



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 12 934 T2** 2004.01.29

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 986 570 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 12 934.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/NO98/00020**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 901 592.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/032762**

(86) PCT-Anmeldetag: **23.01.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **30.07.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **22.03.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **02.04.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.01.2004**

(51) Int Cl.7: **C07H 19/073**
A61K 31/70

(30) Unionspriorität:
9701427 **24.01.1997** **GB**

(73) Patentinhaber:
ConPharma AS, Oslo, NO

(74) Vertreter:
Wilhelms, Kilian & Partner, 81541 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
NL, PT, SE**

(72) Erfinder:
MYHREN, Finn, N-3915 Porsgrunn, NO;
BORRETZEN, Bernt, N-3940 Heistad, NO; DALEN,
Are, N-7015 Trondheim, NO; SANDVOLD, Liland,
Marit, N-3931 Porsgrunn, NO

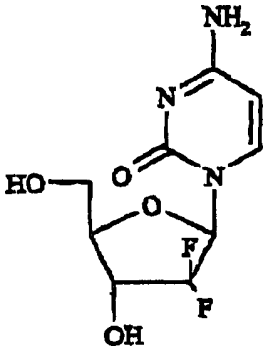
(54) Bezeichnung: **GEMCITABIN-DERIVATE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Diese Erfindung betrifft bestimmte langkettige gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäurederivate von 2',2'-Difluordesoxycytidin (Gemcitabin) und pharmazeutische Zusammensetzungen, die sie enthalten. Gemcitabin besitzt die Formel:



Gemcitabin ist ein Nucleosidanalogon, das sowohl in In-vitro- als auch in In-vivo-Studien Wirkung bei der Behandlung von neoplastischen Zuständen gezeigt hat (New anticancer agents, Weiss et al., Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers Annual 16, Herausgeber Pinedo, Longo und Chabner, 1996. Elsevier Science B.V., Supplement to Seminars in Oncology, Bd. 22, Nr. 4, Ergänzgs-Bd. 11, 1995, Herausgeber Yarbro et al. Gemcitabine Hydrochloride: Status of Preclinical Studies). Eine nützliche Wirkung ist auch in der klinischen Entwicklung von Gemcitabin beobachtet worden. In diesen Studien sind sowohl die klinischen als auch die Nebenwirkungen von Gemcitabin in hohem Maße vom Schema abhängig (Seminars in Oncology, Bd. 22, Nr. 4, Ergänzgs-Bd. 11, 1995, Seite 42–46).

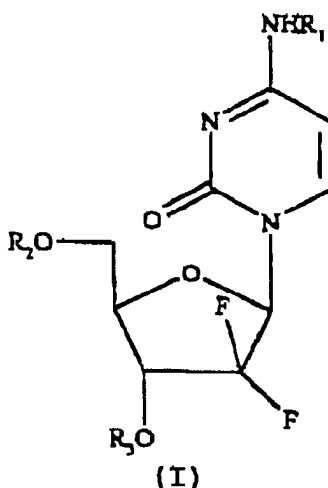
[0002] EP-A-O 184 365 offenbart die Synthese einer Reihe neuartiger 2'-Desoxy-2',2'-difluornucleosid-Derivate, die für die Behandlung von Krebs nützlich sind; unter diesen findet sich Gemcitabin. Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung sind in EP-A-O 184 365 nicht offenbart.

[0003] Langkettige Fettsäurederivate von antiviralen Nucleosiden sind durch WO-A-94 22887 bekannt.

[0004] Gemcitabin wird in der Zelle durch Desoxycytidinkinase zu seiner aktiven Form, dem Triphosphat von Gemcitabin (dFdCTP), aktiviert. Parallel dazu wird Gemcitabin durch Desoxycytidindesaminase zu dem entsprechenden Uracilderivat (inaktiv) deaktiviert.

[0005] Wir haben nun überraschenderweise festgestellt, daß bestimmte Fettsäurederivate von Gemcitabin eine völlig veränderte Pharmakokinetik und Gewebeverteilung aufweisen. Dies wird vor allem bei bösartigen Erkrankungen in dem RES, Lungen, Bauchspeicheldrüse, Därmen, Speiseröhre, Gebärmutter, Eierstöcken, Melanom und weiblichen Brust der Fall sein.

[0006] Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung können durch die Formel I dargestellt werden:



worin R_1 , R_2 und R_3 unabhängig ausgewählt sind aus Wasserstoff und gesättigten und einfach ungesättigten C_{18} - und C_{20} -Acylgruppen, mit der Bedingung, daß R_1 , R_2 und R_3 nicht alle Wasserstoff sein können.

[0007] Gemcitabin besitzt drei derivatisierbare funktionelle Gruppen, nämlich die 5'- und die 3'-Hydroxylgruppe und die N^4 -Aminogruppe. Jede Gruppe kann selektiv zu einem Ester- oder Amidderivat umgewandelt werden, jedoch können auch Diaddukte (Diester oder Esteramide) und Triaddukte gebildet werden. Im Fall der Di- und Triaddukte brauchen die Acyl-Substituentengruppen nicht unbedingt dieselben zu sein.

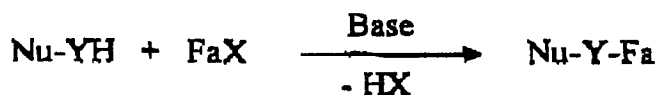
[0008] Gegenwärtig werden die Monoacylderivate dieser Erfindung, d. h., bei denen zwei von R_1 , R_2 und R_3 Wasserstoff sind, bevorzugt. Es wird vor allem bevorzugt, daß die Monosubstitution mit der Acylgruppe in der 3'-O- und 5'-O-Position des Zucker-Molekülteils sein sollte, wobei die 5'-O-Substitution am meisten bevorzugt wird.

[0009] Die Doppelbindung der einfach ungesättigten Acylgruppen kann entweder in der cis- oder trans-Konfiguration vorliegen, obwohl der therapeutische Effekt in Abhängigkeit davon, welche Konfiguration verwendet wird, unterschiedlich sein kann.

[0010] Die Position der Doppelbindung in den einfach ungesättigten Acylgruppen scheint die Aktivität ebenfalls zu beeinflussen. Gegenwärtig bevorzugen wir, Ester oder Amide zu verwenden, die ihre Ungesättigkeit in der ω -9-Position aufweisen. In dem ω -Nomenklatorsystem wird die ω -Position der Doppelbindung einer einfach ungesättigten Fettsäure von der endständigen Methylgruppe aus gezählt, so daß z. B. Eicosensäure (C_{20} : 1 ω -9) in der Kette 20 Kohlenstoffatome aufweist und eine einzige Doppelbindung zwischen dem 9. und 10. Kohlenstoff ausgebildet ist, wenn vom Methyl-Ende der Kette aus gezählt wird. Wir bevorzugen, Ester, Esteramide und Amide zu verwenden, die sich von Ölsäure (C_{18} : 1 ω -9, cis), Elaidinsäure (C_{18} : 1 ω -9, trans), Eicosensäure(n) (C_{20} : 1 ω -9, cis und C_{20} : 1 ω -9, trans) ableiten, und die Amide und 5'-Ester sind gegenwärtig die am meisten bevorzugten Derivate dieser Erfindung.

[0011] Ester, Esteramide und Amide von Gemcitabin, die sich von Stearinsäure (C_{18} : 0) und Eicosensäure (C_{20} : 0) ableiten, werden in einigen Fällen vorteilhaft genutzt.

[0012] Die erfindungsgemäßen Derivate von Gemcitabin können gewöhnlich gemäß folgender Reaktionsgleichung hergestellt werden:



worin Nu-YH für Gemcitabin steht, Y Sauerstoff in der 3'-und/oder 5'-Position des Zucker-Molekülteils oder Stickstoff in der Position 4 des Pyrimidin-Molekülteils von Gemcitabin, Fa eine Acylgruppe einer einfach ungesättigten C_{18} - oder C_{20} -Fettsäure und X eine abgehende Gruppe sind, z. B. Cl, Br, 3-Thiazolidin-2-thion oder OR' , worin R' Fa, $COCH_3$, COEt oder $COCF_3$ sind. Somit erfolgt die Reaktion durch Acylierung des Nucleosides. Dies wird durch die Verwendung geeigneter reaktiver Derivate von Fettsäuren, vor allem Säurehalogeniden oder Säureanhydriden, erreicht.

[0013] Im allgemeinen muß ein Protonenfänger anwesend sein, um die Säure HX aufzunehmen, die durch die Reaktion freigesetzt wird. So kann der Reaktionsmischung eine Base zugegeben werden. Wenn z. B. ein Säurehalogenid, wie z. B. ein Säurechlorid, verwendet wird, kann eine tert.-Amin-Base, wie z. B. Triethylamin, N,N-Dimethylanilin, Pyridin oder N,N-Dimethylaminopyridin, zu der Reaktionsmischung gegeben werden, um die freigesetzte Halogenwasserstoffsäure zu binden. In anderen Fällen kann ein Lösemittel, das in der Reaktion verwendet wird, als der Protonenfänger dienen.

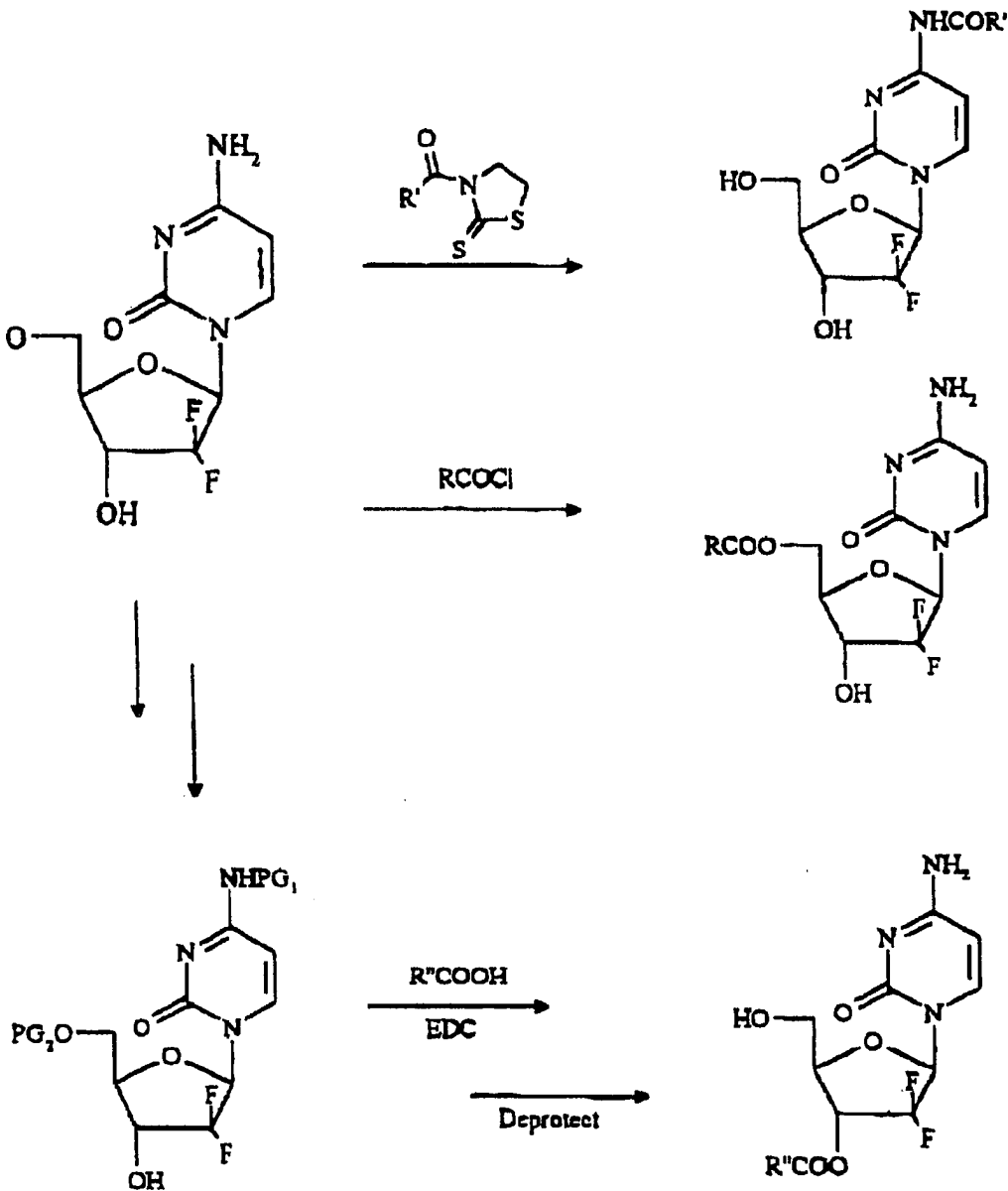
[0014] Normalerweise geht die Acylierungsreaktion ohne die Notwendigkeit eines Katalysators vonstatten. Das reaktionsfähige Fettsäurederivat FaX kann in einigen Fällen mittels Kopplungsreagenzien, wie z. B. N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) oder O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluorborat(TBTU) in situ gebildet werden.

[0015] Die Reaktionen werden vorzugsweise in einem reaktionsunfähigen Lösemittel, wie z. B. N,N-Dimethylformamid oder einem halogenierten Kohlenwasserstoff, wie z. B. Dichlormethan, durchgeführt. Falls gewünscht, kann eine beliebige der obenerwähnten tert.-Amin-Basen als Lösemittel verwendet werden, unter Beachtung, daß ein angemessener Überschuß vorhanden ist. In diesem Fall wird kein separater Protonenfänger benötigt. Die Reaktion sollte vorzugsweise zwischen 5°C und 5°C gehalten werden. Nach einem Zeitraum von 1 bis 60 Stunden wird die Reaktion im wesentlichen abgeschlossen sein. Das Voranschreiten der Reaktion kann unter Verwendung von Dünnschichtchromatographie (DC) und geeigneten Lösemittelsystemen verfolgt werden. Wenn die Reaktion abgeschlossen ist, wie durch DC bestimmt, kann das Produkt mit einem organischen Lösemittel extrahiert und durch Chromatographie und/oder Umkristallisation aus einem geeigneten Lösemittelsystem gereinigt werden. Da in Gemcitabin mehr als eine Hydroxylgruppe und auch eine Aminogruppe vorhanden sind, kann eine Mischung aus acylierten Verbindungen hergestellt werden. Falls erforderlich, können die erforderlichen einzelnen einfach und mehrfach acylierten Derivate z. B. durch Chromatographie, Kristallisation, überkritische Extraktion usw. getrennt werden.

[0016] Wenn es gewünscht ist, eine mehrfach acylierte Verbindung der Formel I herzustellen, in der R_1 und/oder R_2 und/oder R_3 dieselbe Acylgruppe sind, wird bevorzugt, das (die) obige(n) Verfahren unter Verwendung des (der) geeigneten Acylreagenzes(ien) im Überschuß anzuwenden.

[0017] Um mehrfach acylierte Verbindungen der Formel I herzustellen, in denen R_1 und/oder R_2 und/oder R_3 verschieden sind, wird bevorzugt, die obigen Verfahren bei geeigneter Reagenzwahl schrittweise anzuwenden. Es ist auch möglich, passend gewählte Schutzgruppen zu verwenden, um eine bestimmte Reaktion si-

herzustellen. Eine Auswahl dieser Verfahren wird in dem untenstehenden Schema 1 gezeigt. Eine beliebige Kombination der Verfahren kann eingesetzt werden, um ein spezifisches Produkt herzustellen.



Deprotect = Schutz aufheben

Schema 1

[0018] Die folgenden Beispiele veranschaulichen die Herstellung von zwei bevorzugten Gemcitabin-Derivaten dieser Erfindung.

BEISPIEL 1

Elaidinsäure-(5')-Gemcitabinester

[0019] Zu einer Lösung von 2',2'-Difluordesoxyribofuranosylcytosin (Gemcitabin) (0,42 g, 1,6 mmol) in 30 ml DMF wurden 0,81 ml DMF, die 1,6 mmol HCL(g) enthielten, gegeben, gefolgt von einer Lösung von Elaidinsäurechlorid (0,51 g, 1,7 mmol) in 3 ml DMF, und die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur 12 Stunden lang gerührt. Das Lösemittel wurde im Hochvakuum verdampft, und das Rohprodukt wurde in einer Silikagelsäule mit 15% Methanol in Chloroform als dem Eluentensystem gereinigt. Die unreinen Fraktionen wurden erneut gereinigt, um insgesamt 0,25 g (30%) der Titelverbindung zu ergeben.

[0020] 1H NMR (DMSO- d_6 300 MHz) δ : 7,5(1H, d, ArH), 7,45(2H, br. s, NH $_2$), 6,45(1H, d, -OH), 6,17(1H, t, CH-1'), 5,8(1H, d, ArH), 5,35(2H, m, CH=CH), 4,4-4,05(3H, m, CH $_2$ -5' und CH-4'), 3,95(1H, m, CH-3'),

2,35(2H, t, CH₂-COO), 1,95(4H, m, CH₂-CH=), 1,55(2H, m, CH₂-C-COO), 1,25 (20H, m, CH₂), 0,85 (3H, t, CH₃).
 [0021] ¹³C NMR (DMSO-d₆, 75 MHz) δ: 172,67(COO), 165,63 (C-4), 154,51(C-2), 141,12(C-6), 130,08 und 130,03 (C-9"/C-10"), 126,09, 122,67 und 119,24(t, C-2'), 94,86(C-5), 83,90(C-1'), 77,36(C-4'), 70,41, 70,11 und 69,80(t, C-3'), 62,53(C-5'), 33,24, 31,95, 31,29, 29,00, 28,94, 28,84, 28,72, 28,50, 28,43, 28,33, 24,34, 22,11 (CH₂), 13,94 (CH₃).

[0022] Zusätzlich wurde eine kleine Menge (0,05 g) des Elaidinsäure-(3')-Gemcitabinesters aus unreinen Fraktionen isoliert.

[0023] ¹H NMR (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 7,65(1H, d, ArH), 7,40(2H, d, NH₂), 6,25(1H, t, CH-1'), 5,82(1H, d, ArH), 5,4–5,2(4H, m, OH-5', CH=CH und CH-3'), 4,15(1H, m, CH-4'), 3,85– 3,55(2H, m CH₂-5'), 2,45(2H, t, CH₂-COO), 1,95(2H, m, CH₂-C=), 1,55(2H, m, CH₂-C-COO), 1,25 (20H, m, CH₂), 0,85 (3H, t, CH₃).

[0024] ¹³C NMR (DMSO-d₆, 75 MHz) δ: 171,70(000), 165,69(C-4), 154,46(C-2), 141,30(C-6), 130,10 und 130,03(C-9"/C-10"), 125,17, 121,72 und 118,27 (t, C-2'), 94,78(C-5), 83,78(C-1'), 78,41(C-4'), 69,93, 69,60 und 69,30(t, C-3'), 59,15(C-5'), 32,95, 31,93, 31,26, 28,98, 28,90, 28,81, 28,69, 28,46, 28,28, 28,23, 24,26, 22,09(CH₂), 13,95(CH₃).

BEISPIEL 2

Elaidinsäure-(N⁴)-Gemcitabinamid

[0025] Zu einer Lösung von 2',2'-Difluordesoxyribofuranosylcytosin (Gemcitabin) (0,38 g, 1,3 mmol) in 5 ml Pyridin wurde Elaidinsäurechlorid (0,57 g, 1,9 mmol) gegeben, und die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur 2,5 Stunden lang gerührt. Das Lösemittel wurde im Hochvakuum verdampft, und das Rohprodukt wurde in einer Silikagelsäule mit 15% Methanol in Chloroform als dem Eluentensystem gereinigt. Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden eingedampft, und der Rückstand wurde mit Ether/Hexan in einem Ultraschallbad behandelt. Das kristalline Material wurde getrocknet, um 0,1 g (15%) der Titelverbindung zu ergeben.

[0026] ¹H NMR (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 10,95(1H, s, NHCO), 8,25(1H, d, ArH), 7,25(1H, d, ArH), 6,30(1H, d, -OH), 6,15(1H, t, CH-1'), 5,35(2H, m, CH=CH), 5,30(1H, t, -OH), 4,2(1H, m, CH-4'), 3,9–3,6(3H, m, CH-3' und CH₂-5'), 2,35 (2H, t, CH₂-CON), 1,95 (2H, m, CH₂-C=), 1,55 (2H, m, CH₂-C-COO), 1,5 (20H, m, CH₂), 0,85 (3H, t, CH₃).

[0027] ¹³C NMR (DMSO-d₆, 75 MHz) δ: 174,06(CONH), 162,89(C-4), 154,22(C-2), 144,69(C-6), 130,04(C-9"/C-10"), 122,94 (J_{CF} = 259 Hz, C-2'), 95,91(C-5), 84,11(J_{CF} = 31 Hz, C-1'), 81,02(C-4'), 68,35(J_{CF} = 22 Hz, C-3'), 58,76 (C-5'), 36,38, 31,94, 31,28, 28,99, 28,83, 28,71, 28,56, 28,48, 28,30, 24,34, 22,10(CH₂), 13,94(CH₃).

[0028] Bevorzugte Gemcitabin-Derivate dieser Erfindung besitzen einen höheren therapeutischen Wert für die Behandlung von bösartigen Erkrankungen als Gemcitabin selbst. Dies wurde in zwei verschiedenen In-vivo-Modellen mit sowohl einmaliger Dosierung als auch wiederholter Dosierung gezeigt. Für die Behandlung durch einmalige Gabe ist die Wirkung der Derivate besser oder vergleichbar mit Gemcitabin. Dies ist ganz besonders ausgeprägt bei dem Amidderivat, bei dem mit gerade 25% der Gemcitabin-Dosis eine überlegene Wirkung erhalten wird.

[0029] Bei wiederholter Dosierung ist der Unterschied zwischen den Derivaten und Gemcitabin noch eindrucksvoller. Dies drückt sich sowohl in einer erhöhten Überlebenszeit als auch bei den Langzeitüberlebenden aus. Ein weiteres eindrucksvolles Kennzeichen ist die Toxizität, die bei Gemcitabin selbst sowohl im oberen, als auch im mittleren Bereich der wiederholten Dosierung beobachtet wird. Obwohl die Wirkung, die mit der nichttoxischen Dosis im niedrigen Bereich (1 mg/kg) erhalten wird, gut ist, wird sie sowohl von den N⁴-Amid- als auch den 5'-Esterderivaten übertroffen. Gemcitabin weist bei einer Plasmakonzentration von etwa 20 μM eine optimale Wirkung auf, aber höhere Konzentrationen, über 35 μM, hemmen die Antikrebswirkung aufgrund von Sättigung des Phosphorylierungsmechanismus (Gandhi, Cellular Pharmacology of Gemcitabine in Gemcitabine: Rationales for Clinical Trial Design and Evaluation, Mini Symposium, 12.3.96, Vrije Universiteit Amsterdam). Im Gegensatz dazu erzielen bevorzugte Gemcitabin-Derivate der Erfindung ein optimales Plasmaniveau von Gemcitabin über einen längeren Zeitraum, ohne Hemmkonzentrationen (>35 μM) zu erreichen. Das kann dadurch sein, daß die Derivate keiner Phosphorylierung unterworfen sind und wahrscheinlich auch keine Hemmer dieses Mechanismus sind.

[0030] Ein Hauptproblem bei der Krebsbehandlung ist die Entwicklung von Resistenz gegen die Therapie. Mehrfachresistenz gegen Arzneimittel (MDR) ist einer der Hauptgründe für ein Versagen von sonst wirksamen Arzneimitteln. Wir haben festgestellt, daß die bevorzugten Derivate dieser Erfindung die MDR-Pumpe irgendwie blockieren und folglich dieses Problem umgehen.

[0031] Die Aufnahme von Nucleosiden und Nucleosid-Analoga, wie z. B. Gemcitabin, erfolgt hauptsächlich über den selektiven Nucleosid-Transport-Rezeptor (NT).

[0032] Modulation/Hemmung dieses Rezeptors kann in einer klinischen Situation als Resistenz gegen das

Arzneimittel erkannt werden. Dieses Phänomen kann in vitro durch Zugabe von NT-Hemmern beobachtet werden. Wir haben überraschenderweise festgestellt, daß unsere Derivate von der Anwesenheit von NT-Hemmern nicht beeinflusst werden, da die zytostatische Aktivität der bevorzugten Derivate in Gegenwart solcher Hemmer bewahrt wird.

[0033] Bedingt durch die schnelle Desaminierung durch das endogene Enzym Desoxycytidindesaminase zu dem entsprechenden Uracilderivat (P.G. Johnston et al., Cancer Chromatography and Biological Response Modifiers, Annual 16, 1996, Kap. 1, Hrsg. Pinedo H.M. et al.), beträgt die Halbwertszeit von Gemcitabin in Plasma ungefähr 10 Minuten.

[0034] Im Gegensatz dazu, sind die Derivate dieser Erfindung schlechte Substrate für das deaktivierende Enzym, und deshalb ist ihre Halbwertszeit erhöht. Folglich sind die Derivate dieser Erfindung für systemische oder lokale Behandlung von bösartigen Tumoren besser geeignet als Gemcitabin selbst.

BIOLOGIE

Untersuchungen

[0035] Die Zytotoxizitätsaktivität von Gemcitabin-N⁴-elaidinamid und Gemcitabin-5'-elaidinester wurde an 2 Paaren von Nagetier- und menschlichen Tumorzelllinien untersucht, wobei jedes aus einer Elternlinie und einer Sublinie bestand, die entweder resistent oder kreuzresistent zu Gemcitabin war.

[0036] Die Zelllinien waren die Tumorzelle A2780 und die Sublinie AG6000 aus menschlichen Eierstöcken, die gegen Gemcitabin resistent ist und einen Mangel an Desoxycytidinkinase aufweist, und die murine Dickdarmtumorzelle C26A und die Sublinie C26G ohne veränderte Desoxycytidinkinase, aber einer 10fachen Abnahme der Thymidinkinase I. Die Zytotoxizität jeder Verbindung wurde nach kontinuierlicher Arzneimittelaussetzung von 72 Stunden bewertet. Die Anzahl der Zellen wurde mittels SRB-Assay bestimmt, und die prozentuale Wachstumshemmung wurde für jede Zelllinie als IC₅₀-Wert berechnet, angegeben in µM; das ist die Konzentration der Verbindung, die verglichen mit der Kontrolle eine 50 %ige Wachstumshemmung verursacht.

Ergebnisse

[0037] Der IC₅₀-Wert in µM der Zytotoxizitätsaktivität von Gemcitabin selbst im Vergleich zu der Zytotoxizitätsaktivität von Gemcitabin-N⁴-elaidinamid und Gemcitabin-5'-elaidinester werden in der untenstehenden Tabelle gezeigt. Die Aktivität der Derivate von Gemcitabin ist in den getesteten Zelllinien viel größer als die Zytotoxizitätsaktivität von Gemcitabin.

Tabelle Die Zytotoxizität von Gemcitabin, Gemcitabin-N⁴-elaidinamid und Gemcitabin-5'-elaidinester in IC₅₀-Werten (µM) in den Zelllinien C26-A, C26-G, A2780 und AG600

	C26-A	C26-G	A2780	AG6000
Gemcitabin	0,0055	0,0075	0,0005	100
Gemcitabin-N ⁴ -elaidinamid	<0,0001	<0,0001	<0,0001	35
Gemcitabin-5'-elaidinester	0,0003	0,0005	<0,0001	100

[0038] Die Zytotoxizitätsaktivität von Gemcitabin und Gemcitabin-5'-elaidinsäureester in CEM-Zellen wurde mit und ohne die Nucleosidtransportmodifizierer Nitrobenzylthioinosin (NBMPR) oder Persantin (Pyridamol) bestimmt. Wie anhand untenstehender Tabelle erkannt werden kann, ist der IC₅₀ von Gemcitabin doppelt so hoch wie der IC₅₀ von Gemcitabin-5'-elaidinsäureester. Mit der Zugabe von NT-Hemmern kommt es zu einem zehnfachen Anstieg der IC₅₀-Werte von Gemcitabin, wohingegen der IC₅₀ von Gemcitabin-5'-elaidinsäureester nur wenig beeinflusst wird (1,3—1,5facher Anstieg). In der „Resistenz“-Situation ist das bevorzugte Derivat 15- bis 20mal potenter als das Stammarzneimittel.

Verbindung	IC ₅₀ µM kein Hemmer	IC ₅₀ µM NBMPR 100 µM	IC ₅₀ µM Persantin 4 µg/ml
Gemcitabin	0,11 ± 0,01	1,11 ± 0,08	1,26 ± 0,04
Gemcitabin-5'- elaidinsäureester	0,047 ± 0,006	0,072 ± 0,034	0,065 ± 0,023

[0039] Die Antitumorwirkung von Gemcitabin-N⁴-elaidinamid oder Gemcitabin-5'-elaidinester wurde in vivo an Mäusen an zwei verschiedenen Tumorarten untersucht, beide mit einmaliger und wiederholter Dosierung.

Wirkung von Gemcitabin-N⁴-elaidinamid oder Gemcitabin-5'-elaidinester auf intrasplenisch mit Co-26 geimpften Mäusen

[0040] Weibliche Balb/c-Mäuse wurden am Tag 0 mit dem murinen Dickdarmkrebs Co-26 in die Milz geimpft. In diesem Modell entwickeln sich Tumoren hauptsächlich in der Leber. Intraperitoneale Behandlung wurde am Tag 1 begonnen. Einmalige Gaben der Verbindungen wurden im Vergleich mit Gemcitabin in einmaligen Gaben getestet. Kochsalzlösung wurde zur Kontrolle verwendet.

Zahl der Mäuse	Substanz	Dosis mg/kg	Mittlere Überlebenszeit T/C [%]	Langzeitüberlebende (>35 d)	Toxische Todesfälle
10	Kochsalzlösung				
8	Gemcitabin-N ⁴ -elaidinamid	25	103,7	5/8	1/8
7	Gemcitabin-5'-elaidinester	75	128,6	1/7	0/7
7	Gemcitabin-5'-elaidinester	100	100,1	4/7	0/7
7	Gemcitabin	75	132,8	2/7	0/7
7	Gemcitabin	100	116,2	4/7	0/7

[0041] Die mittlere Überlebenszeit der Tiere, die starben, lag für die getesteten Verbindungen in demselben Bereich. Gemcitabin-N⁴-elaidinamid war Gemcitabin-5'-elaidinester und Gemcitabin mit 5/8 Überlebenden bei einer Dosis von nur 25 mg/kg im Vergleich zu Gemcitabin bei 100 mg/kg überlegen.

[0042] In einem parallelen Experiment wurde die Dosierung am Tag 1 bis 11 wiederholt.

Zahl der Mäuse	Substanz	Dosis mg/kg	Mittlere Überlebenszeit T/C [%]	Langzeitüberlebende (>46 d)	Toxische Todesfälle
10	Kochsalz-				

	lösung				
8	Gemcitabin-N ⁴ -elaidinamid	1	155	2/8	0/8
8	Gemcitabin-N ⁴ -elaidinamid	4	185,6	1/8	0/8
8	Gemcitabin-5'-elaidinester	1	150,6	1/8	0/8
8	Gemcitabin-5'-elaidinester	4	166,9	3/8	2/8
8	Gemcitabin	1	170,6	2/8	1/8
8	Gemcitabin	4	toxisch	0/8	8/8

[0043] In diesem Experiment waren die mit Gemcitabin-N⁴-elaidinamid und niedrigen Dosen von Gemcitabin-5'-elaidinester erhaltenen Ergebnisse besser oder gleich den Ergebnissen, die mit der niedrigen Dosis von Gemcitabin erhalten wurden. Obwohl die hohe Dosis an Gemcitabin-5'-elaidinsäureester leicht toxisch ist, ist sie es weniger als die hohe Dosis von Gemcitabin selbst.

Wirkung von Gemcitabin-N⁴-elaidinamid oder Gemcitabin-5'-elaidinester bei P-388-ip-in-Mäusen, einmalige Gaben oder wiederholte Gaben

[0044] Weiblichen B6D2F1-Mäusen wurden die Zellen der murinen lymphatischen Leukämie P 388 intraperitoneal implantiert. Behandlungen wurden am Tag 1 nach der intraperitonealen Implantation der Zellen begonnen. Mittlere Überlebenszeit, Langzeitüberlebende und toxische Todesfälle wurden im Anschluß an die Einmalgaben-Behandlung, Wiederholungsgaben-Behandlung von 5 Tagen und Wiederholungsgaben-Behandlung von 10 Tagen aufgezeichnet. Die Ergebnisse sind in der untenstehenden Tabelle dargestellt. Einmalgaben-Behandlung mit Gemcitabin-5'-elaidinester war hinsichtlich beobachteter längerer Überlebenszeit und Langzeitüberlebender im Vergleich zu derselben Gabe an Gemcitabin wirksam.

Einmalgaben-Behandlung

Zahl der Mäuse	Substanz	Dosis mg/kg	Mittlere Überlebenszeit T/C [%]	Langzeitüberlebende (>35 d)	Toxische Todesfälle
9	Kochsalzlösung				
6	Gemcitabin-5'-elaidinester	75	186,3	1/6	0/6
6	Gemcitabin-5'-elaidinester	100	138,9	0/6	0/6
6	Gemcitabin	75	138,9	0/6	0/7

Wiederholungsgaben-Behandlung, Tag 1-4

Zahl der Mäuse	Substanz	Dosis mg/kg	Mittlere Überlebenszeit T/C [%]	Langzeitüberlebende (>35 d)	Toxische Todesfälle
8	Kochsalzlösung				
6	Gemcitabin-N ⁴ -elaidinamid		78	/6	/6
6	Gemcitabin-N ⁴ -elaidinamid		83	/6	/6
6	Gemcitabin	5	8,0	/6	/6

[0045] Aktivität von Gemcitabin-N⁴-elaidinamid war bei Wiederholungsgaben an Tag 1 bis 4 angesichts beobachteter Langzeitüberlebender und verlängerter mittlerer Überlebenszeiten sowohl bei 1 als auch bei 4 mg/kg eindeutig. In der mit Gemcitabin von 15 mg/kg behandelten Kontrollgruppe starben alle Tiere aufgrund von Toxizität.

Wiederholungsgaben-Behandlung, Behandlungstag 1-11

Zahl der Mäuse	Substanz	Dosis mg/kg	Mittlere Überlebenszeit T/C [%]	Langzeitüberlebende (>45 d)	Toxische Todesfälle
9	Kochsalzlösung				
6	Gemcitabin-N ⁴ -elaidinamid	1	172,5	1/6	0/6
6	Gemcitabin-N ⁴ -elaidinamid	4	215,7	0/6	0/6
6	Gemcitabin-5'-elaidinester	1	317,0	0/6	0/6
6	Gemcitabin-5'-elaidinester	4	220,6	2/6	0/6
6	Gemcitabin	1	178,8	0/6	0/6
6	Gemcitabin	4	71,9	0/6	6/6

[0046] Behandlung von 10 Tagen erhöhte die Antitumoraktivität im Vergleich zu kürzerer Behandlung. Toxizität von Gemcitabin war auf einer mg/kg-Basis höher, mit 6/6 toxischen Todesfällen bei 4 mg/kg. Langzeitüber-

lebende wurden nach der Wiederholungsbehandlung sowohl mit Gemcitabin-N⁴-elaidinamid als auch Gemcitabin-5'-elaidinester beobachtet, und es wurden wesentlich erhöhte mittlere Überlebenszeiten sowohl für Gemcitabin-N⁴-elaidinamid und Gemcitabin-5'-elaidinester beobachtet.

[0047] Die Gemcitabinester oder -amide der vorliegenden Erfindung können systemisch verabreicht werden, entweder enteral oder parenteral.

[0048] Für enterale Verabreichung können die aktiven Verbindungen der vorliegenden Erfindung z. B. als weiche oder harte Gelatinkapseln, Tabletten, Granulate, Körner oder Pulver, Dragees, Sirupe, Suspensionen oder Lösungen dargereicht werden.

[0049] Für parenterale Verabreichung sind Zubereitungen der Gemcitabinester oder -amide als Injektions- oder Infusionslösungen, -suspensionen oder -emulsionen geeignet.

[0050] Die Zubereitung kann inerte oder pharmakodynamisch aktive Zusätze enthalten, wie dem Fachmann auf dem Gebiet der Formulierung wohlbekannt ist. Tabletten oder Granulate können z. B. eine Reihe von Bindemitteln, Füllstoffen, Emulgatoren, Trägersubstanzen oder Verdünnungsmitteln enthalten. Flüssige Zubereitungen können z. B. in der Form einer sterilen Lösung vorliegen.

[0051] Kapseln können zusätzlich zu dem aktiven Inhaltsstoff einen Füllstoff oder Verdickungsmittel enthalten. Weiterhin können geschmacksverbessernde Zusätze ebenso wie die üblicherweise verwendeten Substanzen wie Konservierungs-, Stabilisierungs-, Feuchtigkeitsrückhaltmittel und Emulgatoren, Salze zum Verändern des osmotischen Drucks, Puffer und andere Zusätze anwesend sein.

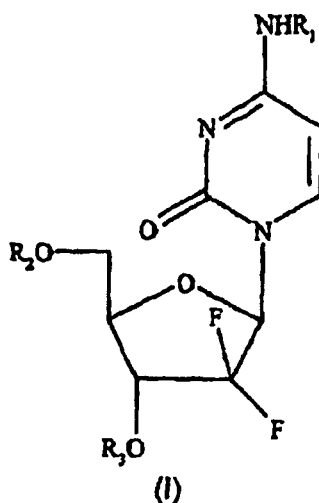
[0052] Die Dosierung, in der die erfindungsgemäßen Zubereitungen verabreicht werden, wird gemäß der Verwendungsweise und dem Verwendungsweg sowie auch den Anforderungen des Patienten variieren. Im allgemeinen wird eine Tagesdosis für eine systemische Therapie eines erwachsenen durchschnittlichen Patienten etwa 0,1 bis 150 mg/kg Körpergewicht/Tag, vorzugsweise 1 bis 40 mg/kg/Tag betragen. Für topische Verabreichung kann z. B. eine Salbe von 0,1 bis 10 Gew.% der pharmazeutischen Formulierung, besonders 0,5 bis 5 Gew.% enthalten.

[0053] Falls gewünscht, kann die pharmazeutische Zubereitung, die die Gemcitabinester oder -amide enthält, ein Antioxidans, z. B. Tocopherol, N-Methyltocopherin, butyliertes Hydrocyanisol, Ascorbinsäure oder butyliertes Hydroxytoluol enthalten.

[0054] Kombinationstherapien, d. h., bei denen die Verabreichung eines Gemcitabinesters oder -amids dieser Erfindung in Verbindung mit anderen Therapien, z. B. Chirurgie, Strahlungsbehandlung und Chemotherapie, erfolgt, werden ebenfalls erwogen. Zum Beispiel scheint die bevorzugte Behandlung von Gehirntumoren wahrscheinlich eine Kombination von Chirurgie und Behandlung mit einem Gemcitabinester oder -amid dieser Erfindung durch systemische oder lokale Verabreichung zu sein.

Patentansprüche

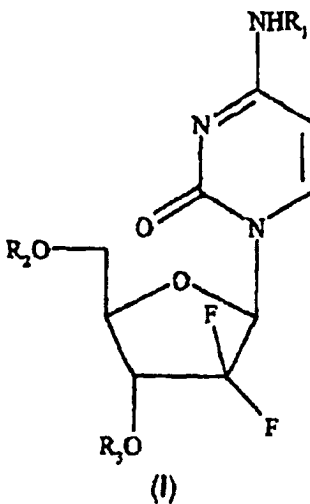
1. Gemcitabine-Derivat mit der Formel (I):



dadurch gekennzeichnet, dass R₁, R₂ und R₃ einzeln ausgewählt sind aus Wasserstoff und aus gesättigten und einfach ungesättigten C₁₈- und C₂₀-Acylgruppen unter der Bedingung, dass R₁, R₂ und R₃ nicht alle Wasserstoff sein können.

2. Verbindung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass nur eines von R₁, R₂ und R₃ eine solche Acylgruppe ist.

3. Verbindung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass diese Monoacylsubstitution an der 3'-O oder 5'-O Position des Zuckeranteils liegt.
4. Verbindung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass diese Monoacylsubstitution an der 5'-O Position des Zuckeranteils liegt.
5. Verbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass R_1 , R_2 und R_3 ausgewählt sind aus Oleoyl, Elaidoyl, cis-Eicosenoyl und trans-Eicosenoyl.
6. (5')-Gemcitabine-Ester der Elaidinsäure.
7. (N^4)-Gemcitabine-Amid der Elaidinsäure.
8. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend einen Gemcitabine-Ester oder -Amid nach einem der vorstehenden Ansprüche und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger oder Vehikel.
9. Gemcitabine-Ester oder -Amid nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Verwendung als Anti-Krebs-Wirkstoff.
10. Verwendung eines Gemcitabine-Esters oder -Amids nach einem der Ansprüche 1 bis 7 in der Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung mit einer Anti-Krebs-Wirkung.
11. Verfahren zur Zubereitung eines Gemcitabine-Derivats nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch das Hervorrufen einer Reaktion von Gemcitabine mit einer Verbindung der Formel:



wobei Fa eine Acylgruppe einer einfach ungesättigten C_{18} - oder C_{20} -Fettsäure und X eine Abgangsgruppe ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen