flameless Zeeman atomic absorption spectrometer (FAAS). The calibration curves included 5 standards of K₂PtCl₄ stock solution with concentrations ranging from 50 to
15 250 ng platinum per ml. Platinum content was expressed as picomoles platinum per 1×10^6 cells.

Determination of Pt-DNA adducts by FAAS

Cells were seeded for 48 hr before one of the drugs was added to the culture medium. After 24 hr of exposure, the complexes were removed and the cells washed
20 twice with ice-cold PBS and pelleted. DNA from platinum-containing material (2×10^6 cells) was extracted from the cell pellet by QIAamp DNA Blood Kit (QIAGEN, Germany) according to the manufacture instructions. DNA yield was determined by measuring the concentration of DNA in the eluate by absorbance at 260 nm. The DNA isolated from each sample averaged 50 ± 10 µg/ml. Purity is
25 determined by calculating the ratio of absorbance at 260 nm to 280 nm; the grade of purification of DNA was on average 95%.

Determination of Pt-DNA adducts by EtBr fluorescence

A plasmid (4.8 kbp) containing a gene coding for human growth hormone, plasmid pS16-hGH, was prepared as previously described⁽²³⁾. The freshly prepared DNA was analyzed by agarose gel (1%) electrophoresis using post-staining with SYBR Green I fluorescent dye (Molecular Probes, Eugene, OR). Quantitative analysis of supercoiled plasmid⁽²⁴⁾ was performed and showed that the plasmid DNA was 85–90% in a supercoiled form. UV-spectroscopy showed no presence of protein or RNA contamination in any of the DNA batches. The ratio of absorbance at 260 nm to that at 280 nm was always between 1.8 and 1.9.

DNA were modified by the platinum complexes in 10mM NaClO₄ (pH 7.0) at 37°C in the dark for 24 hr. Measurements of EtBr fluorescence were performed on an LS50B luminescence spectrometer (Perkin Elmer, Norwalk, CT). Fluorescence measurements of DNA modified by platinum in the presence of EtBr were performed using the excitation wavelength of 546 nm (slit 10 nm) and emission wavelength of 590nm (slit 10 nm) at 25°C. The concentrations were 0.01 mg/ml for DNA and 0.04 mg/ml for EtBr, which corresponded to the saturation of all intercalation sites of EtBr in DNA.

Assessment of apoptosis

Apoptosis was assessed by two approaches:

- (1) By staining of the C-26 and OV-1063 cells with Merocyanine 540 (MC 540) (Molecular probes, Oregon, USA) and 4', 6-diamidino-2-phenylindone dihydrochloride (DAPI) (Molecular probes, Oregon, USA). This assay is based on the observation that soon after the initiation of apoptosis, phosphatidylserine (PS) translocates from the inner face of the plasma membrane to the cell surface. At this point, PS can be easily detected by staining with MC 540, which has a strong affinity to PS⁽²⁵⁾. Chromatin condensation was assessed by staining with DAPI, which preferentially stains double stranded DNA. In the following experiments samples containing 5*10⁵ cells were cultured on 6-well plates covered with a glass coverslip. After treatment of cells with IC₅₀ of the complexes, cells were washed with PBS and

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 24 -

incubated for 2 min in the dark in 500 μ l of PBS containing 2.5 μ l of MC 540 (1 mg/ml). After that cells were washed with PBS, fixated with 4% formaldehyde and stained with 300 μ l DAPI (3 μ M). Thereafter, glass coverslip was placed on a glass slide and photographed using a fluorescence confocal microscope.

5 (2) By the EnzChekm Caspase-3 Assay Kit (Molecular probes, Eugene, OR). This Kit allows the detection of apoptosis by assaying for increases in caspase-3 and other DEVD-specific protease activities (e.g., caspase-7). The basis for the assay is rhodamine 110 bis-(N-CBZ-aspartil-L-glutamyl-L-valyl-aspartic acid amide) (Z-DEVD-R110). This substrate is a bisamide derivative of rhodamine 110(R110)
10 containing DEVD peptides covalently linked to each of R110's amino groups. Upon enzymatic cleavage, the non-fluorescent bisamide substrate converted to the fluorescent R110, which can be quantified by fluorescence microplate reader using excitation at 485 $\pm$ 10 nm and emission detection at 535 $\pm$ 10 nm.

Briefly, C-26 and OV-1063 cells were treated with IC50 of
15 *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperidine)] (5) (4.5 μ M and 6.5 μ M, respectively) and of *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperazine)•HCl] (12) (5 μ M and 7.5 μ M, respectively) for 5 or 16 hr. Both "induced" and "control" cells were then harvested and lysed. Enzyme reactions were performed in 96-well plates with 50 μ g of cytosolic proteins (55 minutes of incubation) and with a final concentration of 25 μ M Z-DEVD-R110
20 substrate as described in the kit protocol.

In vivo toxicity and anti-tumor effect

The *trans*-platinum(II) derivatives, *trans*-[PtCl₂(NH₃)(4-piperidino-piperidine)] (3) was evaluated for its toxicity and antitumor efficacy as compared to *cis*-DDP.

Toxicity

25 Toxicity of the *trans*-[PtCl₂(NH₃)(4-piperidino-piperidine)] was evaluated on 8 week-old female BALB/C mice and compared to *cis*-DDP. This novel complex and *cis*-DDP at different concentrations were injected i.v., three times at weekly intervals, and animal weight and survival were evaluated.

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 25 -

Antitumor efficacy

Female BALB/C mice (in the weight range of 17-20g) were injected i.p. with 1×10^6 C-26 colon carcinomas. The viability of these cells was >90% by trypan blue exclusion.

- 5 The therapeutic efficacy of *trans*-[PtCl₂(NH₃)(piperidino-piperidine)]•HCl (3) was studied and compared to cis-DDP. Treatment began at day 3 after tumor inoculation and was repeated twice for a total of three injections at weekly intervals.

RESULTS**Solubility of the Pt complexes**

- 10 The low solubility of the neutral diaminedichloro platinum(II) compounds, that results in poor bioavailability, was one of the reasons for the design and synthesis of the positively charged complexes of the general formula [PtCl₂(Am)(pz)]•HCl. The Compounds presented herein were shown to be more soluble than their neutral counterparts having solubilities in the range of 20 mM compared with 6.3 mM for cisplatin and 0.8 mM for transplatin. For example,
15 *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperazine)]•HCl (13) exhibited solubility in DDW (at 37°C) 7.5 mg/ml (18.0 mM).

Biological activity*In vitro growth inhibition*

- 20 In order to assess the anti-tumor activity of the synthesized *trans* and *cis* complexes C-26 and OV-1063 cells were incubated for 4, 24, or 72 hrs with these complexes. MB cytotoxicity assay revealed that replacing one (NH₃) or both of the transplatin enhances significantly (by more than fourfold) the cytotoxicity of the new *trans*-PtCl₂ compounds in both C-26 and OV-1063 cancer cell lines (Table 1).

Table 1: IC₅₀ of complexes against C-26 cells and OV-1063 cells as compared to cisplatin and transplatin

	C-26 cells				OV-1063 cells			
	Complex No.	IC ₅₀ , μM 4 h	IC ₅₀ , μM 24 h	IC ₅₀ , μM 72 h	IC ₅₀ , μM 4 h	IC ₅₀ , μM 24 h	IC ₅₀ , μM 72 h	
Cisplatin		1.5±1.3	0.6±0.1	0.2±0.2	2.0±0.5	0.7±0.2	0.5±0.2	
Transplatin		64.0±2.0	46.0±3.1	41.0±1.7	81.0±4.3	73.0±5.1	52.0±3.2	
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (4-picoline)(piperidine)]	5	4.5±0.7	2.5±0.7	1.75±1.0	6.5±0.7	6.0±1.4	4.5±2.1	
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (NH ₃)(4-picoline)]		12.0±1.2	11.0±2.0	11.0±1.1	18.0±3.7	16.0±3.5	14.0±2.3	
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (NH ₃)(piperidine)]	1	8.5±2.0	7.7±2.0	7.0±2.5	11.0±2.0	9.5±1.7	8.7±1.4	
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (4-picoline)(piperazine)]•HCl	13	5.5±1.0	4.5±0.75	3.5±0.8	7.4±1.5	6.0±1.0	5.1±0.9	
<i>cis</i> -[PtCl ₂ (NH ₃)(4-picoline)]		5.1±1.2	4.7±2.4	3.7±1.6	6.0±2.2	5.1±1.9	4.0±1.7	
<i>cis</i> -[PtCl ₂ (NH ₃)(piperidine)]	7	2.6±1.7	2.1±1.2	1.3±0.7	4.2±1.7	3.1±1.2	2.6±0.7	
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (NH ₃)(4-piperidino-piperidine)]•HCl	3	2	0.7	0.4	4.5	1.7	0.9	
<i>cis</i> -[PtCl ₂ (NH ₃)(piperazine)]•HCl	15	>10	>10	5	NA	NA	NA	

^a IC₅₀ in μM, mean ± SD from at least 2 experiments.

Replacement of one NH_3 group by either an aromatic-planar amine (4-picoline) to give *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(4\text{-picoline})]$ or by an aliphatic non-planar amine (piperidine) to give *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(\text{piperidine})]$ (**1**) enhanced the cytotoxic activity relative to transplatin (Table 1). It should be noted that complex (**1**) was more cytotoxic than the
5 *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(4\text{-picoline})]$ derivate which suggests that activation of the *trans* position can be achieved by sterically hindered amine ligands. Piperidine is more sterically hindered than the 4-picoline because of the hydrogen atoms pointing out in opposite directions in contrast to the planar hydrogens of the aromatic ring of 4-picoline which may correlate with cytotoxic activity.

10 In addition, replacing the second NH_3 in *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(4\text{-picoline})]$ with piperidine to give the mixed *trans*- $[\text{PtCl}_2(4\text{-picoline})(\text{piperidine})]$ (**5**) enhanced the compound's cytotoxicity by a factor of 2-3 (Table 1). This observation may be explained by a higher sterically hindered structure of complex (**5**). The *trans*- $[\text{PtCl}_2(4\text{-picoline})(\text{piperidine})]$ was 3 folds less active than cisplatin and the
15 higher IC_{50} values of *trans*- $[\text{PtCl}_2(4\text{-picoline})(\text{piperidine})]$ were consistent with the lower level of Pt-DNA adducts as shown in Figs. 1A and 1B.

The cytotoxicity of the sterically hindered compounds of the *trans* geometry was compared with that of their *cis* counterparts *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(4\text{-picoline})]$ and *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(\text{piperidine})]$ (**7**). In contrast with the effect of replacing one NH_3 in
20 the new *trans*-Pt complexes, a similar replacement of one NH_3 of cisplatin by an aromatic-planar amine ligand (4-picoline) or by an aliphatic non-planar amine (piperidine) resulted in lower cytotoxic activity as compared to cisplatin itself. The complex *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(\text{piperidine})]$ is an analogue to the new active *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(2\text{-picoline})]$ (AMD473) a novel sterically hindered anti-tumor compound
25 designed to circumvent platinum drug resistance and is currently under clinical trials⁽²⁶⁾.

The cytotoxicity of several of the piperazine-containing Pt complexes on cisplatin sensitive and resistance cancer cell lines was also determined. In particular, three pairs of cisplatin sensitive and resistant cancer cell lines (A2780/A2780cisR,
30 41M/41McisR and CH1/CH1cisR) were employed.

WO 03/017998

- 28 -

PCT/IL02/00687

The complexes were incubated for 24 hours with the above mentioned cell lines and the cell survival in compound-treated cultures was evaluated by the (microculture tetrazolium) MTS method as previously reported. The results of the IC₅₀ studies are shown in Table 2A-2B.

- 5 **Table 2A** IC₅₀ mean values (μM) obtained for several piperidine (pip) containing complexes (the number in brackets represents resistance factor)

	A2780	A2780cisR	CH1	CH1cisR	41M	41McisR
<i>trans</i> -PtCl ₂ (4-pic)(pip)	9±1	135±7 (15)	26±3	169±9 (6.5)	35±4	210± (6.0)
<i>trans</i> -PtCl ₂ (NH ₃)(4-pip) Cl ₂	5±0.7	20±2 (4.0)	15±2	94±6 (6.3)	27±2	150±8 (5.5)
<i>trans</i> -PtCl ₂ (pip) ₂	15±2	250±12 (16.7)	35±2	280±12 (8)	50±3	300±25 (6)
<i>cis</i> -PtCl ₂ (pip) ₂	15±2	250±12 (16.7)	32±2	280±12 (8)	50±3	300±25 (6)
<i>cis</i> -PtCl ₂ (NH ₃)(pip)	26±3	234±17 (9)	36±4	263±17 (7.3)	64±5	315±24 (4.9)
Transplatin	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Cisplatin	2.2	38	6	23	26	107

Table 2B IC₅₀ mean values (μM) obtained for several piperazine-(pz) containing complexes

	A2780	A2780cisR	CHI	CH1cisR	41M	41McisR
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (NH ₃)(pz)]•HCl	5±1	44±4 (8.8)	12±3	34±4 (2.8)	52±5	155±12 (3.0)
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (NBA)(pz)]•HCl	16±2	28±2 (1.8)	17±2	19±3 (1.1)	32±5	48±3 (1.5)
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (IPA)(pz)]•HCl	14±1	30±2 (2.1)	10±1	50±3 (5.0)	38±3	122±8 (3.2)
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (4-pic)(pz)]•HCl	10±3	24±3 (2.4)	16±2	42±3 (2.6)	45±3	147±10 (3.3)
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (pip)(pz)]•HCl	18±2	64±5 (3.6)	22±3	85±7 (3.9)	37±4	118±9 (3.2)
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (pz)(pz)]•HCl	17±3	43±3 (2.5)	26±2	53±3 (2.0)	43±3	153±10 (3.6)
<i>cis</i> -[PtCl ₂ (NH ₃)(pz)]•HCl	10±1	25±2 (2.5)	28±2	56±3 (2.0)	46±3	112±12 (2.4)
<i>trans</i> -PtCl ₂ (NH ₃) ₂	>200	>200	>200	>200	>200	>200
<i>cis</i> -PtCl ₂ (NH ₃) ₂	2.2±0.6	38±3 (17.3)	6±1	23±3 (3.8)	26±2	107±8 (4.1)

NBA=n-butylamine, IPA=isopropylamine, 4-pic=4-methylpyridine, pip=piperidine, pip-piperazine. The numbers in parentheses are the resistance factors (IC₅₀ resistant/IC₅₀ sensitive)

In terms of the SAR, replacing one or both amine ligands of transplatin with piperazine markedly increases the antitumor activity relative to transplatin indicating the positively charged non-planar amine ligand (piperazine) can activate the *trans* geometry. The most striking feature of these cytotoxicity studies is that the complexes are at least as active as cisplatin against the A2780cisR cell line that is resistant through enhanced DNA repair/tolerance and elevated GSH levels. Especially noticeable are the very low resistance factors (RF) of *trans*-[PtCl₂(NBA)(pz)]•HCl

(10) against all three cell lines (RF < 2) indicating efficient circumvention of cisplatin resistance.

A possible explanation for the enhancement of anti-tumor activity of these transplatin complexes is that the sterically hindered ligands may decrease detoxification by thiols. The reduced reactivity towards biological thiols and thioethers (proteins and peptides) is considered beneficial since reaction of cisplatin with biological sulfur containing ligands is believed to be in the source of acquired resistance and the toxic side effects of the drug.

Cellular drug uptake and DNA platination

In order to determine drug accumulation in tumor cells, C-26 and OV-1063 cells were exposed to the cytotoxic compounds *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperidine)] (5) and *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperazine)•HCl] (13) for 24 hr and compared with the drug uptake of cisplatin and transplatin under the identical conditions. The Pt content associated with the cells was measured by Atomic Absorption Spectroscopy (AAS). It was found that *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperidine)] (5) penetrates the cells very efficiently in both cell lines (6-fold higher than cisplatin), as shown in Fig. 1A.

Also, compared to transplatin the penetration of *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperidine)] (5) was 7-fold higher in OV-1063 cells and 30-fold higher in C-26 cells, as shown in Fig. 1B). A time-dependent increase of *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperidine)] (5) accumulation was observed during the 4 (data not shown) to 24 hr of drug exposure. The time-dependent accumulation of Pt in the cells was consistent with the decrease in the IC₅₀ values (Table 1). The *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperazine)•HCl] (13) showed the highest penetration values in both cell lines (22-fold higher in comparison to cisplatin) (Figs. 1A and 1B).

To determine the cellular DNA platination, C-26 cells and OV-1063 cells were exposed to these transplatin complexes for 4 hr or 24 hr and compared with cisplatin and the platinum DNA content was measured by AA spectrometer. The *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperidine)] DNA platination was the same as that of Cis-Pt in C-26 and OV-1063 cells and the values of Pt molecules intercalated with DNA

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 31 -

from $\text{trans-[PtCl}_2(4\text{-picoline})(\text{piperazine})]\cdot\text{HCl}$ complex were 7-fold higher than of Cis-Pt in both cell lines (Figs. 2A and 2B).

The formation of calf thymus DNA platination was also examined. To this end, calf thymus DNA was incubated with different compounds (Table 3) in which the following parameters were determined:

$t_{1/2}$ – half time (in minutes) of the binding of the compounds to calf thymus DNA in 10 mM NaClO_4 , at 37°C , $r_t = 0.08$ determined by differential pulse polarography;

$\Delta\epsilon_{\text{max}}$ – the maximum of the positive CD band at around 275 nm, the difference between the control and platinated calf thymus DNA;

ΔT_m – the difference in the melting temperature of unplatinated and platinated calf thymus DNA;

unwinding – the unwinding angle per adduct;

%IEC/adduct – frequency of interstrand crosslinks.

15

Table 3: DNA binding

	$t_{1/2}$ (min)	$\Delta\epsilon_{\text{max}}$ $r_t=0.05$	$\Delta T_m(0.01\text{M Na}_4\text{EDTA}, r_t=0.05)$		unwinding	%IEC/ adduct
			0.01M Na_4EDTA	0.2 M		
<i>cis</i> -[PtCl ₂ (NH ₃)(pip)]	113	0.93	-2.5	-6.0	13.2°	5
<i>Cis</i> -[PtCl ₂ (NH ₃)(pz)]	35		3.5	-4.5	13°	6
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (NH ₃)(pip)]	113	0.15	+7.6	-1.9	52.8°	26
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (NH ₃)(pz)]	20	0.01	6.3	-1.9	26.4°	13
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (4-pic)(pip)]	260	0.04	+ 5.5	+0.5	11°	2
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (4-pic)(pz)]	12	-0.30	+ 4.7	-3.5	17°	6
<i>cis</i> -[PtCl ₂ (NH ₃)(pic)]	21	0.92	+1.6	-4.8	12°	4
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (NH ₃)(4-pic)]	50	-0.29	+7.2	+0.6	39.6°	40
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (NH ₃) ₂]	100	-0.34	+8.7	+0.6	9.4°	12
<i>cis</i> -[PtCl ₂ (NH ₃) ₂]	100	1.27	-2.6	-4.0	13°	6

As can be seen, both piperazine- and piperidine containing complexes bind to DNA at a significantly higher rate than cisplatin.

Characterization of DNA adducts by EtBr fluorescence

EtBr, as the fluorescent probe, was used to distinguish between perturbations induced in DNA by adducts of platinum (II) compounds ⁽¹⁴⁾. Binding of EtBr by intercalation is blocked in a stoichiometric manner by formation of the bifunctional adducts, as of Cis-Pt, which results in a loss of fluorescence intensity. On the other hand, formation of monofunctional adducts results only in a slight decrease of EtBr fluorescence.

DNA platination measurements of DNA modified by *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperazine)]•HCl showed considerable decrease in fluorescence which is in agreement with the formation of bifunctional adducts. On the other hand, the decrease of fluorescence intensity by adducts of *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperidine)] was lower than that of cisplatin, however, greater than that of transplatin. The best adduct was formed with *trans*-[PtCl₂(NH₃)(piperidino-piperidine)]•HCl (Table 4 and also in Fig.3).

Table 4: Penetration and formation of Pt-DNA adducts of various platinum complexes

Name	Penetration to cells (pmol Pt/1*10 ⁶ cells) 24 hr		Pt-DNA adducts (pmol Pt/50µg DNA) 24 hr	
	C-26	OV-1063	C-26	OV-1063
<i>cis</i> -DDP	2244	194	149	107
<i>trans</i> -DDP	384	474	0	0
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (4-pic)(pip)]	14974	2092	51	41
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (4-pic)(pz)]•HCl	54461	12307	297	205

The conclusion thus drawn was that *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperidine)] forms monofunctional and also bifunctional adducts that are capable of inhibiting the intercalation of EtBr into the DNA and, therefore, decreasing of EtBr fluorescence intensity.

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 33 -

In addition, DNA incubated with *trans*-[PtCl₂(NH₃)(piperidino-piperidine)]•HCl (**3**) for 24 hr showed considerable decrease in EtBr fluorescence (slightly higher than that of cisplatin) (Fig. 4). The difference between complex (**3**) and cis-DDP was higher at low concentration, which suggest that complex (**3**) posses higher affinity to DNA. The decrease of fluorescence intensity by the adducts of *cis*-[PtCl₂(NH₃)(piperazine)]•HCl (**8**) was similar to that of cisplatin (Fig. 4).

Assessment of apoptosis

Apoptosis, also known as programmed cell death, is involved in the regulation of cell number in multicellular organism, and the pathogenesis of various diseases, including tumor progression, neurodegenerative disorders and viral infections. It has been demonstrated in most cell types that phosphatidylserine (PS), a lipid normally confined to the inner leaflet of the plasma membrane of the normal cell. In the cell that undergoes apoptosis the PS is exported to the outer plasma membrane leaflet in the early stage of apoptosis. PS exposure in treated C-26 and OV-1063 cells was detected by staining with MC 540, which has a strong affinity to PS and chromatin condensation was assessed by staining with DAPI, that preferentially stains double stranded DNA.

Distinguishing features of apoptosis in *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperidine)] treated OV 1063 cells were observed as evidenced by appearance of red fluorescence in the cell membrane and increasing green fluorescence of nucleus in contrast to red-uncolored untreated cells (results not shown). The results of this staining showed that large proportion of the OV-1063 cells appeared to be apoptotic after 5 hr of treatment with 6.5 μM of *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperidine)]. The cell surface of C-26 cells became slightly red-fluorescent after 5 hr of treatment with 4.5 μM of *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperidine)] (results not shown) in contrast to none of the red fluorescence in untreated cells (results not shown).

Recently, members of the caspase (CED-3/ICE) family of proteases have been found to be crucial mediators of the complex biochemical events associated with

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 34 -

apoptosis⁽²⁷⁾. In particular, the activation of caspase-3, which cleaves a number of different proteins, including poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), protein kinase C δ and actin, has been shown to be important for the initiation of apoptosis⁽²⁸⁾. Thus, activation of caspase-3 was measured in *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperidine)] treated C-26 and OV-1063 cells. It was found that OV-1063 cells treated for 5 hr with 6.5 μ M *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperidine)] or with 7.5 μ M *trans*-[PtCl₂[(4-picoline)(piperazine)]•HCl activated caspase-3 (~2-fold increase in fluorescence in treated cells in comparison to untreated cells). Moreover, after 16 hr of treatment of OV-1063 cells with *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperidine)] or with *trans*-[PtCl₂[(4-picoline)(piperazine)]•HCl there was a 3-fold increase in fluorescence in the treated cells in comparison to untreated cells (not shown).

To confirm that the observed fluorescent signal was due to activation of caspase-3, the reversible Ac-DEVD-CHO inhibitor of caspase-3-like proteases was added to the control and treated samples. A drastic decrease in fluorescent signal was found in samples treated with Ac-DEVD-CHO inhibitor (not shown), which argues for specific activation of caspase-3. There was no fluorescent signal found in C-26 cells treated with 4.5 μ M *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperidine)].

To determine whether OV-1063 or C-26 cells treated with cisplatin undergo apoptosis these cell lines were treated for 5 or 16 hrs with 2 μ M or 1.5 μ M, respectively. No fluorescent signal was found in cisplatin treated OV-1063 cells or C-26 cells. These findings are in agreement with data of L. Szmigiero *et al.* which demonstrated that there is no degraded DNA detected by agarose gel electrophoresis in L1210 cells treated with cisplatin⁽²⁹⁾. It was also in agreement with several findings which have shown that colon cancer cells protect themselves by secreting a soluble factor(s) that inhibit apoptosis⁽³⁰⁾ and by aberrant activation of c-kit which protects colon carcinoma cells from apoptosis.

Protein binding

Since most platinum(II) derivatives which are administered intravenously become protein bound within 24 hr, the binding kinetics of two model proteins,

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 35 -

Ubiquitin (MW 8565) and Heart Myoglobin (MW 16951), to Pt complexes was determined. To this end, a 1:1 reaction between the platinum complexes and the proteins were carried out at 1-2 mM concentrations, in 10mM phosphate buffer, pH 6.4 at 37 °C. Protein binding kinetics were measured directly on the reaction mixtures, by Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS). Figure 5 shows that while the neutral *trans*-PtCl₂(NH₃)(piperidine) binds rapidly to the proteins, followed, with respect to binding rate, by cisplatin and transplatin, the charged piperazine complexes had no significant binding to the proteins. The combination of very rapid binding to DNA with slow and inefficient binding to proteins is a very desirable property of a platinum based anti-tumor drug.

Toxicity

It was found that *trans*-[PtCl₂(NH₃)(piperidino-piperidine)]•HCl and *cis*-DDP were non-toxic at concentration of 5mg/kg, and *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperazine)]•HCl was non-toxic at concentration of 20 mg/kg.

In vivo Antitumor effect

Female BALB/C mice (in the weight range of 17-20gr) were injected i.p. with 1*10⁶ C-26 colon carcinomas. The viability of these cells was >90% by trypan blue exclusion.

The therapeutic efficacy of *trans*-[PtCl₂(NH₃)(piperidino-piperidine)]•HCl was studied and compared to cisplatin. Treatment was as performed according to the schedule described above. The results are presented in Table 5 and in Fig. 6.

Table 5: Antitumor effect in first schedule of treatment

Treatment	Dose (mg/kg)	Dose (mmole/kg)	No. of mice	Survival (days)	Increase in life span (%)
control			7	11,5±0,5	
cisplatin	5	16,6	8	24±5	108
<i>trans</i> -[PtCl ₂ NH ₃ (pip-ip)]•HCl	5	10,3	8	24±3	108

EXAMPLE 3-LIPOSOMAL FORMULATION**Preparation and characterization of sterically stabilized liposomes (SSL) containing *trans*-[PtCl₂(NH₃)(piperidino-piperidine)]•HCl***Preparation of SSL containing trans-[PtCl₂(NH₃)(piperidino-piperidine)]•HCl*

5 *Trans*-[PtCl₂(NH₃)(piperidino-piperidine)]•HCl (10mg/ml) was dissolved in 0.9% NaCl at 65°C and left at this temperature for 1 hr. Lipids (HSPC:cholesterol:PEG²⁰⁰⁰-DSPE 51:44:5) were dissolved in ethanol. The lipids were hydrated by adding this ethanolic solution to the drug mixture. Final lipid concentration was 150 mg/ml (15%) in 25% ethanol, at 65°C. The mixture was kept stirring for 1 hr at 65°C, then extruded at 65°C, 5 times through 25mm polycarbonate filters with 200nm pore size using Lipex extruder (Nothern Lipids Inc, Vancouver, Canada), followed by extrusion 11 times through a 100 nm pore size polycarbonate filter. Sized liposomes (~100nm) were allowed to cool to room temperature. During the cooling, a heavy precipitate formed the supernatant was collected. Then supernatant was cooled to 4°C overnight and the supernatant was collected again. The supernatant was collected and dialyzed against 10mM histidine buffer (pH=6.5) containing 10% sucrose and 1mM NaCl for overall of 5 times against 100 vols. of buffer and 1 time against 200vols at 4°C Under these conditions, a complete equilibration with buffer should occur. The final liposome dispersion was a translucent white.

Characterization of SSL containing trans-[PtCl₂(NH₃)(piperidino-piperidine)]•HCl

Liposomes were characterized for their size distribution at 25°C by dynamic light-scattering (DLS) with a Coulter model N4 SD (Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA).

25 The concentration of the phospholipids (PLs) was checked by lipid phosphorus content (modified Bartlett method)⁽³¹⁾.

The platinum concentration in the liposomes was measured by flameless Zeeman atomic absorption spectrometer (FAAS). The platinum concentration was

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 37 -

calculated according to a calibration curve included 5 standards of K_2PtCl_4 stock solution with concentrations ranging from 50 to 250ng platinum per mL.

The SSL containing *trans*- $[PtCl_2(NH_3)(piperidino-piperidine)] \cdot HCl$ is characterized by the following parameters: Size – 102 nm; Concentration of *trans*- $[PtCl_2(NH_3)(piperidino-piperidine)] \cdot HCl$ in the formulation: 1 mM; Concentration of the lipid in the formulation: 94 mM; and Percentage of encapsulation (Pt/PI ratio in liposomes/initial Pt/PI ratio x 100) 8%.

Characterization of Pt release from trans-[PtCl₂(NH₃)(piperidino-piperidine)]·HCl SSL

10 Sulfur containing glutathion (GSH) is known as strong platinophile. Hence it was chosen for the release experiments of the platinum from the liposome. Its fast reaction with platinum and the strong chemical shift the binding of its sulfur induces on the ^{195}Pt -NMR will enable us to detect only the diaminedichloroplatinum at the range of interest. An active positively charged derivate was
15 *trans*- $[PtCl_2(NH_3)(piperidino-piperidine)] \cdot HCl$ (**3**).

All NMR spectra were recorded on a Varian Inova 500 MHz spectrometer using a 5 mm switchable probe. ^{195}Pt NMR spectra were referenced externally to K_2PtCl_4 in HCl (-1624 ppm).

20 ^{195}Pt NMR experiment

To 0.5 mL of the liposome suspension (0.5 mg/mL) in NMR tube, 2 eq. of glutathion (GSH) were added and the suspension was vigorously shaken for 2 min. ^{195}Pt -NMR test indicated that the complex inside the liposome is intact ($\delta = -2134.597$ ppm). The sample was left at 37 °C. ^{195}Pt -NMR follow up was done after 1, 2, and 7
25 days. Through the first 2 days the platinum moiety was intact. ^{195}Pt -NMR that was done at the seventh day revealed the total disappearance of the chemical shift characteristic of the dimmededichloroplatinum(II) moiety.

To evaluate the effect of (GSH) on the release of the platinum drug the above experiment was repeated with no GSH. ^{195}Pt -NMR revealed that the complex is intact

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 38 -

inside even after 10 day at 37 °C ($\delta = -2132.585$ ppm) with minor product at $\delta = -2661.428$ ppm.

In summary the results indicated clearly that the charged complex *trans*-[PtCl₂(NH₃)(piperidino-piperidine)]•HCl, in contrast to cisplatin is released. The total disappearance of the characteristic chemical shift of the diaminedichloroplatinum(II) means that the ligands in the coordination sphere have changed. Nevertheless, the fact that no change is apparent in the GSH free experiment is not a clue for lack of release. For that the solution out side should be filtered and atomic absorption (AA) and (if possible) ¹⁹⁵Pt-NMR in order to verify the existence of the platinum moiety outside the liposome.

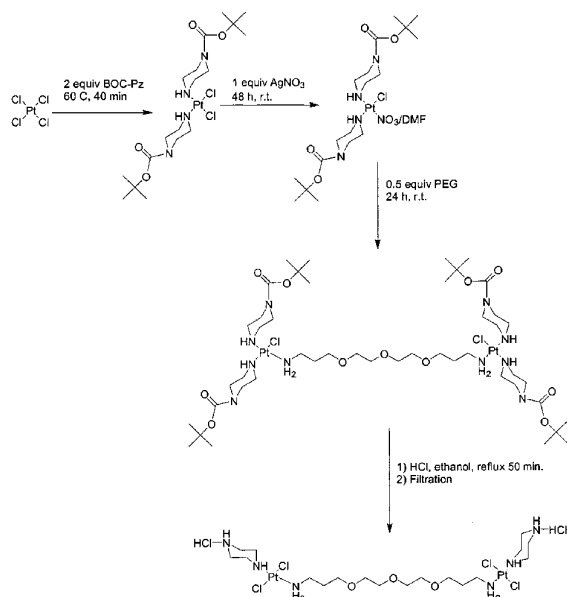
EXAMPLE 4- Bis-platinum tetra-functional positively charged piperazine-based complexes

Continuing the efforts to synthesize non-classical platinum complexes, tetrafunctional positively charged bis-platinum complexes was synthesized according to the following scheme:

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 39 -



Cis- $\text{PtCl}_2(\text{BOC-Pz})_2$ (1 g, 2.41 mmol) was dissolved in 20 mL DDW. To the stirred mixture, 2 eq. (0.9 g, 4.84 mmol) of *tert*-butyl 1-piperazine carboxylate were added and the mixture was warmed to 70°C. Stirring and warming continued for 50 min., then yellow precipitate was collected and washed twice with 40 mL DDW. After drying, the yellow product was characterized using ^{195}Pt -NMR(DMF) and used with no further purification.

^{195}Pt -NMR(DMF): $\delta = -2239.4$ ppm, -2267.8 ppm

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 40 -

Synthesis of Bis-[(trans,trans-(PtCl₂-Pz)₂](Linker)]•2HCl

In dark, *cis*-PtCl₂(Boc-Pz)₂ (538 mg, 1 mmol) was dissolve in 50 mL DMF. To the stirred yellow solution, 1 eq. (169.88mg, 1 mmol) of silver nitrate was added and the mixture was stirred at room temperature for 48 hours. ¹⁹⁵Pt-NMR(DMF) indicated the formation of the mono-nitrato/DMF mono-chloro diaminoplatinum(II) (δ=-2002.987 ppm, -2123.995) with few traces of the starting material at (δ=-2240.477 ppm) At his stage the AgCl precipitate was filtered off and 0.5 eq. (110 mg, 0.5 mmol) of 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine were added. The mixture was stirred at dark overnight. ¹⁹⁵Pt-NMR(DMF) shown the formation of the mono-chloro-triamine platinum (δ= -2542.974 ppm, -2570.911 ppm). The yellowish filtrate was taken and solvents were evaporated under reduced pressure to dryness. The gum was dissolve in 20 ml of ethanol and 1 mL of concentrated hydrochloric acid was added. The mixture was stirred at room temperature until total solubilization, and then temperature was elevated to reflux for 50 minutes. Through out this period of time yellowish precipitate was formed. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature and the precipitate was collected, washed with 20 ml ethanol and dried.

¹⁹⁵Pt-NMR(H₂O): δ= -2224.396 ppm, 2238.142 ppm, 2248.194 ppm.

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 41 -

REFERENCES

- 1) Jamieson, E. R. & Lippard, S. J.; Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem. Rev.* 1999; 99(9); 2467-2498.
- 2) Kartalou, M. & Essigmann, J. M. Recognition of cisplatin adducts by
5 cellular proteins. *Mutat. Res.* 2001, 478, 1-2, 1-21.
- 3) Gonzalez, V. M.; Fuertes, M. A.; Alonso C.; Perez J. M. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol. Pharmacol.* 2001, 59, 4, 657-63.
- 4) Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat. Res.* 2001, 478, 1-2, 23-43.
- 10 5) Cornelison, T. L. & Reed, E. Nephrotoxicity and Hydration Management for Cisplatin, Carboplatin, and Ormaplatin, *Gynecol. Onc.* 1993, 50, 2, 147-158.
- 6) Wong, E. & Giandomenico, C. M.; Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs *Chem. Rev.* 1999; 99(9); 2451-2466.
- 7) Cleare, M. J.; Hoeschele, J. D. Studies on the antitumor activity of group
15 VIII transition metal complexes. Part I. Platinum(II) complexes. *Bionorg. Chem.* 1973, 2, 187-210.
- 8) Bierbach, U.; Qu, Y.; Hambley, T. W.; Peroutka, J.; Nguyen, H. L.; Doedee, M.; Farrell, N.; Synthesis, Structure, Biological Activity, and DNA Binding of Platinum(II) Complexes of the Type *trans*-[PtCl₂(NH₃)L] (L = Planar Nitrogen
20 Base). Effect of L and Cis/Trans Isomerism on Sequence Specificity and Unwinding Properties Observed in Globally Platinated DNA. *Inorg. Chem.* 1999; 38 ,15, 3535-3542.
- 9) Montero, E. I.; Díaz, S.; González-Vadillo, A. M.; Pérez, J. M.; Alonso, C. & Navarro-Ranninger, C. Preparation and characterization of novel
25 *trans*-[PtCl(2)(amine)(isopropylamine)] compounds: cytotoxic activity and apoptosis induction in ras-transformed cells, *J. Med. Chem.* 1999, 42, 20, 4264-4268.
- 10) Coluccia, M.; Nassi, A.; Boccarelli, A.; Giordano, D.; Cardelliechio, N.; Locker, D.; Leng, M.; Sivo, M.; Intini, F. P.; & Natile, G. In vitro and in vivo antitumour activity and cellular pharmacological properties of new
30 platinum-iminoether complexes with different configuration at the iminoether

- ligands, *J. Inorg. Biochem.* 1999, 77, 1-2, 31-35.
- 11) John D. Roberts, John Peroutka and Nicholas Farrell Cellular pharmacology of polynuclear platinum anti-cancer agents, *J. Inorg. Biochem.* 1999, 77, 1-2, 51-57.
- 12) Kelland, L. R.; Sharp, S. Y.; O'Neill, C. F.; Raynaud, F. I.; Beale, P. J. & Judson, I. Mini-review: discovery and development of platinum complexes designed to circumvent cisplatin resistance, *J. Inorg. Biochem.* 1999, 77, 1-2, 111-115.
- 13) Bierbach, U.; Sabat, M.; Farrell, N.; Inversion of the Cis Geometry Requirement for Cytotoxicity in Structurally Novel Platinum(II) Complexes Containing the Bidentate N,O-Donor Pyridin-2-yl-acetate *Inorg. Chem.* 2000; 39(9); 1882-1890.
- 14) Hollis, L S; Amundsen, A R; Stern, E W. Chemical and biological properties of a new series of cis-diammineplatinum(II) antitumor agents containing three nitrogen donors: cis-[Pt(NH₃)₂(N-donor)Cl]⁺, *Journal of Medicinal Chemistry, Volume 32, Issue 1, January 1989, Pages 128-136.*
- 15) Kelland, L. R.; Abel, G.; McKeage, M. J.; Jones, M.; Goddard, P. M., Valenti, M.; Murrer, B. A., Harrap, K. R. Preclinical antitumor evaluation of bis-acetato-ammine-dichloro-cyclohexylamine platinum(IV): an orally active platinum drug. *Cancer Res.* 1993, 53, 2581-2586.
- 16) Loh, S. Y.; Mistry, P.; Kelland, L. R.; Abel, G.; Harrap, K. R. Reduced drug accumulation as a major mechanism of acquired resistance to cisplatin in a human ovarian carcinoma cell line: circumvention studies using novel platinum (II) and (IV) ammine/amine complexes. *Brit. J. Cancer.* 1992, 66, 1109-1115
- 17) Goddard, P. M; Orr, R. M.; Valenti, M. R.; Barnard, C. F.; Murrer, B. A.; Kelland, L. R.; Harrap, K. R. Novel *trans*-platinum complexes: comparative in vitro and in vivo activity against platinum-sensitive and resistant murine tumours. *Anticancer Res.* 1996, 16, 33-8
- 18) Behrens, B. C.; Hamilton, T. C.; Masuda, H.; Grotzinger, K. R.; Whang-Peng, J.; Louie, K. G.; Knutsen, T.; McKoy, W. M.; Young, R. C.; Ozols, R. F. Characterization of a *cis*-diamminedichloroplatinum(II)-resistant human ovarian cancer cell line and its use in evaluation of platinum analogues. *Cancer Res.* 1987,

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 43 -

- 47, 414-418.
- 19) Gorodetsky, R.; Levy-Acaba, F.; Mou, X.; Vexler, A.M. Combination of cisplatin and radiation in cell culture: effect of duration of exposure to drug and timing of irradiation. *Int. J. Cancer* 1998, 75, 635-642.
- 5 20) Gorodetsky, R.; Moy, X.; Pfeffer, M. R.; Peretz, T. ; Levy-Agababa, F.; Vexler, A.M. Sub-additive effect of the combination of radiation and cisplatin in cultured murine and human cell lines. *Isr. J. Med. Sci.* 1995, 31, 175-180.
- 21) Cory, A H; Owen, T C; Barltrop, J A; Cory, J G Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture, *Cancer*
 10 *Communications, Volume 3, Issue 7, July 1991, Pages 207-212*
- Lindauer, E.; Holler, E. Cellular distribution and cellular reactivity of platinum(II) complexes. *Biochem. Pharmacol.* 1996, 52, 7-14.
- 22) Zuidan, N. J.; Hirsh-Lerner, D.; Margulies, S.; Barenholz, Y. Lamellarity of cationic liposomes and mode of preparation of lipoplexes affect transfection
 15 efficiency. *Biochim. Biophys. Acta* 1999, 1419, 207-220.
- 23) Even-Chen, S.; Barenholz, Y. DOTAP cationic liposomes prefer relaxed over supercoiled plasmide *Boichim. Biophys. Acta* 2000, 1509, 176-188.
- 24) Reid, S.; Cross, R.; Snow, E. C. Combined Hoechst 33342 and merocyanine 540 staining examine murine B cell cycle stage, viability and apoptosis. *J. Immunol.*
 20 *Methods* 1996, 192, 43-54.
- 25) Holford, J; Raynaud, F.; Murrer, B. A.; Grimaldi, K; Hartley, J. A.; Abrams, M; Kelland, L. R. Chemical, biochemical and pharmacological activity of the novel sterically hindered platinum co-ordination complex, cis-[amminedichloro(2-methylpyridine)] platinum(II) (AMD473), *Anti-Cancer Drug*
 25 *Des.* 1998, 13, 1,1-18.
- 26) Thornberry, N.A.; Lazebnic, Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998, 281, 1312-1316.
- 27) Villa, P.; Kaufmann, S. H.; Earnshaw, W. C. Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem. Sci.* 1997, 22, 388-393.
- 30 28) Ciesielska, E.; Studzan, K.; Zyner, E.; Ochocki, J.; Szmigiero, L. DNA

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 44 -

damage and apoptosis induction in L1210 cells by diamminedichloroplatinum(II) and its new aminoflavone analogue *Cell.Mol.Biol.Lett.* 2000, 5, 441-450.

- 29) Liu, W.; Davis, D.W.; Ramirez, K.; McConkey, D.J.; Ellis, L.M. Endothelial cell apoptosis is inhibited by a soluble factor secreted by human colon cancer cells. *Int. J. Cancer* 2001, 92, 26-30.
- 30) Y. Barenholz, S. Amsalem. In: *Liposome Technology* 2nd Edn., G. Gregoriadis (Ed.) CRC Press, Boca Raton, 1993, vol. 1, pp: 527-616.

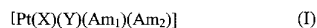
WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 45 -

CLAIMS:

1. A platinum complex of the general formula (I):



wherein:

- 5 - **X** and **Y**, which may be the same or different, represent a halogen, carboxylate, phosphate or sulphate group;
 - **Am₁** represents an amine selected from ammonia, a primary amine, a secondary amine, a non-planar heterocyclic aliphatic amine or a heterocyclic aromatic amine; and
 - 10 - **Am₂** represents a non-planar heterocyclic aliphatic amine;
- with the proviso that when said complex is in a *cis* configuration, **Am₁** and **Am₂** cannot represent simultaneously piperidine.
2. □ The complex of Claim 1, in the form of a dimer in which each monomeric unit is a Pt-complex as defined in Claim 1, bound to the other Pt-complex,
 - 15 independently, through the **Am₁**, through the **Am₂**, through a linker connected to said **Am₁** or **Am₂** or through a cyclic ring formed from said **Am₁** and **Am₂**.
 3. The complex of Claim 1 or 2, wherein said **X** and **Y** are the same or different and represent chloride or iodide.
 4. The complex of Claim 3, wherein said **X** and **Y** both represent a chloride.
 - 20 5. The complex of any one of Claims 1-4, wherein said **Am₁** represents ammonia.
 6. The complex of any one of Claims 1-4, wherein said **Am₁** represents a primary amine selected from methylamine, ethylamine, n-propylamine, isopropylamine, n-butylamine, n-hexylamine, n-heptylamine or n-nonylamine.
 7. The complex of any one of Claims 1-4, wherein said **Am₁** represents a
 - 25 secondary amine selected from dimethylamine, diethylamine, dipropylamine, dibutylamine.
 8. The complex of any one of Claims 1-4, wherein said **Am₁** represents a non-planar heterocyclic aliphatic amine selected from piperazine,

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 46 -

2-methylpiperazine, piperidine, 2-, 3-, or 4-hydroxypiperidine, 4-piperidino-piperidine, pyrrolidine, 4-(2-hydroxyethyl)piperazine and 3-aminopyrrolidine.

9. The complex of any one of Claims 1-4, wherein said Am₁ represents a heterocyclic aromatic amine selected from pyridine, 2-, 3-, or 4-aminopyridine, 2-, 3-, or 4-picoline, quinoline, 3-, or 4-aminoquinoline, thiazole, imidazole, 3-pyrroline, pyrazine, 2-methylpyrazine, 4-aminoquinaldine.

10. The complex of any one of Claims 1-9, wherein said Am₂ represents a non-planar heterocyclic amine selected from piperazine, 2-methylpiperazine, piperidine, 2-, 3-, or 4-hydroxypiperidine, 4-piperidino-piperidine, pyrrolidine, 4-(2-hydroxyethyl)piperazine and 3-aminopyrrolidine.

11. The complex of Claim 10, being in *trans* configuration.

12. The complex of Claim 11, selected from

- *trans*-[PtCl₂(NH₃)(piperidine)];
- *trans*-[PtCl₂(NH₃)(4-hydroxypiperidine)];
- *trans*-[PtCl₂(NH₃)(4-piperidino-piperidine)];
- *trans*-[PtCl₂(NH₃)(4,4'-bipiperidine)];
- *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperidine)];
- *trans*-[PtCl₂(piperidine)₂];
- *trans*-[PtCl₂(NH₃)(piperazine)]•HCl;
- *trans*-[PtCl₂(isopropylamine)(piperazine)]•HCl;
- *trans*-[PtCl₂(n-butylamine)(piperazine)]•HCl;
- *trans*-[PtCl₂(n-nonylamine)(piperazine)]•HCl;
- *trans*-[PtCl₂(piperidine)(piperazine)]•HCl;
- *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperazine)]•HCl;
- *trans*-[PtCl₂(piperazine)(piperazine)]•HCl;
- *trans*-[PtCl₂(NH₃)[4-(2-hydroxyethyl)piperazine]]•HCl;

13. The complex of Claim 10, being in a *cis* configuration.

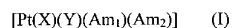
14. The complex of Claim 13 selected from *cis*-[PtCl₂(NH₃)(piperidine)] or *cis*-[PtCl₂(NH₃)(piperazine)]•HCl.

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 47 -

15. The complex of any one of Claims 1-10, being positively charged.
16. The complex of Claim 2, wherein said linker comprises 4,7,10-trioxa-1,13-tridecane chain.
17. The complex of Claim 16, being Bis- $\{trans-(PtCl_2piperazine)_2\}(4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine)\} \cdot 2HCl$.
18. A pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and as an active ingredient a therapeutically effective amount of a platinum (Pt) complex of the general formula:



10 wherein

- X and Y, which may be the same or different, represent a halogen, carboxylate, phosphate or sulphate group;
 - Am_1 represents an amine selected from ammonia, a primary amine, a secondary amine, a non-planar heterocyclic aliphatic amine or a heterocyclic aromatic amine; and
 - Am_2 represents a non-planar heterocyclic aliphatic amine,
- with the proviso that when said complex is in a *cis* configuration, Am_1 and Am_2 cannot represent simultaneously piperidine.

19. The composition of Claim 18, wherein the active ingredient is said Pt complex in a form of a dimer in which each monomeric unit is a Pt-complex as defined in Claim 18, bound to the other Pt-complex, independently, through the Am_1 , through the Am_2 , through a linker connected to said Am_1 or Am_2 or through a cyclic ring formed from said Am_1 and Am_2 .

20. The composition of Claim 18 or 19, wherein the active ingredient is said Pt complex in which X and Y are the same or different and represent chloride or iodide.

21. The composition of Claim 20, wherein the active ingredient is said Pt complex in which X and Y both represent a chloride.

22. The composition of any one of Claims 18-21, wherein the active ingredient

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 48 -

comprises said Pt complex in which said Am₁ represents ammonia.

23. The composition of any one of Claims 18-21, wherein the active ingredient comprises said Pt complex in which Am₁ represents a primary amine selected from methylamine, ethylamine, n-propylamine, isopropylamine, n-butylamine, n-hexylamine, n-heptylamine or n-nonylamine.

24. The composition of any one of Claims 18-21, wherein the active ingredient comprises said Pt complex in which Am₁ represents a secondary amine selected from dimethylamine, diethylamine, dipropylamine, dibutylamine.

25. The composition of any one of Claims 18-21, wherein the active ingredient comprises said Pt complex in which Am₁ represents a heterocyclic aromatic amine selected from pyridine, 2-, 3-, or 4-aminopyridine, 2-, 3-, or 4-picoline, quinoline, 3-, or 4-aminoquinoline, thiazole, imidazole, 3-pyrroline, pyrazine, 2-methylpyrazine, 4-aminoquinoline.

26. The composition of any one of Claims 18-21, wherein the active ingredient comprises said Pt complex in which Am₁ represents a non-planar heterocyclic aliphatic amine selected from piperazine, 2-methylpiperazine, 2-pyrazoline, piperidine, 2-, 3-, or 4-hydroxypiperidine, 4-piperidino-piperidine, pyrrolidine, 4-(2-hydroxyethyl)piperazine or 3-aminopyrrolidine.

27. The composition of any one of Claims 18-26, wherein the active ingredient comprises said Pt complex in which Am₂ is a non-planar heterocyclic aliphatic amine selected from piperazine, 2-methylpiperazine, 2-pyrazoline, piperidine, 2-, 3-, or 4-hydroxypiperidine, 4-piperidino-piperidine, pyrrolidine, 4-(2-hydroxyethyl)piperazine or 3-aminopyrrolidine.

28. The composition of any one of Claims 18-26, wherein the active ingredient comprises said Pt complex in *trans* configuration.

29. The composition of Claim 28, wherein said active ingredient is selected from

- *trans*-[PtCl₂(NH₃)(piperidine)];
- *trans*-[PtCl₂(NH₃)(4-hydroxypiperidine)];
- *trans*-[PtCl₂(NH₃)(4-piperidino-piperidine)];

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 49 -

- *trans*-[PtCl₂(NH₃)(4,4'-bipiperidine)];
 - *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperidine)];
 - *trans*-[PtCl₂(piperidine)₂];
 - *trans*-[PtCl₂(NH₃)(piperazine)]•HCl;
 - 5 - *trans*-[PtCl₂(isopropylamine)(piperazine)]•HCl;
 - *trans*-[PtCl₂(n-butylamine)(piperazine)]•HCl;
 - *trans*-[PtCl₂(n-nonylamine)(piperazine)]•HCl;
 - *trans*-[PtCl₂(piperidine)(piperazine)]•HCl;
 - *trans*-[PtCl₂(4-picoline)(piperazine)]•HCl;
 - 10 - *trans*-[PtCl₂(piperazine)(piperazine)]•HCl;
 - *trans*-[PtCl₂(NH₃)[4-(2-hydroxyethyl)piperazine]]•HCl;
30. The composition of any one of Claims 18-26, wherein said active ingredient is in *cis* configuration.
31. The composition of Claim 30 selected from *cis*-[PtCl₂(NH₃)(piperidine)];
- 15 *cis*-[PtCl₂(NH₃)(piperazine)].
32. The composition of Claim 19, wherein said linker comprises a 4,7,10-trioxa-1,13-tridecane chain.
33. The composition of Claim 32, being Bis-[{*trans*, *trans*-(PtCl₂piperazine)₂}(4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine)]•2HCl.
- 20 34. The composition of any one of Claims 18-33, for achieving a therapeutic effect, the therapeutic effect comprises forming an adduct between said Pt complex and DNA.
35. The composition of any one of Claims 18-33, for achieving a therapeutic effect, the therapeutic effect comprises inhibiting undesired cell proliferation.
- 25 36. The composition of Claim 35 for inducing apoptosis of undesired cells.
37. The composition of any one of Claims 18-36, loaded into a liposome.
38. A method for achieving a therapeutic effect, the method comprising administering to a subject in need an amount of a Pt-complex, the amount being sufficient for achieving said therapeutic effect and the Pt complex comprises the

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 50 -

general formula (I):



wherein:

- **X** and **Y**, which may be the same or different, represent a halogen, carboxylate, phosphate or sulphate group;
 - **Am₁** represents an amine selected from ammonia, a primary amine, a secondary amine, a non-planar heterocyclic aliphatic amine or a heterocyclic aromatic amine; and
 - **Am₂** represents a non-planar heterocyclic aliphatic amine,
- with the proviso that when said complex is in a *cis* configuration, Am₁ and Am₂ cannot represent simultaneously piperidine.
39. The method of claim 38, wherein said Pt-complex is in a form of a dimer in which each monomeric unit is a Pt-complex bound to the other complex, independently, through the Am₁, through the Am₂, through a linker connected to said Am₁ or Am₂ or through a cyclic ring formed from said Am₁ and Am₂.
40. The method of Claim 38 or 39, wherein said subject is administered with a Pt complex in which X and Y are the same or different and represent chloride or iodide.
41. The method of Claim 40, wherein X and Y both represent a chloride.
42. The method of any one of Claims 38-41, wherein said subject is administered with a Pt complex in which Am₁ represents ammonia.
43. The method of any one of Claims 38-41, wherein said subject is administered with a Pt complex in which Am₁ represents a primary amine selected from methylamine, ethylamine, n-propylamine, isopropylamine, n-butylamine, n-hexylamine, n-heptylamine or n-nonylamine.
44. The method of any one of Claims 38-41, wherein said subject is administered with a Pt complex in which Am₁ represents a secondary amine selected from dimethylamine, diethylamine, dipropylamine, dibutylamine.
45. The method of any one of Claims 38-41, wherein said subject is administered

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 51 -

with a Pt complex in which Am₁ represents a heterocyclic aromatic amine selected from pyridine, 2-, 3- or 4-picoline, quinoline, 3- or 4-aminoquinoline, thiazole, 2-, 3- or 4-aminopyridine, imidazole, 3-pyrroline, pyrazine, 2-methylpyrazine or 4-aminoquinaldine.

5 46. The method of any one of Claims 38-41, wherein said subject is administered with a Pt complex in which Am₁ represents a non-planar heterocyclic amine selected from piperazine, 2-methylpiperazine, piperidine, 2-, 3-, or 4-hydroxypiperidine, 4-piperidino-piperidine, pyrrolidine, 4-(2-hydroxyethyl)piperazine or 3-aminopyrrolidine.

10 47. The method of Claim 46, wherein Am₂ represents a non-planar heterocyclic amine selected from piperazine, 2-methylpiperazine, piperidine, 2-, 3-, or 4-hydroxypiperidine, 4-piperidino-piperidine, pyrrolidine, 4-(2-hydroxyethyl)piperazine or 3-aminopyrrolidine.

15 48. The method of any one of Claims 38-47, wherein said complex is in *trans* configuration.

49. The method of Claim 48, comprising administering to said subject a platinum complex selected from:

trans-[PtCl₂(NH₃)(piperidine)];

trans-[PtCl₂(NH₃)(4-hydroxypiperidine)];

20 *trans*-[PtCl₂(NH₃)(4-piperidino-piperidine)];

trans-[PtCl₂(NH₃)(1,4'-bipiperidine)];

trans-[PtCl₂(4-picoline)(piperidine)];

trans-[PtCl₂(piperidine)₂];

trans-[PtCl₂(NH₃)(piperazine)]•HCl;

25 *trans*-[PtCl₂(isopropylamine)(piperazine)]•HCl;

trans-[PtCl₂(n-butylamine)(piperazine)]•HCl;

trans-[PtCl₂(n-nonylamine)(piperazine)]•HCl

trans-[PtCl₂(piperidine)(piperazine)]•HCl;

trans-[PtCl₂(4-picoline)(piperazine)]•HCl;

30 *trans*-[PtCl₂(piperazine)(piperazine)]•HCl;

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

- 52 -

trans-[PtCl₂(NH₃)[4-(2-hydroxyethyl)piperazine]]•HCl;

50. The method of any one of Claims 38-47, wherein said complex is in a *cis* configuration.

51. The method of Claim 50, wherein said complex is selected from
5 *cis*-[PtCl₂(NH₃)(piperidine)]; *cis*-[PtCl₂(NH₃)(piperazine)].

52. The method of Claim 39, wherein said linker comprises a
4,7,10-trioxa-1,13-tridecane chain.

53. The method of Claim 52, wherein the subject is administered with a
therapeutically effective amount of Bis-[{*trans*,
10 *trans*-(PtCl₂piperazine)₂}(4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine)]•2HCl.

54. The method of any one of Claims 38-53, for achieving a therapeutic effect, the
therapeutic effect comprises forming an adduct between said Pt complex and DNA.

55. The method of any one of Claims 38-53, for achieving a therapeutic effect, the
therapeutic effect comprises inhibiting undesired cell proliferation.

15 56. The method of Claim 55 for inducing apoptosis of undesired cells.

57. The method of any one of Claims 38-56, wherein said Pt complex is loaded
into a liposome.

58. A platinum complex as defined in any one of Claims 1-17, for use as an
anti-cancer agent.

20

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

1/8

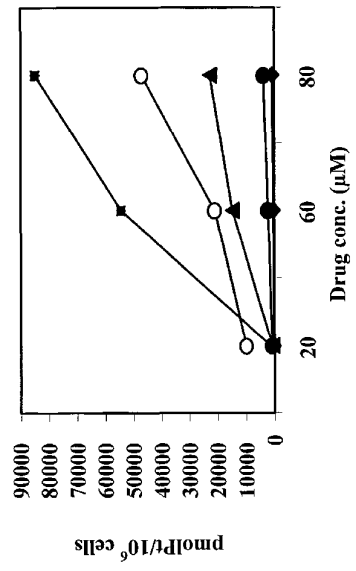


FIG.1A

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

2/8

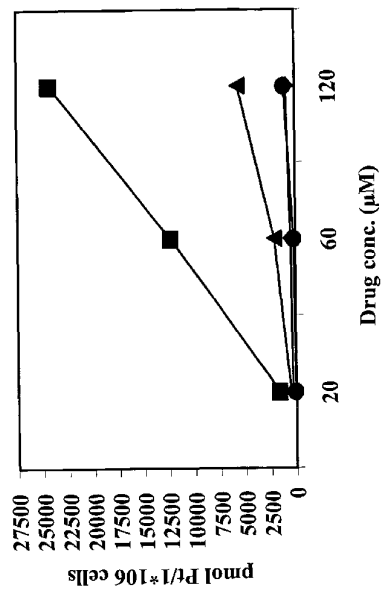


FIG.1B

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

3/8

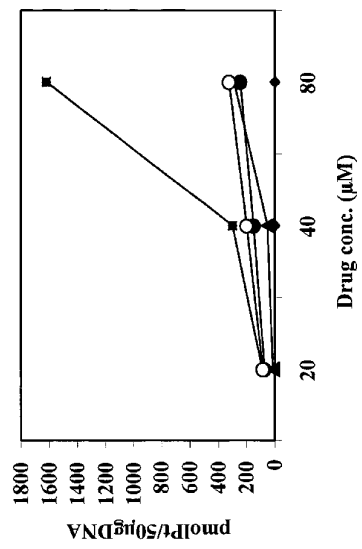


FIG. 2A

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

4/8

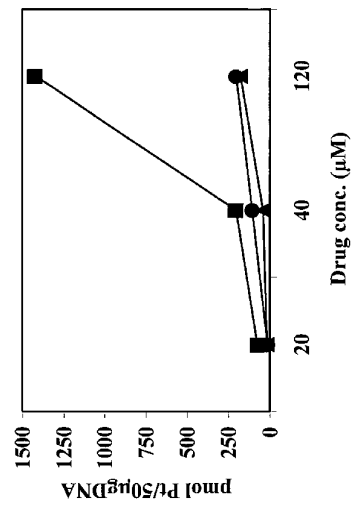
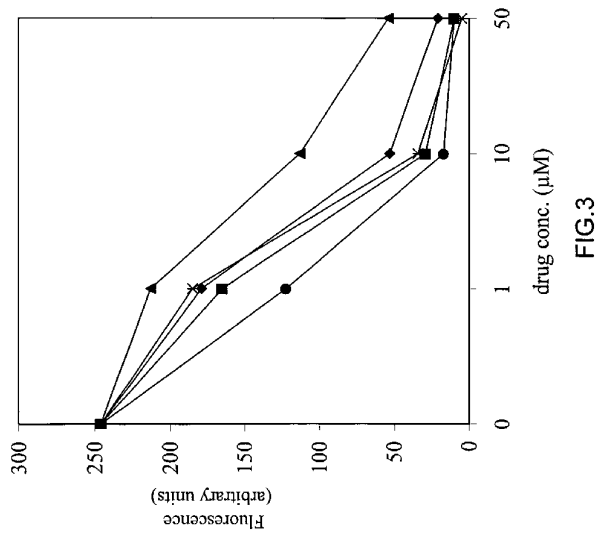


FIG.2B

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

5/8



WO 03/017998

PCT/IL02/00687

6/8

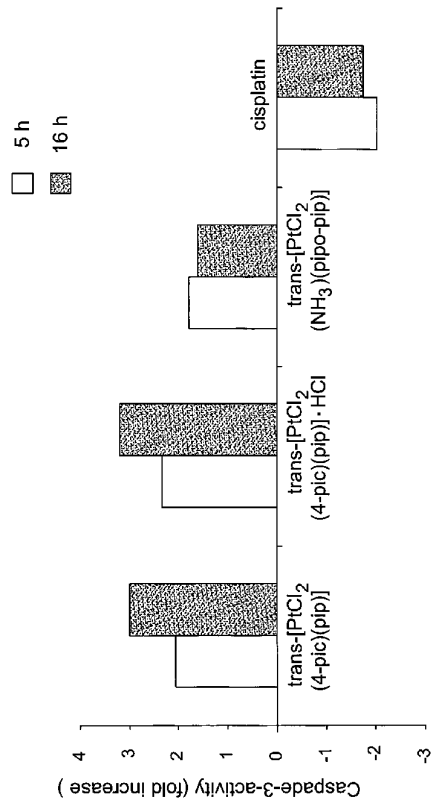


FIG. 4

WO 03/017998

PCT/IL02/00687

7/8

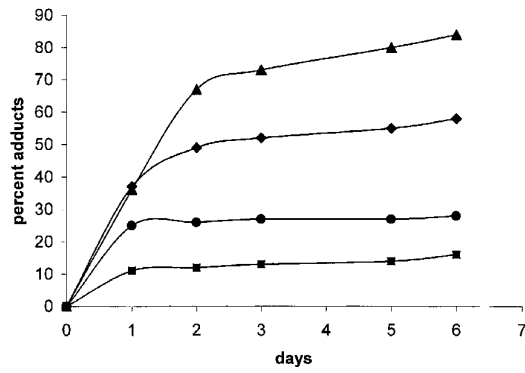


FIG. 5

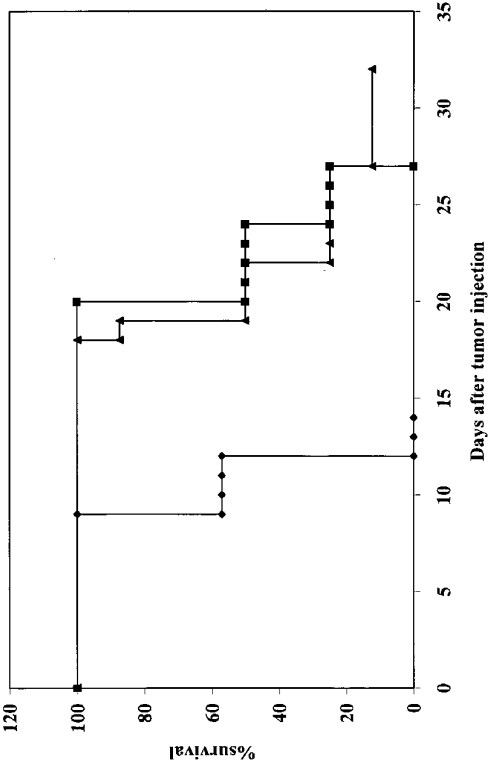


FIG.6

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
6 March 2003 (06.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/017998 A1

(51) International Patent Classification: A61K 31/28, C07F 15/00 (74) Agent: REINHOLD COHN AND PARTNERS; P.O.Box 4060, 61040 Tel Aviv (IL).

(21) International Application Number: PCT/IL02/00687

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GH, GM, GT, HN, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date: 21 August 2002 (21.08.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/314,115 23 August 2001 (23.08.2001) US

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM [IL/IL]; 46 Jabotinsky Street, 92182 Jerusalem (IL).

Published:
— with international search report
with amended claims(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): BARENHOLZ, Yechezkel [IL/IL]; 18 Nave Shanan Street, 93707 Jerusalem (IL). GIBSON, Dan [IL/IL]; 1 Nachshon Street, 93548 Jerusalem (IL). NAJAJREH, Yousef [IL/IL]; A-Sahel Street, I'ayez O'mar Building, Apartment No. 10, Beit Jala (IL). KHAZANOV, Elena [IL/IL]; 18/8 Shderot Ha-Yarkon, 99000 Ramat Beit Shemesh (IL).Date of publication of the amended claims: 28 August 2003
For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/017998 A1

(54) Title: PLATINUM COMPLEXES AND THEIR USE IN CANCER TREATMENT

(57) Abstract: The present invention concerns novel platinum complexes in which at least one of the amine ligand is a non-planar heterocyclic aliphatic amine. The platinum complexes may be in a trans or cis configuration and were found to possess therapeutic activities. Thus, the present concerns novel platinum complexes, pharmaceutical compositions comprising them and other uses thereof.

【手続補正書】

【提出日】平成15年8月22日(2003.8.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0004

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0004】

2個の離脱基のシス立体配置がシス-ジアミンジクロロ白金(シス-DDP)の抗腫瘍活性に必須であることは一般的に受け入れられた。これは、 Am_1 、 $Am_2 = NH_3$ 又は平面状アミンリガンド、例えばキノリン、チアゾール、ピリジン又はベンゾチアゾールであるトランス- $PtCl_2 (Am_1) (Am_2)$ 、(例えばトランス- $[PtCl_2 (NH_3) (ピリジン)]$ 、トランス- $[PtCl_2 (NH_3) (チアゾール)]$ 、トランス- $[PtCl_2 (NH_3) (キノリン)]$ 及びトランス- $[PtCl_2 (NH_3) (ベンゾチアゾール)]$)における1個もしくは両方の NH_3 リガンドの置き換えがトランス形の細胞毒性を実質的に強化することを *farrell* 等が報告するまで20年以上のものより長い間の状況であった(非特許文献8)。(非特許文献15)は、キノリンならびに第一級及び第二級アミンを含有するシス- $PtCl_2$ 錯体の合成を記載しており、それらの ^1H-NMR スペクトルを議論している。(非特許文献16)は、2個のアミン含有リガンドを含有し、1個は芳香族ピリジン又はベンジルアミンであり、他は脂肪族環状アミン(モルホリン又はピペリジン)であるシス- $PtCl_2$ 錯体を記載しており、錯体のIR及びラマンスペクトルを議論している。(非特許文献17)は、ピペリジン及び芳香族アミン又は芳香族アミンで置換されたアミンを含有するシス- $PtCl_2$ 錯体の合成、それらのIR、ラマン及びUVスペクトルを記載している。さらに、ヒト肝臓ガン細胞への細胞毒性に関して錯体を調べた。(非特許文献18)は、キノリンならびにモルホリン、シクロヘキシルアミン、ピペリジン又はベンジルアミンから選ばれるアミンを含有するシス- $PtCl_2$ 錯体の合成、それらのUV及びIRスペクトルならびに仁の発芽の減少のためのそれらの生物学的活性を記載している。(特許文献1)は、式 $Pt(X)(Z)(A)_2$ のシス- Pt 錯体及びガン細胞へのそれらの活性を記載している。Aは離脱基(例えばハロゲン、ヒドロキシ、カルボキシレート又は一緒になって二座配位カルボキシレート又はサルフェートを形成する)であり、Xは NH_3 又はモノーもしくはジアルキル置換 NH_3 であり、Zは置換アミン、好ましくは5-もしくは6-員単環式又は8~10員多環式アミン、特に置換ピリジン又は二環式アミンであり、ここでアミンは窒素原子を介して配位している。(非特許文献19)は、ピペラジンとの PtX_2 錯体の合成を記載しており、ここでXはCl又はBrであることができる。合成された錯体は、ピペラジンのコンフォメーションを明らかにするために振動分光学を用いて分析された。(非特許文献20)は、ピリジン、置換ピリジン、モルホリン、ピペリジン及びジメチルアミンから選ばれる2個のアミンリガンドを含有するシス及びトランス $PtCl_2$ 錯体を記載している。(特許文献2)は、シス- $PtX_2 (NH_3) (Am)$ 錯体及びそれらの抗腫瘍活性を開示している。XはCl、I、ニトロ又は環状部分であることができ、Amは置換 C_6H_4N である。(非特許文献21)は、白金に基づく抗腫瘍薬剤を総説しており、シス- Pt 錯体に言及している。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0007】

一般にトランス-ジアミンジクロロ白金(II)類似体は、それらのシスの相手より低い水溶液中における溶解度を有し、限られたバイオアベイラビリティを生ずる。水溶解度

を向上させる1つの方法は錯体に電荷を加えることによる方法である。Farrell等は、トランス- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(\text{Am}_1)]$ (Am_1 = 平面状リガンド)の型の化合物の劣った水溶解度の克服においていくらかの努力をしたが、 NH_3 及び平面状リガンドのトランス配向及び四角形-平面状物 (square-planar entity) の電気的中性性を保持した。トランス-白金錯体、トランス- $[\text{PtCl}(\text{PyAc}-\text{N}, \text{O})(\text{NH}_3)]$ (PyAc = ピリジン-2-イルアセテート、N-ドナーはトランス) 及びそのシス異性体が合成され、トランス異性体は類似錯体、トランス- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(\text{Am}_1)]$ (Am_1 = 平面状リガンド) と比較して水中における溶解度の向上を示した (約 $4 \sim 5$ ミリモル L^{-1}) (非特許文献13)。他方、Farrell等により、及びまたHollis等により製造される白金錯体のカチオン性電荷は金属中心上にあり、アニオン性クロドリガンドの1つの中性リガンドによる置換から生ずる (非特許文献14)。

【非特許文献1】

Jamieson, E. R. & Lippard, S. J. 著, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. Chem. Rev. 1999; 99 (9); 2467-2498

【非特許文献2】

Kartalou, M. & Essigmann, J. M. 著, Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins, Mutat. Res. 2001, 478, 1-2, 1-21

【非特許文献3】

Gonzalez, V. M. ; Fuertes, M. A. ; Alonso C. ; Perez J. M. 著, Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? Mol. Pharmacol. 2001, 59, 4, 657-63

【非特許文献4】

Kartalou M, Essigmann JM. 著, Mechanisms of resistance to cisplatin. Mutat. Res. 2001, 478, 1-2, 23-43

【非特許文献5】

Cornelison, T. L. & Reed, E. 著, Nephrotoxicity and Hydration Management for Cisplatin, Carboplatin, and Ormaplatin, Gynecol. Onc. 1993, 50, 2, 147-158

【非特許文献6】

Wong, E. & Giandomenico, C. M. 著, Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs Chem. Rev. 1999; 99 (9); 2451-2466

【非特許文献7】

Cleare, M. J. ; Hoeschele, J. D. 著, Studies on the antitumor activity of group VIII transition metal complexes. part I. Platinum (II) complexes. Bioinorg. Chem. 1973, 2, 187-210

【非特許文献8】

Bierbach, U. ; Qu, Y. ; Hambley, T. W. ; Peroutka, J. ; Nguyen, H. L. ; Doedee, M. ; Farrell, N. ; Syntthesis, Structure, Biological Activity, and DNA Binding of Platinum (II) Complexes of the Type trans- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)\text{L}]$ (L = Planar N

itrogen Base). Effect of L and Cis/Trans Isomerism on Sequence Specificity and Unwinding Properties Observed in Globally Platinated DNA. *Inorg. Chem.* 1999; 38, 15, 3535-3542

【非特許文献9】

Montero, E. I. ; Diaz, S. ; Gonzalez-Vadillo, A. M. ; Perez, J. M. ; Alonso, C. & Navarro-Ranninger, C. 著, Preparation and characterization of novel trans-[PtCl(2)(amine)(isopropylamine)] compounds: cytotoxic activity and apoptosis induction in ras-transformed cells, *J. Med. Chem.* 1999, 42, 20, 4264-4268

【非特許文献10】

Coluccia, M. ; Nassi, A. ; Boccarelli, A. ; Giordano, D. ; Cardellicio, N. ; Locker, D. ; Leng, M. ; Sivo, M. ; Intini, F. P. ; & Natile, G. 著, In vitro and in vivo antitumour activity and cellular pharmacological properties of new platinum-iminoether complexes with different configuration at the iminoether ligands, *J. Inorg. Biochem.* 1999, 77, 1-2, 31-35

【非特許文献11】

John D. Roberts, John Peroutka and Nicholas Farrell 著, Cellular pharmacology of polynuclear platinum anti-cancer agents, *J. Inorg. Biochem.* 1999, 77, 1-2, 51-57

【非特許文献12】

Kelland, L. R; Sharp, S. Y. ; O'Neill, C. F. ; Raynaud, F. I. ; Beale, P. J. & Judson, I. 著, Mini-review: discovery and development of platinum complexes designed to circumvent cisplatin resistance, *J. Inorg. Biochem.* 1999, 77, 1-2, 111-115

【非特許文献13】

Bierbach, U. ; Sabat, M. ; Farrell, N. 著, Inversion of the Cis Geometry Requirement for Cytotoxicity in Structurally Novel Platinum(II) Complexes Containing the Bidentate N, O-Donor Pyridin-2-yl-acetate, *Inorg. Chem.* 2000; 39 (9) ; 1882-1890

【非特許文献14】

Hollis, L S; Amundsen, A R; Stern, E W. 著, Chemical and biological properties of a new series of cis-diammineplatinum(II) antitumor agents containing three nitrogen donors: cis-[Pt(NH₃)₂(N-donor)Cl]⁺, *Journal of Medicinal Chemistry*, January 1989, Volume 32, Issue 1, pages 128-136

【非特許文献15】

Nguyen, H. D. et al. 著, Vietnam J. of Chem., 2001年, 39 (4), 111-114

【非特許文献16】

Tran, T. D. et al. 著, Tap Chi Duoc Hoc, 2001年, 6, 6-8

【非特許文献17】

Tran T. D. et al. 著, Vietnam J. of Chem., 2001年, 39 (3), 99-102

【非特許文献18】

Tran, T. D. et al. 著, Tap Chi Duoc Hoc (Vietnam J. of Chem.), 1997年, 35 (2), 21-23

【特許文献1】

欧州特許出願公開第0727430号明細書, Johnson Matthey Pub. Ltd. Co., 1996年

【非特許文献19】

Ivanova, N. A. et al. 著, Russian J. Coord. Chem., 1993年, 19 (12), 856-863

【非特許文献20】

Cattalini, L. et al. 著, J. Chem. Soc. Dalton Transactions, 1993年, 233-236

【特許文献2】

欧州特許出願公開第0273315号明細書, Shionogi & Co., 1988年

【非特許文献21】

Wong et al. 著, Chem. Rev., 1999年, 99 (9), 2451-2466

【発明の開示】

【手続補正書】

【提出日】平成15年11月19日(2003.11.19)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

一般式 (I) :

$$[Pt(X)(Y)(Am_1)(Am_2)] \quad (I)$$

[式中 :

—X及びYは、同一もしくは異なることができ、ハロゲン、カルボキシレート、ホスフェート又はサルエート基を示し ;

—Am₁ はアンモニア、第一級アミン、第二級アミン、非一平面状複素環式脂肪族アミン又は複素環式芳香族アミンから選ばれるアミンを示し ;

—Am₂ は非一平面状複素環式脂肪族アミンを示す]

のトランス立体配置にある白金錯体であって、以下の化合物 :

トランス-[Pt(ピペリジン)₂Cl₂] 及びトランス-[Pt(モルホリン)₂Cl₂] を除く白金錯体。

【請求項2】

各モノマー単位が、独立してAm₁ を介して又はAm₂ を介して又は該Am₁ もしくはA

m₂ に連結したリンカーを介して他の Pt-錯体に結合している請求項 1 で定義されている Pt-錯体であるダイマー形態の請求項 1 の錯体。

【請求項 3】

該 X 及び Y が同一もしくは異なり、クロリド又はヨウダイドを示す請求項 1 又は 2 の錯体。

【請求項 4】

該 X 及び Y が両方ともクロリドを示す請求項 3 の錯体。

【請求項 5】

該 Am₁ がアンモニアを示す請求項 1～4 のいずれか 1 つの錯体。

【請求項 6】

該 Am₁ がメチルアミン、エチルアミン、n-プロピルアミン、イソプロピルアミン、n-ブチルアミン、n-ヘキシルアミン、n-ヘプチルアミン又は n-ノニルアミンから選ばれる第一級アミンを示す請求項 1～4 のいずれか 1 つの錯体。

【請求項 7】

該 Am₁ がジメチルアミン、ジエチルアミン、ジプロピルアミン、ジブチルアミンから選ばれる第二級アミンを示す請求項 1～4 のいずれか 1 つの錯体。

【請求項 8】

該 Am₁ がピペラジン、2-メチルピペラジン、ピペリジン、2-、3-もしくは 4-ヒドロキシピペリジン、4-ピペリジノーピペリジン、ピロリジン、4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン及び 3-アミノピロリジンから選ばれる非-平面状複素環式脂肪族アミンを示す請求項 1～4 のいずれか 1 つの錯体。

【請求項 9】

該 Am₁ がピリジン、2-、3-もしくは 4-アミノピリジン、2-、3-もしくは 4-ピコリン、キノリン、3-もしくは 4-アミノキノリン、チアゾール、イミダゾール、3-ピロリン、ピラジン、2-メチルピラジン、4-アミノキナルジンから選ばれる複素環式芳香族アミンを示す請求項 1～4 のいずれか 1 つの錯体。

【請求項 10】

該 Am₂ がピペラジン、2-メチルピペラジン、ピペリジン、2-、3-もしくは 4-ヒドロキシピペリジン、4-ピペリジノーピペリジン、ピロリジン、4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン及び 3-アミノピロリジンから選ばれる非-平面状複素環式アミンを示す請求項 1～9 のいずれか 1 つの錯体。

【請求項 11】

ートランスー [PtCl₂ (NH₃) (ピペリジン)] ;
 ートランスー [PtCl₂ (NH₃) (4-ヒドロキシピペリジン)] ;
 ートランスー [PtCl₂ (NH₃) (4-ピペリジノーピペリジン)] ;
 ートランスー [PtCl₂ (NH₃) (4, 4'-ビピペリジン)] ;
 ートランスー [PtCl₂ (4-ピコリン) (ピペリジン)] ;
 ートランスー [PtCl₂ (NH₃) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (イソプロピルアミン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (n-ブチルアミン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (n-ノニルアミン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (ピペリジン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (4-ピコリン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (ピペラジン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (NH₃) [4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン]] · HCl ;

から選ばれる請求項 1 の錯体。

【請求項 12】

正に帯電している請求項 1～10 のいずれか 1 つの錯体。

【請求項 13】

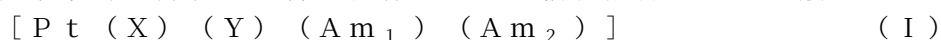
該リンカーが 4, 7, 10-トリオキサー-1, 13-トリデカン鎖を含んでなる請求項 2 の錯体。

【請求項 14】

ビスー [{トランス, トランスー (PtCl₂ ピペラジン)₂ } (4, 7, 10-トリオキサー-1, 13-トリデカンジアミン)] · 2HCl である請求項 13 の錯体。

【請求項 15】

製薬学的に許容され得る担体ならびに活性成分として一般式：



[式中、

—X 及び Y は、同一もしくは異なることができ、ハロゲン、カルボキシレート、ホスフェート又はサルフェート基を示し；

—Am₁ はアンモニア、第一級アミン、第二級アミン、非—平面状複素環式脂肪族アミン又は複素環式芳香族アミンから選ばれるアミンを示し；

—Am₂ は非—平面状複素環式脂肪族アミンを示す]

のトランス立体配置にある白金 (Pt) 錯体であって、以下の化合物：

トランスー [Pt (ピペリジン)₂ Cl₂] 及びトランスー [Pt (モルホリン)₂ Cl₂] を除く白金錯体の治療的に有効な量を含んでなる製薬学的組成物。

【請求項 16】

活性成分がダイマー形態の該 Pt 錯体であり、そこにおいて各モノマー単位は、独立して Am₁ を介して又は Am₂ を介して又は該 Am₁ もしくは Am₂ に連結したリンカーを介して他の Pt-錯体に結合している請求項 18 で定義されている Pt-錯体である請求項 15 の組成物。

【請求項 17】

活性成分が、X 及び Y が同一もしくは異なり、クロリド又はヨードイドを示す該 Pt 錯体である請求項 15 又は 16 の組成物。

【請求項 18】

活性成分が、X 及び Y が両方ともクロリドを示す該 Pt 錯体である請求項 17 の組成物。

【請求項 19】

活性成分が、該 Am₁ がアンモニアを示す該 Pt 錯体を含んでなる請求項 15～18 のいずれか 1 つの組成物。

【請求項 20】

活性成分が、Am₁ がメチルアミン、エチルアミン、n-プロピルアミン、イソプロピルアミン、n-ブチルアミン、n-ヘキシルアミン、n-ヘプチルアミン又は n-ノニルアミンから選ばれる第一級アミンを示す該 Pt 錯体を含んでなる請求項 15～18 のいずれか 1 つの組成物。

【請求項 21】

活性成分が、Am₁ がジメチルアミン、ジエチルアミン、ジプロピルアミン、ジブチルアミンから選ばれる第二級アミンを示す該 Pt 錯体を含んでなる請求項 15～18 のいずれか 1 つの組成物。

【請求項 22】

活性成分が、Am₁ がピリジン、2-, 3-もしくは 4-アミノピリジン、2-, 3-もしくは 4-ピコリン、キノリン、3-もしくは 4-アミノキノリン、チアゾール、イミダゾール、3-ピロリン、ピラジン、2-メチルピラジン、4-アミノキナリジンから選ばれる複素環式芳香族アミンを示す該 Pt 錯体を含んでなる請求項 15～18 のいずれか 1 つの組成物。

【請求項 23】

活性成分が、Am₁ がピペラジン、2-メチルピペラジン、2-ピラゾリン、ピペリジン、2-, 3-もしくは 4-ヒドロキシピペリジン、4-ピペリジノーピペリジン、ピロリジン、4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン又は 3-アミノピロリジンから選ばれる非—平面状複素環式脂肪族アミンを示す該 Pt 錯体を含んでなる請求項 15～18 のい

れか 1 つの組成物。

【請求項 24】

活性成分が、 Am_2 がピペラジン、2-メチルピペラジン、2-ピラゾリン、ピペリジン、2-、3-もしくは4-ヒドロキシピペリジン、4-ピペリジノーピペリジン、ピロリジン、4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン又は3-アミノピロリジンから選ばれる非-平面状複素環式脂肪族アミンである該Pt錯体を含んでなる請求項15～23のいずれか1つの組成物。

【請求項 25】

該活性成分が、

- トランス— $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(\text{ピペリジン})]$ ；
- トランス— $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(4\text{-ヒドロキシピペリジン})]$ ；
- トランス— $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(4\text{-ピペリジノーピペリジン})]$ ；
- トランス— $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(4, 4'\text{-ビピペリジン})]$ ；
- トランス— $[\text{PtCl}_2(4\text{-ピコリン})(\text{ピペリジン})]$ ；
- トランス— $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(\text{ピペラジン})] \cdot \text{HCl}$ ；
- トランス— $[\text{PtCl}_2(\text{イソプロピルアミン})(\text{ピペラジン})] \cdot \text{HCl}$ ；
- トランス— $[\text{PtCl}_2(\text{n-ブチルアミン})(\text{ピペラジン})] \cdot \text{HCl}$ ；
- トランス— $[\text{PtCl}_2(\text{n-ノニルアミン})(\text{ピペラジン})] \cdot \text{HCl}$ ；
- トランス— $[\text{PtCl}_2(\text{ピペリジン})(\text{ピペラジン})] \cdot \text{HCl}$ ；
- トランス— $[\text{PtCl}_2(4\text{-ピコリン})(\text{ピペラジン})] \cdot \text{HCl}$ ；
- トランス— $[\text{PtCl}_2(\text{ピペラジン})(\text{ピペラジン})] \cdot \text{HCl}$ ；
- トランス— $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)[4\text{-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン}]] \cdot \text{HCl}$ ；

から選ばれる請求項15の組成物。

【請求項 26】

該リンカーが4, 7, 10-トリオキサー1, 13-トリデカン鎖を含んでなる請求項16の組成物。

【請求項 27】

ビス— $[\{ \text{トランス}, \text{トランス-(PtCl}_2\text{ピペラジン)}_2 \} (4, 7, 10\text{-トリオキサー1, 13-トリデカンジアミン})] \cdot 2\text{HCl}$ である請求項26の組成物。

【請求項 28】

該Pt錯体とDNAの間の付加物の形成を含んでなる治療的效果を達成するための請求項15～27のいずれか1つの組成物。

【請求項 29】

望ましくない細胞増殖の阻害を含んでなる治療的效果を達成するための請求項15～27のいずれか1つの組成物。

【請求項 30】

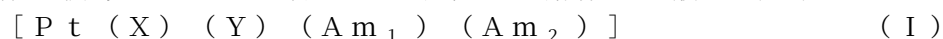
望ましくない細胞のアポトーシスを誘導するための請求項29の組成物。

【請求項 31】

リボソーム内に充填される請求項15～30のいずれか1つの組成物。

【請求項 32】

必要のある患者に治療的效果を達成するのに十分な量のトランス立体配置にあるPt-錯体を投与することを含んでなり、Pt錯体が一般式(I)：



[式中：

- X及びYは、同一もしくは異なることができ、ハロゲン、カルボキシレート、ホスフェート又はサルフェート基を示し；
- Am_1 はアンモニア、第一級アミン、第二級アミン、非-平面状複素環式脂肪族アミン又は複素環式芳香族アミンから選ばれるアミンを示し；
- Am_2 は非-平面状複素環式脂肪族アミンを示し、

ここで以下の化合物：

トランスー $[Pt (ピペリジン)_2 Cl_2]$ 及びトランスー $[Pt (モルホリン)_2 Cl_2]$ を除く]

から成る、治療的效果を達成するための方法。

【請求項 33】

該 Pt 錯体がダイマーの形態にあり、そこにおいて各モノマー単位は、独立して Am_1 を介して、 Am_2 を介して又は該 Am_1 もしくは Am_2 に連結したリンカーを介して他の錯体に結合している Pt 錯体である請求項 32 の方法。

【請求項 34】

X 及び Y が同一もしくは異なり、クロリド又はヨーダイドを示す Pt 錯体を該患者に投与する請求項 32 又は 33 の方法。

【請求項 35】

X 及び Y が両方ともクロリドを示す請求項 34 の方法。

【請求項 36】

Am_1 がアンモニアを示す Pt 錯体を該患者に投与する請求項 32 ～ 35 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 37】

Am_1 がメチルアミン、エチルアミン、n-プロピルアミン、イソプロピルアミン、n-ブチルアミン、n-ヘキシルアミン、n-ヘプチルアミン又はn-ノニルアミンから選ばれる第一級アミンを示す Pt 錯体を該患者に投与する請求項 32 ～ 35 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 38】

Am_1 がジメチルアミン、ジエチルアミン、ジプロピルアミン、ジブチルアミンから選ばれる第二級アミンを示す Pt 錯体を該患者に投与する請求項 32 ～ 35 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 39】

Am_1 がピリジン、2-、3-もしくは4-ピコリン、キノリン、3-もしくは4-アミノキノリン、チアゾール、2-、3-もしくは4-アミノピリジン、イミダゾール、3-ピロリン、ピラジン、2-メチルピラジン又は4-アミノキナルジンから選ばれる複素環式芳香族アミンを示す Pt 錯体を該患者に投与する請求項 32 ～ 35 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 40】

Am_1 がピペラジン、2-メチルピペラジン、ピペリジン、2-、3-もしくは4-ヒドロキシピペリジン、4-ピペリジノーピペリジン、ピロリジン、4-（2-ヒドロキシエチル）ピペラジン及び3-アミノピロリジンから選ばれる非-平面状複素環式アミンを示す Pt 錯体を該患者に投与する請求項 32 ～ 35 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 41】

Am_2 がピペラジン、2-メチルピペラジン、ピペリジン、2-、3-もしくは4-ヒドロキシピペリジン、4-ピペリジノーピペリジン、ピロリジン、4-（2-ヒドロキシエチル）ピペラジン又は3-アミノピロリジンから選ばれる非-平面状複素環式アミンを示す請求項の方法。

【請求項 42】

トランスー $[Pt Cl_2 (NH_3) (ピペリジン)]$ ；
 トランスー $[Pt Cl_2 (NH_3) (4-ヒドロキシピペリジン)]$ ；
 トランスー $[Pt Cl_2 (NH_3) (4-ピペリジノーピペリジン)]$ ；
 トランスー $[Pt Cl_2 (NH_3) (1, 4'-ビピペリジン)]$ ；
 トランスー $[Pt Cl_2 (4-ピコリン) (ピペリジン)]$ ；
 トランスー $[Pt Cl_2 (NH_3) (ピペラジン)] \cdot HCl$ ；
 トランスー $[Pt Cl_2 (イソプロピルアミン) (ピペラジン)] \cdot HCl$ ；
 トランスー $[Pt Cl_2 (n-ブチルアミン) (ピペラジン)] \cdot HCl$ ；

ートランスー [PtCl₂ (n-ノニルアミン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (ピペリジン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (4-ピコリン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (ピペラジン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (NH₃) [4-(2-ヒドロキシエチル) ピペラジン]] · HCl ;

から選ばれる白金錯体を該患者に投与することを含んでなる請求項32の方法。

【請求項43】

該リンカーが4, 7, 10-トリオキサー1, 13-トリデカン鎖を含んでなる請求項33の方法。

【請求項44】

治療的に有効な量のビスー [{トランス, トランスー (PtCl₂ ピペラジン)₂ } (4, 7, 10-トリオキサー1, 13-トリデカンジアミン)] · 2HCl を患者に投与する請求項43の方法。

【請求項45】

該Pt錯体とDNAの間の付加物の形成を含んでなる治療的効果を達成するための請求項32～44のいずれか1つの方法。

【請求項46】

望ましくない細胞増殖の阻害を含んでなる治療的効果を達成するための請求項32～44のいずれか1つの方法。

【請求項47】

望ましくない細胞のアポトーシスを誘導するための請求項46の方法。

【請求項48】

該Pt錯体をリポソーム内に充填する請求項32～47のいずれか1つの方法。

【請求項49】

ートランスー [PtCl₂ (NH₃) (ピペリジン)] ;
 ートランスー [PtCl₂ (NH₃) (4-ヒドロキシピペリジン)] ;
 ートランスー [PtCl₂ (NH₃) (4-ピペリジノ-ピペリジン)] ;
 ートランスー [PtCl₂ (NH₃) (1, 4'-ビピペリジン)] ;
 ートランスー [PtCl₂ (4-ピコリン) (ピペリジン)] ;
 ートランスー [PtCl₂ (ピペリジン)₂] ;
 ートランスー [PtCl₂ (NH₃) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (イソプロピルアミン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (n-ブチルアミン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (n-ノニルアミン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (ピペリジン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (4-ピコリン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (ピペラジン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (NH₃) [4-(2-ヒドロキシエチル) ピペラジン]] · HCl ;

から選ばれる白金錯体を該患者に投与することを含んでなる請求項48の方法。

【請求項50】

該錯体がシス立体配置にある請求項38～47のいずれか1つの方法。

【請求項51】

該錯体がシスー [PtCl₂ (NH₃) (ピペリジン)] ; シスー [PtCl₂ (NH₃) (ピペラジン)] から選ばれる請求項50の方法。

【請求項52】

該リンカーが4, 7, 10-トリオキサー1, 13-トリデカン鎖を含んでなる請求項39の方法。

【請求項53】

治療的に有効な量のビスー [{トランス, トランスー (PtCl₂ ピペラジン)₂ } (4, 7, 10-トリオキサ-1, 13-トリデカンジアミン)] ・ 2HCl を患者に投与する請求項 52 の方法。

【請求項 54】

該 Pt 錯体と DNA の間の付加物の形成を含んでなる治療的效果を達成するための請求項 38～53 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 55】

望ましくない細胞増殖の阻害を含んでなる治療的效果を達成するための請求項 38～53 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 56】

望ましくない細胞のアポトーシスを誘導するための請求項 55 の方法。

【請求項 57】

該 Pt 錯体をリポソーム内に充填する請求項 38～56 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 58】

抗ガン剤として用いるための請求項 1～17 のいずれか 1 つで定義されている白金錯体。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0008】

発明の概略

本発明は、その側面の第 1 に従い、一般式 (I) :



[式中:

—X 及び Y は、同一もしくは異なることができ、ハロゲン、カルボキシレート、ホスフェート又はサルフェート基を示し;

—Am₁ はアンモニア、第一級アミン、第二級アミン、非—平面状複素環式脂肪族アミン又は複素環式芳香族アミンから選ばれるアミンを示し;

—Am₂ は非—平面状複素環式脂肪族アミンを示す]

を有するトランス配置にある新規な白金錯体 (Pt—錯体) であって、以下の化合物:

トランスー [Pt (ピペリジン)₂ Cl₂] 及びトランスー [Pt (モルホリン)₂ Cl₂] を除く白金錯体に関する。

【手続補正書】

【提出日】平成 15 年 12 月 15 日 (2003.12.15)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

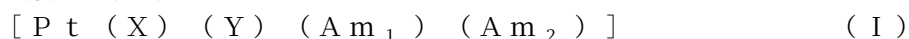
【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一般式 (I) :



[式中:

—X 及び Y は、同一もしくは異なることができ、ハロゲン、カルボキシレート、ホスフェート又はサルフェート基を示し;

—Am₁ はアンモニア、第一級アミン、第二級アミン、非—平面状複素環式脂肪族アミン又は複素環式芳香族アミンから選ばれるアミンを示し;

—Am₂ は非—平面状複素環式脂肪族アミンを示す]

のトランス立体配置にある白金錯体であって、以下の化合物：

トランスー $[\text{Pt}(\text{ピペリジン})_2\text{Cl}_2]$ 及びトランスー $[\text{Pt}(\text{モルホリン})_2\text{Cl}_2]$ を除く白金錯体。

【請求項 2】

各モノマー単位が、独立して Am_1 を介して又は Am_2 を介して又は該 Am_1 もしくは Am_2 に連結したリンカーを介して他の Pt -錯体に結合している請求項 1 で定義されている Pt -錯体であるダイマー形態の請求項 1 の錯体。

【請求項 3】

該 X 及び Y が同一もしくは異なり、クロリド又はヨウダイドを示す請求項 1 又は 2 の錯体。

【請求項 4】

該 X 及び Y が両方ともクロリドを示す請求項 3 の錯体。

【請求項 5】

該 Am_1 がアンモニアを示す請求項 1～4 のいずれか 1 つの錯体。

【請求項 6】

該 Am_1 がメチルアミン、エチルアミン、 n -プロピルアミン、イソプロピルアミン、 n -ブチルアミン、 n -ヘキシルアミン、 n -ヘプチルアミン又は n -ノニルアミンから選ばれる第一級アミンを示す請求項 1～4 のいずれか 1 つの錯体。

【請求項 7】

該 Am_1 がジメチルアミン、ジエチルアミン、ジプロピルアミン、ジブチルアミンから選ばれる第二級アミンを示す請求項 1～4 のいずれか 1 つの錯体。

【請求項 8】

該 Am_1 がピペラジン、2-メチルピペラジン、ピペリジン、2-、3-もしくは4-ヒドロキシピペリジン、4-ピペリジノーピペリジン、ピロリジン、4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン及び3-アミノピロリジンから選ばれる非-平面状複素環式脂肪族アミンを示す請求項 1～4 のいずれか 1 つの錯体。

【請求項 9】

該 Am_1 がピリジン、2-、3-もしくは4-アミノピリジン、2-、3-もしくは4-ピコリン、キノリン、3-もしくは4-アミノキノリン、チアゾール、イミダゾール、3-ピロリン、ピラジン、2-メチルピラジン、4-アミノキナリジンから選ばれる複素環式芳香族アミンを示す請求項 1～4 のいずれか 1 つの錯体。

【請求項 10】

該 Am_2 がピペラジン、2-メチルピペラジン、ピペリジン、2-、3-もしくは4-ヒドロキシピペリジン、4-ピペリジノーピペリジン、ピロリジン、4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン及び3-アミノピロリジンから選ばれる非-平面状複素環式アミンを示す請求項 1～9 のいずれか 1 つの錯体。

【請求項 11】

トランスー $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(\text{ピペリジン})]$ ；
 トランスー $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(4\text{-ヒドロキシピペリジン})]$ ；
 トランスー $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(4\text{-ピペリジノーピペリジン})]$ ；
 トランスー $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(4, 4'\text{-ビピペリジン})]$ ；
 トランスー $[\text{PtCl}_2(4\text{-ピコリン})(\text{ピペリジン})]$ ；
 トランスー $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(\text{ピペラジン})] \cdot \text{HCl}$ ；
 トランスー $[\text{PtCl}_2(\text{イソプロピルアミン})(\text{ピペラジン})] \cdot \text{HCl}$ ；
 トランスー $[\text{PtCl}_2(n\text{-ブチルアミン})(\text{ピペラジン})] \cdot \text{HCl}$ ；
 トランスー $[\text{PtCl}_2(n\text{-ノニルアミン})(\text{ピペラジン})] \cdot \text{HCl}$ ；
 トランスー $[\text{PtCl}_2(\text{ピペリジン})(\text{ピペラジン})] \cdot \text{HCl}$ ；
 トランスー $[\text{PtCl}_2(4\text{-ピコリン})(\text{ピペラジン})] \cdot \text{HCl}$ ；
 トランスー $[\text{PtCl}_2(\text{ピペラジン})(\text{ピペラジン})] \cdot \text{HCl}$ ；
 トランスー $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)[4\text{-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン}]] \cdot$

HCl ;

から選ばれる請求項1の錯体。

【請求項12】

正に帯電している請求項1～10のいずれか1つの錯体。

【請求項13】

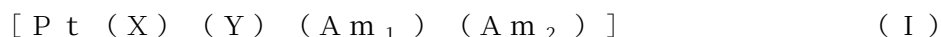
該リンカーが4, 7, 10-トリオキサー1, 13-トリデカン鎖を含んでなる請求項2の錯体。

【請求項14】

ビスー[{トランス, トランスー(PtCl₂ピペラジン)₂} (4, 7, 10-トリオキサー1, 13-トリデカンジアミン)]・2HClである請求項13の錯体。

【請求項15】

製薬学的に許容され得る担体ならびに活性成分として一般式：



[式中、

—X及びYは、同一もしくは異なることができ、ハロゲン、カルボキシレート、ホスフェート又はサルフェート基を示し；

—Am₁はアンモニア、第一級アミン、第二級アミン、非一平面状複素環式脂肪族アミン又は複素環式芳香族アミンから選ばれるアミンを示し；

—Am₂は非一平面状複素環式脂肪族アミンを示す]

のトランス立体配置にある白金(Pt)錯体であって、以下の化合物：

トランスー[Pt(ピペリジン)₂Cl₂]及びトランスー[Pt(モルホリン)₂Cl₂]を除く白金錯体の治療的に有効な量を含んでなる製薬学的組成物。

【請求項16】

活性成分がダイマー形態の該Pt錯体であり、そこにおいて各モノマー単位は、独立してAm₁を介して又はAm₂を介して又は該Am₁もしくはAm₂に連結したリンカーを介して他のPt錯体に結合している請求項18で定義されているPt錯体である請求項15の組成物。

【請求項17】

活性成分が、X及びYが同一もしくは異なり、クロリド又はヨウダイドを示す該Pt錯体である請求項15又は16の組成物。

【請求項18】

活性成分が、X及びYが両方ともクロリドを示す該Pt錯体である請求項17の組成物。

【請求項19】

活性成分が、該Am₁がアンモニアを示す該Pt錯体を含んでなる請求項15～18のいずれか1つの組成物。

【請求項20】

活性成分が、Am₁がメチルアミン、エチルアミン、n-プロピルアミン、イソプロピルアミン、n-ブチルアミン、n-ヘキシルアミン、n-ヘプチルアミン又はn-ノニルアミンから選ばれる第一級アミンを示す該Pt錯体を含んでなる請求項15～18のいずれか1つの組成物。

【請求項21】

活性成分が、Am₁がジメチルアミン、ジエチルアミン、ジプロピルアミン、ジブチルアミンから選ばれる第二級アミンを示す該Pt錯体を含んでなる請求項15～18のいずれか1つの組成物。

【請求項22】

活性成分が、Am₁がピリジン、2-, 3-もしくは4-アミノピリジン、2-, 3-もしくは4-ピコリン、キノリン、3-もしくは4-アミノキノリン、チアゾール、イミダゾール、3-ピロリン、ピラジン、2-メチルピラジン、4-アミノキナリジンから選ばれる複素環式芳香族アミンを示す該Pt錯体を含んでなる請求項15～18のいずれか1つの組成物。

【請求項 23】

活性成分が、 Am_1 がピペラジン、2-メチルピペラジン、2-ピラゾリン、ピペリジン、2-、3-もしくは4-ヒドロキシピペリジン、4-ピペリジノーピペリジン、ピロリジン、4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン又は3-アミノピロリジンから選ばれる非-平面状複素環式脂肪族アミンを示す該Pt錯体を含んでなる請求項15～18のいずれか1つの組成物。

【請求項 24】

活性成分が、 Am_2 がピペラジン、2-メチルピペラジン、2-ピラゾリン、ピペリジン、2-、3-もしくは4-ヒドロキシピペリジン、4-ピペリジノーピペリジン、ピロリジン、4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン又は3-アミノピロリジンから選ばれる非-平面状複素環式脂肪族アミンである該Pt錯体を含んでなる請求項15～23のいずれか1つの組成物。

【請求項 25】

該活性成分が、

- トランス— $[PtCl_2(NH_3)(\text{ピペリジン})]$ ；
- トランス— $[PtCl_2(NH_3)(4\text{-ヒドロキシピペリジン})]$ ；
- トランス— $[PtCl_2(NH_3)(4\text{-ピペリジノーピペリジン})]$ ；
- トランス— $[PtCl_2(NH_3)(4, 4'\text{-ビピペリジン})]$ ；
- トランス— $[PtCl_2(4\text{-ピコリン})(\text{ピペリジン})]$ ；
- トランス— $[PtCl_2(NH_3)(\text{ピペラジン})] \cdot HCl$ ；
- トランス— $[PtCl_2(\text{イソプロピルアミン})(\text{ピペラジン})] \cdot HCl$ ；
- トランス— $[PtCl_2(n\text{-ブチルアミン})(\text{ピペラジン})] \cdot HCl$ ；
- トランス— $[PtCl_2(n\text{-ノニルアミン})(\text{ピペラジン})] \cdot HCl$ ；
- トランス— $[PtCl_2(\text{ピペリジン})(\text{ピペラジン})] \cdot HCl$ ；
- トランス— $[PtCl_2(4\text{-ピコリン})(\text{ピペラジン})] \cdot HCl$ ；
- トランス— $[PtCl_2(\text{ピペラジン})(\text{ピペラジン})] \cdot HCl$ ；
- トランス— $[PtCl_2(NH_3)[4\text{-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン}]] \cdot HCl$ ；

から選ばれる請求項15の組成物。

【請求項 26】

該リンカーが4, 7, 10-トリオキサー1, 13-トリデカン鎖を含んでなる請求項16の組成物。

【請求項 27】

ビス— $[\{ \text{トランス, トランス—}(PtCl_2 \text{ ピペラジン})_2 \} (4, 7, 10\text{-トリオキサー1, 13-トリデカンジアミン})] \cdot 2HCl$ である請求項26の組成物。

【請求項 28】

該Pt錯体とDNAの間の付加物の形成を含んでなる治療的效果を達成するための請求項15～27のいずれか1つの組成物。

【請求項 29】

望ましくない細胞増殖の阻害を含んでなる治療的效果を達成するための請求項15～27のいずれか1つの組成物。

【請求項 30】

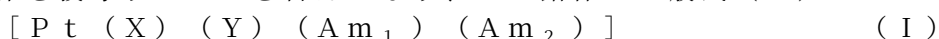
望ましくない細胞のアポトーシスを誘導するための請求項29の組成物。

【請求項 31】

リボソーム内に充填される請求項15～30のいずれか1つの組成物。

【請求項 32】

必要のある患者に治療的效果を達成するのに十分な量のトランス立体配置にあるPt-錯体を投与することを含んでなり、Pt錯体が一般式(I)：



[式中：

—X及びYは、同一もしくは異なることができ、ハロゲン、カルボキシレート、ホスフェート又はサルフェート基を示し；

—Am₁ はアンモニア、第一級アミン、第二級アミン、非—平面状複素環式脂肪族アミン又は複素環式芳香族アミンから選ばれるアミンを示し；

—Am₂ は非—平面状複素環式脂肪族アミンを示し、

ここで以下の化合物：

トランス—[Pt (ピペリジン)₂ Cl₂] 及びトランス—[Pt (モルホリン)₂ Cl₂] を除く]

から成る、治療的效果を達成するための方法。

【請求項 33】

該Pt—錯体がダイマーの形態にあり、そこにおいて各モノマー単位は、独立してAm₁ を介して、Am₂ を介して又は該Am₁ もしくはAm₂ に連結したリンカーを介して他の錯体に結合しているPt—錯体である請求項32の方法。

【請求項 34】

X及びYが同一もしくは異なり、クロリド又はヨーダイドを示すPt錯体を該患者に投与する請求項32又は33の方法。

【請求項 35】

X及びYが両方ともクロリドを示す請求項34の方法。

【請求項 36】

Am₁ がアンモニアを示すPt錯体を該患者に投与する請求項32～35のいずれか1つの方法。

【請求項 37】

Am₁ がメチルアミン、エチルアミン、n—プロピルアミン、イソプロピルアミン、n—ブチルアミン、n—ヘキシルアミン、n—ヘプチルアミン又はn—ノニルアミンから選ばれる第一級アミンを示すPt錯体を該患者に投与する請求項32～35のいずれか1つの方法。

【請求項 38】

Am₁ がジメチルアミン、ジエチルアミン、ジプロピルアミン、ジブチルアミンから選ばれる第二級アミンを示すPt錯体を該患者に投与する請求項32～35のいずれか1つの方法。

【請求項 39】

Am₁ がピリジン、2—、3—もしくは4—ピコリン、キノリン、3—もしくは4—アミノキノリン、チアゾール、2—、3—もしくは4—アミノピリジン、イミダゾール、3—ピロリン、ピラジン、2—メチルピラジン又は4—アミノキナリジンから選ばれる複素環式芳香族アミンを示すPt錯体を該患者に投与する請求項32～35のいずれか1つの方法。

【請求項 40】

Am₁ がピペラジン、2—メチルピペラジン、ピペリジン、2—、3—もしくは4—ヒドロキシピペリジン、4—ピペリジノーピペリジン、ピロリジン、4—(2—ヒドロキシエチル)ピペラジン及び3—アミノピロリジンから選ばれる非—平面状複素環式アミンを示すPt錯体を該患者に投与する請求項32～35のいずれか1つの方法。

【請求項 41】

Am₂ がピペラジン、2—メチルピペラジン、ピペリジン、2—、3—もしくは4—ヒドロキシピペリジン、4—ピペリジノーピペリジン、ピロリジン、4—(2—ヒドロキシエチル)ピペラジン又は3—アミノピロリジンから選ばれる非—平面状複素環式アミンを示す請求項の方法。

【請求項 42】

—トランス—[Pt Cl₂ (NH₃) (ピペリジン)]；

—トランス—[Pt Cl₂ (NH₃) (4—ヒドロキシピペリジン)]；

—トランス—[Pt Cl₂ (NH₃) (4—ピペリジノーピペリジン)]；

ートランスー [PtCl₂ (NH₃) (1, 4'-ビペリジン)] ;
 ートランスー [PtCl₂ (4-ピコリン) (ピペリジン)] ;
 ートランスー [PtCl₂ (NH₃) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (イソプロピルアミン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (n-ブチルアミン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (n-ノニルアミン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (ピペリジン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (4-ピコリン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (ピペラジン) (ピペラジン)] · HCl ;
 ートランスー [PtCl₂ (NH₃) [4-(2-ヒドロキシエチル) ピペラジン]] · HCl ;

から選ばれる白金錯体を該患者に投与することを含んでなる請求項32の方法。

【請求項43】

該リンカーが4, 7, 10-トリオキサー1, 13-トリデカン鎖を含んでなる請求項33の方法。

【請求項44】

治療的に有効な量のビスー [{トランス, トランスー (PtCl₂ ピペラジン)₂ } (4, 7, 10-トリオキサー1, 13-トリデカンジアミン)] · 2HCl を患者に投与する請求項43の方法。

【請求項45】

該Pt錯体とDNAの間の付加物の形成を含んでなる治療的効果を達成するための請求項32～44のいずれか1つの方法。

【請求項46】

望ましくない細胞増殖の阻害を含んでなる治療的効果を達成するための請求項32～44のいずれか1つの方法。

【請求項47】

望ましくない細胞のアポトーシスを誘導するための請求項46の方法。

【請求項48】

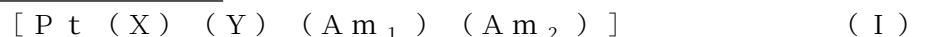
該Pt錯体をリポソーム内に充填する請求項32～47のいずれか1つの方法。

【請求項49】

抗ガン剤として用いるための請求項1～14のいずれか1つで定義されている白金錯体。

【請求項50】

一般式 (I) :



[式中:]

ーX及びYは、同一もしくは異なることができ、ハロゲン、カルボキシレート、ホスフェート又はサルエート基を示し；

ーAm₁ はアンモニア、第一級アミン、第二級アミン、非平面状複素環式脂肪族アミン又は複素環式芳香族アミンから選ばれるアミンを示し；

ーAm₂ は非平面状複素環式脂肪族アミンを示す]

の白金錯体であって、以下の化合物：

シスー [PtCl₂ (キノリン) (ピペリジン)] ; シスー [PtCl₂ (ピペリジン) (ピリジン)] ; シスー [PtCl₂ (ピペリジン) (o-CH₃-C₆H₄-NH₂)] ; シスー [PtCl₂ (ピペリジン) (p-CH₃-C₆H₄-NH₂)] ; シスー [PtCl₂ (モルホリン) (ピリジン)] ; シスー [PtCl₂ (モルホリン) (o-CH₃-C₆H₄-NH₂)] ; シスー [PtCl₂ (モルホリン) (p-CH₃-C₆H₄-NH₂)] ; シスー [PtCl₂ (ピペリジン) (アニリン)] ; シスー [PtCl₂ (ピペリジン) (o-CH₃OC₆H₄-NH₂)] ; シスー [PtCl₂ (ピペリジン) (p-C₂H₅OC₆H₄-NH₂)] ; シスー [PtCl₂ (キノリン) (シクロヘキシルアミン)] ; シスー [PtCl₂ (キノリン) (モルホリン)] ; シスー [

PtCl_2 (キノリン) (ピペリジン)] ; シスー [PtBr_2 (ピペラジン) (ピペラジン)] ; シスー [PtCl_2 (ピペラジン) (ピペラジン)] ; シスー [PtCl_2 (ピペリジン) (ピペリジン)] ; シスー [PtCl_2 (モルホリン) (モルホリン)] ; シスー [PtCl_2 (ピロリジン) (NH₃)] , シスー [PtI_2 (ピロリジン) (NH₃)] , シスー [PtICl (ピロリジン) (NH₃)] , シスー [PtCl_2 (ピペリジン) (NH₃)] , シスー [PtI_2 (ピペリジン) (NH₃)] , シスー [PtCl_2 (ピペリドン) (NH₃)] , シスー [PtI_2 (ピペリドン) (NH₃)] , シスー [PtICl (ピペリドン) (NH₃)] , シスー [PtCl_2 (3-ヒドロキシピロリジン) (NH₃)] , シスー [PtI_2 (3-ヒドロキシピロリジン) (NH₃)] , シスー [PtClI (3-ヒドロキシピロリジン) (NH₃)] , トランスー [Pt (ピペリジン)₂ Cl_2] 及びトランスー [Pt (モルホリン)₂ Cl_2] を除く白金錯体。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

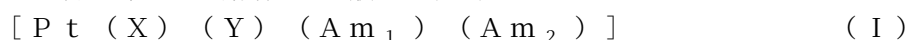
【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0011】

本発明は、必要のある患者に治療的効果を達成するのに十分な量の白金錯体を投与することを含み、Pt錯体が一般式 (I) :



[式中:

—X及びYは、同一もしくは異なることができ、ハロゲン、カルボキシレート、ホスフェート又はサルフェート基を示し;

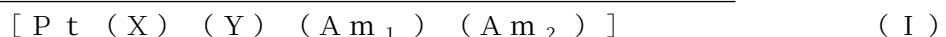
—Am₁ はアンモニア、第一級アミン、第二級アミン、非一平面状複素環式脂肪族アミン又は複素環式芳香族アミンから選ばれるアミンを示し;

—Am₂ は非一平面状複素環式脂肪族アミンを示し、

但し、該錯体がシス立体配置にある場合、Am₁ 及びAm₂ は同時にピペリジンを示すことはできない]

を含む治療的効果を達成するための方法にも関する。

さらに別の側面に従うと、本発明は一般式 (I) :



[式中:

—X及びYは、同一もしくは異なることができ、ハロゲン、カルボキシレート、ホスフェート又はサルフェート基を示し;

—Am₁ はアンモニア、第一級アミン、第二級アミン、非一平面状複素環式脂肪族アミン又は複素環式芳香族アミンから選ばれるアミンを示し;

—Am₂ は非一平面状複素環式脂肪族アミンを示す]

の白金錯体であって、以下の化合物:

シスー [PtCl_2 (キノリン) (ピペリジン)] ; シスー [PtCl_2 (ピペリジン) (ピリジン)] ; シスー [PtCl_2 — (ピペリジン) (o-CH₃-C₆H₄-NH₂)] ; シスー [PtCl_2 (ピペリジン) (p-CH₃-C₆H₄-NH₂)] ; シスー [PtCl_2 (モルホリン) (ピリジン)] ; シスー [PtCl_2 (モルホリン) (o-CH₃-C₆H₄-NH₂)] ; シスー [PtCl_2 (モルホリン) (p-CH₃-C₆H₄-NH₂)] ; シスー [PtCl_2 (ピペリジン) (アニリン)] ; シスー [PtCl_2 (ピペリジン) (o-CH₃O-C₆H₄-NH₂)] ; シスー [PtCl_2 (ピペリジン) (p-C₂H₅OC₆H₄-NH₂)] ; シスー [PtCl_2 (キノリン) (シクロヘキシルアミン)] ; シスー [PtCl_2 (キノリン) (モルホリン)] ; シスー [PtCl_2 (キノリン) (ピペリジン)] ; シスー [PtBr_2 (ピペラジン) (ピペラジン)] ; シスー [PtCl_2 (ピペラジン) (ピペラジン)] ; シスー [PtCl_2 (ピペリジン) (ピペリジン)] ; シスー [PtCl_2 (モルホリン) (モルホリン)] ; シ

スー $[\text{PtCl}_2(\text{ピロリジン})(\text{NH}_3)]$, シスー $[\text{PtI}_2(\text{ピロリジン})(\text{NH}_3)]$, シスー $[\text{PtICl}(\text{ピロリジン})(\text{NH}_3)]$, シスー $[\text{PtCl}_2(\text{ピペリジン})(\text{NH}_3)]$, シスー $[\text{PtI}_2(\text{ピペリジン})(\text{NH}_3)]$, シスー $[\text{PtCl}_2(\text{ピペリドン})(\text{NH}_3)]$, シスー $[\text{PtI}_2(\text{ピペリドン})(\text{NH}_3)]$, シスー $[\text{PtICl}(\text{ピペリドン})(\text{NH}_3)]$, シスー $[\text{PtCl}_2(3\text{-ヒドロキシピロリジン})(\text{NH}_3)]$, シスー $[\text{PtI}_2(3\text{-ヒドロキシピロリジン})(\text{NH}_3)]$, シスー $[\text{PtClI}(3\text{-ヒドロキシピロリジン})(\text{NH}_3)]$, トランスー $[\text{Pt}(\text{ピペリジン})_2\text{Cl}_2]$ 及びトランスー $[\text{Pt}(\text{モルホリン})_2\text{Cl}_2]$ を除く白金錯体に関する。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. Application No. PCT/IL 02/00687
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K31/28 C07F15/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K C07F		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EP0-Internal, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NGUYEN, HUU DINH ET AL: "1H-NMR spectra and structure of some Pt(II) complexes containing quinolin" TAP CHI HOA HOC (VIETNAM JOURNAL OF CHEMISTRY), vol. 39, no. 4, 2001, pages 111-114, XP001117912 ISSN: 0378-2336 the whole document --- -/--	1, 3, 4, 6, 7, 9, 18, 20, 21, 23-25, 34-36, 38, 40, 41, 43-45, 54-56, 58
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 November 2002		Date of mailing of the international search report 22/01/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Elliott, A

Patent Application No
PCT/IL 02/00687

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TRAN, THI DA ET AL: "Synthesis and biological effects of some complex cis-diamine compounds of platinum(II) containing piperidine or morpholine and some other amines" TAP CHI DUOC HOC, no. 6, 2001, pages 6-8, XP001119544 ISSN: 0258-6967 abstract; figure 1; table 1	1, 3, 4, 8-10, 18, 20, 21, 25-27, 34-36, 38, 40, 41, 45-47, 54-56, 58
X	TRAN, THI DA ET AL: "Syntheses and properties of some mixed cis-diamine Pt(II) complexes containing piperidine and aromatic amines" TAP CHI HOA HOC (VIETNAM JOURNAL OF CHEMISTRY), vol. 39, no. 3, 2001, pages 99-102, XP001117911 ISSN: 0378-2336 the whole document	1, 3, 4, 8, 10, 18, 20, 21, 26, 27, 34-36, 38, 40, 41, 46, 47, 54-56, 58
X	TRAN, THI DA ET AL: "Synthesis and properties of some mixed cis-diamine of platinum (II) containing quinoline" TAP CHI HOA HOC (VIETNAM JOURNAL OF CHEMISTRY), vol. 35, no. 2, 1997, pages 21-23, XP001119543 ISSN: 0378-2336 abstract; table 1	1, 3, 4, 8-10, 18, 20, 21, 25-27, 34-36, 38, 40, 41, 45-47, 54-56, 58
X	EP 0 727 430 A (JOHNSON MATTHEY PLC) 21 August 1996 (1996-08-21) the whole document	1, 3-15, 18, 20-31, 34-36, 38, 40-51, 54-56, 58
X	IVANOVA N A ET AL: "Coordination abilities of piperazine in platinum(II), platinum(IV) and palladium(II) complexes" RUSSIAN JOURNAL OF COORDINATION CHEMISTRY, vol. 19, no. 12, 1993, pages 856-863, XP001119659 the whole document	1, 3, 4, 8, 10-14

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		nal Application No PCT/IL 02/00687
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CATTALINI L ET AL: "The ci- and trans-effects of cyanide in substitution at platinum(II)" JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, DALTON TRANSACTIONS, 1993, pages 233-236, XP001119636 the whole document ----	1,3,4,8, 10-13
X	EP 0 273 315 A (SHIONOGI & CO) 6 July 1988 (1988-07-06) the whole document ----	1,3-5,8, 10-14, 18, 20-22, 26-31, 34-36, 38, 40-42, 46-50, 54-56,58
A	WONG E ET AL: "Current status of platinum-based anti-tumour drugs" CHEMICAL REVIEWS, vol. 99, no. 9, 1999, pages 2451-2466, XP002220406 cited in the application the whole document -----	1-58

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/IL 02/00687
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. ☒ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 38-57 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compounds.	
2. ☒ Claims Nos.: 1-11, 13, 15, 16, 18-28, 30, 32, 34-37 (all partially) because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:	
1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest	
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.	
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

International Application No. PCT/IL 02 00687

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-11, 13, 15, 16, 18-28, 30, 32, 34-37 (all partially)

The initial phase of the search revealed a very large number of documents possibly relevant to the issue of novelty of the subject-matter of claim 1; in this respect the search was complicated by the fact that it was not facile to determine which of the documents possibly relevant to the question of novelty contained the group Am2, Am2 being a non-planar heterocyclic aliphatic amine. For these reasons, a meaningful search over the whole breadth of the claims was deemed impossible. Consequently, the search has been restricted to compounds where X and Y are both chloride (as in claim 4) and where Am1 and Am2 are as stipulated in claims 5-10. Hence only compound claims 12, 14 and 17 have been searched in their entirety. Likewise for pharmaceutical composition claims 29, 31 and 33. The method of treatment claims have been searched for the therapeutic effects as mentioned in claims 55, 56 and 58.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/IL 02/00687

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0727430	A	21-08-1996	AT 202111 T 15-06-2001
			AU 707814 B2 22-07-1999
			AU 4225896 A 22-08-1996
			CA 2169019 A1 15-08-1996
			DE 69613254 D1 19-07-2001
			DE 69613254 T2 20-09-2001
			DK 727430 T3 03-09-2001
			EP 0727430 A1 21-08-1996
			ES 2157399 T3 16-08-2001
			FI 960660 A 15-08-1996
			GR 3036513 T3 31-12-2001
			JP 3219235 B2 15-10-2001
			JP 8259581 A 08-10-1996
			NO 960569 A 15-08-1996
			NZ 280946 A 26-05-1997
			PT 727430 T 30-11-2001
			TW 432068 B 01-05-2001
			US 5665771 A 09-09-1997
			ZA 9600885 A 14-08-1996
EP 0273315	A	06-07-1988	AT 73814 T 15-04-1992
			CA 1327039 A1 15-02-1994
			DE 3777583 D1 23-04-1992
			EP 0273315 A1 06-07-1988
			ES 2032430 T3 16-02-1993
			GR 3004629 T3 28-04-1993
			JP 63264492 A 01-11-1988
			KR 9003457 B1 19-05-1990
			US 4902797 A 20-02-1990

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C O 7 D 211/58	C O 7 D 211/58	
C O 7 D 295/02	C O 7 D 295/02	A
// C O 7 M 1:00	C O 7 D 295/02	Z
	C O 7 M 1:00	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ナジヤイレ, ユーセフ
イスラエル・ベイトジヤラ・アパートメントナンバー 10・フアエズオマルビルディング・エー
サヘルストリート

(72)発明者 カザノブ, エレナ
イスラエル・99000ラマトベイトシエメシユ・シユデロトハーヤルコン18/8

Fターム(参考) 4C054 AA02 CC01 DD01 EE01 FF01 FF24 FF28

4C076 AA19 BB11 CC27 FF31 FF67

4C086 AA01 AA02 AA03 DA32 MA01 MA24 MA66 NA05 NA14 ZB21

ZB26