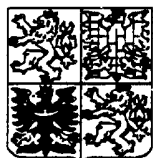


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **3252-92**

(22) Přihlášeno: 29. 10. 92

(30) Právo přednosti:
29. 10. 91 PL 91/292220

(40) Zveřejněno: 15. 09. 93

(47) Uděleno: 15. 10. 96

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 11. 12. 96

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 D 519/00

C 07 D 487/22

C 07 D 257/00

C 07 D 207/30

C 07 D 207/44

A 61 K 31/40

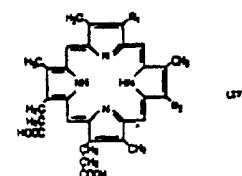
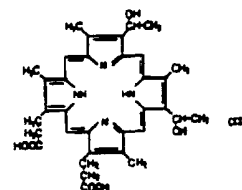
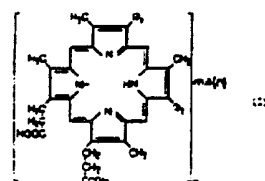
(73) Majitel patentu:
Wojskowa Akademia Techniczna im.
Jaroslawa Dabrowskiego, Warszawa, PL;

(72) Původce vynálezu:
Graczyk Alfreda asst.prof. dr. chem.,
Warszawa, PL;
Konarski Jerzy dr. chem., Warszawa, PL;

(54) Název vynálezu:
**Komplexní soli hematoporfyrinu a jejich
deriváty, způsob přípravy a léčebné
prostředky je obsahující**

(57) Anotace:
Komplexní soli hematoporfyrinu a jejich deriváty obecného vzorce I, v němž R^1 a R^2 nezávisle na sobě znamenají $-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}(\text{OH})-$, $-\text{CH}_3$ nebo $\text{CH}(\text{OR}^3)-\text{CH}_3$, kde R^3 znamená skupinu sestávající z jedné až pěti jednotek odvozených od monomeru vzorce II, nebo znamenají stejnou skupinu $\text{CH}(\text{R}^4)-\text{CH}_3$, kde R^4 znamená karboxymethylaminovou, 1-karboxy-pentylaminovou, 1-karboxy-2-methylpropylaminovou, 1-karboxy-3-methyl-butylaminovou, 1-karboxy-2-methyl-butylaminovou, 1-karboxy-butylaminovou, 1-karboxy-pentylaminovou, 1-karboxy-2-hydroxyethylaminovou, 1-karboxy-2-hydroxy-propylaminovou, 1-karboxy-2-merkapto-ethylaminovou, 1-karboxy-3-methylthio-propylaminovou, 1,2-dikarboxy-ethylaminovou, 1-karboxy-2-karbamoyl-ethylaminovou, 1,3-dikarboxy-propylaminovou, 1-karboxy-3-karbamoyl-propylaminovou, 1-karboxy-2-fenyl-ethylaminovou, 1-karboxy-2-(4-hydroxyfenyl)-ethylaminovou, 1-karboxy-2-indolyl-ethylaminovou, 2-karboxy-pyrrolidinovou, 2-karboxy-4-hydroxy-pyrrolidinovou, 1-karboxy-5-amino-pentylaminovou,

1-karboxy-4-guanidyl-butylaminovou, 1-karboxy-4-hydroxy-5-amino-pentylaminovou nebo 1-karboxy-2-(1H-imidazol)-ethylaminovou skupinu, A znamená bázičskou aminokyselinu, m znamená číslo 2 až 6 a n znamená číslo 1 až 5. Komplexní soli obecného vzorce I se připravují tak, že se hematoporfyrinové deriváty obecného vzorce IV nechají zreagovat s bázičskou aminokyselinou. Nové komplexní soli jsou použitelné jako terapeutické činidlo při detekci a léčení nádorů.



Komplexní soli hematoporphyrinu a jejich deriváty, způsob jejich přípravy a léčebné prostředky je obsahující

Oblast techniky

Tento vynález se týká komplexních solí hematoporphyrinu a jeho derivátů, jejich syntézy a terapeutického činidla. Tyto nové soli hematoporphyrinu a jeho derivátů mohou být používány pro detekci a léčení nádorových onemocnění.

Dosavadní stav techniky

Už více než desetiletí slouží hematoporphyrinové deriváty (HpD) a hematoporphyrin jako činidla citlivá na světlo (fotosenzibilní činidla) používaná pro detekci a destrukci nádorů u lidí a zvířat. Tyto sloučeniny se podávají intravenózní injekcí a přemísťují se aktivním transportem do různých orgánů v těle. Ve zdravých tkáních zůstávají relativně krátkou dobu, protože jsou metabolizovány a vylučovány, zatímco v nádorových tkáních jsou zadržovány a zůstávají tam několik dnů v nezměněné hladině. Tato vlastnost byla využita při fotodynamickém způsobu diagnózy a selektivní destrukce nádorových tkání. Protože všechny hematoporphyrinové deriváty jsou nepatrně rozpustné ve vodě, příprava jejich vodných roztoků byla dosud velice obtížná.

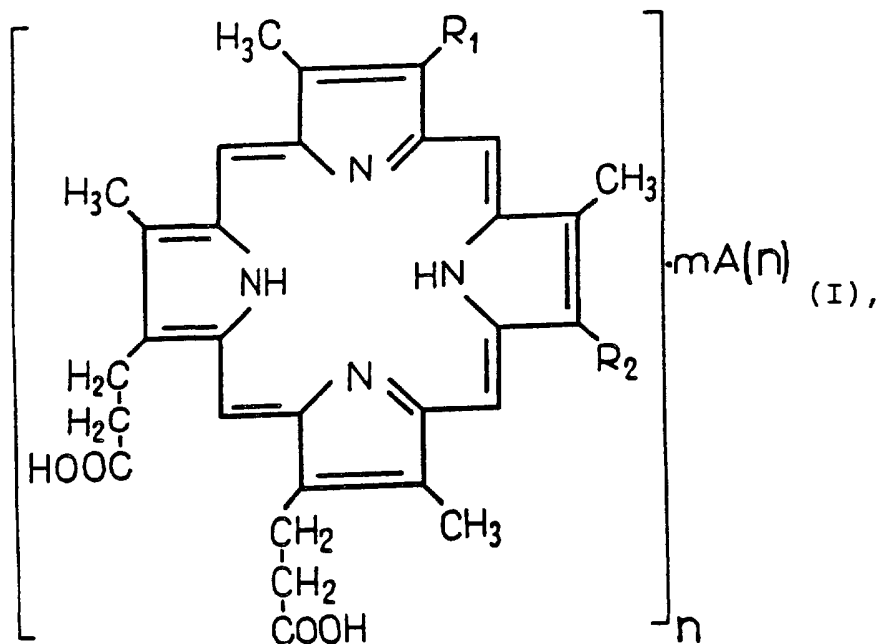
V Cancer Research 44, 1924 (1984) (viz stejný časopis 45, 635 (1985) jako další odkaz) je popsán způsob získávání hematoporphyrinových prostředků, které se používají v injekcích. Podle tohoto způsobu se hematoporphyrinové deriváty rozpustí v roztoku hydroxidu sodného, tento roztok se míchá jednu hodinu a pH roztoku se upraví přidáním 0,1 N kyseliny chlorovodíkové na hodnotu asi 7,1. Tento způsob je velice nevhodný, protože dokonce i nepatrné překročení pH pod hodnotu 7,0 způsobuje vysrážení této sloučeniny. Konečný roztok se připraví přidáním příslušného množství solného roztoku. Tento výsledný roztok se steriluje a skladuje se v zatavených ampulích. Tyto vodné roztoky jsou nestálé vzhledem k silné tendenci všech hematoporphyrinových derivátů agregovat. Podle citované práce zůstávají tyto roztoky stabilní po dobu asi tří měsíců za předpokladu, že jsou uchovávány v mrazničce (při teplotě -20 °C) a ve tmě.

Podstata vynálezu

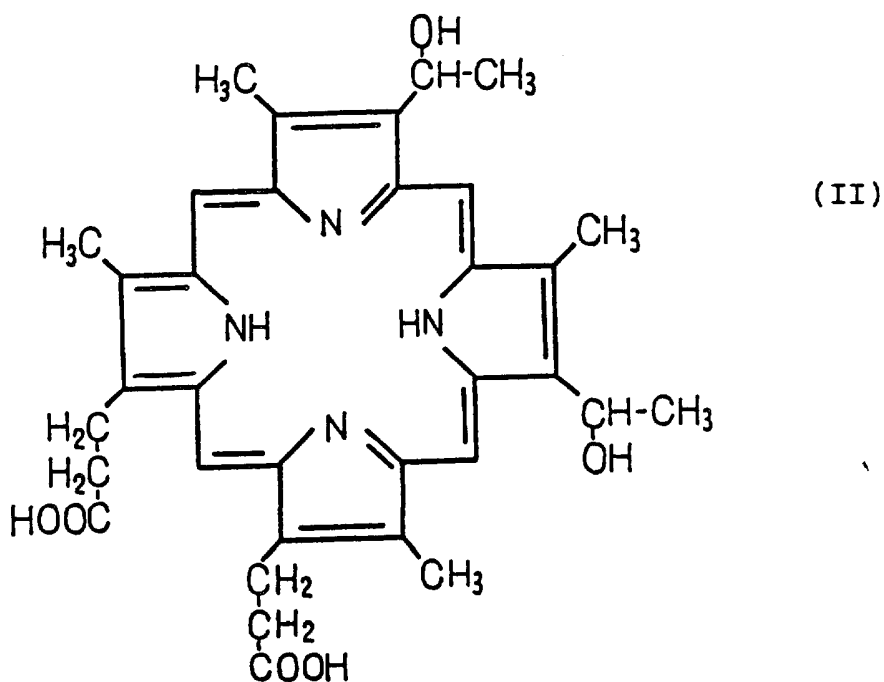
Podle tohoto vynálezu se získávají nové ve vodě rozpustné komplexní soli hematoporphyrinu a jeho derivátů, jejichž roztoky mají pH mezi 7,2 až 7,8 (podle koncentrace). To umožňuje rychlou přípravu roztoku dobře rozpustného ve vodě nebo v solném roztoku a také to umožňuje lepší biologickou dostupnost terapeutického činidla.

Neočekávaně bylo zjištěno, že terapeutická aktivita nových komplexních solí převyšuje terapeutickou aktivitu například známých sodných solí hematoporphyrinu a jeho derivátů (HpD Na₂). Navíc nové soli inhibují - bez ozařování - vývoj nádorových buněk, což bylo potvrzeno studií na buněčných liniích.

Podle tohoto vynálezu soli hematoporfyrinu a jeho derivátů mají obecný vzorec I



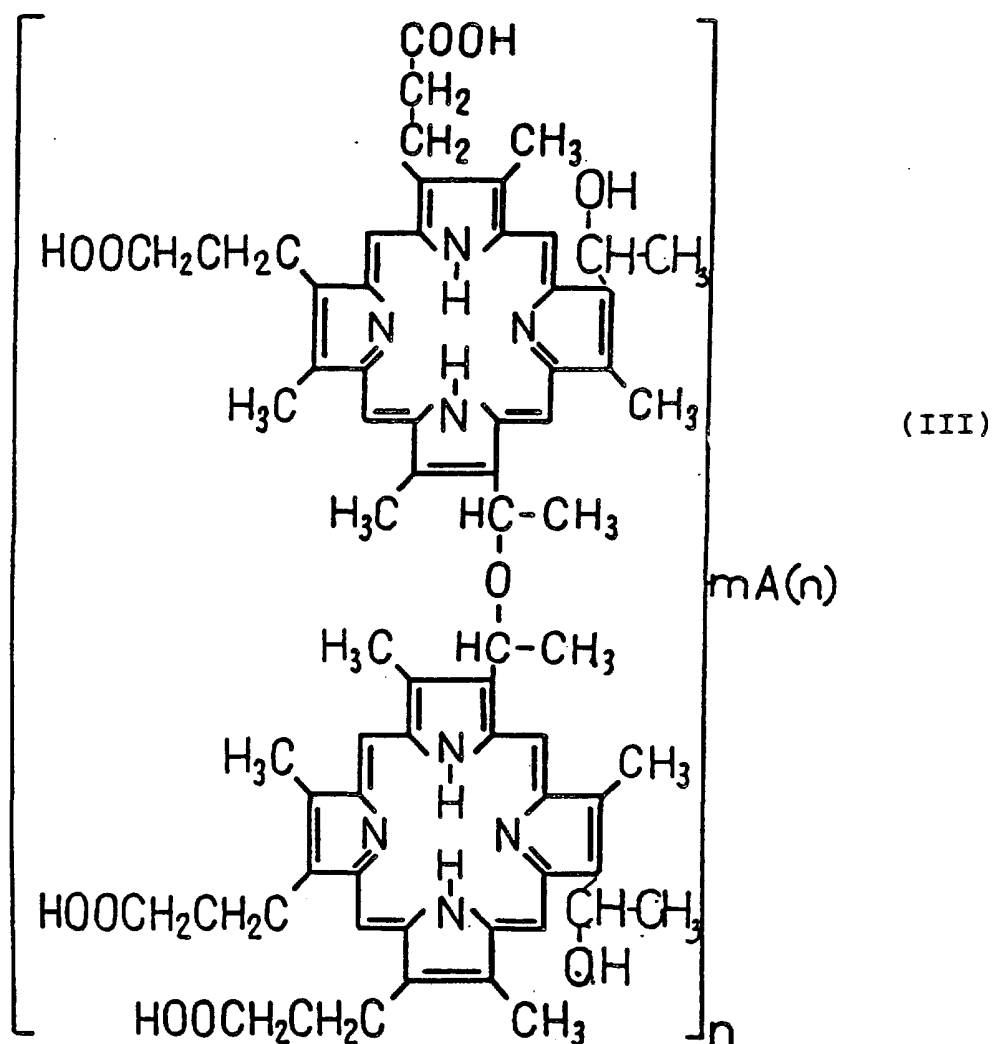
v němž R^1 a R^2 , které znamenají stejnou nebo různou skupinu, znamenají skupiny: $-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{OR}^3)-\text{CH}_3$, kde R^3 znamená skupinu tvořící oligomer obsahující etherovou a/nebo esterovou vazbu, která obsahuje 1 až 5 stejných nebo různých jednotek odvozených od monomeru vzorce II



nebo R^1 a R^2 znamenají stejnou skupinu a to skupinu obecného vzorce $-\text{CH}(\text{R}^4)-\text{CH}_3$, v němž R^4 znamená následující skupiny: karboxymethylaminovou, 1-karboxyethylaminovou, 1-karboxy-2-methyl-

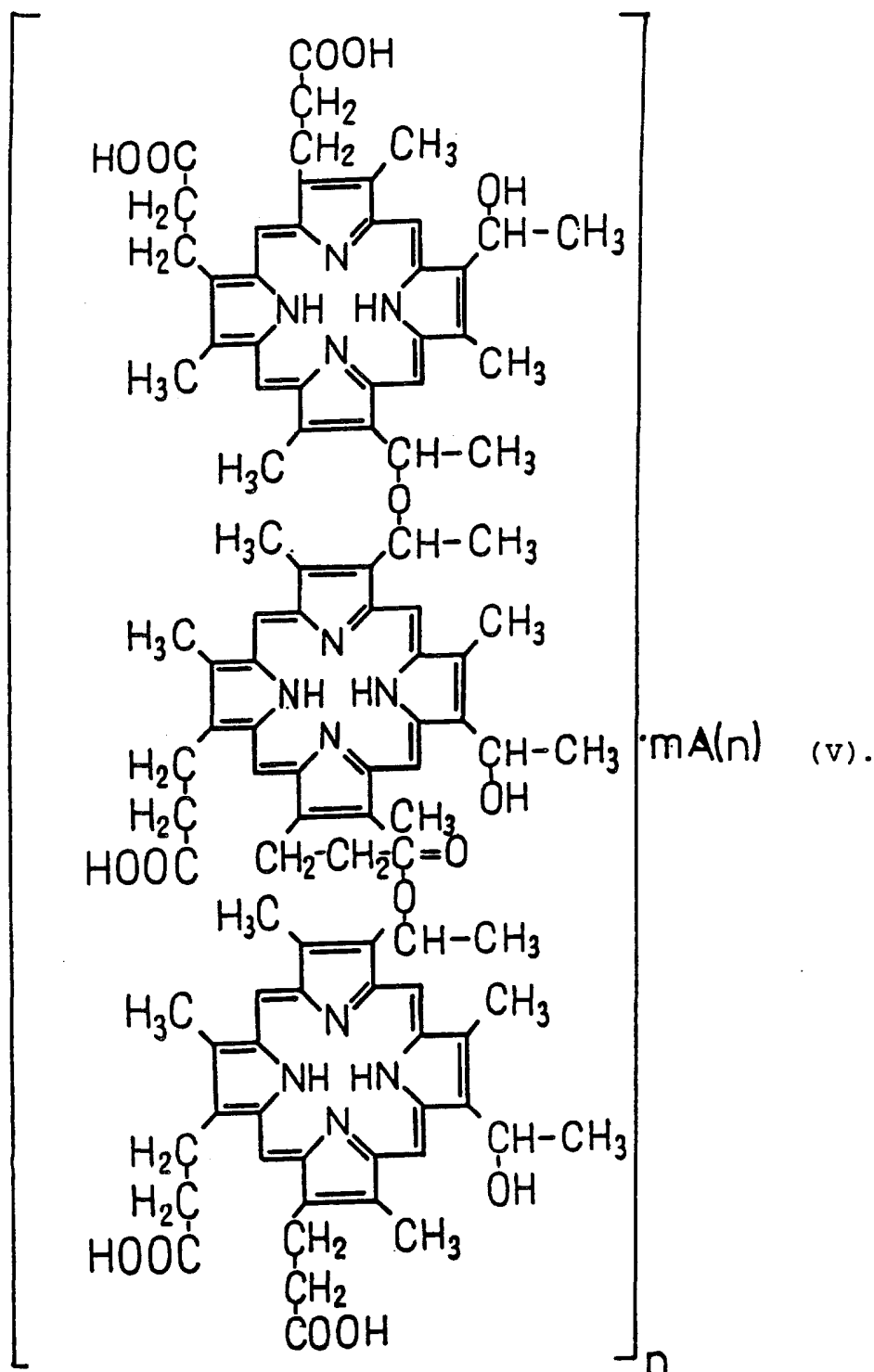
-propylaminovou, 1-karboxy-3-methyl-butylaminovou, 1-karboxy-2-methyl-butylaminovou, 1-karboxy-butylaminovou, 1-karboxy-pentylaminovou, 1-karboxy-2-hydroxyethylaminovou, 1-karboxy-2-hydroxypropylaminovou, 1-karboxy-2-merkaptethylaminovou, 1-karboxy-3-methylthio-propylaminovou, 1,2-dikarboxyethylaminovou, 1-karboxy-2-karbamoyl-ethylaminovou, 1,3-dikarboxy-propylaminovou, 1-karboxy-3-karbamoylpropylaminovou, 1-karboxy-2-fenyl-ethylaminovou, 1-karboxy-2-(4-hydroxyfenyl)-ethylaminovou, 1-karboxy-2-indolyl-ethylaminovou, 2-karboxy-pyrrolidinylovou, 2-karboxy-4-hydroxypyrrolidinylovou, 1-karboxy-5-amino-pentylaminovou, 1-karboxy-4-guanidyl-butylaminovou, 1-karboxy-4-hydroxy-5-aminopentylaminovou nebo 1-karboxy-2-(1H-imidazol)-ethylaminovou skupinu, A znamená báze aminokyseliny, m znamená číslo 2 až 6 a n znamená číslo 1 až 5.

Podle tohoto vynálezu se získávají také směsi solí obecného vzorce I a agregace těchto solí. Výhodnými aminokyselinami symbolu A jsou aminokyseliny s isoelektrickým bodem přesahujícím hodnotu 7 (zvláště 1-arginin, lysin, histidin nebo hydroxylysin). Jakožto výhodné soli se uvádějí soli obecného vzorce I, v němž R^1 a R^2 znamenají vždy skupinu obecného vzorce $-\text{CH}(\text{R}^4)-\text{CH}_3$, kde R^4 a ostatní symboly mají shora uvedený význam. Příklady solí obecného vzorce I zahrnují také soli etheru obecného vzorce III



kde jednotlivé symboly mají shora uvedený význam

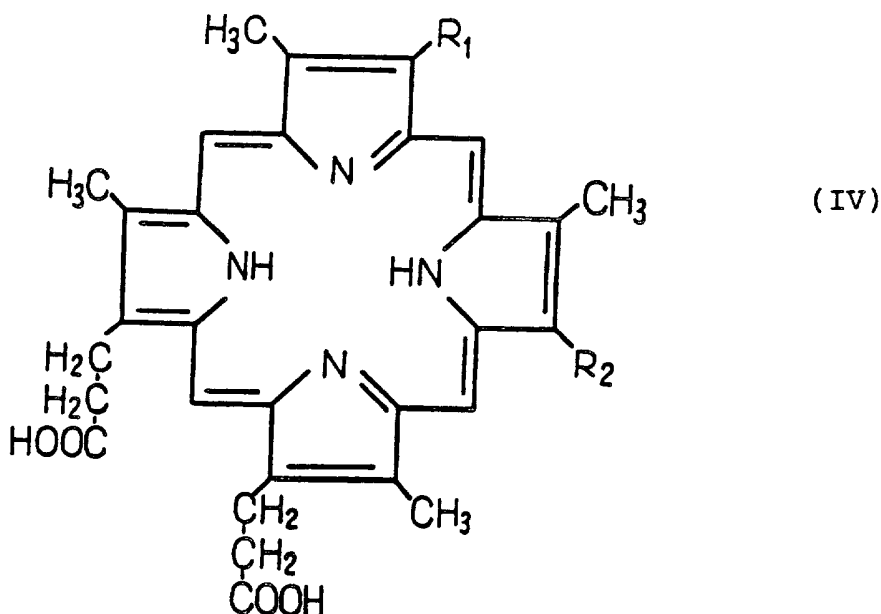
a soli obecného vzorce V, kde jednotlivé symboly mají shora uvedený význam.



Mezi výhodné směsi patří ty směsi, které obsahují soli aminokyselin s hematoporphyrinem, protoporphyrinem, vinyldeuteroporphyrinem a dihematoporphyrinetherem nebo možné jejich agregace.

Podle tohoto vynálezu při způsobu syntézy komplexních solí hematoporphyrinu a jeho derivátů obecného vzorce I nebo směsí solí

obecného vzorce I, v nichž symboly znamenají jak shora uvedeno, se hematoporfyrinový derivát obecného vzorce IV



nebo směs alespoň dvou derivátů obecného vzorce IV, v nichž R^1 a R^2 znamenají jak shora uvedeno, za předpokladu, že jestliže R^1 a R^2 znamenají skupinu obecného vzorce $-\text{CH}(\text{R}^4)-\text{CH}_3$, potom karboxylové skupiny substituentu R^4 mohou být volné nebo chráněné, nechá reagovat s bázičnou aminokyselinou s volnými nebo chráněnými karboxylovými skupinami nebo s jejím monohydrochloridem, s výhodou v organickém rozpouštědle, ve směsi organických rozpouštědel nebo v prostředí, které obsahuje organické rozpouštědlo a vodou nebo směs organických rozpouštědel a vody a případné skupiny, které chrání karboxylové funkce, se odstraní. Isoluje se tak produkt, kterým je sůl obecného vzorce I nebo směs solí obecného vzorce I, popřípadě obsahující agregace solí obecného vzorce I.

Podle způsobu podle tohoto vynálezu se reakcemi aminových skupin aminokyselin s karboxylovými skupinami hematoporfyrinových derivátů tvoří iontové systémy podle této rovnice:



Jako bázičné aminokyseliny se používají aminokyseliny s isoelektrickým bodem větším než 7, zvláště arginin, lysin, histidin nebo hydroxylysin.

Pro chránění karboxylových skupin ve výchozích sloučeninách se mohou používat různé známé chránicí skupiny, jako jsou například ty chránicí skupiny, které jsou popsány v knize "Protective Groups in Organic Synthesis", T. W. Green, John Wiley and Sons, 1981. Příklady těchto skupin jsou skupiny, které tvoří alkyl-,

benzyl- nebo silyl-estery, stejně jako jiné skupiny, které se používají při chránění karboxylových funkcí.

Reakce může probíhat v širokém rozmezí teplot, s výhodou v rozmezí od teploty místnosti do 100 °C, zvláště v rozmezí od 50 do 70 °C. Reakční doba je obvykle od několika minut do více než deseti hodin.

Mezi výhodná organická rozpouštědla patří amidy, například formamid, dimethylformamid, diethylformamid, nitrily, například acetonitril, propionitril, isobutyronitril, estery, například ethylacetát, ketony, například aceton, sulfoxidy, například dimethylsulfoxid, alkoholy a ethyluhličitan, nebo jejich směsi. Reakce se obvykle provádí ve vodně-organickém prostředí.

Chránicí skupiny, jestliže jsou přítomny, se odstraňují známými postupy, například hydrolýzou nebo hydrogenolýzou.

Sůl nebo odpovídající směs soli obecného vzorce I se může izolovat z reakční směsi různými způsoby, například vysrážením, krystalizací nebo jinými známými postupy. Zvláště výhodný způsob spočívá v tom, že se k reakční směsi přidá rozpouštědlo nebo směs rozpouštědel o nízké polaritě, které však tvoří s rozpouštědlem, používaným v reakci, homogenní roztok v poměru od 1 : 1 do 1 : 5. Mezi příslušná rozpouštědla patří například ethylether nebo aceton. Výsledná směs se nechá stát od několika hodin do více než 10 hodin. Pomalu se tak vysráží produkt. Sraženina se odfiltruje, promyje se a vysuší se ve vakuu nad sušícím činidlem, s výhodou oxidem fosforečným. Tyto produkty jsou stabilní a nevlhnou. Musí být chráněny před světlem. Stupeň izolace popřípadě zahrnuje dělení směsi produktů.

Výchozí sloučeniny obecného vzorce IV jsou známé sloučeniny. Mohou se připravovat z heminu.

Podle tohoto vynálezu se získává také terapeutické činidlo pro detekci a/nebo léčení nádorů, které se vyznačuje tím, že obsahuje sůl obecného vzorce I, v němž symboly znamenají jak shora uvedeno, nebo směs alespoň dvou solí obecného vzorce I a popřípadě jejich agregace. Jako příklad směsi lze uvést směs, která obsahuje soli aminokyselin s hematoporfyrinem, protoporfyrinem, vinyldeuteroporfyrinem a dihematoporfyrinetherem a popřípadě jejich agregace.

Podle tohoto vynálezu může terapeutické činidlo obsahovat sůl obecného vzorce I nebo směs solí obecného vzorce I v pevném stavu, s výhodou skladované ve sterilní uzavřené nádobě.

Sterilní uzavřená nádoba obvykle obsahuje sůl nebo směs solí v terapeuticky účinné dávce. Množství terapeuticky účinné dávky je obecně 1,5 až 10 mg/kg tělesné hmotnosti. Ze solí uchovávaných v nádobě se mohou velmi rychle připravovat sterilní vodné roztoky pro přímé parenterální podávání.

Podle tohoto vynálezu se terapeutické činidlo může připravovat také ve formě prostředků pro okamžité použití. V tomto případě se účinná látka, tj. sůl nebo směs solí obecného vzorce I, smíchá s farmakologicky přijatelným ředidlem a/nebo nosičem.

Terapeutické činidlo se obvykle podává injekčně, zvláště intravenózně, ale může se podávat také intraperitoneálně nebo rektálně. Příkladem prostředků může být sterilní vodný roztok. Vodný roztok může vedle soli obecného vzorce I popřípadě obsahovat solný roztok a - jestliže je to nutné - propylenglykol. Jak bylo shora uvedeno, tyto roztoky se buď mohou aplikovat bezprostředně po přípravě, nebo se mohou skladovat ve sterilních nádobách.

Podle tohoto vynálezu se terapeutické činidlo může aplikovat bez ozařování, je však účinnější jako fotosenzitivní činidlo při fotodynamickém způsobu diagnosy a terapie nádorů.

Nové sloučeniny obecného vzorce I byly testovány na buněčných liniích. Bylo použito deset různých nádorových buněčných linií, které byly inkubovány 48 hodin s různými novými solemi protoporfyrinu a s novou solí konvenčně aplikovaných HpD prostředků (hematoporfyrinové deriváty) získaných podle Lipsona a spol. Všechny sloučeniny byly používány ve formě vodných roztoků o koncentraci 50 mcg/ml.

Byla prováděna stanovení:

- 1) fluorescence buněk (F): po 48 hodinách inkubace se buňky promyjí, intensita fluorescence se měří fluorescenčním mikroskopem a vyjádří se na stupnici v rozsahu od 0 do 4,
- 2) procento žijících buněk (P %) po 48 hodinách inkubace,
- 3) koeficient multiplikace buněk (M) v přítomnosti různých prostředků, který se vyjádří takto:

$$M = \frac{\text{počet multiplikovaných buněk v kultuře s testovaným prostředkem při koncentraci 50 mcg/ml po 48 hodinách}}{\text{počet multiplikovaných buněk v kontrolní kultuře po 48 hodinách}}$$

Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 1, 2 a 3. Tyto výsledky ukazují, že sloučeniny obecného vzorce I se liší v afinitě k různým testovaným buněčným liniím a vykazují nestejné účinky na jejich přežití. Jestliže jsou dostupné různé deriváty, je možné vybrat ten, který je nejaktivnější na daný typ nádoru, což rozšiřuje rozsah efektivní terapie.

Symbody, které jsou použity v tabulkách 1 až 3 znamenají následující sloučeniny:

PP(Asp)₂(Arg)₂ znamená 1-argidin-di(N-asparyl)-protoporfyrinát,
 PP(Glu)₂(Arg)₂ znamená 1-argidin-di(N-glutamyl)-protoporfyrinát,
 PP(Cys)₂(Arg)₂ znamená 1-argidin-di(N-cysteyl)-protoporfyrinát,
 PP(Ala)₂(Arg)₂ znamená 1-argidin-di(N-alanyl)-protoporfyrinát,
 PP(Ser)₂(Arg)₂ znamená 1-argidin-di(N-seryl)-protoporfyrinát,
 PP(Lys)₂(Arg)₂ znamená 1-argidin-di(N-lysyl)-protoporfyrinát,

PP(Phe)₂(Arg)₂ znamená 1-argidin-di(N-fenylananyl)-protoporfyri-
nát,

PP(Arg)₂(Arg)₂ znamená 1-argidin-di(N-arginyl)-protoporfyri-
nát,

PP(Trp)₂(Arg)₂ znamená 1-argidin-di(N-tryptofanyl)-protoporfyri-
nát,

PP(Met)₂(Arg)₂ znamená 1-argidin-di(N-methionyl)-protoporfyri-
nát.

V tabulkách 1 až 3 jsou uvedeny následující symboly buněč-
ných linií, které se používají při studiích protinádorových čini-
del: derivátů porfyrinu a HpD prostředků:

Linie lidských nádorů:

Hep-2 buňky rakoviny hrtanu
Hela buňky rakoviny děložního krčku
KB buňky rakoviny orální dutiny
HBT-39/w buňky rakoviny prsu
T-47D buňky rakoviny prsu
P3HR1 buňky Burkittova lymfadenomu
GLC4 malé buňky karcinomu plic

Linie myších nádorů:

GRMT/F6 buňky rakoviny mateřské žlázy myši kmene GR
Mm5MT/C1 buňky rakoviny mateřské žlázy myši kmene C3H
MA-104 buňky rakoviny ledvin zárodku opice Rhesus

Při srovnání se známými HpD prostředky vykazují nové soli
širší rozsah schopnosti pronikat do různých typů nádorových buněk
a vykazují i vyšší účinnosti při jejich destrukci. Například při
použití nové 1-argininové soli HpD, [HpD(Arg)₂], procento žijí-
cích buněk po 48 hodinách inkubace (P %) bylo u Hela linie 13 %,
u linie MA-104 6 % a u linie HBT-39/w 0 %, zatímco po aplikaci
známého prostředku, tj. sodné soli HpD (HpD Na₂) byly příslušné
hodnoty mnohem vyšší - 28 %, 17 % a 10 %.

Nové sloučeniny byly studovány také u zvířat. Vybrali jsme
sloučeninu PP(Lys)₂(Arg)₂ (sloučeninu podle příkladu 21), která
je jednou z nejúčinnějších sloučenin při studiích buněčné linie
Mm5MT/C1 (rakovina prsní žlázy myši C3H) a také sloučeninu
PP(Glu)₂(Arg)₂ (sloučeninu podle příkladu 19), která je jednou
z nejméně účinných sloučenin proti tomuto typu nádoru.

Při studiích na zvířatech se myším C3H s transplantovanou
rakovinou mateřské žlázy podávají obě shora uvedené sloučeniny
v dávce 10 mg/kg tělesné hmotnosti ve dvou variantách: myším ozá-
řeným He-Ne-laserem dávkou 150 J/cm² (na obrázku označeno písme-
nem L vedle symbolu sloučeniny) a neozářeným myším. Výsledky jsou
zaznamenávány na obrázku. Tyto výsledky ukazují následující:

1) studie na zvířatech potvrdily výsledky získané při poku-
sech s buněčnými liniemi,

2) prostředek $\text{PP(Lys)}_2(\text{Arg})_2$ se prokázal být nejúčinnějším prostředkem, který velice prodloužil přežívání myši,

3) deriváty protoporphyrinu s aminokyselinami vykazují cytotoxický účinek na nádorové buňky, tento účinek je silnější v případě buněk ozářených laserem ve srovnání s buňkami neozářenými.

Příklady provedení vynálezu

Příklady komplexních solí hematoporphyrinu a jeho derivátů

Příklad 1

HpD je směs hematoporphyrinových derivátů, jako je například hematoporphyrin, protoporphyrin, vinyldeuteroporphyrin a dihematoporphyrin-ether a jejich agregací. K 1 g HpD o střední molekulové hmotě 600 (1,67 mmolu), rozpuštěnému ve 30 ml dimethylformamidu (DMF) se přidá 581,8 mg 1-argininu (3,34 mmolu) rozpuštěné ve dvou ml vody. Tato směs se zahřívá 15 až 20 minut při 60 °C za intensivního míchání. Potom se přidá 100 ml acetonu a v míchání se pokračuje 3 až 5 minut. Roztok se nechá stát 5 až 15 hodin. Během této doby se vysráží směs solí označená HpD (Arg)₂. Sraženina se odfiltruje, promyje se etherem a vysuší se ve vakuu. Po vysušení ve vakuu je sraženina stabilní na vzduchu. Musí být chráněna před světlem kvůli svému obsahu porfyrinových derivátů. Výtěžek reakce je asi 75 %.

Příklad 2

K 1 g HpD rozpuštěnému ve 20 ml dimethylformamidu se přidá 581,8 mg 1-argininu rozpuštěného ve 2 ml vody. Roztok se zahřívá a míchá jako v příkladu 1. Po ochlazení se přidá 100 ml ethyletheru. Roztok se míchá a nechá se stát několik hodin. Vzniklá sraženina se odfiltruje, promyje etherem a vysuší ve vakuu. Získá se tak směs solí HpD(Arg)₂ (1264,8 g), což odpovídá výtěžku 86 %.

Příklad 3

K 1 230 mg dilysylprotoporphyrinu PP(Lys)_2 (1,4 mmolu) rozpuštěným ve 40 ml formamidu se přidá 490 mg 1-argininu (2,8 mmolu) rozpuštěných v 1,5 ml vody. Tato směs se zahřívá na vodní lázni dvacet minut při teplotě 60 °C. Po ochlazení se přidá 100 ml ethyletheru, roztok se promíchá a nechá se stát několik hodin. Vytvořená sraženina se promyje etherem a vysuší se ve vakuu. Získá se tak produkt v množství 1 630 mg, což odpovídá výtěžku 90 %. Analytická data tohoto produktu jsou uvedena pro číslo XXI v tabulce 4.

Příklad 4

K 1 199,6 mg (1,4 mmolu) diglutamylprotoporphyrinu rozpuštěným v 60 ml formamidu se přidá 409,3 mg 1-lysinu rozpuštěných v 1,5 ml vody. Tento roztok se zahřívá 30 minut na 60 °C. Potom

se přidá 120 ml směsi (1 : 3) acetonu s etherem. Získaná směs se míchá deset minut, potom se nechá stát několik hodin. Vytvořená sraženina se odfiltruje a po promytí ethyletherem se vysuší ve vakuu nad oxidem fosforečným. Získá se 1 575 mg produktu, což odpovídá výtěžku 97,8 %.

Příklad 5

K 1 081,8 mg (1,4 mmolu) diserylprotoporfyriu rozpustěným v 50 ml formamidu se přidá 490 mg 1-argininu (2,8 mmolu) rozpustěných v 1,5 ml vody. Tento roztok se zahřívá 30 minut na 60 °C, potom se přidá 120 ml směsi acetonu s etherem v poměru 1 : 3. Směs se míchá dalších 50 minut, potom se nechá stát několik hodin ke krystalizaci. Vytvořená sraženina se odfiltruje ve vakuu a vysuší se ve vakuu v přítomnosti oxidu fosforečného. Bylo získáno 1 500 mg produktu, což znamená výtěžek 95,5 %.

Všechny soli, které jsou uvedeny v tabulce 4, byly připraveny podle postupu popsaného v příkladu 5. Patří sem:

- PP(Ser)₂(Arg)₂ - 1-arginin-di(N-seryl)protoporfyriinát,
- PP(Gly)₂(Arg)₂ - 1-arginin-di(N-glycyl)protoporfyriinát,
- PP(Ala)₂(Arg)₂ - 1-arginin-di(N-alanyl)protoporfyriinát,
- PP(Val)₂(Arg)₂ - 1-arginin-di(N-valyl)protoporfyriinát,
- PP(Leu)₂(Arg)₂ - 1-arginin-di(N-leucyl)protoporfyriinát,
- PP(Lle)₂(Arg)₂ - 1-arginin-di(N-isoleucyl)protoporfyriinát,
- PP(Phe)₂(Arg)₂ - 1-arginin-di(N-fenylalanyl)protoporfyriinát,
- PP(Tyr)₂(Arg)₂ - 1-arginin-di(N-tyrosyl)protoporfyriinát,
- PP(Pro)₂(Arg)₂ - 1-arginin-di(N-prolyl)protoporfyriinát,
- PP(ProOH)₂(Arg)₂ - 1-arginin-di(N-dihydroxyprolyl)protoporfyriinát,
- PP(Trp)₂(Arg)₂ - 1-arginin-di(N-tryptofanyl)protoporfyriinát,
- PP(Cys)₂(Arg)₂ - 1-arginin-di(N-cysteyl)protoporfyriinát,
- PP(Met)₂(Arg)₂ - 1-arginin-di(N-methionyl)protoporfyriinát,
- PP(Asp)₂(Arg)₂ - 1-arginin-di(N-aspartyl)protoporfyriinát,
- PP(Glu)₂(Arg)₂ - 1-arginin-di(N-glutamyl)protoporfyriinát,
- PP(Arg)₂(Arg)₂ - 1-arginin-di(N-arginylyl)protoporfyriinát,
- PP(Lys)₂(Arg)₂ - 1-arginin-di(N-lysyl)protoporfyriinát,
- PP(LysOH)₂(Arg)₂ - 1-arginin-di(N-hydroxylysyl)protoporfyriinát,

PP(His)₂(Arg)₂ - 1-arginin-di(N-histidyl)protoporfyrinát,
 PP(Asn)₂(Arg)₂ - 1-arginin-di(N-asparginyl)protoporfyrinát,
 PP(Gln)₂(Arg)₂ - 1-arginin-di(N-glutaminyl)protoporfyrinát.

Tabulka 1

č. sloučeniny	symbol	buněčná linie											
		Hela			MA-104			GLC4			P 3H R ¹		
		F	P%	M	F	P%	M	F	P%	M	F	P%	M
1	HpD(Arg) ₂	+	13	0,14	stopy	6	0,05	-	30	0,30	-	30	0,30
2	PP(Asp) ₂ (Arg) ₂	+++	38	0,50	+++	17	0,52	+	55	0,55	+	15	0,15
3	PP(Glu) ₂ (Arg) ₂	++	33	0,16	-	15	0,16	-	45	0,45	+	15	0,15
4	PP(Cys) ₂ (Arg) ₂	++	55	0,43	++	11	0,16	-	30	0,30	+	40	0,40
5	PP(Ala) ₂ (Arg) ₂	+	11	0,11	++	50	0,50	-	30	0,30	++	15	0,15
6	PP(Ser) ₂ (Arg) ₂	++	55	0,50	-	0	0,16	+	0	0	++	2,5	0,02
7	PP(Lys) ₂ (Arg) ₂	+++	16	0,16	-	0	0,10	+	30	0,30	+	50	0,50
8	PP(Phe) ₂ (Arg) ₂	+++	5	0,14	++	35	0,35	++	0	0	+	8	0,08
9	PP(Arg) ₂ (Arg) ₂	++++	11	0,28	++	31	0,42	++	4	0,03	+	10	0,10
10	PP(Trp) ₂ (Arg) ₂	+++	62	0,62	+	25	0,25	-	50	0,50	+	50	0,50
11	PP(Met) ₂ (Arg) ₂	+++	5	0,05	++	22	0,33	+	0	0	+	8	0,08

Tabulka 2

č.	symbol sloučeniny	buněčná linie								
		KB			HBT-39/w			GR MT/F6		
		F	P%	M	F	P%	M	F	P%	M
1	HpD(Arg) ₂	++++	9	0,08	+++	0	0	++	20	0,40
2	PP(Asp) ₂ (Arg) ₂	++	16	0,12	+++	48	0,81	++	25	0,73
3	PP(Glu) ₂ (Arg) ₂	++++	8	0,08	+	66	0,73	+	75	0,75
4	PP(Cys) ₂ (Arg) ₂	+	12	0,12	+	42	0,53	+++	50	0,75
5	PP(Ala) ₂ (Arg) ₂	+++	0	0	++	17	0,33	+	50	0,50
6	PP(Ser) ₂ (Arg) ₂	++	0	0	++	33	0,50	+	12	0,12
7	PP(Lys) ₂ (Arg) ₂	-	12	0,12	++++	47	0,44	+++	25	0,75
8	PP(Phe) ₂ (Arg) ₂	++	12	0,12	++++	11	0,11	+++	0	0
9	PP(Arg) ₂ (Arg) ₂	+	16	0,16	++++	28	0,28	+++	12	0,12
10	PP(Trp) ₂ (Arg) ₂	nb	21	0,21	++++	18	0,11	+++	62	0,62
11	PP(Met) ₂ (Arg) ₂	++	5	0,12	++++	8	0,08	++++	25	0,22

Tabulka 3

č.	symbol sloučeniny	buněčná linie								
		HEp-2			Mm SMT/C1			T-47D		
		F	P%	M	F	P%	M	F	P%	M
1	HpD(Arg) ₂	+	31	0,31	++	33	0,75	+	30	0,66
2	PP(Asp) ₂ (Arg) ₂	++++	47	0,40	+++	70	0,92	++++	65	0,92
3	PP(Glu) ₂ (Arg) ₂	++++	15	0,08	+++	76	0,70	+++	49	0,80
4	PP(Cys) ₂ (Arg) ₂	++++	60	0,32	+++	40	0,73	+	26	0,84
5	PP(Ala) ₂ (Arg) ₂	++	21	0,21	+++	86	0,84	+++	85	0,82
6	PP(Ser) ₂ (Arg) ₂	+	25	0,50	+	37	0,37	+++	40	0,60
7	PP(Lys) ₂ (Arg) ₂	++	10	0,42	++	33	0,80	++	57	0,92
8	PP(Phe) ₂ (Arg) ₂	++	3	0,08	++++	12	0,37	+	60	0,60
9	PP(Arg) ₂ (Arg) ₂	+	5	0,14	+++	12	0,38	+++	40	0,40
10	PP(Trp) ₂ (Arg) ₂	+++	15	0,15	+++	11	0,33	+	13	0,13
11	PP(Met) ₂ (Arg) ₂	+++	0	0	++++	8	0,08	+++	10	0,10

Tabulka 4

příklad	symbol sloučeniny	molekulový vzorec	mol. hnota	C		H		N	
				vyp.(%)	nal.(%)	vyp.(%)	nal.(%)	vyp.(%)	nal.(%)
V	PP(Ser) ₂ (Arg) ₂	C ₅₂ H ₇₆ N ₁₄ O ₁₂	1 121,2	55,65	55,69	6,78	6,81	17,48	17,52
VI	PP(Gly) ₂ (Arg) ₂	C ₅₀ H ₇₂ N ₁₄ O ₁₂	1 061,2	56,53	56,42	6,78	6,71	18,45	18,22
VII	PP(Ala)(Arg) ₂	C ₅₂ H ₇₆ N ₁₄ O ₁₂	1 089,2	55,09	55,14	6,97	7,02	17,99	18,03
VIII	PP(Val) ₂ (Arg) ₂	C ₅₆ H ₈₄ N ₁₄ O ₁₂	1 145,3	58,67	58,58	7,33	7,24	17,11	17,00
IX	PP(Leu) ₂ (Arg) ₂	C ₅₈ H ₇₅ N ₁₄ O ₁₂	1 173,3	59,32	59,24	6,39	6,27	16,71	16,64
X	PP(Lie) ₂ (Arg) ₂	C ₅₈ H ₇₅ N ₁₄ O ₁₂	1 173,3	59,32	59,34	6,39	6,41	16,71	16,68
XI	PP(Phe) ₂ (Arg) ₂	C ₆₄ H ₈₄ N ₁₄ O ₁₂	1 241,4	61,86	61,91	6,78	6,72	15,78	15,74
XII	PP(Tyr) ₂ (Arg) ₂	C ₆₄ H ₈₄ N ₁₄ O ₁₄	1 273,4	60,31	60,39	6,44	6,46	15,39	15,45
XIII	PP(Pro) ₂ (Arg) ₂	C ₅₆ H ₈₀ N ₁₄ O ₁₂	1 141,3	58,88	58,93	7,01	7,07	17,17	17,21

Tabulka 4 (pokračování)

příklad	symbol sloučeniny	molekulový vzorec	mol. hmota	C		H		N	
				vyp.(%)	nal.(%)	vyp.(%)	nal.(%)	vyp.(%)	nal.(%)
XIV	PP(ProOH) ₂ (Arg) ₂	C ₅₆ H ₈₀ N ₁₄ O ₁₄	1 175,3	57,18	57,09	6,80	6,72	16,67	16,59
XV	PP(Trp) ₂ (Arg) ₂	C ₆₈ H ₈₆ N ₁₆ O ₁₂	1 319,4	61,84	61,72	6,52	6,46	16,98	16,79
XVI	PP(Cys) ₂ (Arg) ₂	C ₅₂ H ₇₆ N ₁₄ O ₁₂ S	1 153,3	54,01	54,11	6,59	6,64	16,99	17,04
XVII	PP(Met) ₂ (Arg) ₂	C ₅₆ H ₈₄ N ₁₄ O ₁₂ S ₂	1 209,4	55,56	55,61	6,94	7,01	16,20	16,27
XVIII	PP(Asp) ₂ (Arg) ₂	C ₅₄ H ₇₆ N ₁₄ O ₁₆	1 177,2	55,05	55,11	6,46	6,52	16,65	16,74
XIX	PP(Glu) ₂ (Arg) ₂	C ₅₆ H ₈₀ N ₁₄ O ₁₆	1 205,3	55,75	55,64	6,64	6,53	16,26	16,18
XX	PP(Arg) ₂ (Arg) ₂	C ₅₈ H ₉₀ N ₂₀ O ₁₂	1 339,4	51,96	51,82	6,72	6,64	20,90	20,97
XXI	PP(Liz) ₂ (Arg) ₂	C ₅₈ H ₉₀ N ₁₆ O ₁₂	1 203,4	57,84	57,89	7,48	7,53	18,61	18,58
XXII	PP(LizOH) ₂ (Arg) ₂	C ₅₈ H ₉₀ N ₁₆ O ₁₄	1 235,4	56,34	56,23	7,28	7,19	18,13	18,04
XXIII	PP(His) ₂ (Arg) ₂	C ₅₈ H ₈₂ N ₁₈ O ₁₂	1 221,3	56,99	56,89	6,71	6,67	20,63	20,52
XXIV	PP(Asn) ₂ (Arg) ₂	C ₅₄ H ₇₈ N ₁₆ O ₁₄	1 175	55,14	55,19	6,64	6,68	19,06	18,98
XXV	PP(Gln) ₂ (Arg) ₂	C ₅₈ H ₈₄ N ₁₆ O ₁₄	1 203,3	55,85	55,77	6,98	6,81	18,62	18,71
XVI	PP(Cys) ₂ (Arg) ₂	C ₅₂ H ₇₆ N ₁₄ O ₁₂ S	1 153,3	54,01	54,11	6,59	6,64	16,99	17,04
XVII	PP(Met) ₂ (Arg) ₂	C ₅₆ H ₈₄ N ₁₄ O ₁₂ S ₂	1 209,4	55,56	55,61	6,94	7,01	16,20	16,27
XVIII	PP(Asp) ₂ (Arg) ₂	C ₅₄ H ₇₆ N ₁₄ O ₁₆	1 177,2	55,05	55,11	6,46	6,52	16,65	16,74
XIX	PP(Glu) ₂ (Arg) ₂	C ₅₆ H ₈₀ N ₁₄ O ₁₆	1 205,3	55,75	55,64	6,64	6,53	16,26	16,18
XX	PP(Arg) ₂ (Arg) ₂	C ₅₈ H ₉₀ N ₂₀ O ₁₂	1 339,4	51,96	51,82	6,72	6,64	20,90	20,97
XXI	PP(Lys) ₂ (Arg) ₂	C ₅₈ H ₉₀ N ₁₆ O ₁₂	1 203,4	57,84	57,89	7,48	7,53	18,61	18,58
XXII	PP(LysOH) ₂ (Arg) ₂	C ₅₈ H ₉₀ N ₁₆ O ₁₄	1 235,4	56,34	56,23	7,28	7,19	18,13	18,04
XXIII	PP(His) ₂ (Arg) ₂	C ₅₈ H ₈₂ N ₁₈ O ₁₂	1 221,3	56,99	56,89	6,71	6,67	20,63	20,52
XXIV	PP(Asn) ₂ (Arg) ₂	C ₅₄ H ₇₈ N ₁₆ O ₁₄	1 175,	55,14	55,19	6,64	6,68	19,06	18,98
XXV	PP(Gln) ₂ (Arg) ₂	C ₅₆ H ₈₄ N ₁₆ O ₁₄	1 203,3	55,85	55,77	6,98	6,81	18,62	18,71

Příklad 26

Ke 1 037,12 mg (1,4 mmol) di(N-alanyl)protoporfyrinu, rozpuštěného ve 40 ml dimethylformamidu, se přidá 434,4 mg (2,8 mmol) histidinu, rozpuštěného ve 3 ml vody. Směs se zahřívá po dobu 40

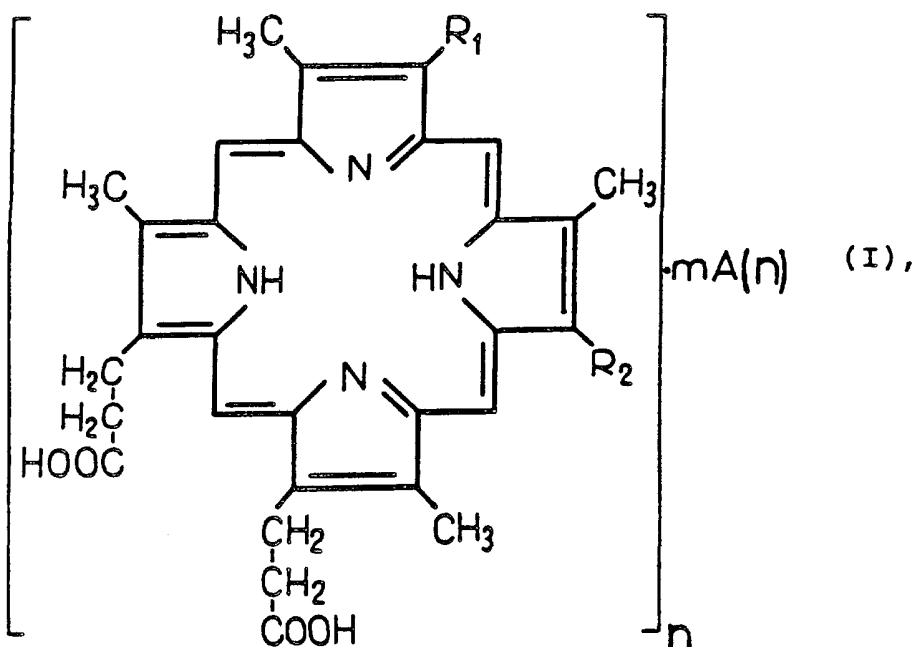
až 50 minut na vodní lázni za intenzivního míchání. Po ochlazení se přidá 100 ml směsi acetonu a etheru (v poměru 1 : 3). Směs se míchá po dobu přibližně 10 minut a nechá se stát po dobu několika hodin. Po zfiltrování ve vakuu a vysušení ve vakuu oxidem fosforečným se získá histidinová sůl v množství 1 353 mg, což znamená výtěžek 92 %. Spektrum UV VIS $\lambda_{\max}$ (nm) 208 (histidin), 400, 514, 550, 570, 632.

Průmyslová využitelnost

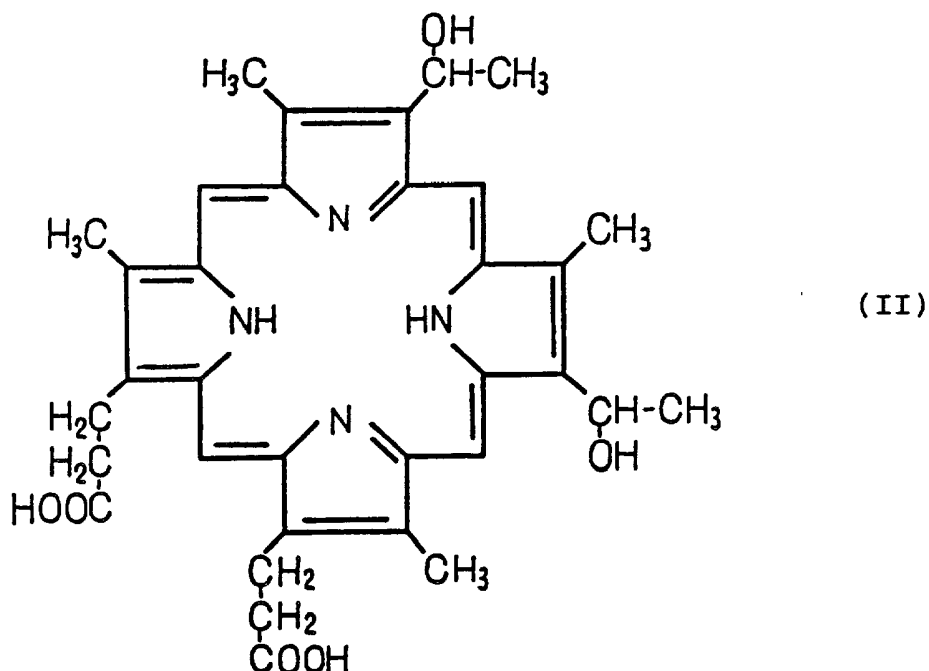
Příprava komplexních solí hematoporphyrinu a jeho derivátů, použitelných jako terapeutické činidlo pro detekci a léčení nádorů.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Komplexní soli hematoporphyrinu a jejich deriváty obecného vzorce I,



v němž R^1 a R^2 , které znamenají stejné nebo různé skupiny, znamenají skupinu $-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{OR}^3)-\text{CH}_3$, kde R^3 znamená skupinu tvořící oligomer obsahující etherovou a/nebo esterovou vazbu, tato skupina obsahuje 1 až 5 stejných nebo různých jednotek odvozených od monomeru vzorce II

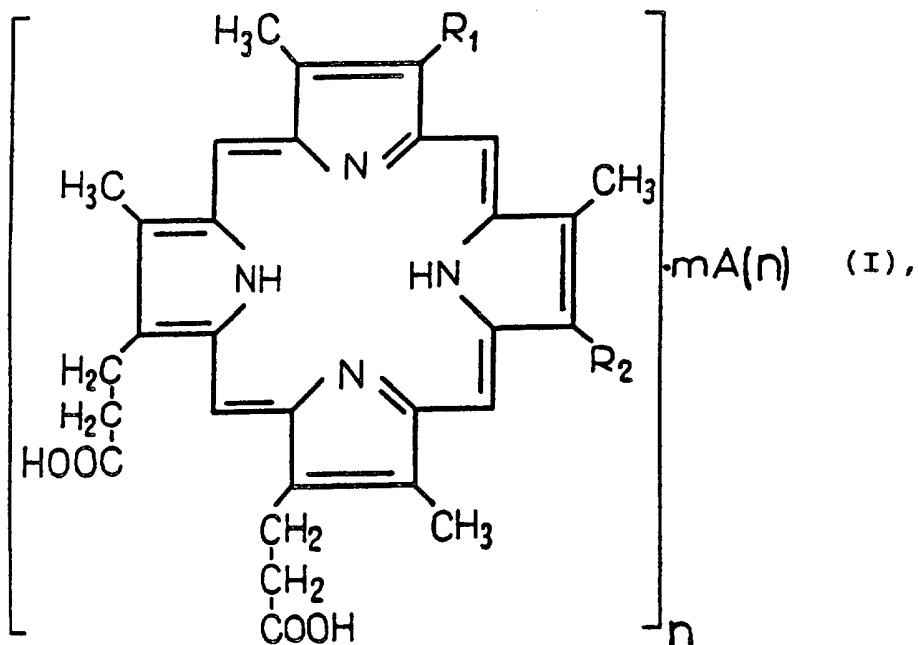


nebo R^1 a R^2 znamenají stejné skupinu, a to skupinu obecného vzorce $-\text{CH}(\text{R}^4)-\text{CH}_3$, v němž R^4 znamená tyto skupiny:

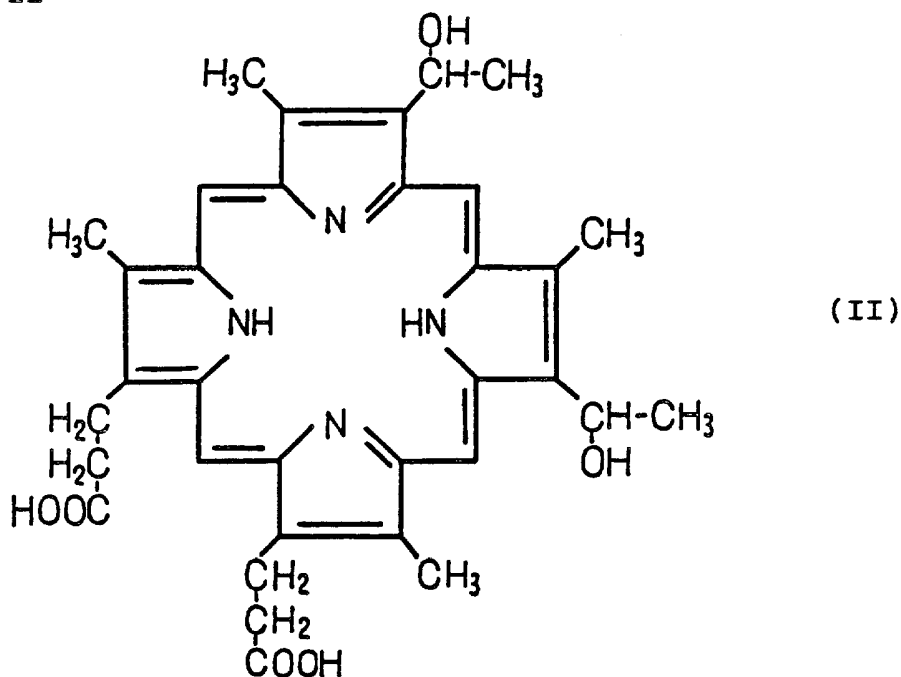
karboxymethylaminovou, 1-karboxyethylaminovou, 1-karboxy-2-methyl-propylaminovou, 1-karboxy-3-methyl-butylaminovou, 1-karboxy-2-methyl-butylaminovou, 1-karboxybutylaminovou, 1-karboxy-pentylaminovou, 1-karboxy-2-hydroxy-ethylaminovou, 1-karboxy-2-hydroxypropylaminovou, 1-karboxy-2-merkpto-ethylaminovou, 1-karboxy-3-methyl-thiopropylaminovou, 1,2-dikarboxy-ethylaminovou, 1-karboxy-2-karbamoyl-ethylaminovou, 1,3-dikarboxypropylaminovou, 1-karboxy-3-karbamoylpropylaminovou, 1-karboxy-2-fenyl-ethylaminovou, 1-karboxy-2-(4-hydroxy-fenyl)-ethylaminovou, 1-karboxy-2-indolyethylaminovou, 2-karboxy-pyrrolidinylovou, 2-karboxy-4-hydroxy-pyrrolidinylovou, 1-karboxy-5-aminopentylaminovou, 1-karboxy-4-guanidyl-butylaminovou, 1-karboxy-4-hydroxy-5-amino-pentylaminovou nebo 1-karboxy-2-(1H-imidazol)-ethylaminovou skupinu, A znamená bazickou aminokyselinu, jako arginin, lysin, hydroxy-lysin a histidin, m znamená 2 až 6 a n 1 až 5.

2. Komplexní soli hematoporfyrinu podle nároku 1, obecného vzorce I, kde znamená R^1 a R^2 vždy skupinu $-\text{CH}(\text{R}^4)-\text{CH}_3$, kde R^4 a ostatní symboly mají v nároku 1 uvedený význam.
3. Komplexní soli hematoporfyrinu podle nároku 1 nebo 2, obecného vzorce I, kde znamená m 2 a n 1 a ostatní symboly mají v nároku 1 nebo 2 uvedený význam.
4. Směs komplexních solí hematoporfyrinu podle nároků 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje alespoň dvě soli podle nároku 1 obecného vzorce I, kde jednotlivé symboly mají v nároku 1 uvedený význam.

5. Směs komplexních solí hematoporfyrinu podle nároků 1 nebo 2, vyznačující se tím, že obsahuje argininové soli hematoporfyrinu, protoporfyrinu, vinyldeuteroporfyrinu a dihematoporfyrin etheru.
6. Způsob přípravy komplexních solí hematoporfyrinu a jeho derivátů obecného vzorce I nebo směsí solí obecného vzorce I podle nároku 1

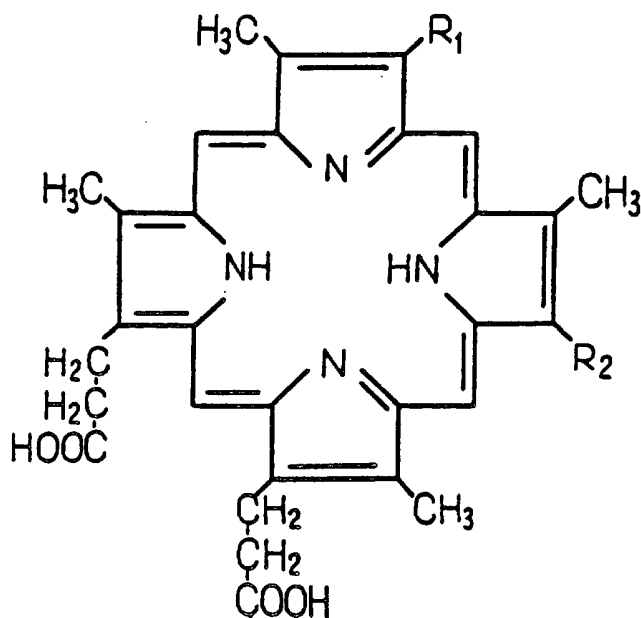


v němž R^1 a R^2 , které znamenají stejné nebo různé skupiny, znamenají skupinu $-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_3$ nebo $-\text{CH}(\text{OR}^3)-\text{CH}_3$, kde R^3 znamená skupinu tvořící oligomer obsahující etherovou a/nebo esterovou vazbu, tato skupina obsahuje 1 až 5 stejných nebo různých jednotek odvozených od monomeru podle nároku 1 vzorce II



nebo R^1 a R^2 znamenají stejné skupiny, a to skupinu obecného vzorce $-\text{CH}(R^4)-\text{CH}_3$, v němž R^4 znamená tyto skupiny:

karboxymethylaminovou, 1-karboxyethylaminovou, 1-karboxy-2-methyl-propylaminovou, 1-karboxy-3-methyl-butylaminovou, 1-karboxy-2-methyl-butylaminovou, 1-karboxybutylaminovou, 1-karboxypentylaminovou, 1-karboxy-2-hydroxy-ethylaminovou, 1-karboxy-2-hydroxy-propylaminovou, 1-karboxy-2-merkaptethylaminovou, 1-karboxy-3-methylthio-propylaminovou, 1,2-dikarboxy-ethylaminovou, 1-karboxy-2-karbamoyl-ethylaminovou, 1,3-dikarboxypropylaminovou, 1-karboxy-3-karbamoylpropylaminovou, 1-karboxy-2-fenyl-ethylaminovou, 1-karboxy-2-(4-hydroxyfenyl)-ethylaminovou, 1-karboxy-2-indolyethylaminovou, 2-karboxy-pyrrolidinylovou, 2-karboxy-4-hydroxypyrrolidinylovou, 1-karboxy-5-amino-pentylaminovou, 1-karboxy-4-guanidylbutylaminovou, 1-karboxy-4-hydroxy-5-amino-pentylaminovou nebo 1-karboxy-2-(1H-imidazol)-ethylaminovou skupinu, kde A znamená bazickou aminokyselinu uvedenou v nároku 1, m znamená číslo od 2 do 6 a n znamená číslo od 1 do 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že hematoporfyrinový derivát obecného vzorce IV nebo směs alespoň dvou derivátů obecného vzorce IV



(IV),

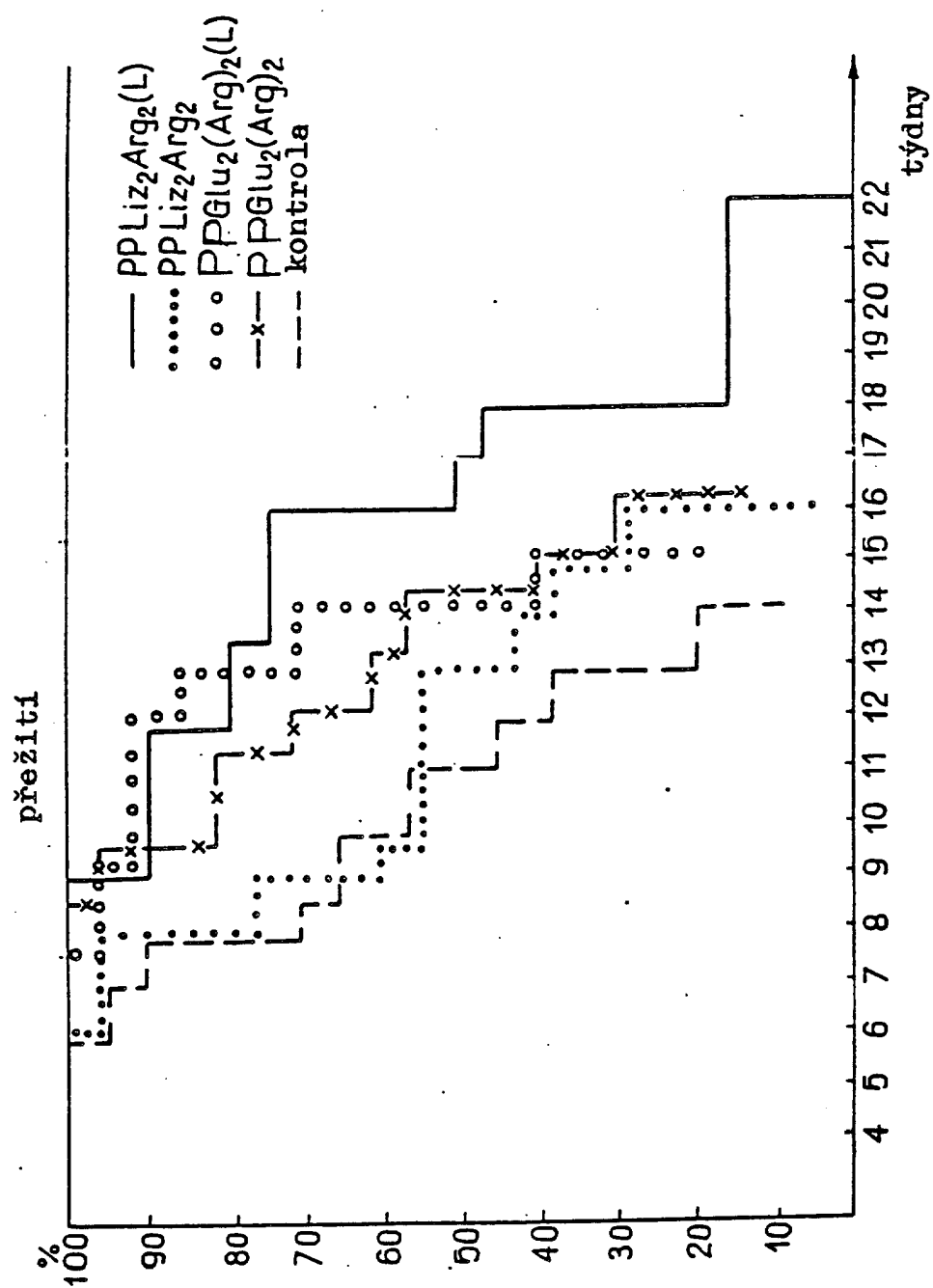
v němž R^1 a R^2 znamenají jak shora uvedeno s tím, že jestliže R^1 a R^2 znamenají skupinu obecného vzorce $-\text{CH}(R^4)-\text{CH}_3$, potom karboxylové skupiny substituentu R^4 mohou být volné nebo chráněné,

se nechává reagovat s bazickou aminokyselinou s volnými nebo s chráněnými karboxylovými skupinami nebo s jejím monohydrochloridem, popřípadě se odstraní chránicí skupiny z karboxylové skupiny a produkt se izoluje.

7. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se reakce provádí v organickém rozpouštědle ze souboru zahrnujícího amidy, nitrily, estery, ketony, sulfoxidy, alkoholy, ethylkarbonáty a jejich směsi nebo v prostředí obsahujícím uvedená rozpouštědla nebo jejich směsi a vodu.

8. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se jako aminokyselina používá arginin, lysin, hydroxylysin nebo histidin.
9. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se nechává reagovat směs obsahující hematoporfyrin, protoporfyrin, vinyldeuteroporfyrin a dihematoporfyrin-ether s argininem.
10. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se sůl nebo směs solí izoluje přidáním k reakční směsi rozpouštědla o nízké polaritě, jako je ethylether nebo aceton, nebo směsi rozpouštědel tvořících homogenní roztok s rozpouštědlem použitým při reakci.
11. Farmaceutický prostředek pro detekci a/nebo léčení nádorů, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje komplexní sůl hematoporfyrinu podle nároku 1 nebo směs alespoň dvou solí podle nároku 1 obecného vzorce I, kde jednotlivé symboly mají v nároku 1 uvedený význam.
12. Farmaceutický prostředek podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje komplexní sůl hematoporfyrinu podle nároku 1 nebo směs alespoň dvou solí podle nároku 1 obecného vzorce I, kde jednotlivé symboly mají v nároku 1 uvedený význam, v pevné formě.
13. Farmaceutický prostředek podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje komplexní sůl hematoporfyrinu podle nároku 1 nebo směs alespoň dvou solí podle nároku 1 obecného vzorce I, kde jednotlivé symboly mají v nároku 1 uvedený význam, a farmaceuticky vhodné ředidlo nebo nosič.

1 výkres



Obrázek 1

Konec dokumentu