

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 854301 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **854301**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
A61K

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **01.11.1985**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **01.11.1985**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **02.05.1986**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

03.11.1984 GB 8427767 16.11.1984 GB 8429030

11.02.1985 GB 8503432

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Johnson Matthey Public Limited Company, 78 Hatton Garden, London EC1N 8JP, ISO-BRITANNIA, (GB)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Stoddart, James Fraser, United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)

2 • Alston, David Robert, United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Seppo Laine Oy, PL 339, 00181 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Solubilisoitu platinayhdiste.

Solubiliserad platinaförening.

Solubilisoitu platina-yhdiste

Tämän keksinnön kohteena ovat platina-yhdisteet, jotka on tarkoitettu käytettäväksi syöpäkemoterapiassa. Etenkin se saa aikaan platina-koordinaatioyhdisteen, joka solubilisoidaan eli tehdään liukenevaksi jotta se olisi helpommin annettavissa ja/tai assimiloituva isoon verenkiertoon.

Rosenberg:in tekemän alkuhavainnon jälkeen, jonka mukaan "cisplatinana" tunnettu yhdiste on aktiivinen syövän vastainen lääke, on useiden tutkimusryhmien toimesta yritetty saada aikaan yhdisteitä, jotka ovat joko aktiivisempia ja/tai vähemmän toksisia ja/tai liukenevampia vesipitoiseen väliaineeseen. Kun liukenevuus on parempi, yhdiste pystyy muodostamaan konsentroidumman liuoksen joko parenteraalista tai oraalista käyttöä varten, jolloin voidaan päästä korkeampaan verikonsentraatioon tai jolloin voidaan saada sopiva tapalisiä annostustasoa. Näin on etenkin silloin, kun potilaalla on korkea platinan eritystaso ja/tai milloin lääke on suhteellisen ei-toksinen. Parantunut liukenevuus tekee yhdisteet myös helpommin käsiteltäviksi sekä jakelussa että varastoinnissa ja myös klinikalla. Milloin on toivottavaa lisätä liukenevuutta vesipitoiseen väliaineeseen, on viime aikoina ehdotettu, että molekyyliin sisällytetään yksi tai useampi solubilisoiva ryhmä, kuten karboksyylihappo tai sulfonihappo, tai että yhdiste valmistetaan jonkin tällaisen hapon anionina yhdessä vesiliukoisen, sopivimmin alkalimetallikationin kanssa. Tällaisilla ehdotuksilla on kuitenkin ollut vähän menestystä, koska määrätyn yhdisteen aktiivisuus on selvästi ollut suhteessa johonkin luonteenomaiseen ominaisuuteen tai osuuteen pikemminkin kuin puhtaasti sen liukenevuuteen. Jopa yrityksillä parantaa niiden yhdisteiden liukenevuutta, joilla on luonteenomaisesti korkeampi aktiivisuus kuin cisplatinalla, on ollut vähän menestystä.

Eräs yhdiste, joka tällä hetkellä näyttää lupaavalta toisen "sukupolven" lääkkeeltä, on yhdiste 1,1-syklobutaanidi-

karboksylaatti-diamiiniplatina(II), joka on esitetty julkaisussa GB 1,380,228. Tämän yhdisteen liukenevuudeksi mainitaan kirjallisuudessa 18,5 mg/ml (50 mmolaarinen) (Cleare et al., Biochemie, 1978, osa 60, s. 835-850). Tämä yhdiste on suhteellisen ei-toksinen verrattuna muihin platinaa sisältäviin yhdisteisiin, etenkin cis-platinaan, jossa annosta rajoittavana tekijänä on munuaistoksisuus. Tämä vaikutus pienenee huomattavasti ja muut sivuvaikutuksia, kuten myelosupressio ja pahoinvointi lievenevät käytettäessä 1,1-syklobutaanidikarboksylaatti-diamiiniplatina(II):a.

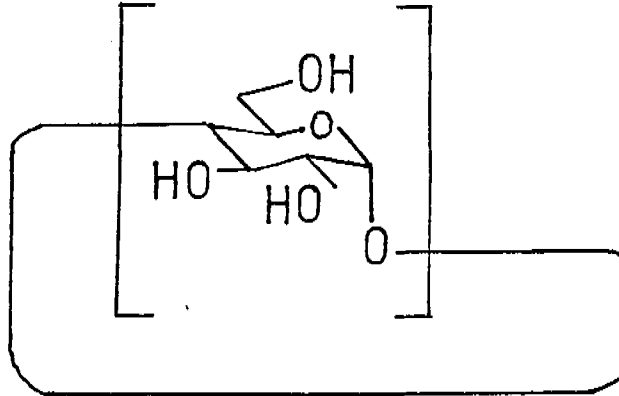
On tunnettua, että eräiden farmakologisesti aktiivisten yhdisteiden liukenevuutta vesipitoisiin väliaineisiin parannetaan muodostamalla niiden inkluusioyhdisteitä α -, β - ja/tai γ -syklodekstriinin kanssa. Tähän mennessä yritykset muodostaa platina-koordinaatioyhdisteiden inkluusioyhdisteitä syklodekstriinien kanssa eivät kuitenkaan ole onnistuneet. Siitä syystä on yleisesti uskottu, että tällaisia inkluusioyhdisteitä ei voida valmistaa. Olemme kuitenkin todenneet, että yhdisteen 1,1-syklobutaanidikarboksylaatti-diamiiniplatina(II):n syklobutaani-osa voidaan sisällyttää erään tietyn syklodekstriinin, nimittäin α -syklodekstriinin rengasrakenteeseen inkluusioyhdisteen muodostamiseksi ja että mainitun inkluusioyhdisteen liukenevuus vesipitoiseen väliaineeseen on suunnilleen 4 kertaa suurempi kuin alkuperäisen yhdisteen.

Tästä syystä tämä keksintö saa siten aikaan 1,1-disyklobutaanidikarboksylaatti-diamiiniplatina(II):n ja α -syklodekstriinin inkluusioyhdisteen.

Keksintö saa myös aikaan farmaseuttisen koostumuksen, joka sisältää 1,1-syklobutaanidikarboksylaatti-diamiiniplatina(II):n ja α -syklodekstriinin inkluusioyhdisteen sekoitettuna tai liuotettuna inertin farmaseuttisesti sopivan laimentimen, kantoaineen tai liuottimen kanssa valinnaisesti yksiköannosmuodossa.

Sopivimmin liuottimena on vesi. Valinnaisesti keksinnön mukaiset koostumukset voivat sisältää lisäaineita, kuten stabilointiaineita.

α -syklodekstriini on syklinen oligosakkaridi, joka koostuu 6 glukoosiyksiköstä ja sen kemiallinen kaava on seuraava:



Keksinnön mukaisissa inkluusiyhdisteissä platinayhdisteen ja syklodekstriinin moolisuhde on yleisesti 1:1, koska tämä suhde antaa maksimaalisen liukenevuuden lisääntymisen, vaikkakin määrättyissä tarkoituksissa voi olla toivottavaa, että käytetään syklodekstriinin ylimäärää.

Kvantitatiivinen todiste keksinnön mukaisen parhaimpana pidetyn yhdisteen, s.o. α -syklodekstriinin ja 1,1-syklobutaanidikarboksylaatti-diamiiniplatina(II):n 1:1-yhdisteen [josta tämän jälkeen käytetään lyhennettä: $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\cdot\text{CBDCA}$] muodostuksesta on määrätty vesiliukenevuudella: lähes 200 mM:n konsentraatiot voidaan saada aikaan huoneenlämpötiloissa, kun käytetään α -syklodekstriinin vesiliuosta (0,6 mooliekv.) platinakompleksin liuottamiseksi verrattuna 50 mM:n konsentraatioihin ilman α -syklodekstriiniä. Siten keksintö saa myös aikaan vesiliuoksen, joka sisältää yhdisteen 1,1-syklobutaanidikarboksylaatti-diamiiniplatina(II):a ja jossa yhdiste on läsnä 1:1-inkluusiyhdisteinä α -syklodekstriinin kanssa ja konsentraatio on suurempi kuin 50 mM, sopivimmin 50 - 200 mM, huoneenlämpötilassa.

Parhaimpana pidetyn yhdisteen rakennemäärittystä selitetään seuraavassa oheisiin piirustuksiin viitaten.

Kuvio 1 esittää assosiaation moolientalpiaa α -syklodekstriinin molaalisuuden funktiona.

Kuvio 2 esittää kaaviota H-3-protonien korjatuista kemiallisista siirtymistä α -syklodekstriinissä (a) ja

H-a-protonien korjatuista kemiallisista siirtymistä Pt(NH₃)₂.CBDCA:ssa (b) sitoutuneen osamäärän funktiona,

Kuvio 3 on tasokuva yhdisteen kiderakenteesta

Kuvio 4 on sivukuva kuvion 4 rakenteesta ja

Kuvio 5 on tilaesitys kuvioiden 3 ja 4 mukaisesta rakenteesta.

Olemme tutkineet assosiaatiovakiota keksinnön mukaiselle edulliselle yhdisteelle mikrokalorimetrisesti, jolloin mitataan platina(II)-yhdisteen ja α-syklodekstriinin liuosten sekoituksesta kehittyvä lämpö, sekä myös käyttämällä ¹HNM-spektroskopiaa.

Mikrokalorimetrisiä tutkimuksia varten platinakompleksin (0,02366 moolia kg⁻¹) vedessä oleva liuos sekoitettiin α-syklodekstriinin joidenkin vesiliuosten kanssa (konsentraatiot olivat n. 0,01 - 0,1 moolia kg⁻¹) eräkalorimetrisessä, joka toimi 25°C:ssa. Sarja alustavia tutkimuksia suoritettiin niin, että voitiin tehdä korjaukset kahden liuoksen laimennuksen entalpiasta syntyneille vaikutuksille. Lauseke, joka yhdistää Pt(NH₃)₂.CBDCA:n moolia kohden lasketun entalpiamuutoksen (ΔH) ja tämän vieraan (G) ja α-syklodekstriinisisännän (H) lopulliset molaalisuudet sekä tasapainovakion (K_a) ja tasapainotilan standardientalpiamuutoksen (ΔH[⊖])



$$\text{on } \underline{K}_a = \underline{\Delta H} \cdot \Delta H^{\ominus} / (\Delta H^{\ominus} [H] - \Delta H [G]) (\Delta H^{\ominus} - \Delta H) \quad (1).$$

Yhtälö (1) ratkaistiin käyttämällä epälineaarista pienimmän neliösumman laskentarutiinia, jolloin saatiin $\underline{K}_a = 199 \pm 10$ moolia⁻¹ kg ja $\Delta H^{\ominus} = -21,0 \pm 2,0$ kJ moolia⁻¹. Tulokset esitetään kuviossa 1, joka esittää Pt(NH₃)₂.CBDCA:n ja α-syklodekstriinin assosiaation moolientalpiaa α-syklodekstriinin molaalisuuden funktiona. Kuviossa täytetyt ympyrät osoitta-

vat kokeellisia tuloksia ja viivat osoittavat yhtälöstä (1) saatua analyysiä. Nähdään, että saadaan aikaan hyvä korrelaatio teorian ja käytännön välillä.

Spektroskooppista tarkastelua varten suoritettiin kahdentyyppistä spektroskooppista tutkimusta D_2O :ssa n. $22^\circ C$:ssa käyttämällä Bruker AM250FT-spektrometriä. Ensimmäisessä koesarjassa tutkittiin $Pt(NH_3)_2.CBDCA:n$ ja α -syklodekstriinin ekvimolaarisia liuoksia erilaisina laimennuksina ja toisessa koesarjassa platinakompleksin konsentraatio pidettiin vakiona ja α -syklodekstriinin konsentraatiota vaihdeltiin. Käsiteltäessä kemiallisia siirtymätietoja, suoritettiin korjaukset α -syklodekstriinin itseassosioitumisen huomioon ottamiseksi. Kuvio 2 esittää korjattuja α -syklodekstriinin H-3-protonien ja $Pt(NH_3)_2.CBDCA:n$ H-protonien kemiallisia siirtymiä sitoutuneen osamäärän funktiona. Viimeksi mainittu laskettiin tasapainovakiosta, joka oli korjattu mikrokalorimetrisesti saadun akvamolaaliseen asteikon mukaiseksi. Kuvion 2 tarkastelusta nähdään, että on olemassa erinomainen yhtäpitävyys NMR- ja termodynaamisten tulosten välillä. Tasapainovakion ja vakion entalpia- ja entropia- ($\Delta S^\circ = -27 \text{ J K}^{-1} \text{ moolia}^{-1}$) muutosten arvot, jotka on esitetty kuviossa 2, osoittavat, että $Pt(NH_3)_2.CBDCA$:lla on hyvin selvä pyrkimys assosioitua α -syklodekstriinin kanssa vedessä.

H-3:n ja H-5:n kemiallisten siirtymien suuruudet α -syklodekstriinin muiden glukopyranoosi-protonien ja H-a:n ja H-b:n kohdalla $Pt(NH_3)_2.CBDCA:n$ CBDCA-ligandissa havaittavien, suurien siirtymien suhteen osoittavat, että nämä isäntä- ja vierasprotonien parit ovat lähekkäin, eli vieraan CBDCA-ligandi tunkeutuu isännän onteloon.

Olemme myös valmistaneet yllä esitetyn keksinnön mukaisen edullisen yhdisteen kiteitä jäädyttämällä ja haihduttamalla hitaasti α -syklodekstriinin (105 mg/1 ml) kuuma ($80^\circ C$), kyllästetty vesiliuos, joka myös oli kyllästetty platina(II)-yhdisteellä (34,7 mg). Muodostuvia kiteitä (sp. $235-255^\circ C$) tutkittiin röntgenkristallografiolla, joka vahvisti, että

platina(II)-yhdisteen syklobutaanirengas on sitoutunut α -syklodekstriinin ontelon sisäpuolelle, jolloin on mahdollista, että on muodostunut vetysidoksia α -syklodekstriinin sekundaarisista hydroksyyliiryhmistä platina(II)-yhdisteen sekä karbonyylihappiatomeihin että amiiniligandeihin.

Kidearvot saatiin Nicolet R3m-diffraktometrillä Cu-K α -säteilytyksellä (grafiittimonokromaattori) käyttämällä ω -pyyhkäisyjä.

Arvot olivat seuraavat:

$C_{42}H_{82}O_{39}N_2Pt$, $M = 1434,1$, ortorombininen, tilaryhmä $P2_12_12_1$, $a = 10.102(2)$, $b = 13.526(4)$, $c = 41.971(9)$ Å, $U = 5735$ Å³, $Z = 4$, $\mu(\text{Cu-K}) = 55 \text{ cm}^{-1}$, $D_c = 1,67 \text{ g cm}^{-3}$.

Rakenne liuotettiin raskasatomimenetelmällä ja puhdistettiin anisotrooppisesti käyttämällä absorptio-korjattuja arvoja $R = 0,041$, $R_w = 0,044$ yleisesti 4211 itsenäiselle heijastukselle [$\theta < 58^\circ$, $|F_o| > 3\sigma(|F_o|)$].

Kiderakenne on esitetty kuvioissa 3, 4 ja 5. Kuviot 3 ja 4 esittävät taso- ja vastaavasti sivukuvia 1:1-adduktin runkoesityksistä. Kuvion 5 tilaesitys osoittaa $Pt(NH_3)_2 \cdot \text{CBDCA}$:n syklobutaanirengaan tunkeutumisasasteen α -syklodekstriiniin. Syklodekstriinillä on luonteenomainen avoin hieman kauhamainen muoto, jossa on paikallinen pseudo- C_6 -symmetria. Sidokompleksi sijoittuu siten, että syklobutaanirengas suuntautuu suunnilleen α -syklodekstriini-toruksen keskiosan päälle, jolloin sen taso on yhdensuuntainen isännän '6-kertaisen' akselin suhteen. Syklobutaanirengas on sovitettu α -syklodekstriiniin siten, että se on 1,03 ja vastaavasti 0,35 Å happiatomien keskitason alapuolella, jotka atomit ovat liittyneet 12 sekundaariseen hydroksyyliiryhmään. Hiiliatomi C(7) on 0,94 Å kuuden glykosidi-happiatomin keskitasossa. Amiiniligandit suuntautuvat suurimmaksi osaksi yhden α -D-glykopyranoosi-yksikön päälle, joka on puolestaan huomattavasti kallistuneempi α -syklodekstriini-isännän perusakselin suhteen. Amiiniligandien ja tämän syklodekstriini-molekyylin

välissä on kaksi [N---H...O]-vetysidosta, yksi N(1):n ja O(13):n välissä, pituuden ollessa 3,14 Å, ja toinen N(2):n ja O(63):n välissä, pituuden ollessa 2,94 Å. Yllättäen CBDCA-karbonyylihappiatomien ja isäntä-syklodekstriini-molekyylin sekundaaristen hydroksyyli-ryhmien välillä ei esiinny vetysidoksia. Kuitenkin vetysidoksia on sekä näistä karbonyylihappiatomista että amiinivetyatomeista symmetriäläheisiin syklodekstriinimolekyyleihin. Samoin vetysidoksia on viiden vesimolekyylin ja sekä α-syklodekstriinihydroksyyli-ryhmien että Pt(NH₃)₂CBDCA-karbonyylihappiatomien ja amiinivetyatomien välissä.

Keksinnön kohteena on myös menetelmä 1,1-syklobutaanidikarboksylaatti-diamiiniplatina(II):n ja α-syklodekstriinin inkluusioyhdisteen valmistamiseksi vesipitoisessa liuoksessa, jonka menetelmän mukaan lisätään toinen yhdisteistä vesiliuokseen, joka sisältää toisen yhdisteistä. Vaihtoehtoisesti inkluusioyhdiste voidaan valmistaa jauhemuodossa lyofilisoimalla muodostuva vesiliuos.

Kokeita suoritettiin Pt(NH₃)₂.CBDCA:n ja α-syklodekstriinin 1:1-inkluusioyhdisteen farmakokineettisten ja toksisuusominaisuuksien määrittämiseksi ja niitä verrattiin yksinään käytetyn Pt(NH₃)₂.CBDCA:n vastaaviin arvoihin. Etenkin tutkittiin platinan jakautumista vereen, virtsaan ja ulosteisiin sen jälkeen, kun yhdistettä oli annettu intravenöösisesti, ja in vitro-sytotoksisuus mitattiin samoin kuin in vivo hematotoksisuus ja nefrotoksisuus. In vivo-tutkimuksia varten koe-eläimet olivat kaikissa tapauksissa koiraspuolisia Wistar-albinorottia. Yleisesti todettiin, että yhdisteet olivat samanlaisia annettaessa niitä vereen. Molempien kohdalla veren platinan kaksifaasinen hajoaminen oli samanlainen, ulostetasot olivat samanlaisia Pt-erityksen ollessa 4-5 % 24 tunnissa ja virtsan tasot olivat samanlaisia Pt-erityksen ollessa 65-67 % 24 tunnissa. In vitro-toksisuustestit osoittivat, että yhdisteiden toksisuus oli samanlainen CHO- ja HeLa-solujen suhteen, eikä HeLa-solujen kohdalla todettu mitään merkittävää ajasta riippuvaa eroa lääkkeen eri inklu-

baatioaikoina (ajat vaihtelivat 0,25 - 3 tunnin välillä), yhdisteen konsentraation ollessa 1,0 mM. Testattaessa hematoksisuutta ja nefrotoksisuutta verinäytteet otettiin 1., 4., 8., 12. ja 16. päivänä pistoksen jälkeen ja ne analysoitiin hematokriitin, valkoisten verisolujen kokonaismäärän, erilaisten valkoisten verisolujen määrän ja plasman ureatypen määrittämiseksi. Munuaiset tutkittiin myös histologisesti. Näiden kahden testiyhdisteen väliset tulokset olivat samanlaisia, vaikkakin keksinnön mukainen yhdiste näytti tuottavan hieman pienemmän aneemisen ja myelosuppressiivisen reaktion. Plasman ureatyyppitasot pysyivät vakioina tutkimusjakson aikana, mikä ei osoittanut mitään suurta nefrotoksisuutta. Tämä oli yhtäpitävä uriinin proteiinitasojen mittausten kanssa, joissa ei havaittu mitään selvää proteinuriaa kolmen päivän aikana. Munuaisten muutamia ydinsuurentumia ilmeni histologisessa tarkastelussa.

Yllä esitetyt tulokset osoittavat, että keksinnön mukainen yhdiste on vähintään yhtä hyvä kuin 1,1-syklobutaanidikarboksylaattidiammiiniplatina(II) farmakokinetiikassaan ja toksisuudessaan, jolloin inkluusioyhdisteen olennaisesti parantunut liukenevuus on merkittävä mitä tulee käsittelymukavuuteen ja kliiniseen käyttöön.

Patenttivaatimukset:

1. 1,1-syklobutaanidikarboksylaatti-diamiiniplatina(II):n ja α -syklodekstriinin inkluusioyhdiste.
2. Farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se käsittää 1,1-syklobutaanidikarboksylaatti-diamiiniplatina(II):n ja α -syklodekstriinin inkluusioyhdisteen sekoitettuna tai liuotettuna inertin, farmaseuttisesti sopivan laimentimen, kantoaineen tai liuottimen kanssa.
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että yhdiste on liuotettu veteen.
4. Farmaseuttinen koostumus, joka koostuu yhdisteen 1,1-syklobutaanidikarboksylaatti-diamiiniplatina(II):n vesiliuoksesta, t u n n e t t u siitä, että mainittu yhdiste on läsnä α -syklodekstriinin kanssa muodostettuna 1:1-inkluusioyhdisteenä ja sen konsentraatio on yli 50 mM huoneenlämpötilassa.
5. Jonkin patenttivaatimuksen 2, 3 tai 4 mukainen koostumus t u n n e t t u siitä, että se on yksikköannostusmuodossa.
6. Menetelmä 1,1-syklobutaanidikarboksylaatti-diamiiniplatina(II):n ja α -syklodekstriinin inkluusioyhdisteen valmistamiseksi vesiliuoksessa, t u n n e t t u siitä, että toinen yhdisteistä lisätään vesiliuokseen, joka sisältää toisen yhdisteistä.
7. Menetelmä 1,1-syklobutaanidikarboksylaatti-diamiiniplatina(II):n ja α -syklodekstriinin inkluusioyhdisteen valmistamiseksi jauhemuodossa, t u n n e t t u siitä, että lyofilisoidaan patenttivaatimuksen 5 mukaisen menetelmän tuote.
8. Menetelmä syövän hoitamiseksi ihmisessä ja eläimissä, t u n n e t t u siitä, että annetaan tehokas määrä 1,1-syklobutaanidikarboksylaatti-diamiiniplatina(II):n ja α -syklodekstriinin inkluusioyhdistettä.

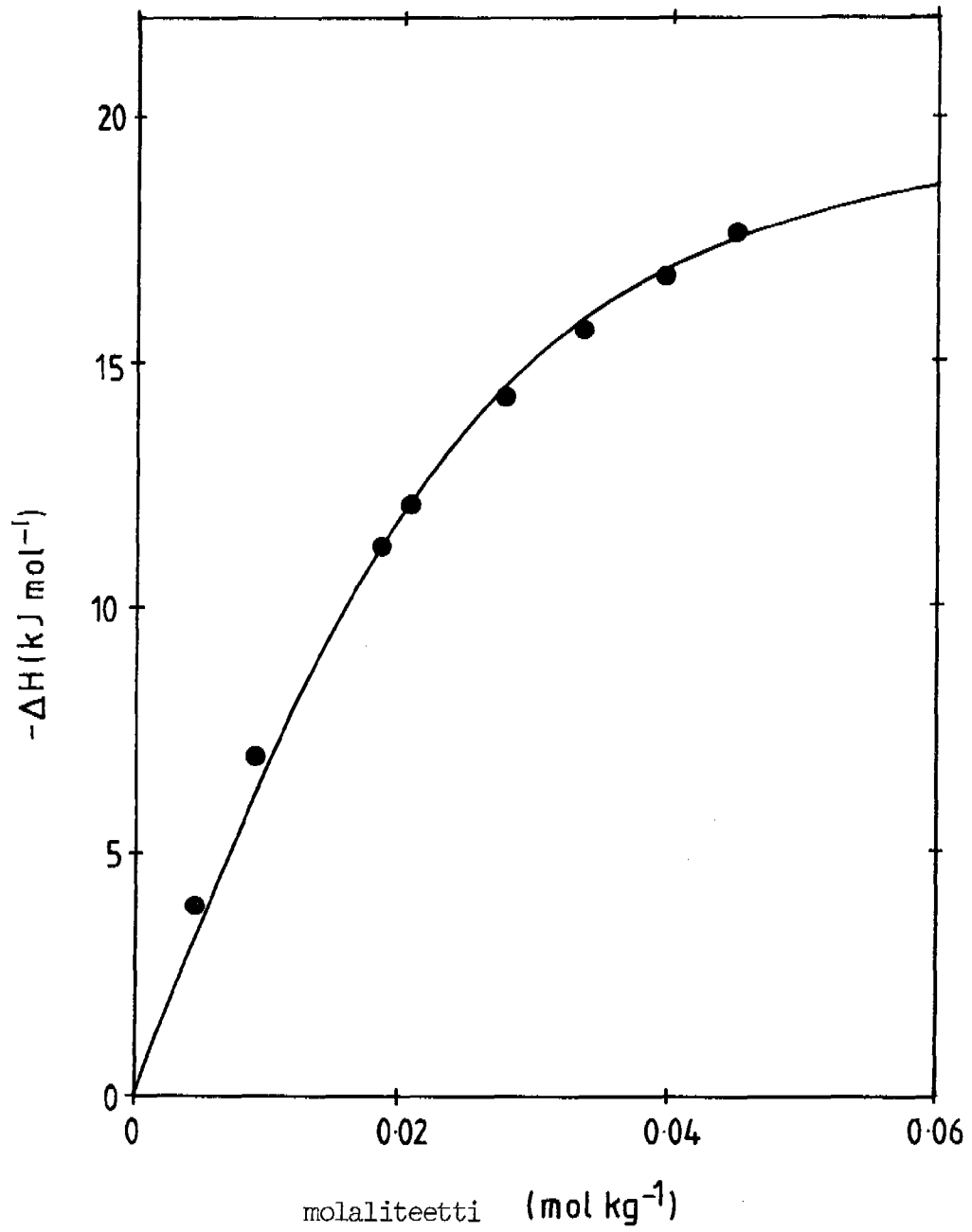


Fig.1.

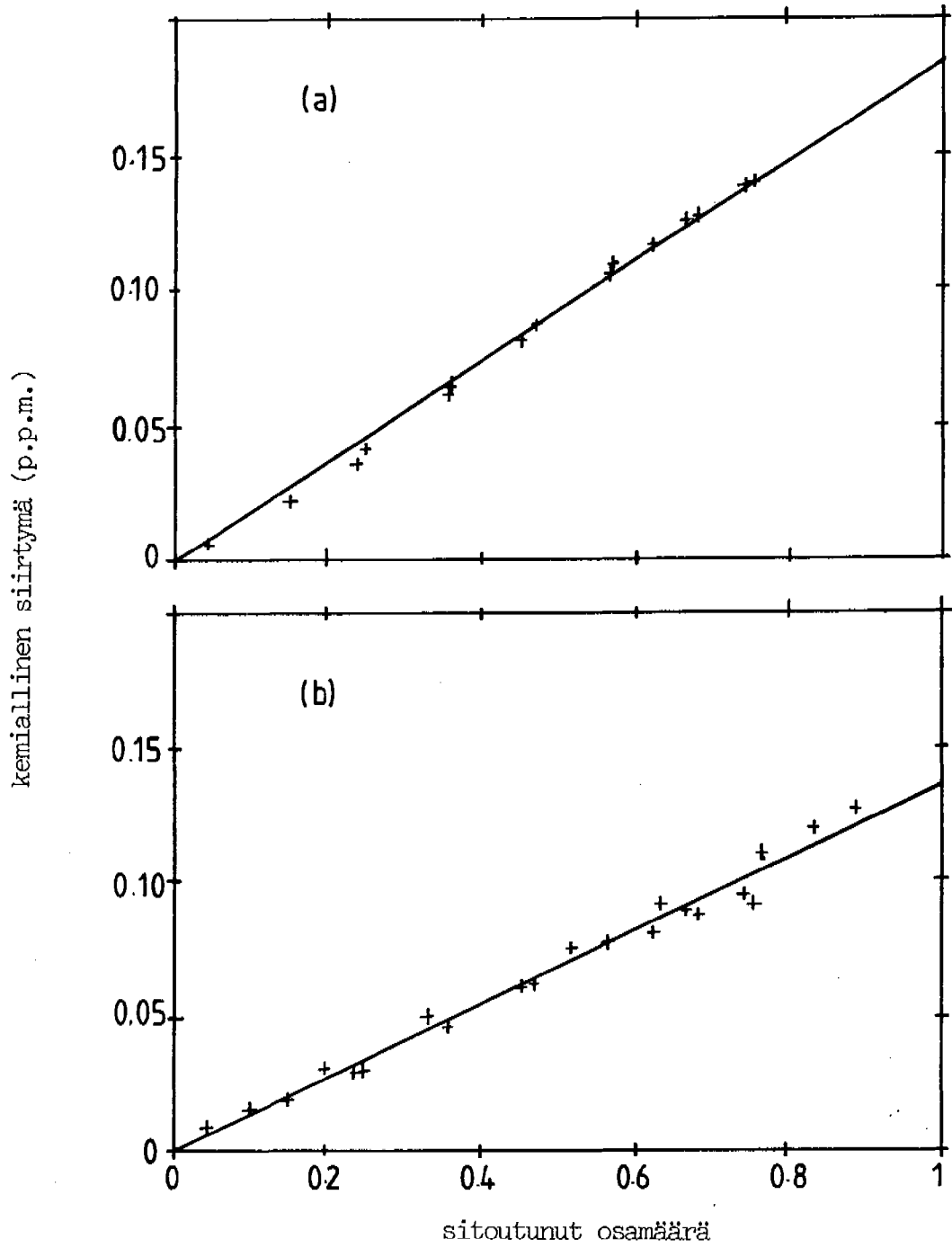


Fig.2.

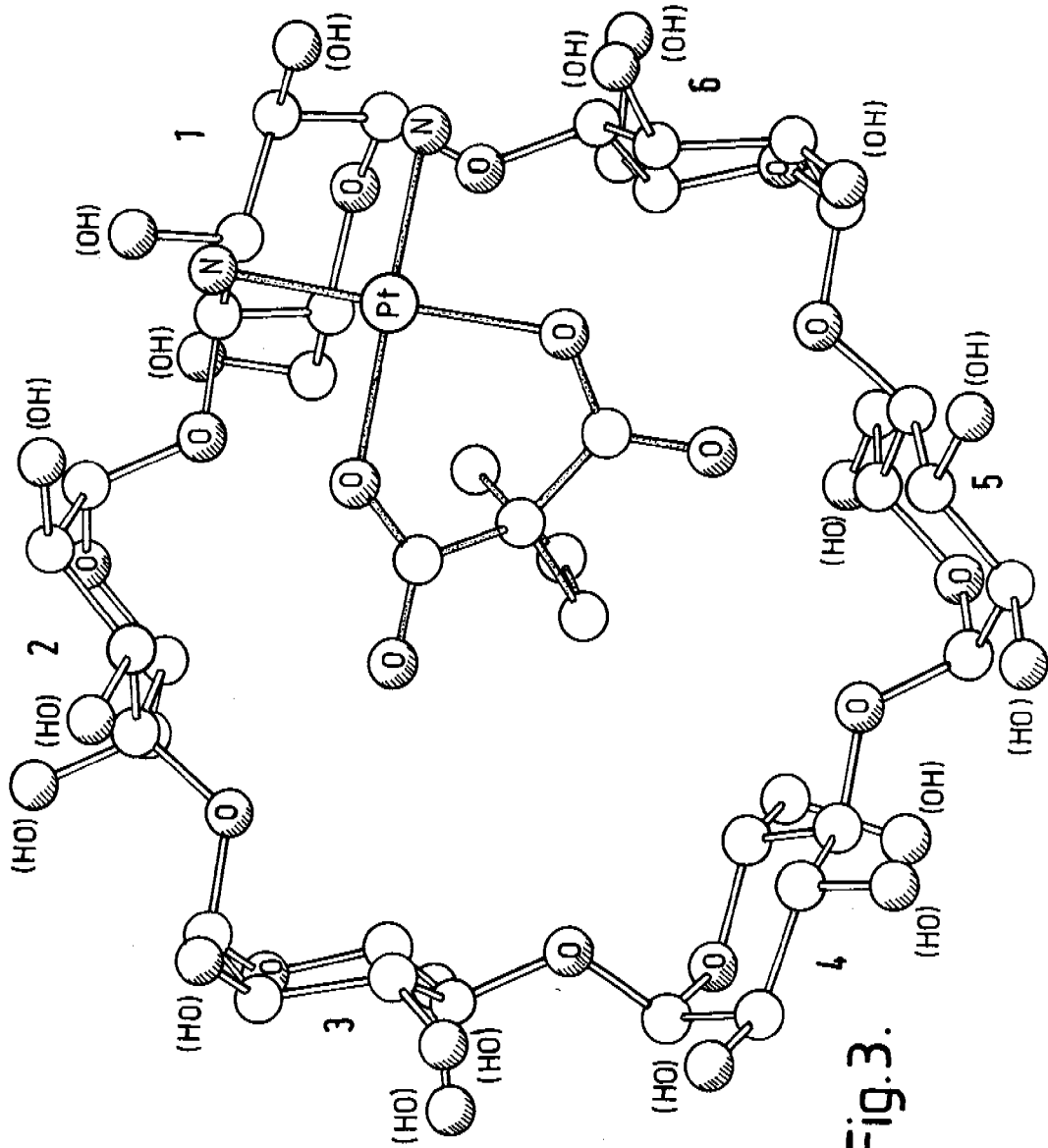


Fig.3.

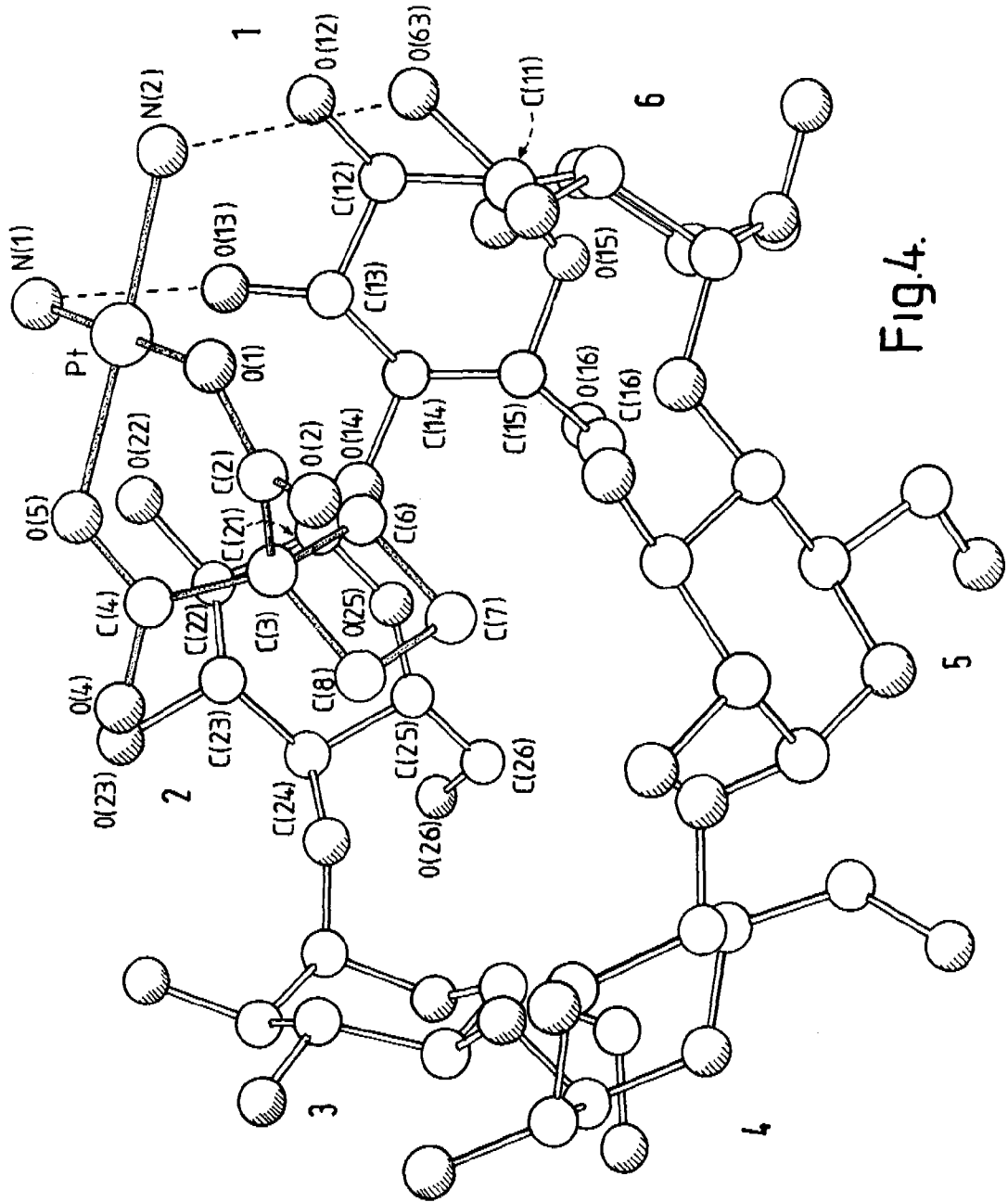


Fig.4.

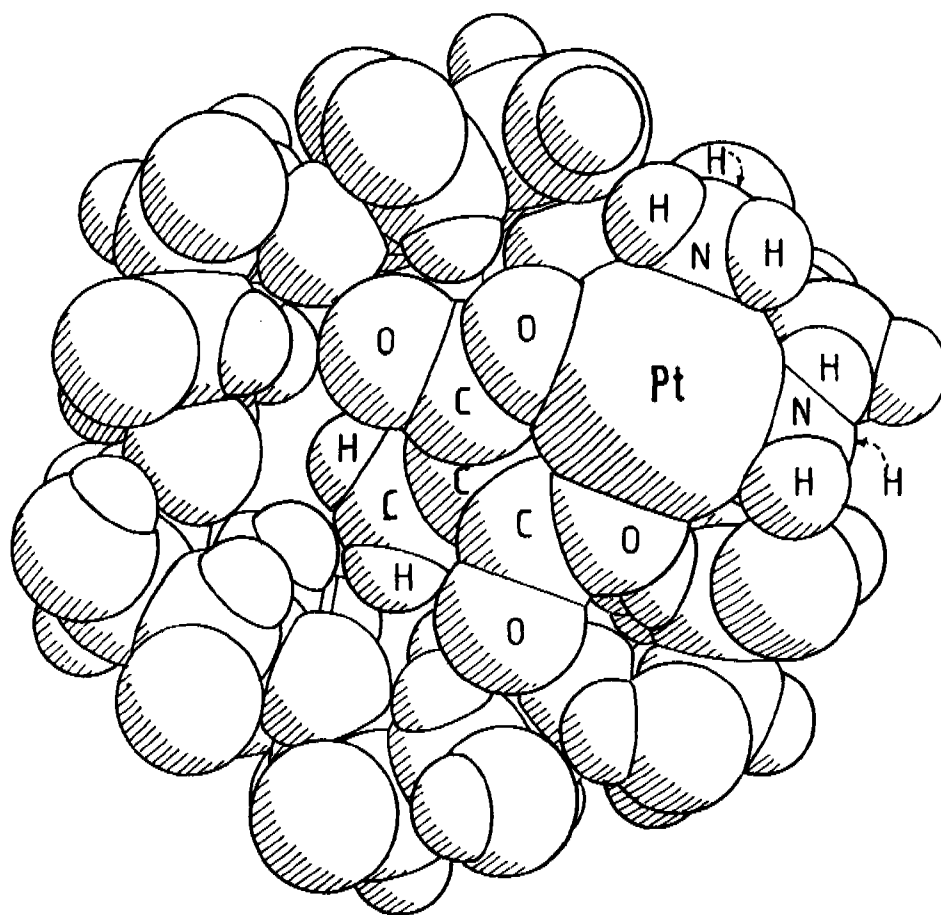


Fig. 5.