



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2173337 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 31/282 (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.11.10
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.07.30
(86)	Europeisk søknadsnr	08797320.2
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.08.06
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.04.14
(30)	Prioritet	2007.08.06, US, 954126 P 2007.09.20, US, 973926 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	OHIO UNIVERSITY, Technology Transfer Office Unit 14 340 West State Street, Athens, Ohio 45701, US-USA
(72)	Oppfinner	BOSE, Rathindra, N., 10966 Rosewood Lane, Athens, OH 45701, US-USA
(74)	Fullmektig	Jesper Levin A/S, Enrum Slot, Vedbæk Strandvej 341, DK-2950 VEDBÆK, Danmark

(54)	Benevnelse	Fosfaplatiner og deres bruk i behandlingen av krefttyper som er resistente mot cisplatin og karboplatin
(56)	Anførte publikasjoner	EP-A1- 2 177 525 EP-A2- 0 409 527 WO-A2-2005/000858 US-A- 4 234 500 BOSE, RATHINDRA N. ET AL.: 'Kinetics and mechanisms of platinum(II)-promoted hydrolysis of inorganic polyphosphates' INORGANIC CHEMISTRY vol. 24, no. 24, 1985, pages 3989 - 3996, XP002601445

Beskrivelse

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

- 5 **[0001]** Platinadiaminkomplekser er vel kjent i teknikken på grunn av den store
suksessen cisdiammindiklorplatina(II) (cisplatin) har hatt for behandlingen av
eggstokk-, testikkel-, hode- og hals- og andre former for kreft. Dessuten brukes
cisplatin i forbindelse med andre terapeutiske regimer, inkludert strålingsterapi.
10 Dette platina-kjemoterapeutikumet formidler apoptose ved G2-fasen av
cellesyklusen i hovedsak gjennom transkripsjonshemming og gjennom
replikasjonshemmende prosesser, særlig ved høye doser. Kovalent binding til
DNA gjennom guanins og adeninbasers N7-posisjoner, begge ved intra- og
inter-streng-moduser, antas generelt å være den viktigste molekylære
15 hendelsen i overføringen av en kaskade med cellereaksjoner som fører til
apoptose.
- [0002]** Selv om cisplatin er svært effektivt, oppviser det nyre-, nefro- og
neurotoksisitet. Dessuten utvikler mange pasienter resistens mot
cisplatinbehandling over tid, og helbredes derfor ikke av cisplatinbehandling. To
20 andre FDA-godkjente platinalegemidler, karboplatin (diammin-1,1-
dikarkarboksylatsyklobutan-platina(II)) og oksaliplatin (diammin-
oksalatplatina(II)), antas også å fungere på en liknende måte som cisplatin.
Karboplatin er særlig effektivt mot cisplatinresistente svulstceller, men relativt
høye doser kreves for å effektivt behandle pasienter som er resistente mot
25 cisplatin. Slike høye doser har også tilknyttede toksisiteter.
- [0003]** Mange nye platinaaminkomplekser er blitt syntetisert og testet for sine
antikreftaktiviteter. Imidlertid har bare noen få av disse kompleksene (hvorav
noen er opplistet i figur 14) vist lovende resultater. Disse nye kompleksene
30 inneholder en rekke utskiftbare ikke-aminligander, samt ikke-utskiftbare
aminligander som antas å være viktige for DNA-binding og celleopptak.
Generelt syntetiseres disse og andre relevante platinaamminkomplekser fra
kjent teknikk ved hjelp av prosessen som brukes for å preparere cisplatin,
nemlig der tetraklorplatinat (PtCl_4^{2-}) mottar aminligander for å bli
35 $\text{PtCl}_2(\text{amin/diamin})$. Start fra tetraklorkomplekset gir generelt andre produkter,
og slik kan PtCl_4^{2-} også brukes til å sikre høyt utbytte og renhet hos cis-isomeren,
fulgt av konversjon av PtCl_4^{2-} til $\text{PtCl}_2(\text{amin/diamin})$ og deretter til
 $\text{PtCl}_2(\text{amin/diamin})$. Ved å konvertere $\text{PtCl}_2(\text{amin/diamin})$ til $\text{PtCl}_2(\text{amin/diamin})$
40 konverteres diiodkomplekset til divannkompleks ved å behandle det første med
to ekvivalenter av sølvnitrat eller andre løselige sølvsalter ved lav pH. Det
resulterende divannkomplekset reagerer lett med kaliumklorid eller saltsyre, slik
at det gir diklorkomplekset av interesse. Generelt syntetiseres
platinakompleksene av interesse fra de korresponderende divannkompleksene
45 ved en lav pH for å introdusere de utskiftbare ligandene, ettersom dimerisasjon
eller polymerisasjon av divannkomplekset finner sted raskt ved høyere pH, og
gir uønskede produkter.

[0004] I stedet for utskiftbare klorinligander har platinaaminkomplekser fra kjent teknikk også nitrogen, svovel, karboksylat og fosfonat som utskiftbare ligander. Én egenskap ved de kompleksene som er mest lovende for å behandle kreft, er imidlertid en utskiftbar hardbaseligand koordinert til platina (en myk syre). Eksempler på slike hard–myk-kombinasjoner som har oppvist utmerkede antikreftegenskaper, er karboksylat-, karbonat-, fosfonatplatinakomplekser.

[0005] Til tross for store anstrengelser for å skifte ut cisplatin med mer effektive kjemoterapeutika har platina(II)- og platina(IV)-komplekser med fosfater som utskiftbare ligander stort sett forblitt utforsket. Dette skyldes først og fremst det faktum at tidlige arbeider på platina(II)fosfatkomplekser som regel resulterte i fosfat-forbundne dinukleærkomplekser. Til tross for rapporter om utmerkede antikreftegenskaper hos noen dinukleære fosfatplatina(II)-komplekser ble ytterligere utforskning av deres anvendelse begrenset på grunn av disse kompleksenes dårlige løselighet i vandige løsninger. Selv om visse monomere pyro- og trifosfatkomplekser er kjent teknikk, er ikke slike komplekser egnet til farmasøytiske sammensetninger for di de gjennomgår fosfathydrolyse i moderat sure løsninger, noe som fører til uløselige dinukleære produkter (se US 7 342 122 til Odani et al., som beskriver en dimer av det monomere komplekset am-2, som er beskrevet her og i Bose et al., Inorg. Chem. 1985, 24, 3989-3996; se også WO 2005/000858 til Odani et al., som beskriver monomer am-2 som et potensielt antikreftlegemiddel).

[0006] Det finnes derfor fortsatt et behov i teknikken for stabile og effektive alternativer til cisplatin og karboplatin for behandlingen av krefttyper.

SAMMENDRAG AV OPPFINNELSEN

[0007] Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer sammensetninger som omfatter fosfaplatiner, stabile monomere fosfatkomplekser av platina(II) og (IV), til bruk i en framgangsmåte for å behandle kreft, som definert i kravene.

[0008] Det tilveiebringes også framgangsmåter for å lage og isolere fosfaplatiner, som definert i kravene.

[0009] Det beskrives framgangsmåter for å behandle krefttyper, inkludert cisplatin- og/eller karboplatin-resistente krefttyper, ved å administrere en effektiv mengde fosfaplatiner, enten alene eller i kombinasjon, med en farmasøytisk akseptabel bærer, til et individ som trenger slik behandling.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

[0010]

FIGUR 1 viser strukturer av noen av platina(II)- og platina(IV)-kompleksene i den foreliggende oppfinnelsen, der R1, R2, R3 og S er som definert i kravene. Ifølge krav 1 og 20 utgjør visse komplekser som er utelukket fra disse strukturene, også en del av oppfinnelsen. I visse utførelsesformer er R1 og R2 valgt blant amin, metylamin, etylamin, propylamin, isopropylamin, butylamin, sykloheksanamin, anilin, pyridin og substituert pyridin. I visse utførelsesformer er R3 valgt blant etylendiamin og sykloheksandiamin. I visse utførelsesformer er det framsatt krav om farmasøytisk akseptable salter av forbindelsene.

FIGUR 2 viser strukturer av noen isolerte komplekser av den foreliggende oppfinnelsen, nemlig (A) diammin(dihydrogenpyrofosfat)platina(II), også kjent som am-2; (B) *cis*-diammin-*trans*-dihydrokso(dihydrogenpyrofosfat)platina(IV), også kjent som am-4; (C) 1,2-etandiamin(dihydrogenpyrofosfat)platina(II), også kjent som en-2; (D) 1,2-etandiamin-*trans*-dihydrokso(dihydrogenpyrofosfat)platina(IV), også kjent som en-4; (E) (*trans*-1,2-sykloheksandiamin)(dihydrogenpyrofosfat)platina(II), også kjent som dach-2; og (F) (*trans*-1,2-sykloheksandiamin)-*trans*-dihydrokso(dihydrogenpyrofosfat)platina(IV), også kjent som dach-4.

FIGUR 3 viser røntgenkrystallstrukturen til am-4 med natrium-motion.

FIGUR 4 viser røntgenkrystallstrukturen til en-4 i dets ulike konformasjoner, som sett fra pyrofosfatsiden.

FIGUR 5 viser omfanget av protonasjon av kompleksene vist i figur 2, som målt av ^{31}P kjemisk skifte som en funksjon av pH. De estimerte aciditetskonstantene er opplistet i tabell 1. Disse dataene gir innsikt i løselighetsforskjellene hos disse kompleksene mellom sur løsning og nøytral løsning. Under de beskrevne forholdene ved pH-verdier under 2 er disse kompleksene fullstendig protonert og forventes dermed å oppvise redusert løselighet.

FIGUR 6 viser den ulike stabiliteten av dach-2 ved (A) pH 4,2 og (B) pH 8. Ved pH 8 ble ingen nedbrytning av dach-2 observert, som vist ved retensjonen av det koordinerte pyrofosfationet til platina(II) i opptil seks dager. I motsetning til dette er det ved pH 4,2 synlig betydelig nedbrytning på grunn av oppkomsten av fritt pyrofosfat-signalet. Med start fra det nederste spekteret i hvert panel ble det registrert spektre med intervaller på 24 timer.

FIGUR 7 er et plott av sammenlikningen av cytotoksiske virkninger av dach-2, cisplatin og karboplatin som en funksjon av mikromolar konsentrasjon i cisplatin- og karboplatinresistente humane ovarialcellelinjer (A2780/C30). Denne cellelinjen er resistent mot 30 mikromolar cisplatin og 100 mikromolar karboplatin.

FIGUR 8 er et plott som sammenlikner de cytotoksiske virkningene av dach-2 med FDA-godkjent cisplatin- og karboplatin-antikreftlegemidler rettet mot human ovarialcellelinje (A2780).

5 FIGUR 9 representerer cytotoksisitet av dach-2 rettet mot (A) cisplatinsensitive og (B) cisplatinresistent hode- og halskreftcellelinjer. IC50-verdier for dach-2 for cisplatinsensitive celler er under 1 mikromolar, og for cisplatinresistente celler er det under 5 mikromolar.

10 FIGUR 10 viser at ved en gitt konsentrasjon tas dach-2 opp av celler (som bestemt ved atomabsorpsjonsspektroskopi) i reduserte mengder sammenliknet med cisplatin. For eksempel var cisplatinakkumulasjon i A2780-celler ved 10 μ M konsentrasjon 3,0 ng Pt/10⁶ celler, mens dach-2 viste 1,0 ng Pt/10⁶ celler. En liknende trend for platinaakkumulasjoner gjelder for andre konsentrasjoner.

15 FIGUR 11 viser omfanget av DNA-binding ved cisplatin som en funksjon av konsentrasjon i human ovarialcellelinje (A2780) målt ved atomabsorpsjonsspektroskopi etter å ha inkubert cisplatin i 2 timer. Intet DNA-bundet platina ble detektert av samme teknikk når A2780-celler ble behandlet med dach-2 opp til 50 mikromolar konsentrasjon, selv når cellene var behandlet i 24 timer.

20 FIGUR 12 er en sammenlikning av guaninbasebinding (cisplatins dominerende DNA-bindingsposisjon) blant cisplatin (bunn), am-2 (midt) og dach-2 (topp) ved proton-NMR-spektroskopi. Toppspekteret oppviser et signal for fritt guanin-basen ved 8,05 ppm for purinringens H8-hydrogen, bunnspekteret viser et ytterligere signal ved 8,43 ppm for H8-proton på grunn av guaninbinding til cisplatin gjennom purinringens N7-posisjon, og det midtre spekteret indikerer bare det ubundne guanin-H8-signalet, men ikke platinabundet signal. Bunnspekteret ble registrert etter 48 timer. Midt- og toppspekteret ble registrert etter henholdsvis 96 og 106 timer. At kompleksene i den foreliggende oppfinnelsen ikke kovalent binder guaninbaser (DNA-bindingsposisjonen for cisplatin, karboplatin og oksaliplatin), antyder apoptotiske mekanismer som er forskjellige fra de som er foreslått for cisplatin.

35 FIGUR 13 viser ¹H NMR-spektroskopidata som bekrefter mangelen på DNA-binding i humane ovarialceller hos dach-2. I det tilknyttede eksperimentet ble dach-2 tillatt å regere med dobbeltstrengt kalvetymus-DNA, et syntetisk oligonukleotid (5'-ATGATTTAGGTGACACTATAGCAGT-3'), et dinukleotid (dGpG), og nukleotidmonofosfater (5'-dGMP og 5'-dAMP) ved konsentrasjoner så mye som 250 ganger høyere enn de hos celledoser. Omfanget av DNA-binding ble overvåket ved ¹H NMR-spektroskopi. Parallelt ble liknende reaksjoner med cisplatin utført under identiske forhold. Resultater fra et typisk NMR-eksperiment ved bruk av et 25-mer-oligonukleotid er vist i figuren, som viser at dach-2 ikke oppviser noen målbar DNA-binding,

mens cisplatin lett danner kovalent addukter med DNA, som vist ved dannelsen av nye signaler i området 8,4 til 8,95 ppm. Cisplatin dannet imidlertid lett addukter med alle nukleotidene nevnt ovenfor, mens ingen detekterbare NMR-signaler for dach-2-binding til nukleotidene ble observert selv etter sju dager.

FIGUR 14 viser strukturer av noen av de aktive platinakompleksene i kjent teknikk som brukes som legemidler, vurderes som potensielle legemidler, eller som har undergått kliniske forsøk.

FIGUR 15 viser strukturer av komplekser som brukes til å danne fosfaplatinkompleksene i FIGURE 1; X er halogen, R1, R2 og R3 er hver uavhengig valgt blant substituerte eller usubstituerte alifatiske eller aromatiske aminer.

DETALJERT BESKRIVELSE

[0011] Her tilveiebringes stabile, monomere platina(II)- og (IV)-pyrofosfatkomplekser (kalt fosfaplatiner) for kreftbehandling, inkludert behandling av cisplatin- og/eller karboplatinresistent krefttyper. Generelt undergår ikke fosfaplatiner lett hydrolyse, er løselige i vandig løsning ved nøytral pH, og er stabile i vandig løsning ved nøytral pH. Videre viser fosfaplatiner generell cytotoxiskitet i kreftcellerlinjer, og er effektive i cellerlinjer som er resistente mot én eller begge av cisplatin og karboplatin. Dermed er fosfaplatinene effektive, og i noen tilfeller mer effektive, i å indusere kreftcelledød sammenliknet med kjente platinkreftlegemidler, og oppviser ønsket stabilitet og løselighet i løsninger som er egnet for administrering til pasienter. Slik det brukes her med henvisning til fosfaplatinene i oppfinnelsen, viser stabil til kompleksenes resistens mot hydrolyse når de holdes i vandig løsning ved en pH i området fra 6 til 8 i en periode fra to til seks dager.

[0012] Det antas at fosfaplatiner, til forskjell fra cisplatin, karboplatin og relaterte platinabaserte antikreftstoffer, ikke binder DNA kovalent. Ettersom cisplatinresistens antas å komme av effektiv reparasjon av DNA-skade ved hjelp av en rekke enzymer, inkludert nukleæreksisjonsreparasjonsenzymer, og ettersom fosfaplatiner ikke binder DNA kovalent, er resistens mot fosfaplatiner på grunn av DNA-reparasjonsmekanismen usannsynlig. Data antyder at fosfaplatiner utløser overekspresjon av fas og fas-relaterte transkripsjonsfaktorer og noen proapoptotiske gener så som Bak og Bax. I tillegg er fosfaplatiners cellebinding mye mindre enn cisplatin, likevel oppviser fosfaplatinene stor cytotoxiskitet. Således tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen effektive platina-antikreftstoffer som har et annet molekylmål enn de i kjent teknikk.

[0013] I noen utførelsesformer har kompleksene de generelle formlene vist i

figur 1, der R1, R2, R3 og S er som definert i kravene. Ifølge krav 1 og 20 utgjør visse komplekser som er utelukket fra disse strukturene, også en del av oppfinnelsen. I visse utførelsesformer er R1 og R2 valgt blant amin, metylamin, etylamin, propylamin, isopropylamin, butylamin, sykloheksanamin, anilin, pyridin og substituert pyridin. I visse utførelsesformer er R3 valgt blant etylendiamin og sykloheksandiamin.

[0014] I visse utførelsesformer er det framsatt krav om farmasøytisk akseptable salter av forbindelsene. Dermed omfatter antikreftstoffene i den foreliggende oppfinnelsen, i visse utførelsesformer, kompleksene i figur 2.

[0015] Her tilveiebringes også framgangsmåter for å syntetisere og isolere stabile monomere platina(II)- og (IV)-pyrofosfatkomplekser. I ett eksempel omfatter framgangsmåten å danne komplekser som har formelen i figur 1 (I) og (III) ved å opprettholde en vandig reaksjonsblanding som omfatter eksess av pyrofosfat og et platinakompleks av formlene vist i figur 15, der R¹, R², R³ og X er som definert i kravene; ved en temperatur på ca. 30 til ca. 60 grader Celsius i en periode på ca. 12 til ca. 18 timer ved en pH fra ca. 7 til ca. 9.

[0016] Kompleksene vist i figur 15 kan lages på en hvilken som helst egnet måte. I noen eksempler som generelt beskrevet i kjent teknikk kan *cis*-(amin/diamin)diklorplatina(II)-komplekser prepareres ved å konvertere K₂PtCl₄ til K₂PtI₄ ved å tilsette kaliumjodid. Dette reageres deretter med de ønskede aminligandene. De resulterende *cis*-(amin/diamin)dijodplatina(II)-kompleksene transformeres så til de korresponderende *cis*-(amin/diamin)divannplatina(II)-kompleksene in situ ved å tilsette to ekvivalenter av sølvnitrat. *Cis*-divannartene [Pt(amin/diamin)₂(H₂O)₂²⁺] konverteres så til *cis*-diklorkompleksene ved å tilsette kaliumklorid.

[0017] Det skal forstås at andre egnede reaksjonsforhold kan benyttes. For eksempel kan temperaturen i noen utførelsesformer være fra ca. 35 til ca. 45 grader C. Dermed kan reaksjonstemperaturen være fra ca. 30–31, 31–32, 32–33, 33–34, 34–35, 35–36, 36–37, 37–38, 38–39, 39–40, 40–41, 41–42, 42–43, 43–44, 44–45, 45–46, 46–47, 47–48, 48–49, 49–50, 50–51, 51–52, 52–53, 53–54, 54–55, 55–56, 56–57, 57–58, 58–59, 59–60 grader C, og mellomliggende steg. Gode resultater er blitt oppnådd ved 40 grader C. I noen eksempler ble reaksjonene latt gå fra ca. 13 til ca. 16 timer. Dermed kan reaksjonstiden være fra ca. 12–13, 13–14, 14–15, 15–16, 16–17 og 17–18 timer, og mellomliggende steg. Gode resultater er blitt oppnådd ved reaksjonstider på 15 timer. I noen eksempler kan pH-en være fra ca. 6–7, 7–8 og 8–9, og mellomliggende steg. Gode resultater er blitt oppnådd ved pH på ca. 8.

[0018] Framgangsmåten omfatter videre å deretter konsentrere den vandige reaksjonsblandingen, slik at det ikke dannes bunnfall av pyrofosfat. Det skal forstås at den vandige reaksjonsblandingen kan konsentreres på en hvilken som helst egnet måte. For eksempel kan den vandige reaksjonsblandingen konsentreres ved roterende fordampning.

- 5 **[0019]** Framgangsmåten omfatter videre å raskt senke reaksjonsblandingens pH til en pH mindre enn 2 ved å tilsette en egnet syre. I noen eksempler kan salpetersyre brukes til å senke pH-en. I noen utførelsesformer er pH-en i området mellom ca. 1 og mindre enn 2. Gode resultater er blitt oppnådd ved pH 1.
- 10 **[0020]** I noen eksempler omfatter framgangsmåten også reaksjonsblandingen til en temperatur på mellom 5 grader Celsius og omgivelsestemperatur etter å ha konsentrert reaksjonsblandingen. I andre eksempler omfatter framgangsmåten også å avkjøle reaksjonsblandingen til en temperatur på mellom 5 grader Celsius og omgivelsestemperatur etter å ha senket reaksjonsblandingens pH.
- 15 **[0021]** I andre utførelsesformer tilveiebringes framgangsmåter for å danne komplekser i henhold til figur 1 (II) og (IV). Framgangsmåtene er som beskrevet ovenfor, men omfatter videre å tilsette til reaksjonsblandingen hydrogenperoksid, og eventuelt en reagens valgt fra gruppen acetatsalter, butyratsalter og salter av alfa-hydroksysyrer etter å ha opprettholdt reaksjonsblandingen ved en temperatur på ca. 30 til ca. 60 grader Celsius i en periode på ca. 12 til ca. 18 timer ved en pH fra ca. 7 til ca. 9.
- 20 **[0022]** I noen eksempler er den eventuelle reagensen som er tilsatt sammen med hydrogenperoksid før konsentrasjon av reaksjonsblandingen, valgt blant natriumacetat, natriumbutyrat og natriumsalter av alfa-hydroksysyrer. I andre eksempler er den eventuelle reagensen som er tilsatt sammen med hydrogenperoksid før konsentrasjon av reaksjonsblandingen, valgt blant kaliumacetat, kaliumbutyrat og kaliumsalter av alfa-hydroksysyrer.
- 25 **[0023]** Framgangsmåten for syntese og isolasjon av monomere komplekser beskrevet her kan utmerke seg framfor kjent teknikk ettersom den nye framgangsmåten ikke produserer dimere eller oligomere fosfatforbindelser. For eksempel var framgangsmåten rapportert av Bose et al. i Inorg. Chem. 1985, 24, 3989-3996 ("Bose 1985"), som omfatter å isolere $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7)$ (am-2) fra reaksjonsblandingen ved å absorbere det anioniske pyrofosfatkomplekset på en anionbytterharpiks ved nøytral pH og eluere det med en eluent med lavere pH, ikke nyttig for syntesen og isolasjonen av am-4, en-2, en-4, dach-2 og dach-4. Da Bose 1985-framgangsmåten ble brukt, ble disse kompleksene brutt ned på ionebyttersengene da separasjon ble forsøkt ved elusjon med en elektrolytt med lavere pH. Initielt ble kompleksene brunsvarte, fulgt av dannelsen av et uløselig svart bunnfall innenfor ionebytterharpiksene. Separasjon av am-4, en-2, en-4, dach-2 og dach-4 fra deres respektive reaksjonsblandinger var bare mulig når Bose 1985-framgangsmåten ble modifisert som beskrevet her. Hver reaksjonsblanding ble konsentrert ved vakuumbfordampning i den grad at ureagert pyrofosforsyre ikke felte ut når pH-en ble senket i et følgende trinn (pyrofosfatligandens løselighet varierer mye med pH). For å initiere selektiv felling var sluttkonsentrasjonene mellom 0,05 M og 0,08 M, ettersom ytterligere reduksjon i volum resulterte i kofelling av det
- 30
- 35
- 40
- 45

ureagerte pyrofosfatet som må være til stede i eksess under reaksjonen. Etter konsentrering ble reaksjonsblandingen avkjølt, og pH-en ble raskt senket til 1,0 for å indusere felling ved å dra nytte av forskjellen i løselighet mellom de protonerte og avprotonerte formene av kompleksene.

[0024] Ved nøytral pH er de isolerte monomere Pt(II)- og Pt(IV)-kompleksene i den foreliggende oppfinnelsen stabile. Som indikert av ^{31}P NMR-spektre led ikke kompleksene i området med pH 6-8 noen deligasjon på grunn av tapet av enten en amin eller en pyrofosfatligand over tidsintervallet på seks dager ved nøytral pH i vandig løsning. I samme tidsintervall var imidlertid treg deligasjon på grunn av utslippet av pyrofosfatliganden synlig ved pH 4,2 ved oppkomsten av fritt pyrofosfat-signalet på -10,3 ppm. Samtidig ble det dannet et uløselig pyrofosfat-forbundet dinukleærplatina(II)-produkt. Dataene indikerer også at syrenedbrytning stort sett er avhengig av aciditet – dess høyere aciditer, dess raskere nedbrytning (se figur 5, tabell 1 og tabell 2).

Tabell 1. Kjemiske bytter (d, ppm) for avprotonerte platina(II)- og platina(IV)pyrofosfat-komplekser og Pt-P-koplingskonstanter

Kompleks	$\delta\text{-}^{31}\text{P}$, ppm	$\delta\text{-}^{195}\text{Pt}$, ppm	$J_{\text{P-Pt}}$, Hz
am-2	2,12	-1503	23,44
dach-2	1,78	-1729	25,03
en-2	1,93	–	29,73
am-4	2,32	1733	15,38
dach-4	2,41	1613	25,91
en-4	2,35	1582	25,91

Tabell 2. Beregnet pKa-verdier (-log av aciditetskonstanter) for Pt(II)- og Pt(IV)pyrofosfat-komplekser bestemt ut fra kjemiske bytter med fosfor-31

Kompleks	pKa ₁	pKa ₂
am-2	2,9±0,3 (3,8±0,1)	4,7±0,2
en-2	2,2±0,1	4,4±0,1
dach-2	2,6±0,2 (3,3±0,1)	4,4±0,2
am-4	2,0±0,1	4,7±0,1
en-4	<2	4,3±0,1

[0025] Kompleksene i den foreliggende oppfinnelsen er nyttige for å behandle ulike krefttyper. Cytotoksiske analyser i humane ovarialcellelinjer (A2780) og kinesiske ovarialceller (CHO) viser at disse kompleksene er effektive som en første behandlingsrunde, og analyser med både cisplatin- og karboplatinresistente ovarialceller (C30) (se tabell 3) viser at disse kompleksene er en egnet andre behandlingsrunde for resistente krefttyper. Kompleksene i den foreliggende oppfinnelsen er spesielt ønskelige ettersom de kan ha

reduisert toksisitet *in vivo*. Disse kompleksene tas opp av celler i reduserte mengder sammenliknet med cisplatin, noe som indikerer at lavere dosering kan være nødvendig sammenliknet med doseringer for cisplatin og andre platina-kreftterapeutika. For eksempel var cisplatinakkumulasjon i A2780-celler ved 10 μM konsentrasjon 3,0 ng Pt/ 10^5 celler, mens dach-2 viste 1,0 ng Pt/ 10^6 celler, og i de resistente cellelinjene viste dach-2 1,4 ng Pt/ 10^6 celler ved sin IC₅₀-verdi, mens cisplatin viste > 5 ng Pt/ 10^6 celler, likevel er IC₅₀-verdien for det forrige komplekset mindre enn halvparten av det siste komplekset (se figur 10 og tabell 4).

Tabell 3. IC₅₀-verdier i μM -konsentrasjoner for fosfaplatiner, cisplatin og karboplatin i A270 og A2780/C30, CHO-cellelinjer

Kompleks	A780	A2780/C30	CHO
Cisplatin	7,5 $\pm$ 1,5	110 $\pm$ 11,29	29 $\pm$ 3
Karboplatin	90 $\pm$ 13	>200	>200
dach-2	20 $\pm$ 4	48 $\pm$ 5	35 $\pm$ 5
dach-4	180 $\pm$ 15	155 $\pm$ 17	116 $\pm$ 17
am-2	100 $\pm$ 11	>200	120 $\pm$ 30
am-4	175 $\pm$ 22	>200	>200
en-4	170 $\pm$ 33	>200	>200

Tabell 4. Komparative celleakkumulasjoner (ng/ 10^6 celler) of platina for cisplatin og pyrodach-2 i A2780 og A2780/C30-cellelinjer

Konsentrasjon (μM)	A2780		A2780/C30	
	Cisplatin	dach-2	Cisplatin	dach-2
10	3,00 $\pm$ 0,05	1,00 $\pm$ 0,20	1,00 $\pm$ 0,10	0,10 $\pm$ 0,08
20	5,00 $\pm$ 0,06	1,50 $\pm$ 0,30	2,00 $\pm$ 0,40	1,00 $\pm$ 0,02
30	6,00 $\pm$ 0,10	3,00 $\pm$ 1,00	2,00 $\pm$ 0,50	1,00 $\pm$ 0,02
50	20,00 $\pm$ 1,00	5,00 $\pm$ 0,30	5,00 $\pm$ 1,00	2,00 $\pm$ 0,10

[0026] Dataene antyder at kompleksene i den foreliggende oppfinnelsen kan indusere apoptose ved hjelp av andre molekyl- og cellemekanismer enn cisplatin og andre platinalegemidler. For det første indikerer fraværet av kovalent binding (se figur 12 og eksempel 13) at kompleksene i oppfinnelsen ikke fungerer gjennom DNA-bindingsveien. Det er generelt antatt av fagpersonene at ervervet cisplatinresistene er en følge av effektiv fjerning av platina fra DNA ved nukleotideksisjonreparasjonsprosessen. På grunn av det åpenbare fraværet av DNA-binding, og dermed muligheten for at DNA-reparasjonsmekanismer ikke opererer på kompleksene i oppfinnelsen, kan celleresistens mot kompleksene elimineres. Denne konklusjonen har støtte i

cytotoksisitetsdataene som viser at dach-2 er aktivt i både cisplatin- og karboplatinresistente cellerlinjer (se tabell 3).

5 **[0027]** For det andre kommer evidens for at kompleksene i den foreliggende oppfinnelsen induserer apoptose ved hjelp av andre molekyl- og cellemekanismer enn cisplatin og andre platinalegemidler, fra eksperimenter der dach-2 fikk reagere med cystein og glutathion (data ikke vist). Pyrofosfatliganden av dach-2 ble lett utskiftet med konkomitant ligasjon gjennom tiolet, noe som indikerer mulige proteinankerposisjoner på 10 celleoverflateproteinene gjennom cystein- eller metioninrester.

[0028] For det tredje kommer evidens for at kompleksene i den foreliggende oppfinnelsen induserer apoptose ved hjelp av andre molekyl- og cellemekanismer enn cisplatin og andre platinalegemidler, også fra 15 eksperimenter som involverte overekspresjon av fas og dets tilknyttede elementer (se eksempel 11). Slik overekspresjon som reaksjon på kompleksene i oppfinnelsen impliserer at andre signaloverføringsveier enn DNA-skadende veier mest sannsynlig er involvert i å oppvise de cytotoxiske aktivitetene til kompleksene i oppfinnelsen. I gjennomsnitt var fas overeksprimert med en 20 faktor på seks når cellene var behandlet med komplekser fra den foreliggende oppfinnelsen, mens ingen signifikant overekspresjon var observert i celler behandlet med cisplatin.

[0029] Som beskrevet her er kompleksene i den foreliggende oppfinnelsen like 25 effektive eller mer effektive enn vanlig benyttet cisplatin og karboplatin, slik at de tilveiebringer en framgangsmåte for kreftbehandling for pasienter som tidligere manglet effektive alternativer til cisplatin- og karboplatinbehandling. En pasient trenger imidlertid ikke å være tidligere behandlet med cisplatin eller karboplatin for å bli behandlet med kompleksene som er beskrevet her. 30 Administrering av behandlingen kan utføres i et sykehus eller annen medisinsk fasilitet av medisinsk personell.

[0030] Kompleksene i den foreliggende oppfinnelsen administreres og doseres i 35 henhold til god medisinsk praksis, med hensyn til den enkelte pasientens kliniske tilstand, stedet og måten det administreres på, administreringsplan, pasientens alder, kjønn, kroppsvekt og andre faktorer kjent for medisinske utøvere. Den farmasøytisk «effektive mengden» for formålene her er dermed bestemt av slike overveininger som er kjent teknikk. Mengden må være effektiv for å oppnå forbedring, inkludert, men ikke begrenset til, forbedret 40 overlevelseshastighet eller raskere tilfriskning, eller forbedring eller eliminering av symptomer og andre indikatorer som er valgt som egnede mål av fagpersonen. Kompleksene i den foreliggende oppfinnelsen kan administreres til dyr, inkludert pattedyr.

45 **[0031]** Kompleksene i den foreliggende oppfinnelsen kan administreres på ulike måter. Det skal bemerkes at de kan administreres som komplekset, og kan administreres alene i vandig løsning som drar nytte av disse kompleksenes utmerkede løselighet, eller som en aktiv ingrediens i kombinasjon med

farmasøytisk akseptable bærere, fortynningsmidler, adjuvanter og vehikler. Kompleksene kan administreres oralt, subkutant eller parenteralt, inkludert intravenøs, intraarterial, intramuskulær, intraperitoneal, intratonsillær og intranasal administrering, samt intratekale og infusjonsteknikker. Implantater av kompleksene er også nyttige. Pasienten som behandles, er et varmblodig dyr, og spesielt pattedyr, inkludert mennesker. De farmasøytisk akseptable bærerne, fortynningsmidlene, adjuvantene og vehiklene samt implantatbærerne viser generelt til inerte, ikke-toksiske faste stoffer eller flytende fyllstoffer, fortynningsmidler eller innkapslingsmaterialer som ikke reagerer med de aktive ingrediensene i oppfinnelsen.

[0032] Dosene kan være enkeltdoser eller multiple doser over en periode på flere dager. Behandlingen har generelt en lengde proporsjonal med lengden av sykdomsprosessen og legemiddeleffektiviteten, og pasienttypen som behandles.

[0033] Når kompleksene i den foreliggende oppfinnelsen administreres parenteralt, vil de generelt være formulert i en enhetsdoseinjiserbar form (løsning, suspensjon, emulsjon). De farmasøytiske sammensetningene egnet til injeksjon omfatter sterile vandige løsninger eller dispersjoner og sterile pulvere for rekonstituering til sterile injiserbare løsninger eller dispersjoner. Bæreren kan være et løsningsmiddel eller dispersjonsmedium som for eksempel inneholder vann, etanol, polyol (for eksempel glyserol, propylenglykol, flytende polyetylglykol, og liknende), egnede blandinger av dette, og vegetabiliske oljer.

[0034] Riktig fluiditet kan for eksempel opprettholdes ved bruk av et belegg så som lecitin, ved opprettholdelse av påkrevd partikkelstørrelse i tilfelle dispersjon, og ved bruk av overflateaktive stoffer. Ikke-vandige vehikler, så som en bomullsfrøolje, sesamolje, olivenolje, soyabønneolje, maisolje, solsikkeolje eller jordnøttolje, og estere, så som isopropylmyristat, kan også brukes som løsemiddelsystemer for sammensetningene. I tillegg kan det tilsettes ulike tilsetningsstoffer som øker sammensetningenes stabilitet, sterilitet og isotonsitet, inkludert antimikrobielle konserveringsstoffer, antioksidanter, chelatdannere og buffere. Forebygging av mikroorganismers virksomhet kan sikres ved hjelp av ulike antibakterie- og antisoppmidler, for eksempel parabener, klorobutanol, fenol, sorbinsyre og liknende. I mange tilfeller vil det være ønskelig å inkludere isotonske virkestoffer, for eksempel sukker, natriumklorid og liknende. Langvarig absorpsjon av den injiserbare farmasøytiske formen kan fås i stand ved å bruke virkestoffer som forsinker absorpsjon, for eksempel aluminummonostearat og gelatin. Ifølge den foreliggende oppfinnelsen må imidlertid ethvert vehikkel, fortynningsmiddel eller tilsetningsstoff som brukes, være kompatibelt med kompleksene.

[0035] Sterile injiserbare løsninger kan prepareres ved å inkorporere kompleksene som benyttes til å utøve den foreliggende oppfinnelsen, i nødvendig mengde av det aktuelle løsemiddelet med ulike andre ingredienser etter ønske.

[0036] En farmakologisk formulering av den foreliggende oppfinnelsen kan administreres til pasienten i en injiserbar formulering som inneholder en hvilken som helst kompatibel bærer, så som ulike vehikler, adjuvanter, tilsetningsstoffer og fortynningsmidler; eller kompleksene som benyttes i den foreliggende oppfinnelsen kan administreres parenteralt til pasienten i form av saktefrigjørende subkutane implantater eller målrettede leveringssystemer så som monoklonale antistoffer, vektorlevering, iontoforetisk, polymermatriser, liposomer og mikrosfærer. Mange andre slike implantater, leveringssystemer og moduler er velkjent for fagpersonen.

[0037] Oppfinnelsen er videre beskrevet nærmere ved henvisning til de følgende eksperimentelle eksemplene. Disse eksemplene er tilveiebrakt bare med tanke på illustrasjon, og er ikke ment å være begrensende.

[0038] Beskrivelsen ovenfor og eksemplene som følger viser syntese av pyrofosfatplatinakomplekser på en måte som er forskjellig fra tidligere beskrevne framgangsmåter for syntese. Disse kompleksene er blitt vist å ha antikreftaktivitet, inkludert hos cisplatin- og karboplatinresistente krefttyper. Uventet er antikreftaktiviteten som er vist, sammenliknbar med og aktiv ved relativt mindre doser enn noen platinakomplekser som administreres i dag. Også uventet antyder data at kompleksene i den foreliggende oppfinnelsen har en annen virkemekanisme enn platinakomplekser som administreres i dag, nemlig at de ikke binder DNA under behandling. Dermed representerer kompleksene i den foreliggende oppfinnelsen en ny klasse platinaterapeutika som er nyttig for å behandle krefttyper, inkludert cisplatin- og karboplatinresistente krefttyper, der effektiv behandling tidligere har vært vanskelig å oppnå.

EKSEMPEL 1: Diammin(dihydrogenpyrofosfat)platina(II) (am-2)

[0039] Natriumpyrofosfatdekahydrat (0,4 g) og 0,1 g cisplatin ble løst i 250 ml destillert vann, pH 8, og inkubert ved 40 grader C i 15 timer. Etter inkubasjonsperioden ble løsningen konsentrert til 5–10 ml ved roterende fordampning, og filtrert for å fjerne eventuelt ureagert startmateriale. Rask senkning av pH til ca. 1,0 ved å tilsette 1 N HNO₃ felte produktet som et lysegult pulver. Felling ble fullført ved avkjøling på is, og produktet ble isolert ved vakuumfiltrasjon og vasket med kaldt vann og aceton. Utbytte Pt(NH₃)₂(H₂P₂O₇): 0,04 g (30 %). ³¹P NMR-spekteret viser en enkelt topp ved 2,12 ppm, pH 7,99 med hensyn til 85 % fosforsyre som en ekstern referanse. ¹⁹⁵Pt NMR-resonans er detektert ved -1503 ppm.

EKSEMPEL 2: Cis-diammin-trans-dihydrokso(dihydrogenpyrofosfat)platina(IV) (am-4)

[0040] Natriumpyrofosfatdekahydrat (0,4 g) og 0,1 g cisplatin ble løst i 250 ml

destillert vann, pH 8, og inkubert ved 40 grader C i 15 timer. Etter inkubasjonsperioden ble 1 ml 30 % H_2O_2 tilsatt til reaksjonsblandingen, og det fikk reagere i ytterligere 3 timer. Løsningen ble deretter konsentrert til 5–10 ml ved roterende fordampning, og filtrert for å fjerne eventuelt ureagert startmateriale. Rask senkning av pH til ca. 1,0 ved å tilsette 1 N HNO_3 felte produktet som et lysegult pulver. Felling ble fullført ved avkjøling på is, og produktet ble isolert ved vakuumfiltrasjon og vasket med kaldt vann og aceton. Utbytte *cis, trans*- $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7)$: 0,05 g (34 %). ^{31}P NMR-spekteret viser en enkelt topp ved 2,32 ppm, pH 8,11, med en ^{195}Pt - ^{31}P -koplingskonstant på 15,4 Hz. ^{195}Pt NMR-spekteret viser en pentet ved 1733 ppm med en ^{195}Pt - ^{14}N -koplingskonstant på 232 Hz.

EKSEMPEL 3: 1,2-Etandiamin(dihydrogenpyrofosfat)platina(II) (en-2)

[0041] Natriumpyrofosfatdekahydrat (0,4 g) og 0,1 g diklor(etylendiamin)platina(II) ble løst i 250 ml destillert vann, pH 8, og inkubert ved 40 grader C i 15 timer. Etter inkubasjonsperioden ble løsningen konsentrert til 5–10 ml ved roterende fordampning, og filtrert for å fjerne eventuelt ureagert startmateriale. Rask senkning av pH til ca. 1,0 ved å tilsette 1 N HNO_3 felte ikke produktet. Produktet ble karakterisert *in situ* ved ^{31}P NMR. En enkelt topp er observert ved 1,93 ppm i ^{31}P NMR-spekteret med en ^{195}Pt - ^{31}P -konstant på 29,73 Hz.

EKSEMPEL 4: 1,2-Etandiamin-*trans*-dihydrokso(dihydrogenpyrofosfat)platina(IV) (en-4)

[0042] Natriumpyrofosfatdekahydrat (0,4 g) og 0,1 g diklor(etylendiamin)platina(II) ble løst i 250 ml destillert vann, pH 8, og inkubert ved 40 grader C i 15 timer. Etter inkubasjonsperioden ble 1 ml 30 % H_2O_2 tilsatt til reaksjonsblandingen, og det fikk reagere i ytterligere 3 timer. Løsningen ble deretter konsentrert til 5–10 ml ved roterende fordampning, og filtrert for å fjerne eventuelt ureagert startmateriale. Rask senkning av pH til ca. 1,0 ved å tilsette 1 N HNO_3 felte produktet som et lysegult pulver. Felling ble fullført ved avkjøling på is, og produktet ble isolert ved vakuumfiltrasjon og vasket med kaldt vann og aceton. Utbytte *trans*- $\text{Pt}(\text{OH})_2(\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2)(\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7)$: 0,07 g (49 %). ^{31}P NMR-spekteret viser en enkelt topp ved 2,30 ppm, pH 8,13, med en ^{195}Pt - ^{31}P -koplingskonstant på 25,9 Hz. ^{195}Pt NMR-spekteret viste en bred topp ved 1582 ppm.

EKSEMPEL 5: (*Trans*-1,2-sykloheksamediamin)(dihydrogenpyrofosfat)platina(II) (dach-2)

[0043] Natriumpyrofosfatdekahydrat (0,4 g) og 0,1 g diklor(*trans*-1,2-diaminosykloheksyl)platina(II) ble løst i 250 ml destillert vann, pH 8, og inkubert ved 40 grader C i 15 timer. Etter inkubasjonsperioden ble løsningen konsentrert

til 5–10 ml ved roterende fordampning, og filtrert for å fjerne eventuelt ureagert startmateriale. Rask senkning av pH til ca. 1,0 ved å tilsette 1 N HNO₃ felte produktet som et lysegult pulver. Felling ble fullført ved avkjøling på is, og produktet ble isolert ved vakuumfiltrasjon og vasket med kaldt vann og aceton.

5 Utbytte *trans*-Pt(C₆H₁₄N₂)(H₂P₂O₇): 0,05 g (38 %). ³¹P NMR-spekteret viser en enkelt topp ved 1,78 ppm, pH 7,93 med en ¹⁹⁵Pt-³¹P-konstant på 25,03 Hz. ¹⁹⁵Pt NMR-signal er registrert ved -1729 ppm.

EKSEMPEL 6: (*Trans*-1,2-sykloheksandiamin)-*trans*-dihydrokso(dihydrogenpyrofosfat)platina(IV) (dach-4)

10

[0044] Natriumpyrofosfatdekahydrat (0,4 g) og 0,1 g diklor(*trans*-1,2-diaminosykloheksyl)platina(II) ble løst i 250 ml destillert vann, pH 8, og inkubert ved 40 grader C i 15 timer. Etter inkubasjonsperioden ble 1 ml 30 % H₂O₂ tilsatt til reaksjonsblandingen, og det fikk reagere i ytterligere 3 timer. Løsningen ble

15 deretter konsentrert til 5–10 ml ved roterende fordampning, og filtrert for å fjerne eventuelt ureagert startmateriale. Rask senkning av pH til ca. 1,0 ved å tilsette 1 N HNO₃ felte produktet som et lysegult pulver. Felling ble fullført ved avkjøling på is, og produktet ble isolert ved vakuumfiltrasjon og vasket med kaldt vann og aceton. Utbytte *trans*-Pt(OH)₂(C₆H₁₄N₂)(H₂P₂O₇): 0,07 g (52 %). ³¹P NMR-spekteret viser en enkelt topp ved 2,41 ppm, pH 7,95, med en ¹⁹⁵Pt-³¹P-

20 koplingskonstant på 25,9 Hz. ¹⁹⁵Pt NMR-spekteret viste en bred topp ved 1613 ppm.

EKSEMPEL 7

25 **[0045]** ³¹P NMR-spektroskopi kan brukes til å bekrefte at de respektive diamin(pyrofosfat)platina(II)- og diamin(dihydrokso)(pyrofosfat)platina(IV)-kompleksene vist i figur 2 og beskrevet i eksempel 1–6 ble syntetisert og isolert ved hjelp av den nye framgangsmåten beskrevet her.

30 **[0046]** Hvert av kompleksene oppviste en enkelt ³¹P NMR-resonans med kjemiske skifter i området 1,78–2,12 ppm. Disse kjemiske skiftene er 9–11 ppm nedfelts i forhold til den frie pyrofosfatliganden, konsistent med de observerte koordinasjons-kjemiske skiftene for fosfatchelater rapportert i teknikken. Monodentatpyrofosfatkomplekser ble ikke oppdaget i sluttproduktene, som vist

35 ved fraværet av de forventede to settene med dubletter. ³¹P NMR-dataene viste også at oksidasjonen av Pt(II)-komplekser til Pt(IV)-komplekser ved H₂O₂ var selektiv, som bevitnet av dannelsen av et enkelt pyrofosfatplatina(IV)-kompleks i hvert tilfelle.

EKSEMPEL 8

40

[0047] Humane ovarialkreftceller, A2780, ble skaffet fra dr. Thomas Hamilton (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA). Cellene ble dyrket på monolag

ved hjelp av RPMI 1640 supplementert med 10 % fetalt bovinserum, 2 mM glutamin, 0,25 enheter/ml insulin og penicillin/streptomycin i en 37 gader C inkubator kontinuerlig gasset med 5 % CO₂. Cellene ble subdyrket ved hjelp av 0,0625 % trypsin i HBSS for å holde cellene i eksponentiell vekst.

5

[0048] IC50-verdier ble bestemt ved hjelp av en klonogen analyse. En kort tid ble 500 A2780-celler fra en enkelt cellesuspensjon utplassert på 60 mm petriskåler 24 timer før legemiddelbehandling for å tillate cellefesting. På dagen for legemiddelbehandling ble mediet dekantert og erstattet med legemiddelet, og disse behandlede cellene ble plassert tilbake i inkubatoren med 37 grader C i 1 time. Triplikate skåler ble satt opp for hver legemiddelkonsentrasjon. Etter 1 times legemiddelbehandling ble det legemiddelinnholdende mediet dekantert og erstattet med friskt medium. Disse skålene ble returnert til inkubatoren med 37 grader C i 1 uke for kolonidannelse. Koloniene ble fiksert og farget ved hjelp av 2 % krystallfiolett i absolutt metanol. Kolonier som inneholdt mer enn 50 celler, ble talt. Det ble tatt gjennomsnittet av antallet talte kolonier fra de triplikate skålene, og dette tallet ble delt med antallet utplasserte celler for å få en verdi for andelen av celler som danner kolonier. Disse verdiene for andelen celler som dannet kolonier, ble deretter korrigert for skålutsettingseffektivitet ved å dele dem på antallet celler som dannet kolonier i skåler som ikke var behandlet med legemiddel.

20

[0049] Tabell 3 viser antitreftaktiviteten hos kompleksene beskrevet her, uttrykt som IC50-verdier, sammenliknet med cisplatin og karboplatin. Som det framgår av dataene, oppviser dach-2 bedre ytelse enn både cisplatin og karboplatin hos resistente cellelinjer. Dessuten viser dach-4 mye mer overlegen aktivitet enn karboplatin. Dataene viser også at dach-4 er like eller mer effektiv mot cisplatin-/karboplatinresistente kreftceller og cisplatinsensitive celler, som videre indikerer at fosfaplatiner ikke kan utvikle resistens.

30

[0050] Til forskjell fra cisplatin og karboplatin er fosfatkompleksene i den foreliggende oppfinnelsen predikert å oppvise mindre toksisitet på grunn av nærværet av fosfatligander, som kan hjelpe til med å effektivt transportere disse kompleksene til cellen. Til forskjell fra cisplatin oppviste disse fosfatkompleksene dessuten ingen målbar binding til DNA innen 72 timer, som vist i figur 12. Cisplatin antas å fungere ved å binde genomisk DNA. Dermed har fosfatkompleksene i den foreliggende oppfinnelsen ulike cellemål.

35

EKSEMPEL 9

[0051] En cisplatinresistent ovarialcellelinje (C30) (Hamaguchi et al., 1993), skaffet fra dr. Thomas Hamilton (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA), ble behandlet med de monomere platinakompleksene i den foreliggende oppfinnelsen (vist i figur 2). Denne cellelinjen er også kryssresistent mot karboplatin. Cellene ble dyrket på monolag ved hjelp av RPMI 1640 supplementert med 10 % fetalt bovinserum, 2 mM glutamin, 0,25 enheter/ml insulin og penicillin/streptomycin i en 37 gader C inkubator kontinuerlig gasset

45

med 5 % CO₂. Cellene ble subdyrket ved hjelp av 0,025 % trypsin i HBSS for å holde cellene i eksponentiell vekst.

5 **[0052]** IC₅₀-verdier ble bestemt ved hjelp av en klonogen analyse. En kort tid ble 500 C30-celler fra en enkelt celleduspensjon utplassert på 60 mm petriskåler 24 timer før legemiddelbehandling for å tillate cellefesting. På dagen for legemiddelbehandling ble mediet dekantert og erstattet med legemiddelet, og disse behandlede cellene ble plassert tilbake i inkubatoren med 37 grader C i 1 time. Triplikate skåler ble satt opp for hver legemiddelkonsentrasjon. Etter én times legemiddelbehandling ble det legemiddelinnholdende mediet dekantert og erstattet med friskt medium. Disse skålene ble returnert til inkubatoren med 37 grader C i 1 uke for kolonidannelse. Koloniene ble fiksert og farget ved hjelp av 2 % krystallfiolett i absolutt metanol. Kolonier som inneholdt mer enn 50 celler, ble talt. Det ble tatt gjennomsnittet av antallet talt kolonier fra de triplikate skålene, og dette tallet ble delt med antallet utplasserte celler for å få en verdi for andelen av celler som danner kolonier. Disse verdiene for andelen celler som dannet kolonier, ble deretter korrigert for skålutsettingseffektivitet ved å dele dem på antallet celler som dannet kolonier i skåler som ikke var behandlet med legemiddel.

20 **EKSEMPEL 10**

[0053] Cellelinjene UMSCC10b (cisplatinsensitiv) og UMSCC10b/15s (cisplatinresistent) derivert fra humane hode- og hals-skvamøscellekreftlinjer ble skaffet fra dr. Stephen B. Howell ved University of California, Dan Diego.

25 Cellene ble dyrket i 1640 RPMI med 10 % fetalt bovinserum, 100 enheter/ml penicillin og 100 µg/ml streptomycin. Cellene ble sådd i 24-brønnplater med ca. 20 000 celler/500 µl medium i hver brønnplate. Cellene ble eksponert for dach-2 i ulike konsentrasjoner fra 1,12 µM til maksimalt 72 µM. Stamløsninger av dach-2-kompleks ble preparert, og alikvoter av disse løsningene ble tilsatt for å lage

30 de effektive konsentrasjonene. Cellene ble deretter latt vokse i 72 timer. Tolv ulike konsentrasjoner ble brukt i denne studien. Hver konsentrasjon hadde én kontroll for totalt 12 kontroller.

[0054] IC₅₀ for UMSCC10b (cisplatinsensitiv) kan estimeres til å være under 1,0 µM. Til sammenlikning er IC₅₀-verdien for cisplatin 17 µM i samme linje (se Zheng et al., Clinical Cancer Research, 1997, 3, 1157-1165). IC₅₀ for UMS.CC10b/15s (cisplatinresistent) ble bestemt til å være 5 µM. Figur 9 viser celleoverlevelseskurven for de cisplatinsensitive og cisplatinresistente cellelinjene.

40 **EKSEMPEL 11**

[0055] Foreløpige genekspresjoneksperimenter som involverer komplekser fra den foreliggende oppfinnelsen sammenliknet med cisplatin (data ikke vist), ble utført med en apoptotisk matrise inneholdende 84 gener som omfatter BCL2-

superfamilien, både pro- og anti-apoptotisk, kaspaser, BIR-familien, TNF-reseptoraktivatorfaktorer, p53 og dets slektninger, og fas-tilknyttede elementer ved sanntids-PCR. Et nærmere blikk på de to settene med genekspresjoner indikerer klart en rekke forskjeller i ekspresjonsmønstrene. For eksempel var

5 fas- og medlemmene i fas-superfamilie-genene overeksprimert i celler behandlet med dach-2, mens cisplatinet påvirker marginale endringer i ekspresjonen av disse genene. Spesifikt var fas overeksprimert med 6 ganger sammenliknet med kontrollen, og TNFRSF-gener så som TNFRSF-10B var

10 overeksprimert med 2-3 ganger over kontrollene. Disse siste reseptorfaktorene hører til fas-superfamilien. Det er interessant å merke seg at proapoptotiske BCL2-elementer så som BAK1 og BAX var overeksprimert omkring 2-3 ganger av dach-2, mens cisplatin ikke gjorde signifikante endringer i deres ekspresjon.

EKSEMPEL 12: Celleakkumulasjon av platina og estimering av DNA-bundet platina

15 **[0056]** Platinainnhold ble kvantitativt estimert på et Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometer (Perkin Elmer AA-600) ut fra kalibreringskurver etablert ved bruk av cisplatin eller pyrodach-2 i vann. Cellene (5×10^6) ble sådd i T75cm²-flasker. Etter 24 t ble disse cellene deretter behandlet med de ulike

20 konsentrasjonene (0, 10, 20, 30 og 50 μ M) av cisplatin og pyrodach-2. Etter 1 t eksponering med platinakompleksene ble det legemiddelinneholdende mediet fjernet, og cellene ble vasket med iskald fosfat-bufret koksaltløsning (PBS). Cellene ble så trypsinert og sentrifugert inn i en pellet. Cellepelletter ble oppløst i konsentrert HNO₃ og H₂O₂ før analyse, i henhold til McGahans framgangsmåte.

25 Data rapportert i tabell 4 ble samlet inn fra tre uavhengige eksperimenter, hvert ble utført i duplikat. For cisplatinakkumulasjonen ble data hentet fra triplikate kjøringar fra en enkelt prøve ved en gitt konsentrasjon.

30 **[0057]** For DNA-Pt-målinger ble $1,0 \times 10^7$ celler sådd i T75cm²-flasker. Etter 24 t ble platinakompleksene tilsatt ved de ulike konsentrasjonene 0, 10, 20, 30 og 50 μ M. Cellene ble behandlet med platinakompleksene i 24 timer. Etter behandling ble mediet fjernet, og cellene ble vasket med iskald PBS. Cellene ble trypsinert og sentrifugert inn i en pellet. DNA ble ekstrahert ved hjelp av et Wizard[®] SV DNA-rensingssett (Promega). DNA ble kvantitativt estimert ut fra absorpsjonen ved 260 nm ved hjelp av et NanoDrop UV-Vis-instrument.

35

EKSEMPEL 13: Platina-DNA-binding ved NMR

40 **[0058]** Proton-NMR-spektroskopiske eksperimenter ble utført på et Bruker 500 MHz NMR-instrument i 99 % (atom) D₂O med en vannsuppresjonspulssekvens. Prøvene inneholdt cisplatin (2,0 mM) eller pyrodach-2 (2,0 mM) og nukleotider (5'-dGMP, 5'-dAMP, dGpG (5,0 mM)), og enkelt- og dobbeltstrenget DNA (kalvetymus, 5,0 mM) ved pH 7,0 opprettholdt av fosfat- og karbonatbuffere (10–20 mM). Reaksjoner av cisplatin (0,25 mM) og pyrodach-2 (0,25 mM) med en syntetisk 25-mer: 5'-ATGATTTAGGTGACACTATAGCAGT-3' (0,25 mM) ble

også utført under identiske forhold. Reaksjonene ble utført i opptil 7 dager, og ^1H og ^{31}P NMR-spektra ble registrert ved jevnlige tidsintervaller. Vanligvis ble det benyttet en pulsbredde på 5 μs med en 1,0 s repetisjonsforsinkelse for målingene. Typisk ble en sveipebredde på 10 000 Hz og 32 K datapunkter valgt for å samle inn frie induksjonsutsvingninger. En linjeutvidende faktor på 1 Hz ble anvendt for Fourier-transformasjon. De kjemiske skiftene, med henvisning til H-O-D-topp, er ved 4,67 ppm.

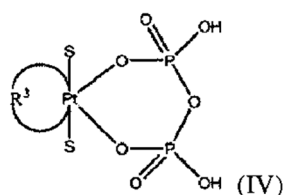
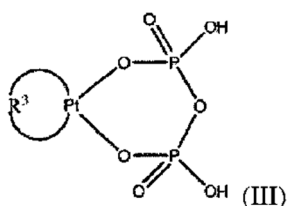
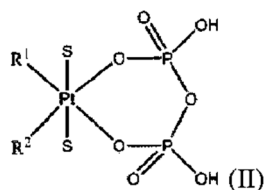
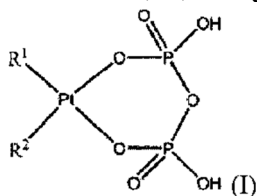
10

Patentkrav

1. Sammensetning for bruk i en framgangsmåte for å behandle kreft, som omfatter:

5

ett eller flere isolerte monomere platina(II)- eller (IV)-komplekser ifølge formlene I, II, III og IV:



10

der hver R^1 og R^2 er uavhengig valgt blant NH_3 og substituerte eller usubstituerte alifatiske aminer;

der hver R^3 er valgt blant substituerte eller usubstituerte alifatiske aminer;

der, når én av R^1 og R^2 er NH_3 , er den andre av R^1 og R^2 ikke NH_3 ; og

15

der hver S er uavhengig valgt blant hydroksid, eddiksyre, smørsyre og alfa-hydroksysyrer; eller

isolerte monomere *cis*-diammin-*trans*-dihydrokso(dihydrogenpyrofosfat)platina(IV);

eller farmasøytisk akseptable salter av dette.

20

2. Sammensetning for bruk i en framgangsmåte for å behandle kreft ifølge krav 1, der R^1 og R^2 hver er uavhengig valgt blant NH_3 , metylamin, etylamin, propylamin, isopropylamin, butylamin og sykloheksanamin.

25

3. Sammensetning for bruk i en framgangsmåte for å behandle kreft ifølge krav 1, der R^3 er valgt blant etylendiamin og sykloheksandiamin.

4. Sammensetning for bruk i en framgangsmåte for å behandle kreft ifølge krav 1, der det isolerte monomere platinakomplekset er:

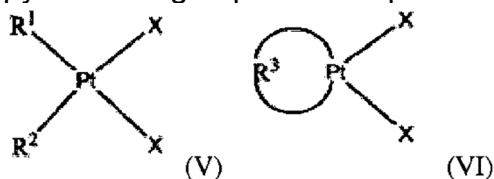
- 1,2-etandiamin(dihydrogenpyrofosfat)platina(II), eller
- (*trans*-1,2-sykloheksandiamin)(dihydrogenpyrofosfat)platina(II), eller
- cis*-diammin-*trans*-dihydrokso(dihydrogenpyrofosfat)platina(IV), eller
- 1,2-etandiamin-*trans*-dihydrokso(dihydrogenpyrofosfat)platina(IV), eller
- 5 (*trans*-1,2-sykloheksandiamin)-*trans*-
dihydrokso(dihydrogenpyrofosfat)platina(IV).
- 10 **5.** Sammensetning for bruk i en framgangsmåte for å behandle kreft ifølge krav
1, der det isolerte monomere platinakomplekset er (*trans*-1,2-
sykloheksandiamin)(dihydrogenpyrofosfat)platina(II).
- 15 **6.** Sammensetning for bruk i en framgangsmåte for å behandle kreft ifølge krav
1, der det isolerte monomere platinakomplekset er (*trans*-1,2-
sykloheksandiamin)-*trans*-dihydrokso(dihydrogenpyrofosfat)platina(IV).
- 20 **7.** Sammensetning for bruk i en framgangsmåte for å behandle kreft ifølge krav
1, som omfatter: ett eller flere isolerte monomere platinakomplekser valgt blant
- (i) *cis*-diammin-*trans*-dihydrokso(dihydrogenpyrofosfat)platina(IV);
- (ii) 1,2-etandiamin(dihydrogenpyrofosfat)platina(II);
- (iii) 1,2-etandiamin-*trans*-dihydrokso(dihydrogenpyrofosfat)platina(IV);
- (iv) (*trans*-1,2-sykloheksandiamin)(dihydrogenpyrofosfat)platina(II);
- (v) (*trans*-1,2-sykloheksandiamin)-*trans*-
dihydrokso(dihydrogenpyrofosfat)platina(IV); og
- 25 (vi) farmasøytisk akseptable salter av dette.
- 30 **8.** Sammensetning for bruk i en framgangsmåte for å behandle kreft ifølge krav
7, der det isolerte monomere platinakomplekset er stabilt i vandig løsning ved
en pH mellom ca. 6 og ca. 8.
- 9.** Sammensetning for bruk i en framgangsmåte for å behandle kreft ifølge krav
7, der det isolerte monomere platinakomplekset ikke binder DNA.
- 35 **10.** Sammensetning for bruk i en framgangsmåte for å behandle kreft ifølge
krav 7, der det isolerte monomere platinakomplekset utløser overekspressjon av

fas og fas-relaterte transkripsjonsfaktorer, eller av proapoptotiske gener.

11. Sammensetning for bruk i en framgangsmåte for å behandle kreft ifølge krav 10, der de proapoptotiske genene er Bak og Bax.

12. Framgangsmåte for å preparere et isolert monomert platina(II)-kompleks, som omfatter:

(i) å opprettholde en vandig reaksjonsblanding som omfatter eksess av pyrofosfat og et platinakompleks ifølge formel V eller VI:



der hver R^1 og R^2 er uavhengig valgt blant NH_3 og substituerte eller usubstituerte alifatiske aminer,

der hver R^3 er valgt blant substituerte eller usubstituerte alifatiske aminer; og

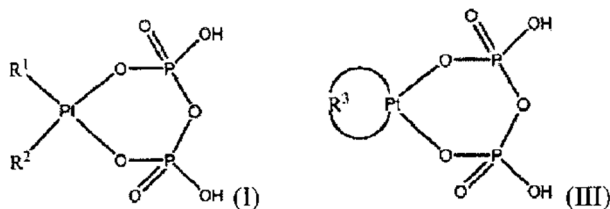
der X er uavhengig valgt blant halogener;

ved en temperatur på ca. 30 til ca. 60 grader Celsius i en periode på ca. 12 til ca. 18 timer ved en pH fra ca. 7 til ca. 9;

(ii) å deretter konsentrere den vandige reaksjonsblandingen, slik at det ikke dannes bunnfall av pyrofosfater;

(iii) å raskt senke reaksjonsblandingsens pH til en pH mindre enn 2 ved å tilsette en syre;

der det isolerte monomere platina(II)-komplekset har en formel av I eller III:



der hver R^1 og R^2 er uavhengig valgt blant NH_3 og substituerte eller usubstituerte alifatiske aminer;

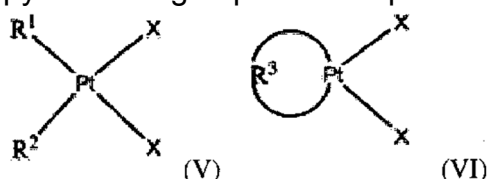
der hver R^3 er valgt blant substituerte eller usubstituerte alifatiske diaminer; og

der det isolerte monomere platinakomplekset er stabilt i vandig løsning ved en pH mellom ca. 6 og ca. 9.

5 **13.** Framgangsmåte ifølge krav 12, der det isolerte monomere platinakomplekset preparert er (*trans*-1,2-sykloheksandiamin)(dihydrogenpyrofosfat)platina(II).

10 **14.** Framgangsmåte for å preparere et isolert monomert platina(IV)-kompleks, som omfatter:

(i) å opprettholde en vandig reaksjonsblanding som omfatter eksess av pyrofosfat og et platinakompleks ifølge formel V eller VI:



15 der hver R¹ og R² er uavhengig valgt blant NH₃ og substituerte eller usubstituerte alifatiske aminer,

der R³ er valgt blant substituerte eller usubstituerte alifatiske aminer, og

der X er uavhengig valgt blant halogener;

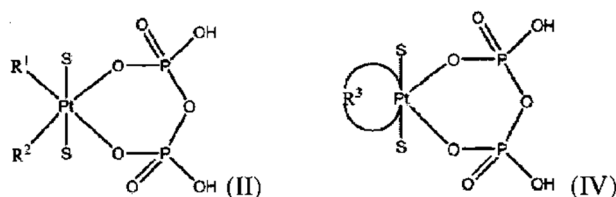
ved en temperatur på ca. 30 til ca. 60 grader Celsius i en periode på ca. 12 til ca. 18 timer ved en pH fra ca. 7 til ca. 9;

20 (ii) å tilsette til reaksjonsblandingen hydrogenperoksid, og eventuelt en reagens valgt fra gruppen av acetatsalter, butyratsalter og salter av alfa-hydroksysyrer, og kombinasjoner av dette;

(iii) å deretter konsentrere den vandige reaksjonsblandingen, slik at det ikke dannes bunnfall av pyrofosfat;

25 (iv) å raskt senke reaksjonsblandingsens pH til en pH mindre enn 2 ved å tilsette salpetersyre;

der det isolerte monomere platina(IV)-komplekset har en formel av II eller IV:



der hver R^1 og R^2 er uavhengig valgt blant NH_3 og substituerte eller usubstituerte alifatiske aminer;

der R^3 er valgt blant substituerte eller usubstituerte alifatiske aminer;

5 der hver S er uavhengig valgt blant hydroksid, eddiksyre, smørsyre og alfa-hydroksysyrer; og

der det isolerte monomere platinakomplekset er stabilt i vandig løsning ved en pH mellom ca. 6 og ca. 9.

10 **15.** Framgangsmåte ifølge krav 12 eller krav 14, der temperaturen er 40 grader Celsius og reaksjonstiden er 15 timer, og pH-en er mellom 7 og 8.

15 **16.** Framgangsmåte ifølge krav 12 eller krav 14, som videre omfatter å avkjøle reaksjonsblandingen til en temperatur på mellom 5 grader Celsius og omgivelsestemperatur etter å ha konsentrert reaksjonsblandingen, eller etter å ha senket reaksjonsblandingen pH.

20 **17.** Framgangsmåte ifølge krav 14, der den eventuelle reagensen som er tilsatt sammen med hydrogenperoksid før konsentrasjon av reaksjonsblandingen, er valgt blant natriumacetat, natriumbutyrat og natriumsalter av alfa-hydroksysyrer, eller blant kaliumacetat, kaliumbutyrat og kaliumsalter av alfa-hydroksysyrer.

25 **18.** Framgangsmåte ifølge krav 14, der hydrogenperoksidet er ved en initiell vol/vol-konsentrasjon på 30 %.

19. Framgangsmåte ifølge krav 14, der det isolerte monomere platinakomplekset preparert er:

cis-diammin-*trans*-dihydrokso(dihydrogenpyrofosfat)platina(IV), eller

1,2-etandiamin-*trans*-dihydrokso(dihydrogenpyrofosfat)platina(IV), eller

30 (*trans*-1,2-sykloheksandiamin)-*trans*-dihydrokso(dihydrogenpyrofosfat)platina(IV).

35 **20.** Sammensetning som omfatter en terapeutisk effektiv mengde av minst ett isolert monomert platinakompleks valgt blant diammin(dihydrogenpyrofosfat)platina(II) og kompleksene ifølge krav 1, og minst én farmasøytisk akseptabel bærer, fortynningsmiddel, adjuvant eller vehikkel, for bruk i en framgangsmåte for å behandle kraft som er resistent mot ett eller flere antikreftvirkestoffer valgt blant cisplatin, karboplatin og oksaliplatin.

40

21. Sammensetning for bruk i en framgangsmåte for å behandle kreft ifølge krav 1 eller krav 20, der krefttypen er valgt blant testikkel-, småcellelunge- samt hode- og halskreft.

5 **22.** Sammensetning for bruk i en framgangsmåte for å behandle kreft ifølge krav 1 eller krav 20, der krefttypen er ovarial.

10 **23.** Sammensetning for bruk i en framgangsmåte for å behandle kreft ifølge et av kravene 20 til 22, der det isolerte monomere platinakomplekset er som definert ifølge et av kravene 2 til 4.

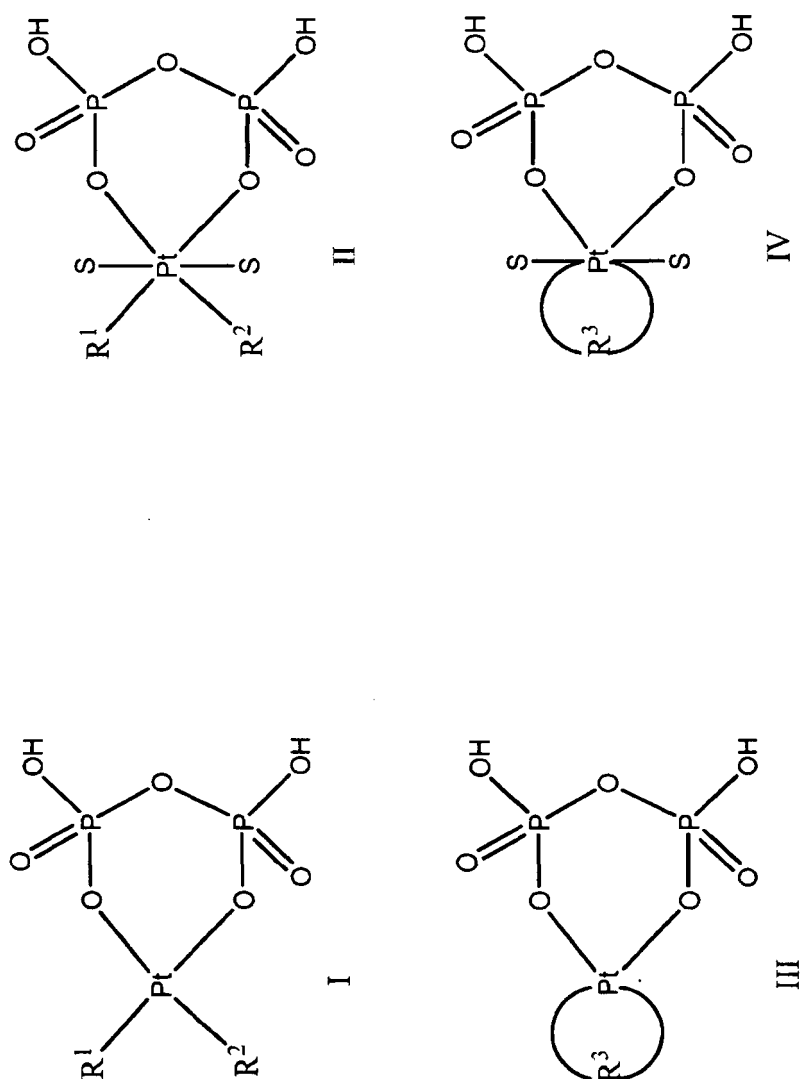
15 **24.** Sammensetning for bruk i en framgangsmåte for å behandle kreft ifølge krav 23, der det isolerte monomere platinakomplekset er (*trans*-1,2-sykloheksandiamin)(dihydrogenpyrofosfat)platina(II).

20 **25.** Sammensetning for bruk i en framgangsmåte for å behandle kreft ifølge krav 23, der det isolerte monomere platinakomplekset er (*trans*-1,2-sykloheksandiamin)-*trans*-dihydrokso(dihydrogenpyrofosfat)platina(IV).

Tegning

25

Figur 1



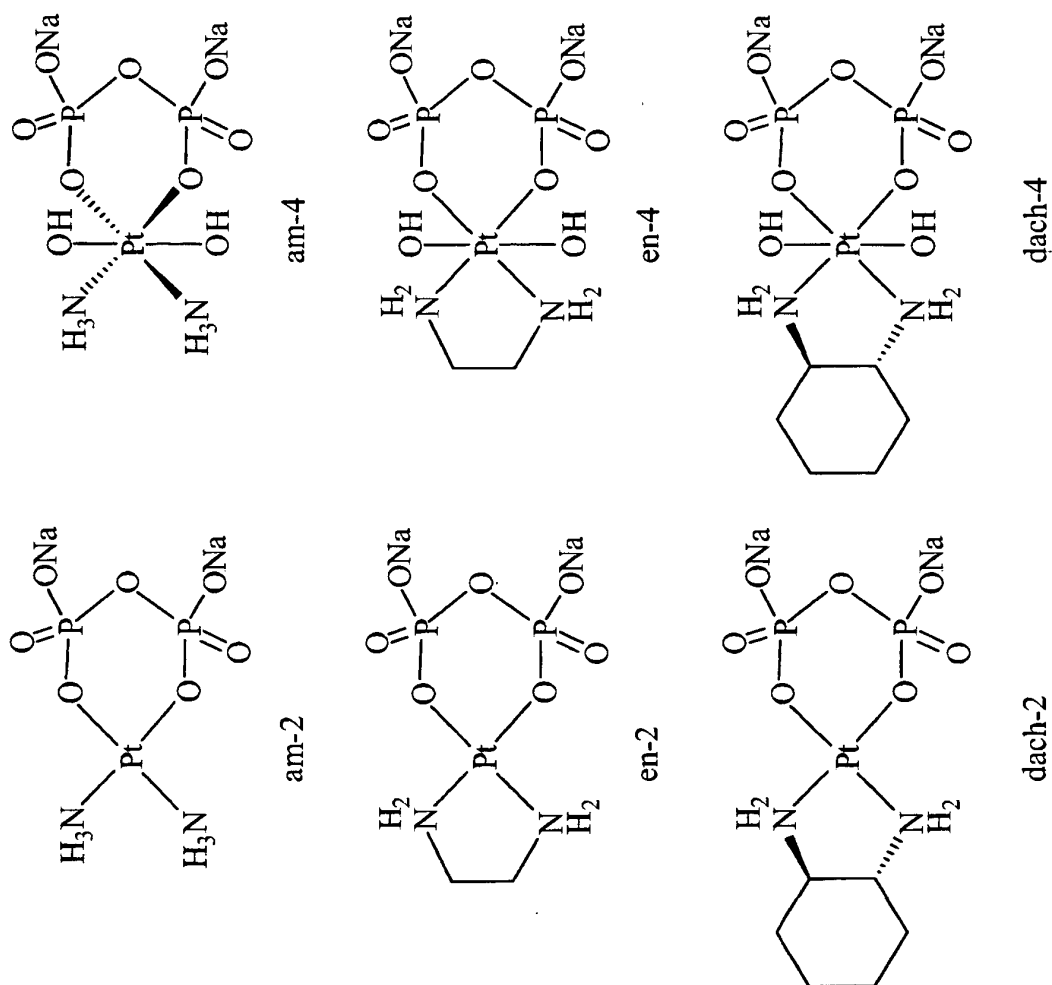
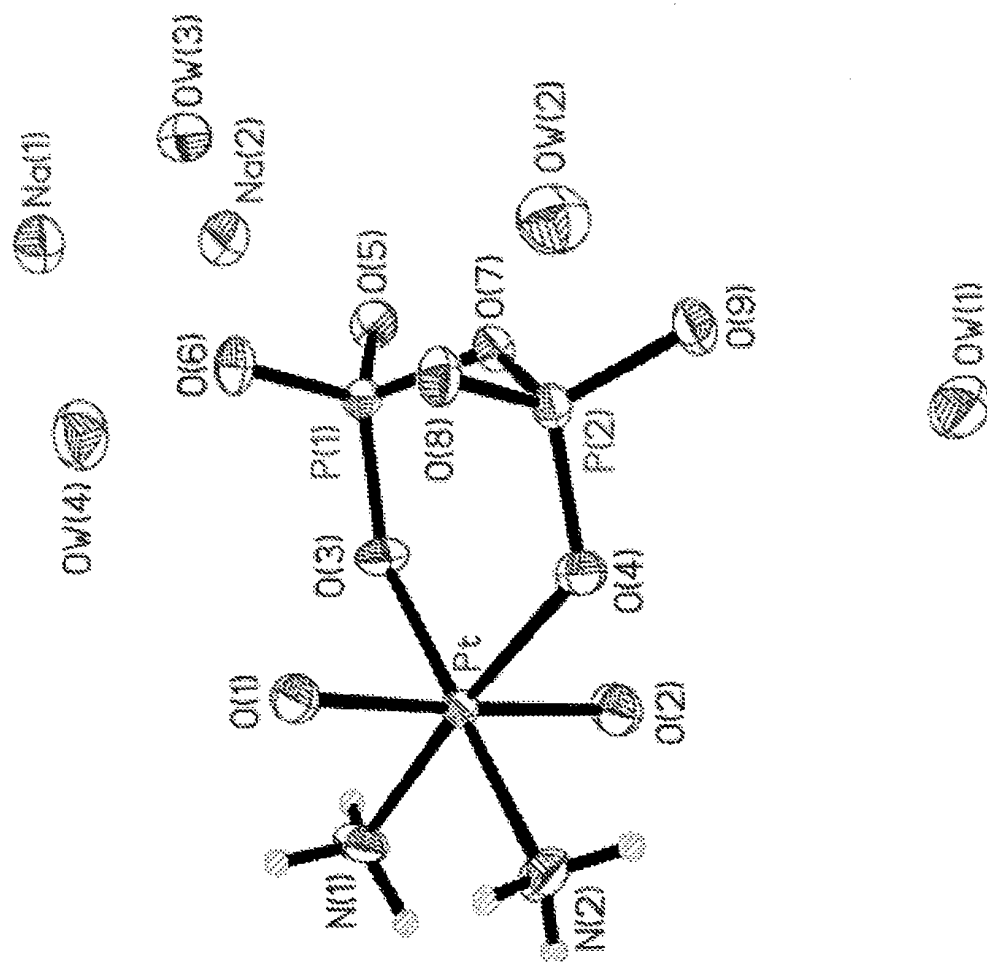
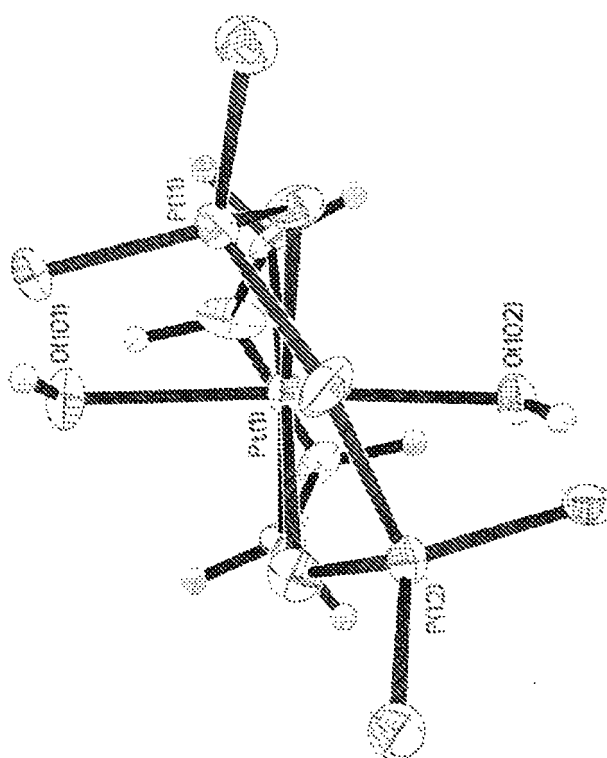
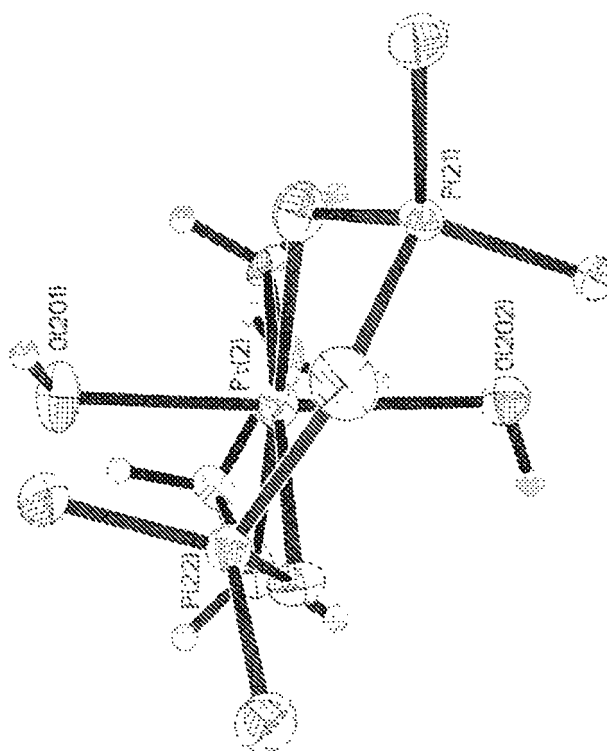
Figur 2

Figure 3



**Figure 4**

Figur 5

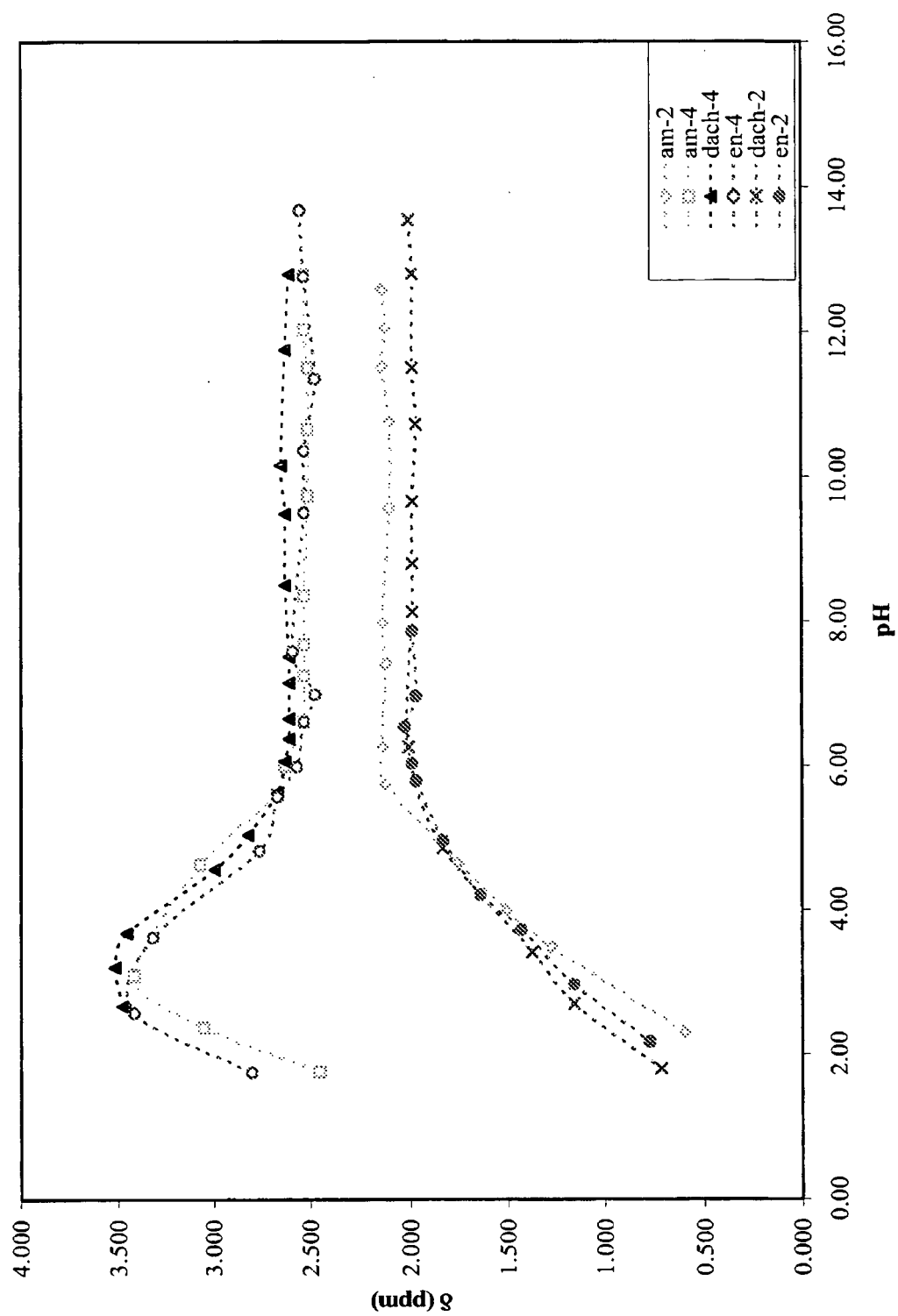
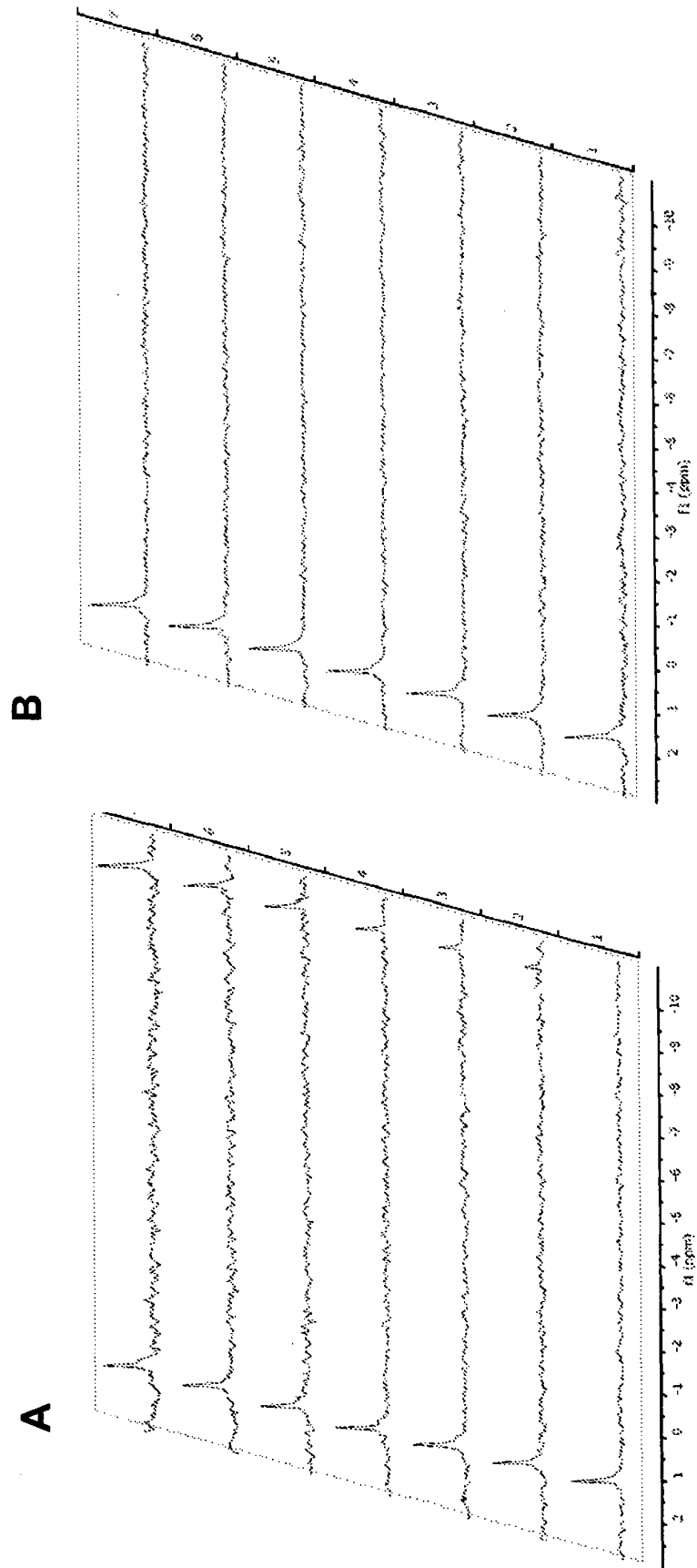
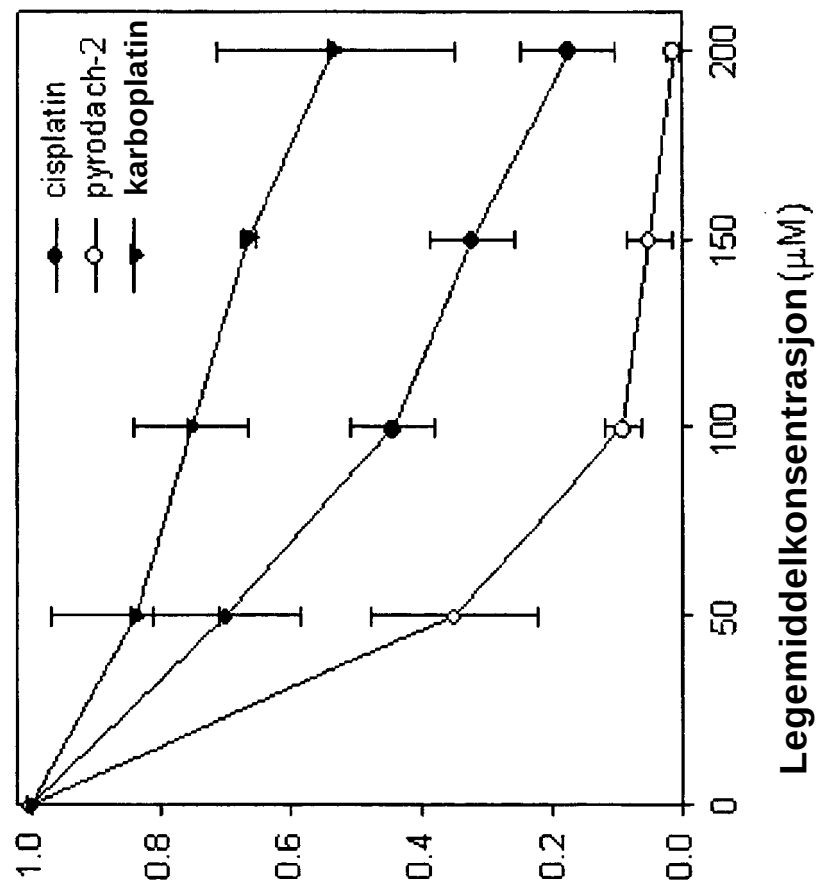


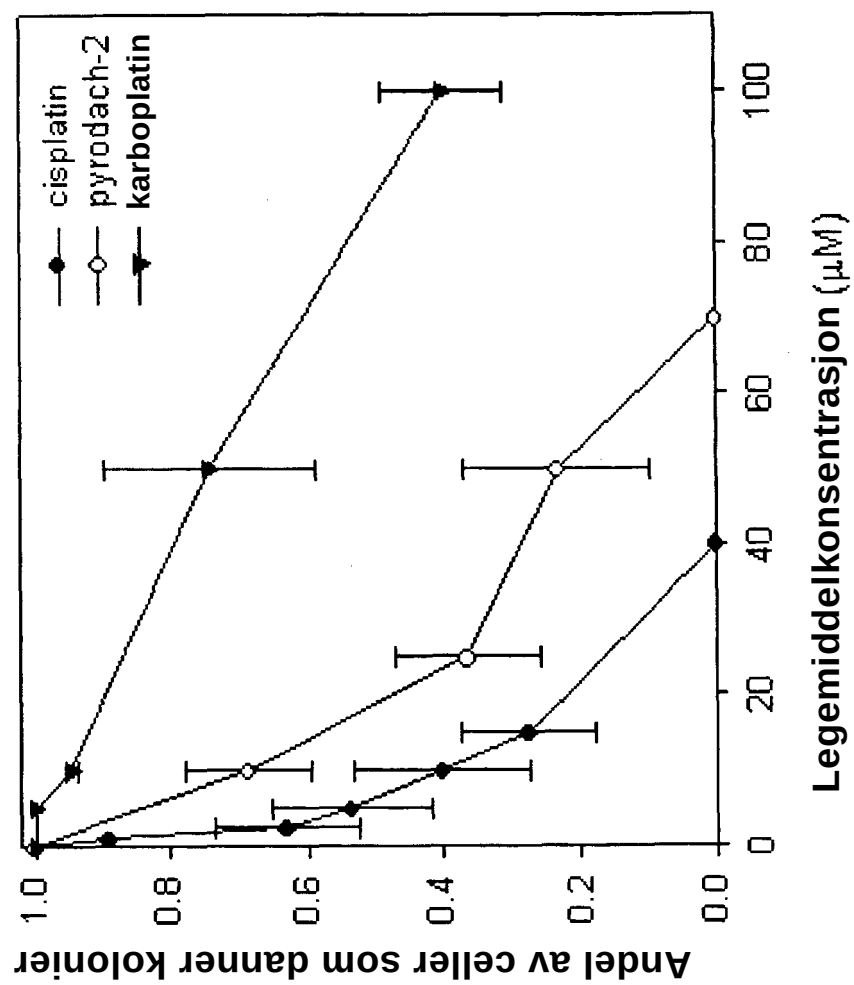
Figure 6



Figur 7

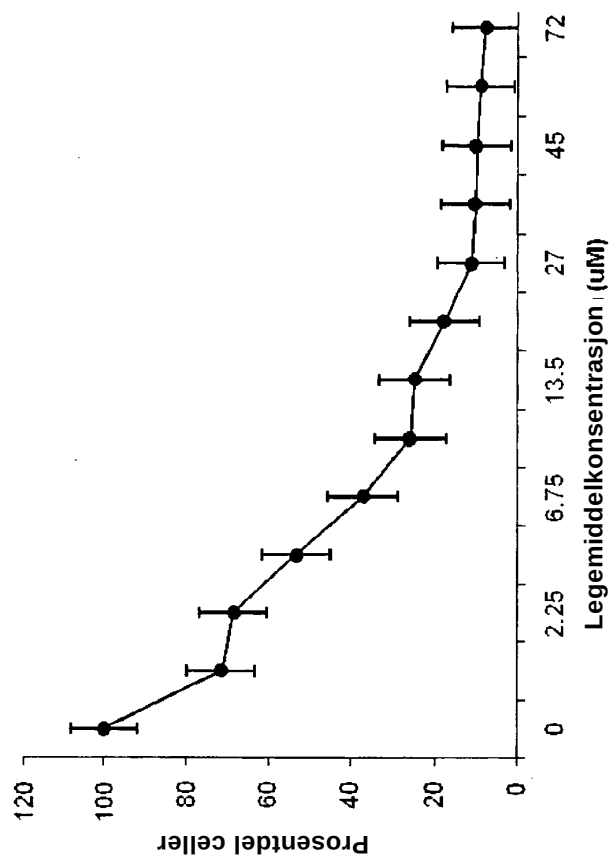
A2780/C30 -celler

Figur 8
A2780 -celler

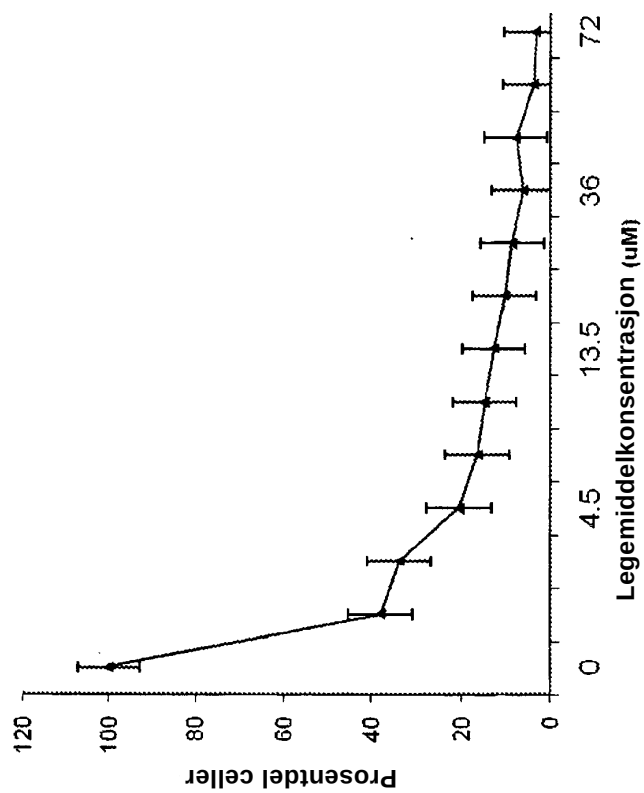


Figur 9

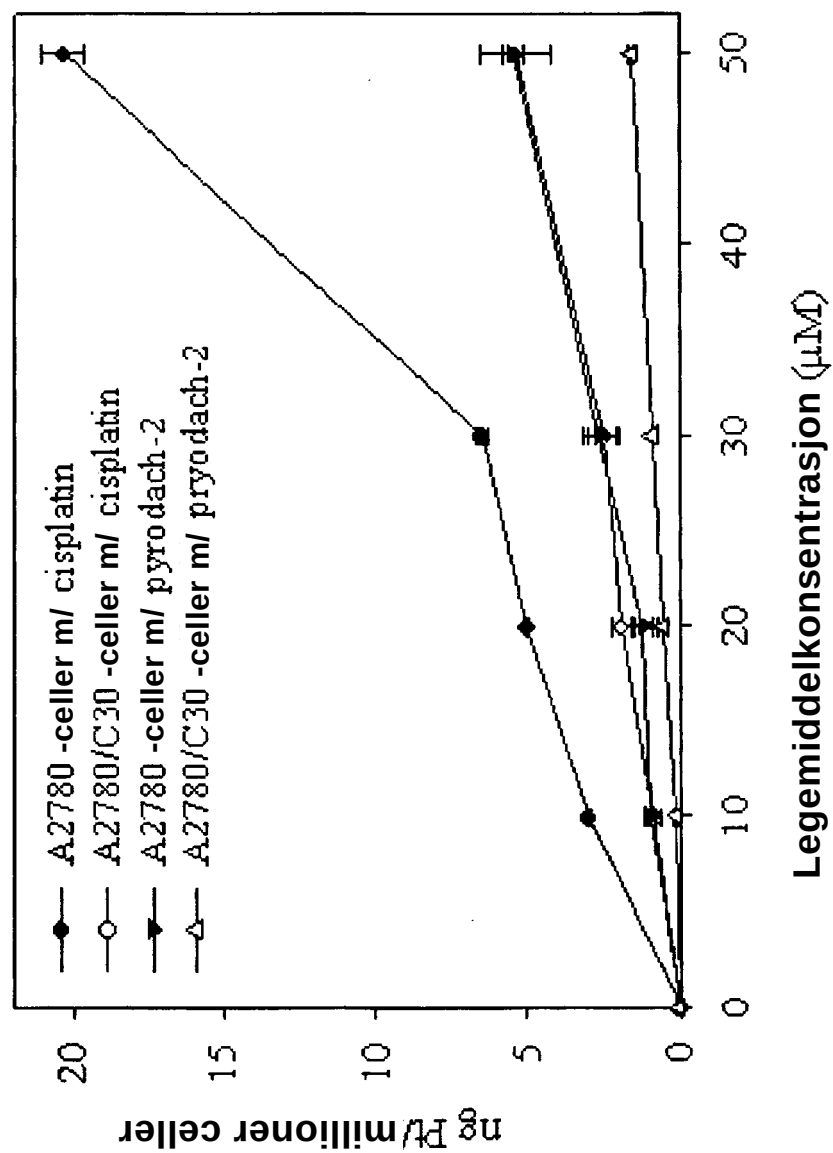
B



A



Figur 10
Platinacelleakkumulasjon



Figur 11

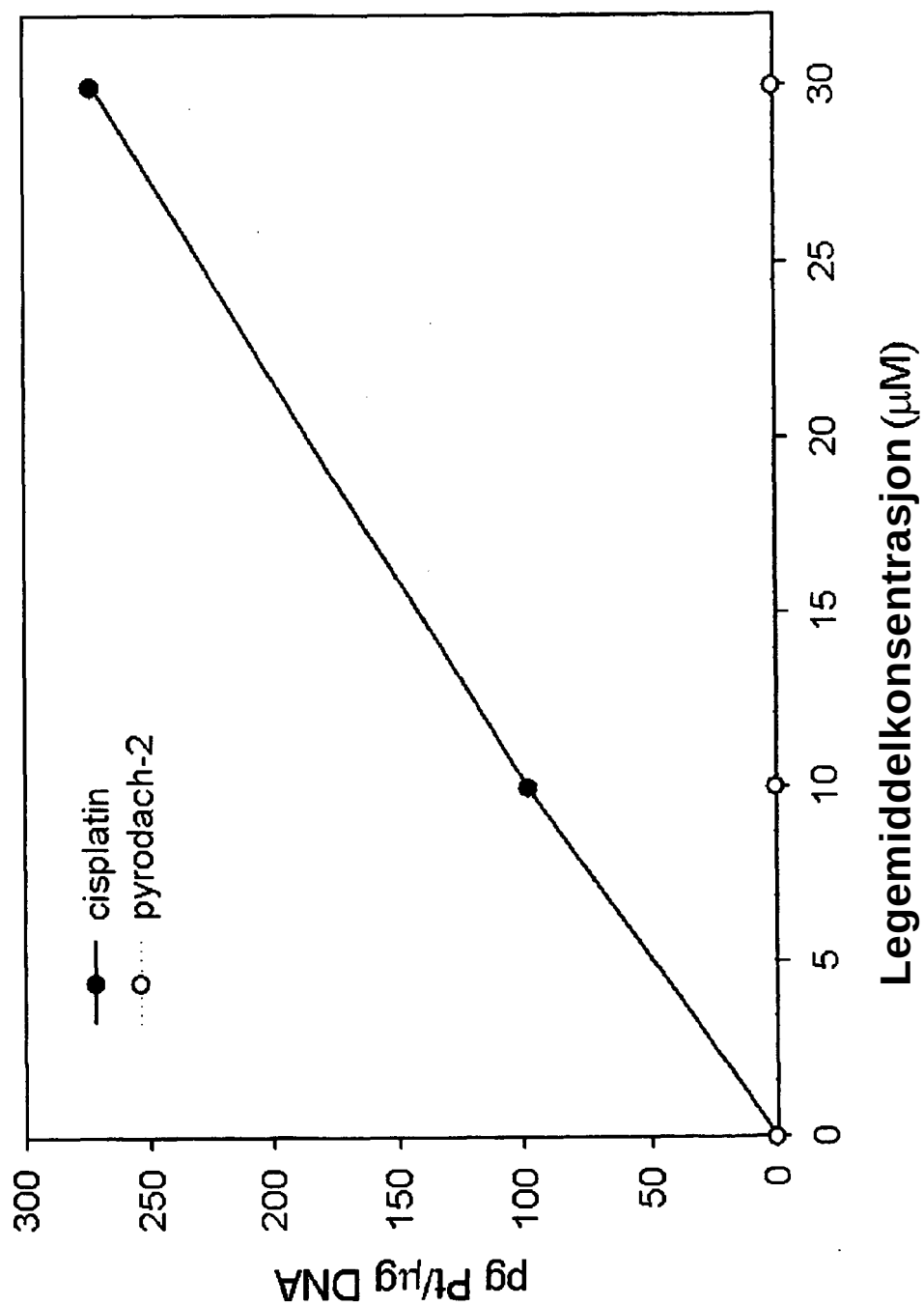
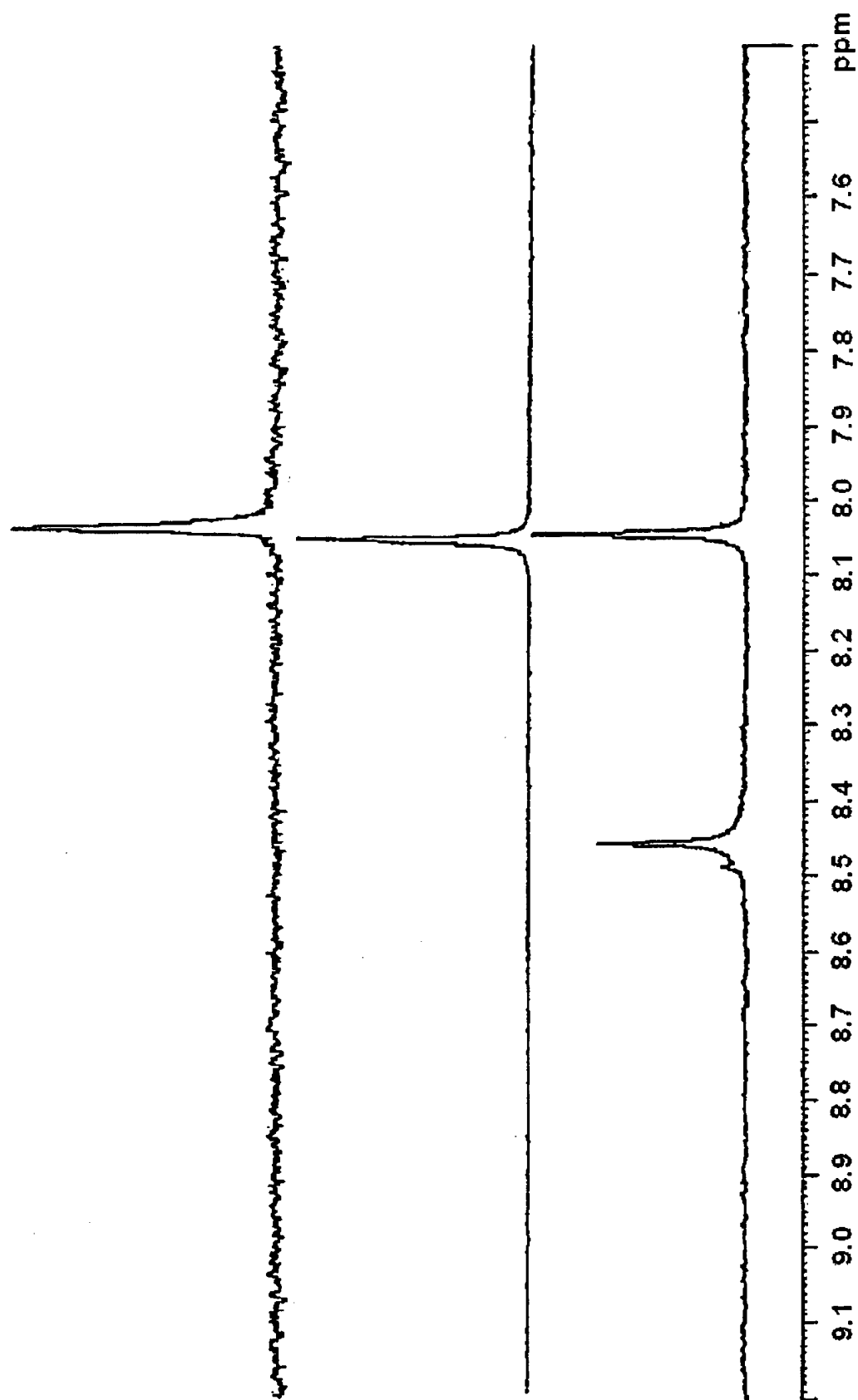
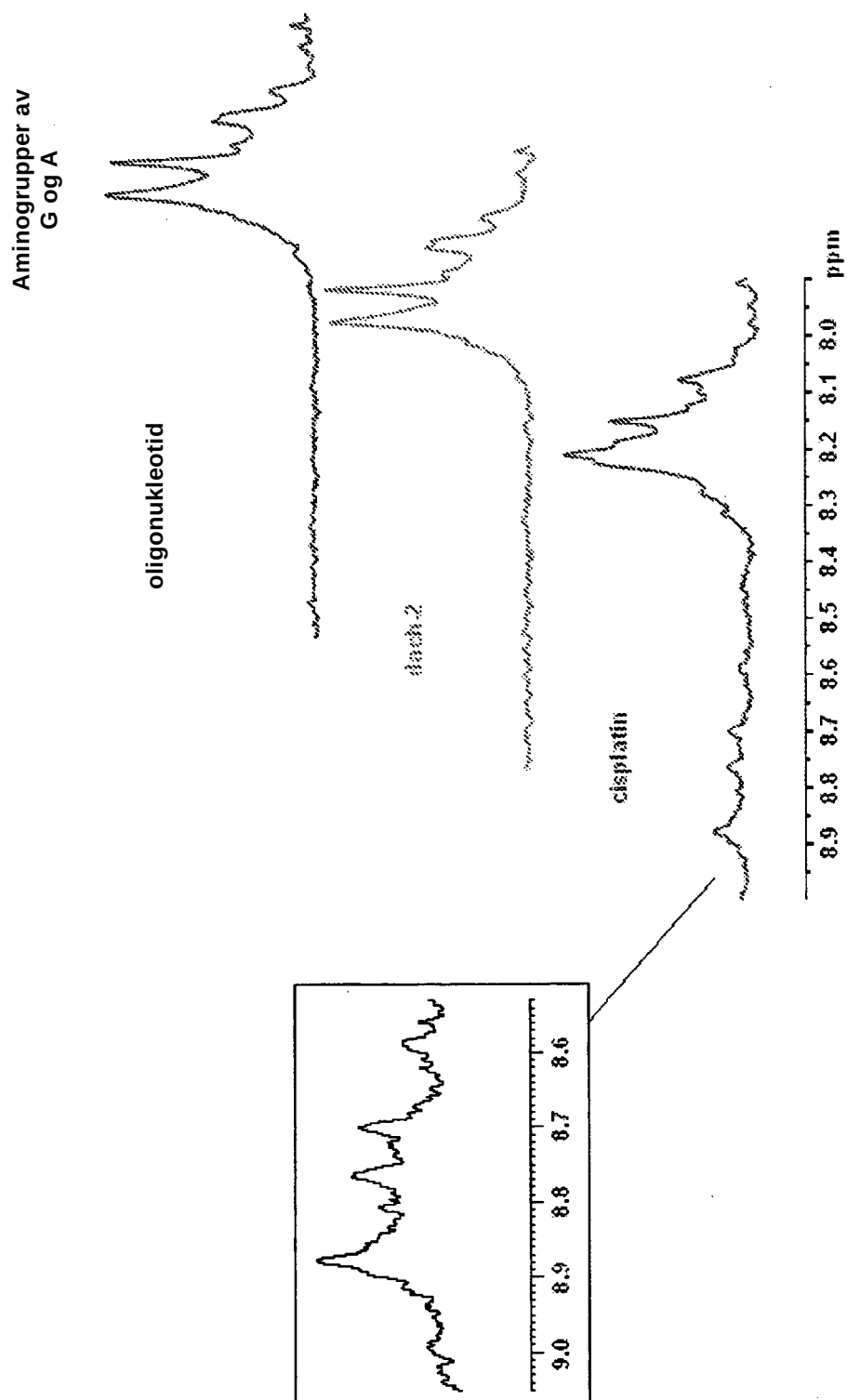


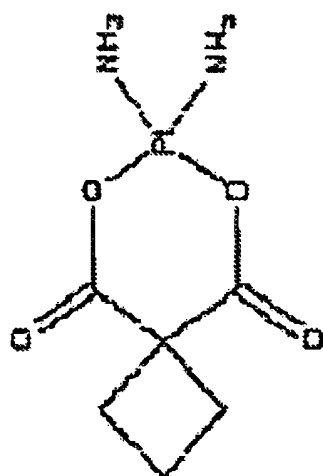
Figure 12



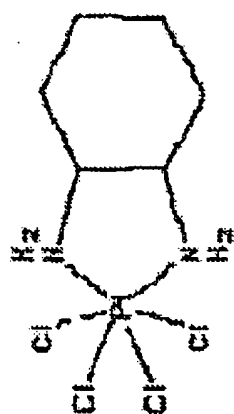
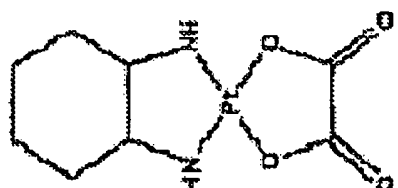
Figur 13



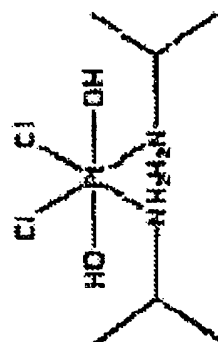
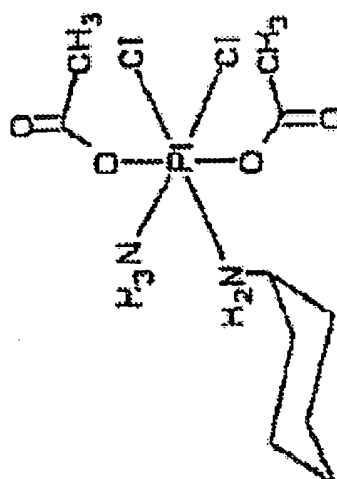
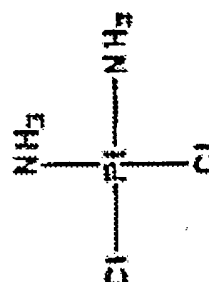
Figur 14



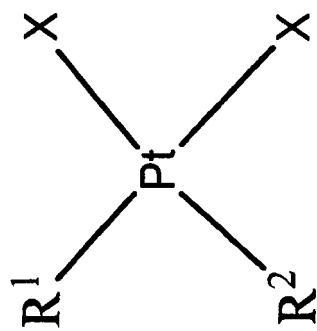
karboplatin

ormaplatin
tetraplatin

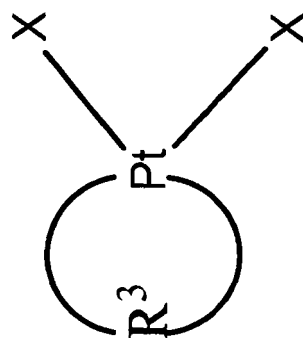
oksaliplatin

iproplatin
CHIPsatraplatin
JM216cisplatin
cis-DDP

Figur 15



V



VI