(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 35 057 T2** 2006.08.31

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 932 399 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 35 057.6**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/03687**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 917 512.2**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1997/033552**
(86) PCT-Anmeldetag: **11.03.1997**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **18.09.1997**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **04.08.1999**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **04.01.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **31.08.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***A61K 31/335*** (2006.01)
A61M 36/00 (2006.01)
A01N 43/02 (2006.01)
C07D 305/00 (2006.01)
A61K 51/04 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
13184 P **12.03.1996** **US**

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

(73) Patentinhaber:
PG-TXL Co., L.P., Houston, Tex., US

(74) Vertreter:
Patent- und Rechtsanwälte Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, 81679 München

(72) Erfinder:
LI, Chun, Missouri City, TX 77459, US; WALLACE, Sidney, Houston, TX 77005, US; YU, Dong-Fang, Houston, TX 77062, US; YANG, David J., Sugarland, TX 77478, US

(54) Bezeichnung: **WASSERLÖSLICHE PACLITAXEL-PRODROGEN**

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

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft im Allgemeinen die Gebiete von bei der Behandlung von Krebs, Autoimmunerkrankungen oder Restenose zu verwendenden Arzneimittelzusammensetzungen. Die vorliegende Erfindung betrifft auch das Gebiet von Arzneimittelpräparaten von Antikrebs-Mitteln wie Paclitaxel (Taxol) und Docetaxel (Taxotere), insbesondere wobei Paclitaxel durch Konjugieren des Arzneimittels an wasserlösliche Einheiten wasserlöslich gemacht wird.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Paclitaxel, ein Antimikrotubulus-Mittel, das aus den Nadeln und der Rinde der pazifischen Eibe, Taxus brevifolia, extrahiert wird, zeigte eine beträchtliche antinoeplastische Wirkung in Krebsstudien der Phase I und Tests der frühen Phase 2 beim menschlichen Krebs (Horwitz et al.,1993). Darüber wurde hauptsächlich bei fortgeschrittenem Eierstock- und Brustkrebs berichtet. Eine beträchtliche Aktivität wurde in kleinzelligem und nicht-kleinzelligem Lungenkrebs, Kopf- und Halskrebs und bei metastatischen Melanomen dokumentiert. Jedoch lag eine Hauptschwierigkeit bei der Entwicklung von Paclitaxel zur Verwendung bei klinischen Tests in seiner Unlöslichkeit in Wasser.

[0003] Docetaxel wird halbsynthetisch aus 10-Deacetylbaccatin III, einem nicht cytotoxischen Vorläufer, der aus den Nadeln der Taxus baccata extrahiert und mit einer chemisch synthetisierten Seitenkette verestert wird hergestellt (Cortes und Pazdur, 1995). Es zeigte sich, dass verschiedene Krebszelllinien, einschließlich Brust-, Lungen-, Eierstock- und kolorektale Krebse und Melanome auf Docetaxel ansprechen. In klinischen Tests wurde Docetaxel zum Erzielen von vollständigen oder teilweisen Antworten in Brust-, Eierstock-, Kopf- und Halskrebsen und malignen Melanomen erzielt.

[0004] Paclitaxel wird typischerweise als konzentrierte Lösung formuliert, die Paclitaxel in 6 mg pro Milliliter Cremophor EL (polyoxyethyliertes Rhizinusöl) und dehydrierten Alkohol (50% V/V) enthält, und muss vor der Verabreichung weiter verdünnt werden (Goldspiel, 1994). Die Menge an Cremophor EL, die zur Abgabe der erforderlichen Paclitaxeldosen nötig ist, ist deutlich höher, als wenn sie mit einem beliebigen anderen in Cremophor formulierten Arzneimittel verabreicht wird. Verschiedene toxische Wirkungen, einschließlich Gefäßverdünnung, Kurzatmigkeit und Hypotenie wurden Cremophor zugeschrieben. Es zeigte sich auch, dass dieses Vehikulum eine gravierende Überempfindlichkeit in Labortieren und Menschen verursacht (Weiss et al., 1990). Tatsächlich wird die maximale Paclitaxeldosis, die Mäusen durch i.v.-Bolusinjektion verabreicht werden kann, durch die akute tödliche Toxizität des Cremophor-Vehikulums diktiert (Eiseman et al, 1994). Zudem ist es bekannt, dass Cremophor EL, ein oberflächenaktives Mittel, Phthalatweichmacher wie Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) aus den Polyvinylchloridbeuteln und Schläuchen zur intravenösen Verabreichungs extrahiert. Es ist bekannt, dass DEHP in Tieren Leberschädigung verursacht und in Nagern karzinogen ist. Es zeigte sich auch, dass dieses Paclitaxelpräparat im Laufe der Zeit teilchenförmige Stoffe bildet, wodurch eine Filtration während der Verabreichung nötig ist (Goldspiel, 1994). Deshalb sind spezielle Maßnahmen zur Herstellung und Verabreichung von Paclitaxellösungen nötig, um eine sichere Arzneimittelabgabe an Patienten zu gewährleisten, und diese Maßnahmen führen unvermeidbar zu höheren Kosten.

[0005] Frühere Versuche zum Erhalt von wasserlöslichem Paclitaxel schlossen die Herstellung von Prodrugs von Paclitaxel durch Anlagern von löslichmachenden Einheiten wie Succinat und Aminosäuren an die 2'-Hydroxygruppe oder an die 7-Hydroxyposition ein (Deutsch et al., 1989; Mathew et al., 1992). Jedoch erwiesen sich diese Prodrugs zur Entwicklung als nicht chemisch stabil genug. Zum Beispiel berichtet Deutsch et al. (1989) über ein 2'-Succinatderivat von Paclitaxel, jedoch beträgt die Wasserlöslichkeit des Natriumsalzes nur etwa 0,1% und waren die Triethanolamin- und N-Methylglucaminsalze nur zu etwa 1% löslich. Zudem wurden Aminosäureester als unstabil berichtet. Ähnliche Ergebnisse wurden von Mathew et al. (1992) berichtet. Greenwald et al. berichtete über die Synthese von hochwasserlöslichen 2'- und 7-Polyethylenglycolestern von Taxol (Greenwald et al, 1994), jedoch wurde über keine Daten, die die in-vivo-Antitumor-Aktivität dieser Verbindungen betreffen, berichtet (Greenwald et al. 1995). Wasserlösliches Polymer (PEG), das an Taxolzusammensetzungen konjugiert ist, sind in WO-A-96/23794, WO-A-98/07713, WO-A-93/24476 und WO-A-95/11924 beschrieben.

[0006] Andere Versuche zum Lösen dieser Probleme beinhalteten die Mikroeinkapselung von Paclitaxel sowohl in Liposome als auch Nanokügelchen (Bartoni und Boitard, 1990). Es wurde berichtet, dass die Liposomformulierung als freies Paclitaxel wirksam ist, jedoch waren nur Liposomformulierungen, die weniger als 2%

Paclitaxel enthielten, physikalisch stabil (Sherma und Straubinger, 1994). Unglücklicherweise erwies sich die Nanokügelchenformulierung als toxisch. Es besteht deshalb immer noch Bedarf nach einer wasserlöslichen Paclitaxelformulierung, die wirksame Mengen Paclitaxel und Docetaxel ohne die durch die Unlöslichkeit des Arzneimittels verursachten Nachteile abgeben kann. WO-A-94/00159 offenbart ein Polymer auf der Basis von an Taxol konjugierten Aminosäureeinheiten zur verbesserten Wasserlöslichkeit.

[0007] Ein anderes Hindernis für die weit verbreitete Verwendung von Paclitaxel sind die eingeschränkten Quellen, aus welchen Paclitaxel hergestellt wird, wodurch die Paclitaxeltherapie teuer wird. Ein Behandlungsverlauf kann z.B. mehrere Tausend Dollar kosten. Hier liegt der zusätzliche Nachteil vor, dass nicht alle Tumore auf eine Paclitaxeltherapie ansprechen, wobei dies daran liegen kann, dass das Paclitaxel nicht in den Tumor eingreift. Es besteht deshalb unmittelbarer Bedarf nach wirksamen Formulierungen von Paclitaxel und verwandten Arzneimitteln, die mit langen Serumhalbwertszeiten zur Behandlung von Tumoren, Autoimmunerkrankungen wie rheumatioder Arthritis sowie zur Vorbeugung der Restenose von Gefäßen, welche Traumas wie Angioplasie und eine Stenteinpflanzung erfuhren, wasserlöslich sind.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0008] Die vorliegende Erfindung strebt danach, diese und andere dem Fachgebiet innewohnenden Nachteile durch Bereitstellen von Zusammensetzungen zu bewältigen, die ein chemotherapeutisches und antiangiogenes Arzneimittel wie Paclitaxel oder Docetaxel umfassen, das an ein wasserlösliches Polymer wie z.B. eine Polyglutaminsäure oder eine Polyaspartamsäure konjugiert ist. Es zeigt sich hier, dass diese Zusammensetzungen als Antitumor-Mittel gegen beispielhafte Tumormodelle überraschend wirksam sind, und es ist zu erwarten, dass gegen beliebige der Erkrankungen oder Zustände, für welche Taxane oder Taxoide als wirksam bekannt sind, mindestens genauso wirksam sind. Die Zusammensetzungen der Erfindung stellen wasserlösliche Taxoide bereit, um die mit der Unlöslichkeit der Arzneimittel selbst verbundenen Nachteile zu bewältigen, und stellen auch die Vorteile der gesteuerten Freisetzung bereit, sodass es sich hier zeigt, dass Tumore in Tiermodellen nach einer einzelnen intravenösen Verabreichung ausgelöscht werden.

[0009] Die hier beschriebenen Verfahren können auch zur Herstellung von wasserlöslichen Polymerkonjugaten von anderen therapeutischen Mitteln, Kontrastmitteln und Arzneimitteln, einschließlich Etopsid, Teniposid,, Fludarabin, Doxorubicin, Daunomycin, Emodin, 5-Fluoruracil, FUDR, Estradiol, Camptothecin, Retinonsäuren, Verapamil, Epothilonen und Cyclosporin, verwendet werden. Insbesondere würden diejenigen Mittel mit einer freien Hydroxygruppe durch ähnliche chemische Reaktionen, wie sie hier für Paclitaxel beschrieben sind, an die Polymere konjugiert werden. Eine derartige Konjugation läge in der Fähigkeit eines routinierten Fachmanns und würde folglich in den Umfang der beanspruchten Erfindung fallen. Diese Mittel würden Etopsid, Teniposid, Camptothecin und die Epothilone einschließen, wären jedoch nicht darauf beschränkt. Wie hier verwendet bedeutet der Begriff konjugiert an ein wasserlösliches Polymer die kovalente Bindung des Arzneimittels an das Polymer.

[0010] Es ist auch klar, dass die wasserlöslichen Konjugate der vorliegenden Erfindung zusammen mit anderen Arzneimitteln, einschließlich anderen Antitumor- oder Antikrebs-Mitteln, verabreicht werden können. Derartige Kombinationen sind auf dem Fachgebiet bekannt. Das wasserlösliche Paclitaxel oder Docetaxel der vorliegenden Erfindung kann in verschiedenen Behandlungstypen mit einem Platinarzneimittel, einem Antibiotikum wie z.B. Doxorubicin oder Daunorubicin oder anderen in Kombination mit Taxol verwendeten Arzneimitteln kombiniert werden.

[0011] Die Konjugation von chemotherapeutischen Arzneimitteln an Polymere ist eine attraktive Vorgehensweise zum Reduzieren der systemischen Toxizität und Verbessern des therapeutischen Indexes. Polymere mit einer Molekularmasse von größer als 30 kDa diffundieren nur schwer durch normale Kapillaren und glornerulares Endothelium, wodurch normales Gewebe vor irrelevanter Arzneimittelvermittelter Toxizität verschont wird (Maeda und Matsumura, 1989; Reynolds, 1995). Andererseits ist es anerkannt, dass bösartige Tumore häufig ein ungeordnetes Kapillarendothelium und eine größere Durchlässigkeit als eine normale Gewebevaskulatur aufweisen (Maeda und Matsumura, 1989; Fidler et al., 1987). Folglich kann ein Polymer-Arzneimittel-Konjugat, das normalerweise in der Vaskulatur bleiben würde, selektiv aus Blutgefäßen in Tumore entweichen, was zur Tumorakkumulation mit einem wirksamen therapeutischen Arzneimittel führt. Zudem können Polymer-Arzneimittel-Konjugate als Arzneimitteldepots für eine Dauerfreisetzung wirken, indem sie eine verlängerte Arzneimitteleinwirkung auf die Tumorzellen erzeugen. Schließlich können wasserlösliche Polymere zum Stabilisieren von Arzneimitteln sowie zum Löslichmachen von sonst unlöslichen Verbindungen verwendet werden. Gegenwärtig wurde eine Vielfalt von synthetischen und natürlichen Polymeren auf ihre Fähigkeit, die tumorspezifische Arzneimittelabgabe zu verbessern, untersucht (Kopecek, 1990, Maeda und Matsumura, 1989). Jedoch

werden nur wenige gegenwärtig einer klinischen Beurteilung unterzogen, einschließlich SMANCS in Japan und HPMA-Dox in United Kingdom (Maeda, 1991; Kopecek und Kopeckova, 1993).

[0012] In der vorliegenden Offenbarung ist Taxoid derart zu verstehen, dass es diejenigen Verbindungen bedeutet, die Paclitaxels und Docetaxels und andere das Taxangerüst aufweisende Chemikalien einschließen (Cortes und Pazdur, 1995), und von natürlichen Quellen wie der Eibe oder aus einer Zellkultur isoliert werden oder chemisch synthetisierte Moleküle sein können, und bevorzugt ist eine chemische Verbindung der allgemeinen chemischen Formel $C_{47}H_{51}NO_{14}$, einschließlich [2aR-[2aα,4β,4αβ,6β,9α(α R*,ßS*),11α,12α,12aα,12bα,]]-β-(Benzoylamino)-α-hydroxybenzolpropansäure-6,12b-bis(acetyloxy)-12-(benzoyloxy)-2a,3,4,4a,5,6,9,10,11,12,12a,12b-dodecahydro-4,11-dihydroxy-4a,8,13,13-tetramethyl-5-oxo-7,11-methan-1H-cyclodeca[3,4]benz-[1,2-b]oxet-9-ylester. Es ist klar, dass jeweils Paclitaxel und Docetaxel gegen bestimmte Tumortypen wirksamer als das andere ist, und dass bei der Durchführung der vorliegenden Erfindung diejenigen Tumore, die für ein bestimmtes Taxoid empfänglicher sind, mit demjenigen wasserlöslichen Taxoidkonjugat behandelt werden würden.

[0013] In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können das Paclitaxel oder Docetaxel an ein wasserlösliches Polymer konjugiert werden, und vorzugsweise ist das Polymer an das 2'- oder das 7'-Hydroxyl oder beides des Paclitaxels oder Docetaxels konjugiert. Folglich wird, wenn funktionelle Gruppen zur Arzneimittelkonjugation wie vorstehend mit C2'-Hydroxyl von Paclitaxel verwendet werden, eine abbaubare Verknüpfung, in diesem Fall ein Ester zum Gewährleisten dessen verwendet, dass das wirksame Arzneimittel von dem Polymerträger freigesetzt wird. Bevorzugte Polymere schließen Poly(1-glutaminsäure), Poly(d-glutaminsäure), Poly(d1-glutaminsäure), Poly(1-aspartamsäure), Poly(d-aspartamsäure), Poly(d1-aspartamsäure), Copolymere der vorstehend aufgelisteten Polyaminosäuren mit Polycaprolacton, Polyglycolsäure und Polymilchsäure sowie Polyacrylsäure Polyacrylsäure, Poly(2-hydroxyethyl-1-glutamin), Carboxymethyldextran, Hyaluronsäure, menschliches Serumalbumin und Alginsäure ein, sind jedoch nicht darauf beschränkt, wobei Polyaspartamsäuren und Polyglutaminsäuren besonders bevorzugt sind. Die Polyglutaminsäuren oder Polyaspartamsäuren der vorliegenden Erfindung weisen vorzugsweise ein Molekulargewicht von etwa 5000 bis etwa 100000 auf, wobei etwa 20000 bis etwa 80000 oder sogar etwa 30000 bis etwa 60000 stärker bevorzugt sind.

[0014] Es ist klar, dass die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung in einer wie nachstehend beschriebenen pharmazeutisch verträglichen Trägerlösung dispergiert werden können. Eine derartige Lösung wäre steril oder aseptisch und kann Wasser, Puffer, isotonische Mittel oder andere dem Fachmann bekannte Inhaltsstoffe, die beim Verabreichen an einen tierischen oder menschlichen Patienten keine Allergene oder andere schädliche Reaktion verursachen würden, einschließen. Deshalb kann die vorliegende Erfindung auch als Arzneimittel beschrieben werden, das ein chemotherapeutisches oder Antikrebs-Arzneimittel wie Paclitaxel oder Docetaxel umfasst, das an ein wasserlösliches Polymer mit hohem Molekulargewicht konjugiert ist. Das Arzneimittel kann Polyglutaminsäuren oder Polyaspartamsäuren einschließen.

[0015] Die vorliegende Erfindung kann in bestimmten Ausführungsformen auch als Verfahren zum Behandeln von Krebs in einem Patienten beschrieben werden. Dieses Verfahren schließt den Erhalt einer Zusammensetzung, umfassend ein chemotherapeutisches Arzneimittel wie Paclitaxel oder Docetaxel, konjugiert an ein wasserlösliches Polymer und dispergiert in einer pharmazeutisch verträglichen Trägerlösung, und Verabreichen der Lösung an den Patienten in einer wirksamen Menge zum Behandeln des Tumors ein. Bevorzugte Zusammensetzungen umfassen Paclitaxel oder Docetaxel, das an Polyglutaminsäuren oder Polyaspartamsäuren und stärker bevorzugt an Poly(1-glutaminsäure) oder Poly(1-aspartamsäure) konjugiert ist. Es ist klar, dass die Zusammensetzungen der Erfindung gegen jeden beliebigen Krebstyp, für welches sich das unkonjugierte Taxoid als wirksam zeigte, wirksam ist, und Brustkrebs, Eierstockkrebs, bösartiges Melanom, Lungenkrebs, Magenkrebs, Darmkrebs, Kopf- und Halskrebs oder Leukämie einschließen würde, jedoch nicht darauf beschränkt ist.

[0016] Die vorliegende Erfindung kann auch in bestimmten breiten Aspekten als Verfahren zum Vermindern zumindest eines Symptoms einer systemischen Autoimmunerkrankung beschrieben werden, umfassend das Verabreichen einer wirksamen Menge einer Zusammensetzung, umfassend Paclitaxel oder Docetaxel, konjugiert an Poly-1-glutaminsäure oder Poly-1-aspartamsäure, an einen Patienten mit einer systemischen Autoimmunerkrankung. Von besonderem Interesse im Zusammenhang der vorliegenden Offenbarung ist die Behandlung von rheumatoider Arthritis, von welcher es bekannt ist, dass sie in manchen Fällen auf Taxol anspricht, wenn sie in einer standardmäßigen Cremophor-Formulierung verabreicht wird (US-Patent 5,583,153). Als Behandlung von Tumoren wird erwogen, dass die Wirksamkeit der wasserlöslichen Taxoide der vorliegenden Erfindung durch die Konjugation an eine wasserlösliche Einheit nicht vermindert wird, und dass die wasserlösli-

che Prodrug als Formulierung mit gesteuerter Freisetzung wirken kann, die das aktive Arzneimittel über einen Zeitraum freisetzt. Deshalb ist zu erwarten, dass die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung so wirksam wie Taxol gegen rheumatoide Arthritis, z.B., ist, jedoch den Vorteil einer gesteuerten Freisetzung bieten. Es ist auch klar, dass die Taxoidzusammensetzungen der vorliegenden Erfindung in Kombination mit anderen Arzneimitteln wie einem Angiogenesehemmer (AGM-1470) (Oliver et al., 1994) oder Methotrexat verwendet werden können.

[0017] Die Entdeckung, dass Paclitaxel auch die Restenose nach einer Ballonangioplastie hemmt, weist darauf hin, dass die wasserlöslichen Paclitaxels und Docetaxels der vorliegenden Erfindung jenseits der direkten parenteralen Verabreichung vielfältig anwendbar sind (WO 9625176). Zum Beispiel wird erwogen, dass wasserlösliches Paclitaxel als Beschichtung für implantierte medizinische Vorrichtungen wie Schläuche, Bypässe, Katheter, künstliche Implantate, Nägel, elektrische Implantate wie Herzschrittmacher und insbesondere für arterielle oder venöse Stents, einschließlich Ballon-erweiterbare Stents, nützlich ist. In diesen Ausführungsformen wird erwogen, dass wasserlösliches Paclitaxel an eine implantierbare medizinische Vorrichtung gebunden werden kann, oder in einer anderen Ausführungsform, dass das wasserlösliche Paclitaxel auf der Oberfläche der implantierbaren Vorrichtung passiv absorbiert werden kann. Zum Beispiel können Stents mit Polymer-Arzneimittel-Konjugaten durch Eintauchen des Stents in die Polymer-Arzneimittel-Lösung oder Besprühen des Stents mit einer derartigen Lösung beschichtet werden. Geeignete Materialien für die implantierbare Vorrichtung sollten bioverträglich und nicht toxisch sein und können aus Metallen wie Nickel-Titan-Legierungen, Stahl oder bioverträglichen Polymeren, Hydrogelen, Polyurethanen, Polyethylenen, Ethylenvinyl-Acetat-Copolymeren usw. ausgewählt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das wasserlösliche Paclitaxel, insbesondere ein PG-Paclitaxel-Konjugat auf einen Stent zum Einsetzen in eine Arterie oder Vene, gefolgt von Ballonangioplastie, aufgetragen. Die Erfindung kann deshalb in bestimmten breiten Aspekten als Verfahren zum Hemmen von Arterienrestinose oder Arterienverschluss infolge von vaskulärem Trauma beschrieben werden, umfassend das Verabreichen einer Zusammensetzung, umfassend Paclitaxel oder Docetaxel, konjugiert an eine Poly-1-glutaminsäure oder Poly-l-aspartamsäure, an einen dies benötigenden Patienten. Bei der Durchführung des Verfahrens kann der Gegenstand ein Herzbypass sein, kann der Patient z.B. ein Patient für einen Herzbypass, eine Gefäßoperation, ein Organtransplantat oder eine Coronar- oder Arterienangioplastie sein und kann die Zusammensetzung direkt, intravenös oder sogar aufgetragen auf einem Stent verabreicht werden, und wird der Stent angesichts von Gefäßtrauma implantiert.

[0018] Eine Ausführungsform der Erfindung ist deshalb eine implantierbare medizinische Vorrichtung, wobei die Vorrichtung mit einer Zusammensetzung, umfassend Paclitaxel oder Docetaxel, konjugiert an Polyglutaminsäuren oder Polyaspartamsäuren in einer Menge, die zum Hemmen der Glattmuskelzellwucherung wirksam ist, beschichtet ist. Eine bevorzugte Vorrichtung ist ein Stent, der mit den wie hier beschriebenen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung beschichtet ist, und in bestimmten Ausführungsformen ist der Stent zur Verwendung nach einer Ballonangioplastie geeignet und ist die Beschichtung zum Hemmen von Restenose wirksam.

[0019] In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen kann die Erfindung als Zusammensetzung, umfassend Polyglutaminsäuren, konjugiert an das 2'- oder 7-Hydroxyl oder beides von Paclitaxel, oder sogar als Zusammensetzung, umfassend Polyaspartamsäure, konjugiert an das 2'- oder 7-Hydroxyl oder beides von Paclitaxel beschrieben werden. Wie hier verwendet schließen die Begriffe „eine Polyglutaminsäure" oder „Polyglutaminsäuren" Poly(1-glutaminsäure), Poly(d-glutaminsäure) und Poly(d1-glutaminsäure) und die Begriffe „eine Polyaspartamsäure" oder „Polyaspartamsäuren" Poly(1-aspartamsäure), Poly(d-aspartamsäure) und Poly(d1-aspartamsäure) ein.

[0020] Wenn nicht anders definiert, weisen alle technischen und wissenschaftlichen Begriffe, die hier verwendet werden, dieselben Bedeutungen auf wie sie üblicherweise für den Fachmann, welchem diese Erfindung gehört, verständlich sind. Obwohl beliebige Verfahren und Materialien oder Äquivalente zu denjenigen, die hier beschrieben sind, bei der Durchführung oder beim Testen der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, werden die bevorzugten Verfahren und Materialien nun beschrieben.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0021] Fig. 1A Chemische Struktur von Paclitaxel, PEG-Paclitaxel und DTPA-Paclitaxel.

[0022] Fig. 1B Chemische Struktur und Reaktionsschema zur Herstellung von PG-Paclitaxel.

[0023] Fig. 2 Hydrolytischer Abbau von PG-Paclitaxel wie bestimmt in PBS bei pH 7,4 bei 37°C. --□-- stellt

den Prozentgehalt an Paclitaxel dar, der an löslichem PG angelagert blieb, --Δ-- stellt den Prozentgehalt an Paclitaxel dar, der freigesetzt wurde, --o-- stellt den Prozentgehalt an hergestelltem Metabolit-1 dar.

[0024] Fig. 3A Antitumorwirkung von PG-Paclitaxel auf Ratten, die Nagerbrusttumor tragen (13762F). -□- stellt das Ansprechverhalten auf eine Einzel-i.v.-Dosis von PG (0,3g/kg) dar; -Δ- stellt das Ansprechverhalten auf Paclitaxel (40 mg/kg) dar, -o- stellt das Ansprechverhalten auf PG-Paclitaxel (60 mg Äquiv. Paclitaxel/kg) dar.

[0025] Fig. 3B Antitumorwirkung von PG-Paclitaxel und Paclitaxel auf Mäuse, die OCa-1-Tumore tragen. -□- stellt das Ansprechverhalten auf eine Einzel-i.v.-Dosis von PG (0,8g/kg) dar; -Δ- stellt das Ansprechverhalten auf Paclitaxel (80 mg/kg) dar, -•- stellt das Ansprechverhalten auf PG-Paclitaxel (80 mg Äquiv. Paclitaxel/kg) dar, -o- stellt das Ansprechverhalten auf PG-Paclitaxel (160 mg Äquiv. Paclitaxel/kg) dar.

[0026] Fig. 3C Antitumorwirkung von PG-Paclitaxel auf Mäuse, die MCa-4-Brustkarzinomtumore tragen. -□- stellt das Ansprechverhalten auf eine Einzel-i.v.-Dosis von Kochsalzlösung, dar; -Δ- stellt das Ansprechverhalten auf eine Einzel-i.v.-Dosis von PG (0,6g/kg) dar, -◆- stellt das Ansprechverhalten auf PG-Paclitaxel (40 mg/kg) dar, -◇- stellt das Ansprechverhalten auf PG-Paclitaxel (60 mg Äquiv. Paclitaxel/kg) dar, -o- stellt das Ansprechverhalten auf PG-Paclitaxel (120 mg Äquiv. Paclitaxel/kg) dar.

[0027] Fig. 3D Antitumorwirkung von PG-Paclitaxel gegen Weichgegebe-Sarkom-Tumor (FSa-II) in Mäusen. -□- stellt das Ansprechverhalten auf eine Einzel-i.v.-Dosis von Kochsalzlösung, dar; -◇- stellt das Ansprechverhalten auf eine Einzel i.v.-Dosis von PG (0,8g/kg) dar, -o- stellt das Ansprechverhalten auf PG-Paclitaxel (80 mg Äquiv. Paclitaxel/kg) dar, -Δ- stellt das Ansprechverhalten auf Paclitaxel (160 mg/kg) dar.

[0028] Fig. 3E Antitumorwirkung von PG-Paclitaxel gegen syngenen Leberkarzinomtumor (HCa-1) in Mäusen. -□- stellt das Ansprechverhalten auf eine Einzel-i.v.-Dosis von Kochsalzlösung, dar; -Δ- stellt das Ansprechverhalten auf eine Einzel-i.v.-Dosis von PG (0,8g/kg) dar, -o- stellt das Ansprechverhalten auf PG-Paclitaxel (160 mg Äquiv. Paclitaxel/kg) dar, -Δ- stellt das Ansprechverhalten auf Paclitaxel (160 mg/kg) dar.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0029] Die vorliegende Erfindung ist auf die Entdeckung von neuen wasserlöslichen Formulierungen von Paclitaxel und Docetaxel und der überraschenden Wirksamkeit dieser Formulierungen gegen Tumorzellen in vivo zurückzuführen. An Poly(1-glutaminsäure) konjugiertes Paclitaxel (PG-Paclitaxel), das Mäusen verabreicht wird, die Eierstockkarzinome (OCa-1) tragen, verursachte verglichen mit derselben Dosis an Paclitaxel ohne PG eine beträchtliche Tumorwachstumsverzögerung. Mäuse, die mit Paclitaxel allein oder mit einer Kombination aus freiem Paclitaxel und PG behandelt wurden, zeigten anfänglich ein verzögertes Tumorwachstum, jedoch wuchsen die Tumore wieder auf Grade an, die mit einer unbehandelten Kontrollgruppe nach 10 Tagen vergleichbar waren. Außerdem war das Wachstum der Tumore bei der maximal tolerierten Dosis (MTD) des PG-Paclitaxel-Konjugats (160 mg Äquiv. Paclitaxel/kg) vollständig unterdrückt, die Tumore schrumpften und Mäuse, die für eine Dauer von 2 Monaten nach der Behandlung beobachtet wurden, blieben tumorfrei (MTD: definiert als die maximale Dosis, die einen 15%igen oder geringeren Körpergewichtsverlust innerhalb von 2 Wochen nach einer einzelnen i.v.-Injektion erzeugte). In einer Parallelstudie wurde die Antitumoraktivität von PG-Paclitaxel in Ratten mit Rattenbrustadenokarzinom (13762F) untersucht. Wiederum wurde bei 40-60 mg Äquiv. Paclitaxel/kg von PG-Paclitaxel eine vollständige Tumorauslöschung beobachtet. Diese überraschenden Ergebnisse zeigen, dass das Polymer-Arzneimittel-Konjugat PG-Paclitaxel gut etablierte feste Tumore sowohl in Mäusen als auch in Ratten nach einer einzelnen intravenösen Injektion vollständig auslöschten. Außerdem ist PG-Paclitaxel mit einer Halbwertszeit von 40 Tagen bei pH 7,4 eines der stabilsten wasserlöslichen Paclitaxelderivate, die bekannt sind (Deutsch et al., 1989; Mathew et al., 1992; Zhao und Kingston, 1991).

[0030] Die neuen Verbindungen und Verfahren der vorliegenden Erfindung stellen gegenüber den Verfahren und Zusammensetzungen des Fachgebiets deutliche Vorteile bereit, da vorhergesagt wird, dass die wasserlöslichen Paclitaxels die Wirksamkeit einer Antikrebstherapie auf Paclitaxelbasis durch Bereitstellen von wasserlöslichem und gesteuert freigesetztem Paclitaxel abgeleiteten Zusammensetzungen verbessern. Derartige Zusammensetzungen eliminieren die Notwendigkeit von Lösungsmitteln, die mit Nebenwirkungen verbunden sind, die mit Paclitaxelzusammensetzungen des Fachgebiets ersichtlich sind. Zudem ist auch radiomarkiertes Paclitaxel, von welchem es sich auch zeigte, dass es Antitumoraktivität beibehält, beim Abbilden von Tumoren nützlich. Des Weiteren gewährt die vorliegende Erfindung die Bestimmung durch Szintigraphie, Einzelphotonenemissionscomputertomographie (SPELT) oder Positronemissionstomographie (PET) dessen, ob ein Paclitaxel von einem bestimmten Tumor aufgenommen wurde. Diese Bestimmung kann dann zum Entscheiden

der Wirksamkeit einer Antikrebsbehandlung verwendet werden. Diese Informationen können als Leitlinie für den Arzt bei der Auswahl von Patienten für das Unterziehen einer Paclitaxeltherapie hilfreich sein.

[0031] Das Paclitaxel kann durch Konjugieren von Paclitaxel an wasserlösliche Polymere, die als Arzneimittelträger dienen, wasserlöslich gemacht werden. Die Strukturen von Paclitaxel und Polyglutaminsäure-Paclitaxel-Konjugat (PG-Paclitaxel) sind in **Fig.** 1 dargestellt.

[0032] Es ist klar, dass zusätzlich zu Paclitaxel (Taxol) und Docetaxel (Taxotere) andere Taxanderivate zur Verwendung in den Zusammensetzungen und Verfahren der vorliegenden Erfindung geeignet sind und derartige Zusammensetzungen und Verfahren von den anhängigen Ansprüchen umfasst sind.

[0033] In bestimmten Ausführungsformen der Erfindung kann ein mit den Polymer-Paclitaxel-Konjugaten beschichteter Stent zur Verhinderung von Restenose, dem Verschluss von Arterien nach einer Ballonangioplastie, verwendet werden. Jüngste Ergebnisse in klinischen Tests unter Verwendung von Ballon-erweiterbaren Stents bei der Koronaangioplastie zeigten einen deutlichen Nutzen bei der Durchgängigkeit und der Restenose verglichen mit einer standardmäßigen Ballonangioplastie (Serruys et al., 1994). Gemäß der Hypothese des Ansprechverhaltens auf Verletzung, ist eine Neointimabildung mit einer erhöhten Zellwucherung verbunden. Gegenwärtig besteht die allgemeine Meinung, dass der entscheidende Prozess, der sowohl bei spontaner als auch beschleunigter Arteriosklerose zu Gefäßläsionen führt, die Glattmuskelzell(SMC)-Wucherung ist (Phillips-Hughes und Kandarpa, 1996). Da eine phenotypische SMC-Wucherung nach einer Arterienverletzung diejenige der neoplastischen Zellen nachahmt, ist es möglich, dass Antikrebs-Arzneimittel zum Verhindern der neoinitalen SMC-Akkumulation nützlich ist. Stents, die mit polymerverknüpften Antiwucherungsmitteln beschichtet sind, die diese Mittel über einen längeren Zeitraum mit einer ausreichenden Konzentration freisetzen können, verhindern folglich das Einwachsen von hyperplastischer Intima und Medien in das Lumen, wodurch die Restenose reduziert wird.

[0034] Da es sich zeigte, dass Paclitaxel die Kollagen-induzierte Arthritis in einem Mäusemodell unterdrückt (Oliver et al., 1994), wird auch erwogen, dass die Formulierungen der vorliegenden Erfindung bei der Behandlung von Autoimmun- und/oder entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis nützlich sind. Eine Paclitaxelbindung an Tubulin verschiebt das Gleichgewicht zu stabilen Miktotubuluspolymeren und macht aus diesem Arzneimittel einen starken Hemmer für die eukariotische Zellreplikation durch Blockieren der Zellen im späten mitotischen G2-Stadium. Mehrere Mechanismen können an der Arthritisunterdrückung durch Paclitaxel beteiligt sein. Zum Beispiel können die phasenspezifischen zytotoxischen Wirkungen von Paclitaxel schnell wuchernde entzündliche Zellen beeinflussen, und weiterhin hemmt Paclitaxel die Zellmitose, Migration, Chemotaxis, den intrazellulären Transport und die neutrophile H_2O_2-Produktion. Zudem kann Paclitaxel durch Blockieren der koordinierten Endothelialzellmigration eine antiangiogene Aktivität aufweisen (Oliver et al., 1994). Deshalb wird erwogen, dass die polymerkonjugierten Prodrugs der vorliegenden Erfindung bei der Behandlung von rheumatoider Arthritis so nützlich wie freies Paclitaxel sind. Die hier offenbarte polymerkonjugierte Formulierung würde auch die Vorteile der verzögerten oder anhaltenden Freisetzung des Arzneimittels und der größeren Löslichkeit bieten. Es ist auch ein Aspekt der Behandlung von Arthritis, dass die Formulierungen direkt in die beeinflussten Verbindungsbereiche injiziert oder implantiert werden können.

[0035] Die pharmazeutischen Präparate von Paclitaxel oder Docetaxel, die zur injizierbaren Verwendung geeignet sind, schließen sterile wässrige Lösungen oder Dispersionen und sterile Pulver zur Herstellung von sterilen injizierbaren Lösungen oder Dispersionen ein. In allen Fällen muss die Form steril und zur Injektion fluidförmig sein. Sie muss unter den Herstellungs- und Lagerbedingungen stabil und gegen die Kontaminierungswirkung von Mikroorganismen wie Bakterien und Pilze konserviert werden. Der Träger kann ein Lösungsmittel oder Dispersionsmedium sein, das z.B. Wasser, Ethanol, Polyol, (z.B. Glycerin, Proplyenglycol und dergleichen enthält), geeignete Gemische davon und Pflanzenöle sein. Die Verhinderung der Wirkung von Mikroorganismen kann durch verschiedene antibakterielle und Antipilzmittel, z.B. Parabene, Chlorbutanol, Phenol, Sorbinsäure, Thimerosal und dergleichen herbeigeführt werden. In vielen Fällen ist es bevorzugt, isotonische Mittel, z.B. Zucker oder Natriumchlorid einzuschließen.

[0036] Sterile injizierbare Lösungen werden durch Einbringen der Wirkverbindungen in den erforderlichen Mengen in das geeignete Lösungsmittel falls erforderlich mit verschiedenen der anderen vorstehend aufgezählten Inhaltsstoffe, gefolgt von Filtrationssterilisation hergestellt. Im Allgemeinen werden Dispersionen durch Einbringen der verschiedenen sterilisierten Wirkstoffe in ein steriles Vehikulum, das das Grunddispersionsmedium und die erforderlichen anderen Inhaltsstoffe aus denjenigen, die vorstehend aufgezählt sind, enthält, hergestellt. Im Falle von sterilen Pulvern zur Herstellung von sterilen injizierbaren Lösungen handelt es sich bei den bevorzugten Verfahren um Vakuumtrocknungs- und Gefriertrocknungstechniken, durch welche ein Pulver

des Wirkstoffs und zusätzlich ein beliebiger gewünschter Inhaltsstoff aus einer vorher steril filtrierten Lösung davon enthalten wird.

[0037] Wie hier verwendet, schließt „pharmazeutisch verträglicher Träger" beliebige und alle Lösungsmittel, Dispersionsmedien, Beschichtungen, antibakterielle und Antipilzmittel und isotonische Mittel und dergleichen ein. Die Verwendung derartiger Medien und Mittel für pharmazeutische Wirkstoffe ist auf dem Fachgebiet bekannt. Mit der Ausnahme dessen, dass beliebige herkömmliche Medien oder Mittel mit dem Wirkstoff unverträglich sind, wird deren Verwendung in den therapeutischen Zusammensetzungen erwogen. Ergänzende Wirkstoffe können ebenfalls in die Zusammensetzungen eingebracht werden.

[0038] Der Ausdruck „pharmazeutisch verträglich" bedeutet molekulare Einheiten und Zusammensetzungen, die keine allergene oder ähnliche unpassende Reaktion erzeugen, wenn sie einem Tier oder einem Menschen verabreicht werden.

[0039] Zur parenteralen Verabreichung in wässriger Lösung sollte die Lösung z.B. gegebenenfalls geeignet gepuffert sein und das flüssige Verdünnungsmittel zuerst mit ausreichender Kochsalzlösung oder Glucose isotonisch gemacht werden. Diese besonderen wässrigen Lösungen sind insbesondere zur intravenösen und intraperitonealen Verabreichung geeignet. In diesem Zusammenhang sind sterile wässrige Medien, die eingesetzt werden können, dem Fachmann im Lichte der vorliegenden Offenbarung bekannt.

[0040] Die folgenden Beispiele sind eingeschlossen, um bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung darzustellen. Es sollte dem Fachmann klar sein, dass die in den folgenden Beispielen offenbarten Techniken Techniken darstellen, von welchen durch den Erfinder entdeckt wurde, dass sie bei der Durchführung der Erfindung gut funktionieren und folglich erwogen werden kann, dass sie bevorzugte Modi für diese Durchführung bilden. Jedoch sollte der Fachmann im Lichte der vorliegenden Offenbarung erkennen, dass viele Änderungen in den spezifischen offenbarten Ausführungsformen durchgeführt werden können und immer noch ein ähnliches oder gleichwertiges Ergebnis ohne Verlassen des Geists und Umfangs der Erfindung erhalten wird.

Beispiel 1

Polyglutaminsäure-Paclitaxel

[0041] Das vorliegende Beispiel zeigt die Konjugation von Paclitaxel an ein wasserlösliches Polymer, Poly(1-glutaminsäure) (PG). Das Potential von wasserlöslichen Polymeren, die als Arzneimittelträger verwendet werden, ist anerkannt (Kopecek, 1990; Maeda und Matsumura, 1989). Zusätzlich zu seinem Vermögen, andere unlösliche Arzneimittel löslich zu machen, kann das Arzneimittel-Polymer-Konjugat auch als langsam freisetzendes Depot zur gesteuerten Arzneimittelfreisetzung dienen.

Synthese von PG-Paclitaxel

[0042] PG wurde als Träger für Paclitaxel ausgewählt, da es durch lysomale Enzyme leicht abgebaut werden kann, in Plasma stabil ist und ausreichend funktionelle Gruppen zur Arzneimittelanlagerung enthält. Verschiedene Antitumor-Arzneimittel, einschließlich Adriamycin (Van Heeswijk et al., 1985; Hoes et al., 1985), Cyclophosphoamid (Hirano et al., 1979) und Ara-C (Kato et al., 1984) wurden an PG konjugiert.

[0043] PG-Natriumsalz (MG 34 K, Sigma, 0,35 g) wurde in Wasser gelöst. Der pH-Wert der wässrigen Lösung wurde unter Verwendung von 0,2 M HCl auf 2 eingestellt.

[0044] Der Niederschlag wurde aufgefangen, gegen destilliertes Wasser dialysiert und lyophilisiert, um 0,29 g PG zu erhalten.

[0045] Einer Lösung von PG (75 mg, Wiederholungseinheit FW 170, 0,44 mmol) in trockenem DMF (1,5 ml) wurden 20 mg Paclitaxel (0,023 mmol, Molverhältnis PG/Paclitaxel = 19), 15 mg Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) (0,073 mmol) und eine Spurenmenge Dimethylaminopyridin (DMAP) zugesetzt. Man ließ die Reaktion bei Raumtemperatur für eine Dauer von 4 Stunden verlaufen. Eine Dünnschichtchromatographie (DSC, Silica) zeigte eine vollständige Umwandlung von Paclitaxel (Rf = 0,55) zu Polymer-Konjugat (Rf = 0, mobile Phase, $CHCl_3$/MeOH = 10:1). Das Reaktionsgemisch wurde in Chloroform gegossen. Der erhaltene Niederschlag wurde aufgefangen und im Vakuum getrocknet, um 65 mg Polymer-Arzneimittel-Konjugat zu erhalten. Durch Ändern des Gewichtsverhältnisses von Paclitaxel zu PG in den Ausgangsmaterialien können Polymerkonjugate mit verschiedenen Paclitaxelkonzentrationen synthetisiert werden.

[0046] Das Natriumsalz von PG-Paclitaxel-Konjugat wurde durch Lösen des Produkts in 0,5 M $NaHCO_3$-Lösung erhalten. Die wässrige Lösung von PG-Paclitaxel wurde gegen destilliertes Wasser (MWCO 1.000) dialysiert, um Kontaminanten mit niedrigem Molekulargewicht und überschüssiges $NaHCO_3$-Salz zu entfernen. Eine Lyophilisierung des Dialysats ergab 88,6 mg weißes Pulver. Der Paclitaxelgehalt in diesem Polymerkonjugat wurde durch UV (nachstehend beschrieben) als 21% (G/G) bestimmt. Ausbeute (Umwandlung zu Polymer-gebundenem Paclitaxel, UV): 93%. PG-Paclitaxel mit höherem Paclitaxelgehalt (bis zu 35%) kann durch dieses Verfahren durch einfaches Erhöhen des Verhältnisses von Paclitaxel zu verwendetem PG synthetisiert werden.
^{1}H-NMR (Spektrometer des Typs GE-Model GN 500, 500 MHz, in D_2O): δ = 7,75 bis 7,36 ppm (aromatische Bestandteile von Paclitaxel) δ = 6,38 ppm (C_{10}-H), 5,97 ppm (C_{13}-H), 5,63 und 4,78 ppm (C_2'-H), 5,55-5.36 ppm (C_3'-H und C_2-H, m), 5,10 ppm (C_5-H), 4,39 ppm (C_7-H), 4,10 (C_{20}-H), 1,97 ppm ($OCOCH_3$) und 1,18-1,20 ppm (C-CH_3) werden aliphatischen Bestandteilen von Paclitaxel zugeschrieben. Andere Resonanzen von Paclitaxel wurden durch die Resonanzen von PG überdeckt. Die PG-Resonanzen bei 4,27 ppm (H-α), 2,21 ppm (H-γ) und 2,04 ppm (H-β) stimmen mit dem reinen PG-Spektrum überein. Die Kopplungen von polymerkonjugiertem Paclitaxel sind zu schlecht aufgelöst, um mit ausreichender Genauigkeit gemessen zu werden. Die Löslichkeit in Wasser betrug > 20 mg Paclitaxel/ml.

Charakterisierung von PG-Paclitaxel

[0047] Ultraviolettspektren (UV) wurden auf einem Spektrophotometer des Typs Beckman DU-640 (Fullerton, CA) erhalten. Der Gehalt an an PG konjugiertem Paclitaxel wurde durch UV, das auf einer Standardkurve basierte, die mit bekannten Konzentrationen an Paclitaxel in Methanol (λ = 228 nm) erhalten wurden, unter der Annahme, dass das Polymer-Konjugat in Wasser und das freie Arzneimittel in Methanol dieselben molaren Extinktionskoeffizienten aufwiesen und beide dem Lambert-Beer-Gesetz folgten, bestimmt. Wie durch sein UV-Spektrum dargestellt weist PG-Paclitaxel eine charakteristische Paclitaxel-Absorption mit λ-Veschiebungen von 228 bis 230 nm auf. Die Konzentration von Paclitaxel in PG-Paclitaxel wurde auf der Basis einer Standardkurve, die mit bekannten Konzentrationen von Paclitaxel in Methanol bei einer Absorption von 228 nm gebildet wurde, unter der Annahme, dass das Polymerkonjugat in Wasser bei 230 nm und das freie Arzneimittel in Methanol bei 228 nm dieselbe molare Extinxtion aufwiesen und beide dem Lambert-Beer-Gesetz folgen, bestimmt.

Gelpermeationschromatographie-Studien von PG-Paclitaxel

[0048] Das relative Molekulargewicht von PG-Paclitaxel wurde durch Gelpermeationschromatographie (GPC) charakterisiert. Das GPC-System bestand aus zwei Pumpen des Typs LDC-Model 3, gekoppelt mit LDC-Gradientmaster, einer PL-Gel-GPC-Säule und einem Fotodiodentafeldetektor des Typs Waters 990. Man ließ den Eluenten (DMF) mit 1,0 ml/Min. mit einer UV-Detektionseinstellung bei 270 nm laufen. Eine Konjugation von Paclitaxel an PG führte zu einer Zunahme im Molekulargewicht des PG-Paclitaxels, wie durch die Verschiebung der Retentionszeit von 6,4 Min. von PG nach 5,0 Min. von PG-Paclitaxel-Konjugat, wie durch GPC analysiert, angegeben. Das berechnete Molekulargewicht von PG-Paclitaxel, enthaltend 15 bis 25% Paclitaxel (G/G) liegt im Bereich von 45 bis 55 kDa. Das Rohprodukt enthielt einen Kontaminanten mit kleinem Molekulargewicht (Retentionszeit 8,0 bis 10,0 Min. und 11,3 Min.) der durch Umwandeln von PG-Paclitaxel zu seinem Natriumsalz, gefolgt von Dialyse, wirksam entfernt werden kann.

Hydrolytischer Abbau von PG-Paclitaxel-Konjugat

[0049] PG-Paclitaxel wurde in phosphatgepufferten Lösungen (PBS, 0,01 M) bei pH 6,0, pH 7,4 und pH 9,6 mit einer äquivalenten Paclitaxelkonzentration von 0,4 mM gelöst. Die Lösungen wurden bei 37°C unter sanftem Schütteln inkubiert. Zu ausgewählten Zeitintervallen wurden Aliquote (100 µl) entfernt, mit einem gleichen Volumen Methanol gemischt und durch Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) analysiert. Das HPCL-System bestand aus einer Umkehrphasen-Silicasäule (Nova-Pac, Waters, CA), einer mobilen Phase aus Methanol-Wasser (2:1, V/V), abgegeben mit einer Fließgeschwindigkeit von 1,0 ml/Min., und einem Fotodiodendetektor. Die Konzentration von PG-gebundenem Paclitaxel, freiem Paclitaxel und anderen Abbauprodukten in jeder Probe wurde durch Vergleichen der Peakflächen mit einer getrennt erhaltenen Standardkurve, hergestellt aus Paclitaxel, unter Annahme dessen, dass der molare Extinktionskoeffizient von jedem Peak bei 228 nm derselbe wie derjenige von Paclitaxel ist, berechnet. Die Halbwertszeit des Konjugats, bestimmt als 132, 40 und 4 Tage bei pH 6,0, 7,4 bzw. 9,6, wurde durch eine lineare Regressionsanalyse des kleinsten Quadrats bestimmt. Eine HPLC-Analyse zeigte, dass die Inkubation von PG-Paclitaxel in PBS-Lösungen Paclitaxel und einige andere Spezies, einschließlich einer, die hydorphober als Paclitaxel ist (Metabolit-1) erzeugte. Tatsächlich überstieg die Metabolit-1-Menge, die am wahrscheinlichsten 7-Epipaclitaxel war, gewonnen in PBS bei pH

7,4, diejenige von Paclitaxel nach 100-stündiger Inkubation (Fig. 2).

In-vitro-Studien

[0050] Aliquote, erhalten von der PBS-Lösung bei pH 7,4, wurden durch einen Tubulin-Polymerisationstest analysiert. Die Tubulinaufbaureaktion wurde bei 32°C in PEM-.Puffer (pH 6,9) bei einer Konzentration von Tubulin (Rinderhirn, Cytoskelton Inc., Boulder, CO) von 1 mg/ml (10 μM) in Gegenwart von Testproben (1,0 μM Äquiv. Paclitaxel) und 1,0 mM GTP durchgeführt. Der Tubulinpolymerisation folgte das Messen der Absorption der Lösung bei 340 mm über einen Zeitraum. Nach 15 Minuten wurde Calciumchlorid (125 mM) zum Messen der $CaCl_2$-induzierten Entpolymerisation der Mikrotubuli zugesetzt. Während frisch in PBS gelöstes PG-Paclitaxel beim Erzeugen von Mikrotubuli inaktiv war, führten für eine Dauer von 3 Tagen inkubierte Aliquote von PG-Paclitaxel zur Tubulinpolymerisation. Die gebildeten Mikrotubuli waren gegen $CaCl_2$-induzierte Entpolymerisation stabil.

[0051] Die Wirkung von PG-Paclitaxel auf das Zellwachstum wurde ebenfalls durch Tetrazoliumsalz (MTT)-Test (Mosmann, 1983) untersucht. MCF-7-Zellen oder 13762F-Zellen wurden mit 2×10^4 Zellen/ml in einer 96-Mulden-Mikrotiterplatte gekeimt, 24 Stunden später mit verschiedenen Konzentrationen von PG-Paclitaxel, Paclitaxel oder PG behandelt und für eine Dauer von zusätzlichen 72 Stunden inkubiert. MTT-Lösung (20 μl, 5 mg/ml) wurde dann jeder Mulde zugesetzt und für eine Dauer von 4 Stunden inkubiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das durch metabolisch lebende Zellen gebildete MTT-Formazan durch ein Mikrotiterfluoreszenzlesegerät bei einer Wellenlänge von 590 nm gemessen. Über eine dreitägige Dauer hemmte PG-Paclitaxel die Tumorzellwucherung zu einem Grad, der denjenigen von freiem Paclitaxel ähnelte. Für die menschliche Brusttumorzelllinie MCF-7 betrugen die erhaltenen IC_{50}-Werte 0,59 μM für Paclitaxel und 0,82 μM für PG-Paclitaxel (gemessen in Paclitaxeläquivalenzeinheiten). Gegen die 12762F-Zellinie war die Empfindlichkeit für PG-Paclitaxel (IC_{50} = 1,86 μM) mit derjenigen von Paclitaxel (IC_{50} = 6,79 μM) vergleichbar. Für beide Zelllinien war der IC_{50} von PG allein größer als 100 μM.

In-vivo-Antitumoraktivität

[0052] Die gesamte Arbeit an Tieren wurde in der Tiereinrichtung am M.D. Anderson Cancer Center gemäß den Institutsrichtlinien durchgeführt. C3H/Kam-Mäuse wurden in einer pathogenfreien Einrichtung im Department of Experimental Radiation Oncology gezüchtet und gehalten. Abgeschlossene Tumore wurden im Muskel der rechten Hüfte von weiblichen C3H/Kam-Mäusen (25 bis 30 g) durch Injizieren von 5×10^5 Mäuseeierstockkarzinomzellen (OCa-1), Brustkarzinomen (MCa-4), Leberkarzinomen (HCa-1) oder fibrösen Sarkomen (FSa-II) hergestellt. In einer Parallelstudie wurden weiblichen Fischer-344-Ratten (125-150 g) $1,0 \times 10^5$ lebensfähige 12762F-Tumorzellen in 0,1 ml PBS injiziert. Die Behandlungen wurden initiiert, als die Tumore in den Mäusen auf 500 mm^3 (10 mm im Durchmesser) angewachsen waren oder als die Tumore in den Ratten auf 2400 mm^3 (mittlerer Durchmesser, 17 mm) angewachsen waren. Eine einzelne Dosis von PG-Paclitaxel in Kochsalzlösung oder Paclitaxel in Cremophor-EL-Vehikulum wurde in Dosen verabreicht, die von 40 bis 160 mg Äquiv. Paclitaxel/kg Körpergewicht variierten. In Kontrollversuchen wurden Kochsalzlösung, Cremophor-Vehikulum [50/50 Cremophor/Ethanol, verdünnt mit Kochsalzlösung (1:4)], eine Lösung von PG (MG 38K) in Kochsalzlösung und ein Paclitaxel/PG-Gemisch verwendet. Das Tumorwachstum wurde täglich (Fig. 3A, Fig. 3B, Fig. 3C, Fig. 3D und Fig. 3E) durch Messen von drei orthogonalen Tumordurchmessern bestimmt. Das Tumorvolumen wurde gemäß der Formel $(A \times B \times C)/2$ berechnet. Die absolute Wachstumsverzögerung (AGD) in Mäusen ist als die Zeit in Tagen definiert, die die mit verschiedenen Arzneimitteln behandelten Tumore zum Anwachsen von 500 auf 200 mm^3 in Mäusen benötigten, minus der Zeit in Tagen, die die mit der Kochsalzlösungskontrolle behandelten Tumore zum Anwachsen von 500 auf 2000 mm^3 benötigten. Tabelle 1 fasst die akute Toxizität von PG-Paclitaxel in Ratten im Vergleich mit Paclitaxel/Cremophor zusammen. Tabelle 2 fasst die Daten zusammen, die die Wirkung von PG-Paclitaxel auf MCA-4-, FSa-II- und HCa-I-Tumore in Mäusen betreffen. Die Daten sind auch in Fig. 3A bis Fig. 3E zusammengefasst.

Tabelle I: Akute Toxizität von PG-Paclitaxel in Fischer-Ratten*

Gruppe	Dosis (mg/kg)	# an toxischem Tod	Verlust an Körpergewicht in %	Zeit am Tiefstpunkt (Tage)	Zeit der vollständigen Wiederherstellung (Tage)
PG-Paclitaxel[a]	60	1/4	15,7	7	14
PG-Paclitaxel[a]	40	0/4	11,1	6	11
Paclitaxel[b]	60	1/4	16,7	6	15
Paclitaxel[b]	40	0/3	17,9	6	16
Kochsalzlösung	1,0 ml	0/2	5,2	1	7
PG[c]	0,3 g/kg	0/2	4,3	2	8
Cremophor-Vehikulum[d]	2,0 ml	0/2	6,9	1	9

* Arzneimittel wurden intravenös an tumortragende 13762F-Fischer-Ratten (weiblich, 130 g) in einer einzelnen Injektion verabreicht.

[a] PG-Paclitaxel-Lösung wurde durch Lösen des Konjugats in Kochsalzlösung (8 mg Äquiv. Paclitaxel/ml) hergestellt. Das injizierte Volumen mit 60 mg/kg betrug 0,975 ml pro Ratte.

[b] Paclitaxel-Cremophorlösung wurde hergestellt durch Lösen von Paclitaxel in einem 1:1-Gemisch von Ethylalkohol und Cremophor (30 mg/ml). Diese Stammlösung wurde weiter mit Kochsalzlösung (1:4) vor der Injektion verdünnt. Die Endkonzentration von Paclitaxel in der Lösung betrug 6 mg/ml. Das injizierte Volumen bei 60 ml/kg betrug 1,3 ml pro Ratte.

[c] PG-Lösung wurde durch Lösen des Polymers in Kochsalzlösung hergestellt (22 mg/ml). Die injizierte Dosis betrug 0,3 g/kg (1,8 ml pro Ratte), was mit einer Paclitaxeldosis von 60 mg/kg äquivalent war.

[d] Das Cremophor-Vehikulum wurde durch Verdünnen eines Gemischs von Ethylalkohol und Cremophor (1:1) mit Kochsalzlösung (1:4) hergestellt.

Tabelle 2: Antitumorwirkung von PG-Paclitaxel auf verschiedene Typen von in-vivo-Mäusetumoren

Tumor	Arzneimittel[a]	Wachstunszeit[00] 500-2000mm³	AGD[?]	t-Test[d]

MCa-4	Kochsalzlösung	4,8±0,8 (5)	-	-
	PG (0,6 g/kg)	9,3±1,1 (4)	4,5	0,0114
	Cremophor-Vehikulum	6,1±0,7 (5)	1,3	0,265
	PG-Pacl (40 mg/kg)	8,6±1,2 (4)	3,8	0,026
	PG-Pacl (60 mg/kg)	14,2±1,1 (5)	9,4	0,0001
	PG-Pacl (120 mg/kg)	44,4±2,9 (5)	39,6	<0,0001
	Paclitaxel (40 mg/kg)	9,0±0,6 (4)	4,2	0,0044
	Paclitaxel (60 mg/kg)	9,3±0,3 (5)	4,5	0,0066
FSa-II	Kochsalzlösung	1,9±0,1 (5)	-	-
	PG (0,8 g/kg)	2,8±0,2 (6)	0,9	0,0043
	Cremophor-Vehikulum	2,2±0,2 (6)	0,3	0,122
	PG-Pacl (80 mg/kg)	3,8±0,4 (6)	1,9	0,0016
	PG-Pacl 160 mg/kg)	5,1±0,3 (13)	3,2	<0,0001
	Paclitaxel (80 mg/kg)	4,2±0,3 (6)	2,3	0,0002
	PG + Paclitaxel	3,0±0,2 (6)	1,1	0,0008
HCa-I	Kochsalzlösung	7,3±0,3 (5)	-	-
	PG (0,8 g/kg)	7,7±0,4 (4)	0,4	0,417
	Cremophor-Vehikulum	6,8±0,8 (5)	-0,5	0,539
	PG-Pacl (40 mg/kg)	8,2±0,7 (5)	0,9	0,218
	PG-Pacl (80 mg/kg)	8,6±0,2 (5)	1,3	0,0053
	PG-Pacl (160 mg/kg)	11,0±0,8 (4)	3,7	0,0023
	Paclitaxel (80 mg/kg)	6,4±0,5 (5)	-0,9	0,138
	PG + Paclitaxel	6,7±0,4 (5)	-0,6	0,294

[a] Mäuse, die Tumore mit 500 mm^3 im rechten Bein trugen, wurden mit verschiedenen Dosen von PG-Paclitaxel (40-120 mg Äquiv. Paclitaxel/kg) in Kochsalzlösung oder Paclitaxel in Cremophor-Vehikulum i.v. in einer einzelnen Injektion behandelt. Kontrolltiere wurden mit Kochsalzlösung (0,6 ml), Cremophor-Vehikulum (0,5 ml), PG-Lösung in Kochsalzlösung oder PG g/kg) plus Paclitaxel (80 mg/kg) behandelt.
[b] Das Tumorwachstum wurde durch tägliche Messung der drei orthogonalen Durchmesser mit Messtastern bestimmt und das Volumen als (a × b × c)/2 berechnet. In Klammern dargestellt ist die Anzahl an Mäusen, die in jeder Gruppe verwendet wurde. Die Zeit in Tagen zum Anwachsen von 500 mm^3 bis 2000 mm^3 ist als mittlere Standardabweichung dargestellt.
[c] Absolute Wachstumsverzögerung (AGD), definiert als die Zeit in Tagen, die die mit verschiedenen Arzneimitteln behandelten Tumore zum Anwachsen von 500 auf 2000 mm^3 benötigten minus der Zeit in Tagen, die die mit Kochsalzlösungskontrolle behandelten Tumore zum Anwachsen von 500 auf 2000 mm^3 benötigten.
[d] Die Zeit in Tagen zum Anwachsen von 500 auf 2000 mm^3 wurde mit Behandlungsgruppen und Kochsalzlösungsgruppe unter Verwendung eines Studenten-t-Tests verglichen. P-Werte sind doppelseitig und wurden als bedeutsam angesehen, wenn sie weniger als oder gleich 0,05 betrugen.

Literaturangaben

[0053] Die folgenden Literaturangeben sind zu dem Grad, mit welchem sie beispielhafte verfahrenstechnische oder andere Einzelheiten, die zu denjenigen hier ergänzend sind, bereitstellen, durch Bezugnahme hier spezifisch eingebracht.

Bartoni und Boitard, „In vitro and in vivo antitumoral activity of free, and encapsulated taxol", J. Microencapsulation, 7:191-197, 1990.
Cortes, J.E. und Pazdur, R., „Docetaxel", Journal of Clinical Oncology, 13:2643-2655, 1995.
Deutsch et al., „Synthesis of congeners and prodrugs. 3. water-soluble prodrugs of taxol with potent antitumor activity", J. Med Chem., 32:788-792, 1989.
Eiseman et al., „Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of paclitaxel in CD2F1 mice", Cancer Chemother. Pharmacol., 34:465-471, 1994.
Fidler, et al., „The biology of Cancer invasion and metastasis", Adv. Cancer Res., 28:149-250, 1987.
Goldspiel, „Taxol pharmaceutical issues: preparation, administration, stability, and compatibility with other medications", Ann. Pharmacotherapy, 28:523-26, 1994.
Greenwald et al., „Highly water soluble Taxol derivatives, 7-polyethylene glycol esters as potential products", J. Org. Chem., 60:331-336, 1995.
Greenwald et al., „Highly water soluble taxol derivative: 2'-polyethylene glycol esters as potential products", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 4:2465-2470, 1994.
Hirano et al., „Polymeric derivatives of activated cyclophosphamide as drug delivery systems in antitumor therapy", Makromol. Chem., 180:1125-1130, 1979.
Hoes et al., „Optimization of macromolecular prodrugs of the antitumor antibiotic adriamycin", J. Controlled Release, 2:205-213, 1985.
Hofle et al., DE38942
Horwitz et al., „Taxol, mechanisms of action and resistance", J. Natl. Cancer Inst. Monographs No. 15, Seite 55-61, 1993.
Kato et al., „Antitumor activity of 1-b-arabinofuranosylcytosine conjugated with polyglutamic acid and its derivative", Cancer Res., 44:25. 1984.
Kopecek, „The potential of water-soluble polymeric carriers in targeted and sitespecific drug delivery", J. Controlled Release, 11:279-290, 1990.
Kopecek und Kopeckova, „Targetable water-soluble polymeric anticancer drugs: achievements and unsolved problems", Proceed. Intern Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 20:190-191, 1993.
Maeda und Matsumura, „Tumoritropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs", Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems, 6:193-210, 1989.
Magri und Kingston, „Modified taxols. 2. Oxidation products of taxol," J. Org. Chem., 51:797-802, 1986.
Mathew et al., „Synthesis and evaluation of some water-soluble prodrugs and derivatives of taxol with antitumor activity," J. Med. Chem., 35:145-151, 1992.
Mosmann, T., „Rapid colormetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay", J. Immunol. Methods, 65:55-63, 1983.
Oliver, S.J. et al., „Suppression of collagen-induced arthritis using an angiogenesis inhibitor, AGM-1470, and a microtubule stabilizer, Taxol", Cellular Immunology, 157:291-299, 1994.
Phillips-Hughes und Kandarpa, „Restenosis: pathophysiology and preventive strategies", JVIR, 7:321-333, 1996.
Reynolds, T., „Polymers help guide cancer drugs to tumor targets- and keep them there", J. Natl. Cancer Institute, 87:1582-1584, 1995.

Scudiero et al. „Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines", Cancer Research, 48:4827-4833, 1988.
Serruys er al., „A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease", N. Engl. J. Med., 331:489-495, 1994.
Sharma und Straubinger, „Novel taxol formulations: Preparation and Characterization of taxol-containing liposomes", Pharm. Res., 11:889-896, 1994.
US Patent 5,583,153
van Heeswijk et al., „The synthesis and characterization of polypeptideadriamycin conjugate and its complexes with adriamycin. Part 1", J. Controlled Release, 1:301-315, 1985.
Weiss et al., „Hypersensitivity reactions from Taxol", J Clin. Oncol., 8:1263-1268, 1990.
WO 96/25176
Zhao, Z. und Kingston, D.G.I., „Modified taxols. 6. Preparation of water-soluble taxol phosphates", J Nat. Prod., 54:1607-1611, 1991.

Patentansprüche

1. Zusammensetzung, umfassend ein an ein wasserlösliches Polymer konjugiertes Antitumor-Arzneimittel, wobei das Antitumor-Arzneimittel Paclitaxel, Docetaxel, Etopsid, Teniposid, Camptothecin oder Epothilon ist, und wobei das wasserlösliche Polymer Poly(1-glutaminsäure), Poly(d-glutaminsäure), Poly(d1-glutaminsäure), Poly(d-aspartamsäure), Poly(1-aspartamsäure), Poly(d1-aspartamsäure), Polyacrylsäure, Poly(2-Hydroxyethyl-1-glutamin), Carboxamethyldextran, Hyaluronsäure, Humanserumalbumuin, Alginsäure oder eine Kombination davon ist.

2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das Antitumor-Arzneimittel ausgewählt ist aus Paclitaxel, Docetaxel und Camptothecin.

3. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei ein Polyaminopolymer des Weiteren als Copolymer mit Polycaprolacton, Polyglycolsäure, Polymilchsäure, Poly(2-hydroxyethyl-1-glutamin), Carboxymethyldextran, Hyaluronsäure, Humanserumalbumin oder Polyalginsäure oder eine Kombination davon definiert ist.

4. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Polymer ein Molekulargewicht von 5.000 bis 100.000, vorzugsweise von 20.000 bis 80.000 aufweist.

5. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das wasserlösliche Polymer an das 2'- oder den 7-Hydroxyl von Paclitaxel oder Docetaxel konjugiert ist.

6. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Zusammensetzung 2 bis 35% (G/G) Paclitaxel umfasst.

7. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das wasserlösliche Polymer Poly(1-glutaminsäure), Poly(d-glutaminsäure), Poly(d1-glutaminsäure), Poly(d-aspartamsäure), Poly(1-aspartamsäure) oder Poly(d1-aspartamsäure) ist.

8. Verwendung der Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs, einer systemischen Autoimmunerkrankung oder Arterienrestenose oder Arterienverschluss nach Gefäßtrauma.

9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei es sich bei dem Krebs um Brustkrebs, Eierstockkrebs, malignes Melanom, Lungenkrebs, Magenkrebs, Prostatakrebs, Darmkrebs, Kopf- und Halskrebs, Leukämie, fibröses Sarkom oder Weichgewebesarkomtumor handelt.

10. Implantierbare medizinische Vorrichtung, insbesondere ein Stent, der mit einer Zusammensetzung, umfassend an ein wasserlösliches Polymer konjugiertes Paclitaxel wie in Anspruch 1 definiert in einer Menge, die zum Hemmen der Muskelzellwucherung wirksam ist.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

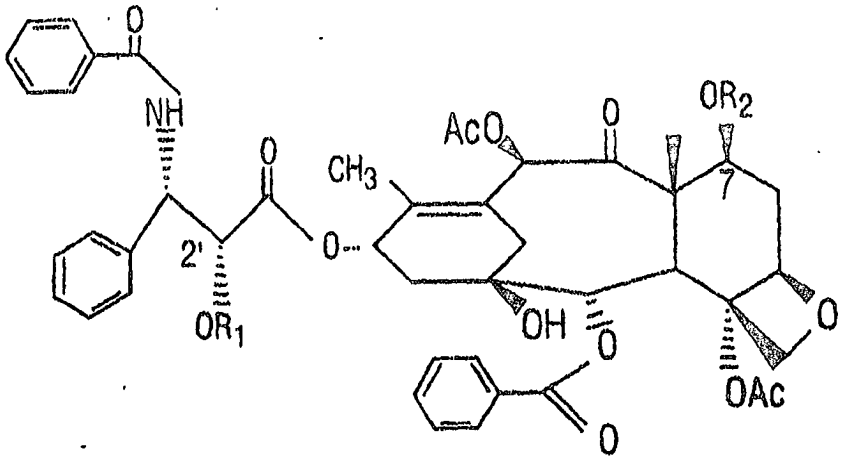

FIG. 1A

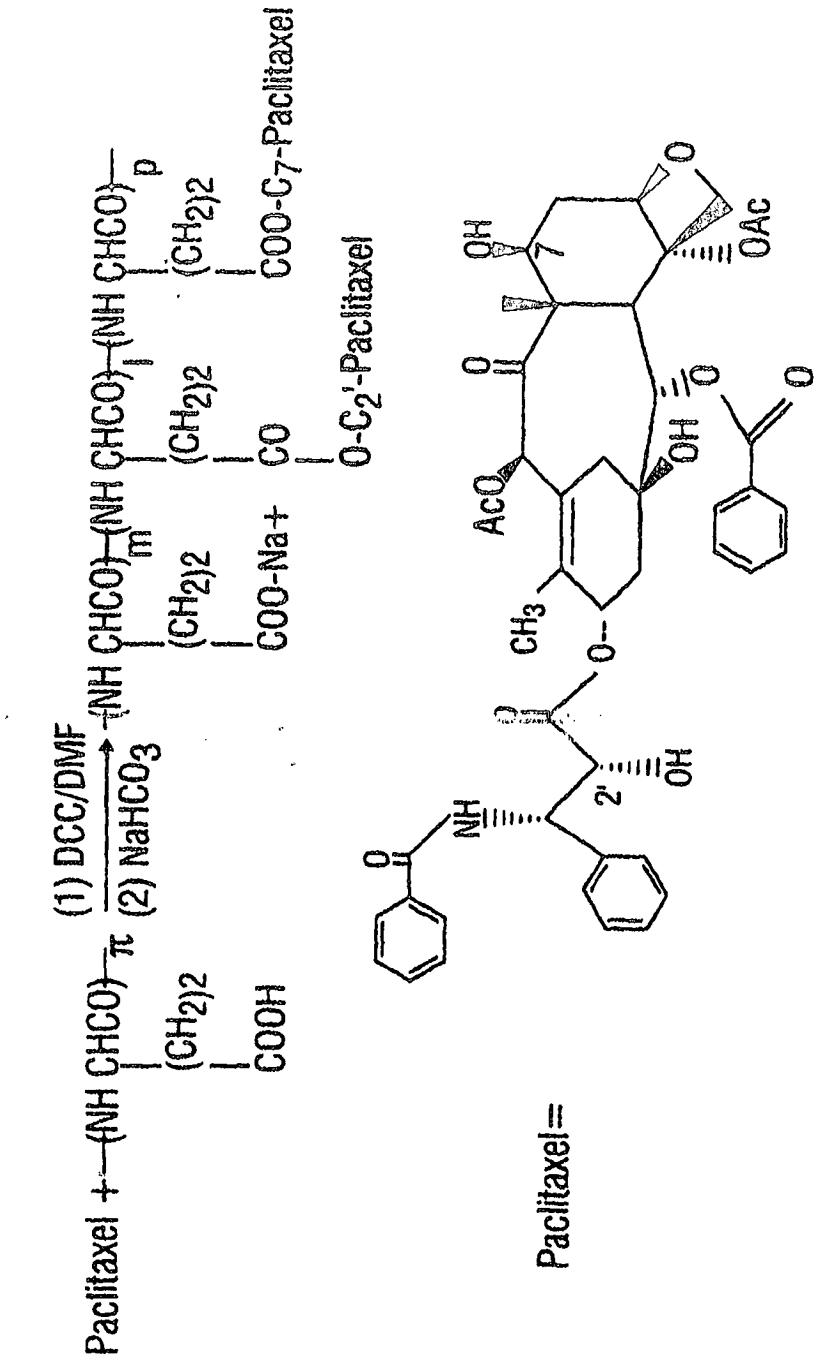
Paclitaxel + (NH CHCO)π
(CH2)2
COOH
(1) DCC/DMF
(2) NaHCO3
(NH CHCO)m (NH CHCO)l (NH CHCO)p
(CH2)2
COO-Na+
(CH2)2
CO
O-C2'-Paclitaxel
(CH2)2
COO-C7-Paclitaxel
Paclitaxel =
NH
2'
OH
O
CH3
AcO
OH
OH
7
OAc

FIG. 1B

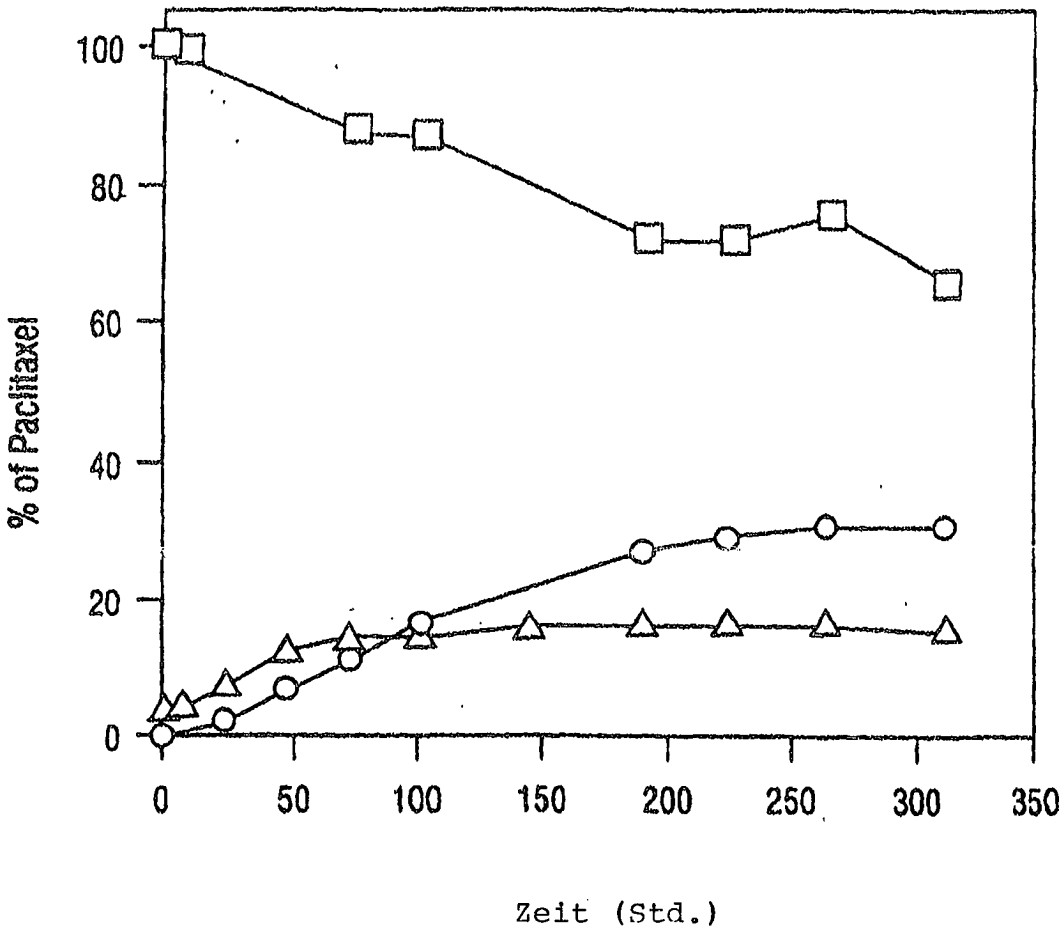
100
80
60
40
20
0
% of Paclitaxel
0
50
100
150
200
250
300
350
Zeit (Std.)

FIG.2

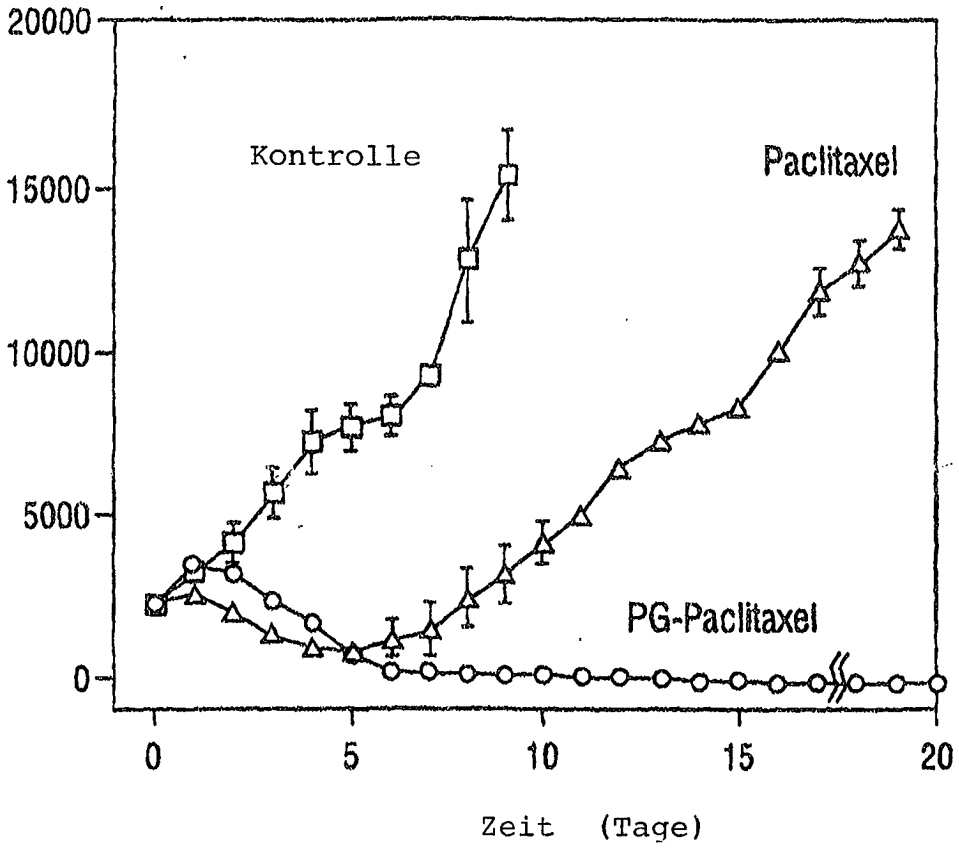
20000
15000
10000
5000
0
Kontrolle
Paclitaxel
PG-Paclitaxel
0
5
10
15
20
Zeit (Tage)

FIG.3A

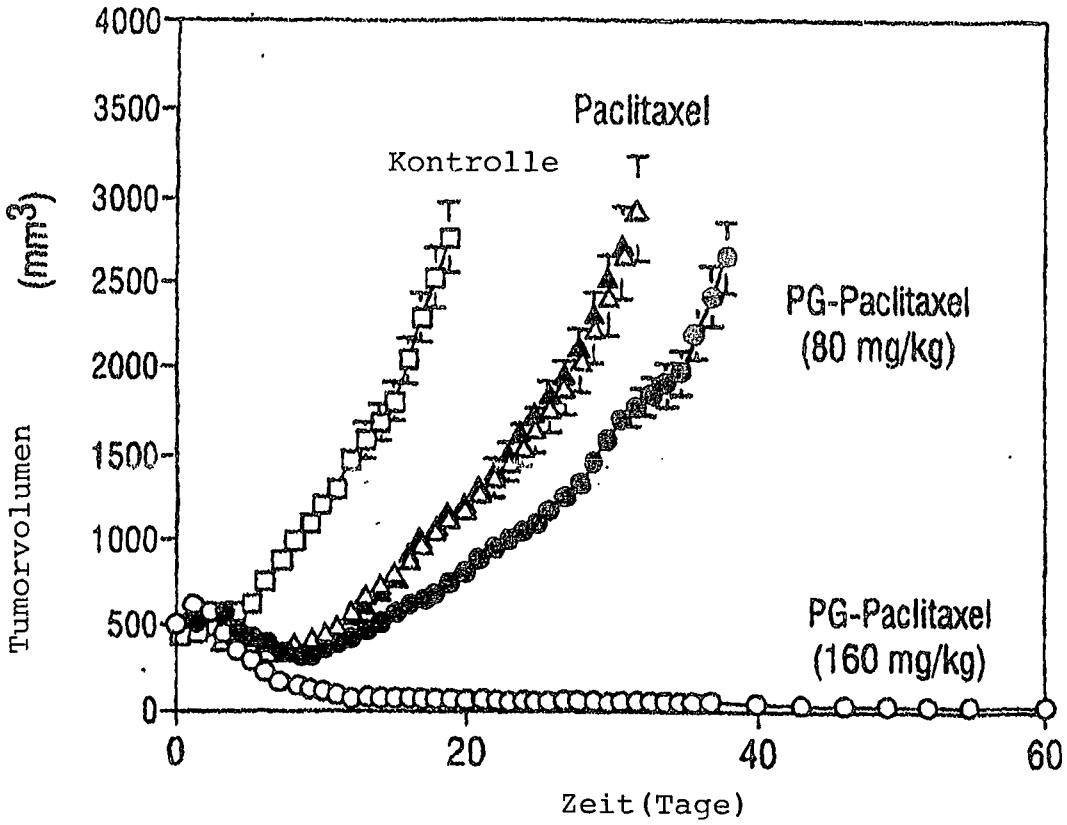
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Tumorvolumen (mm3)
Paclitaxel
Kontrolle
PG-Paclitaxel
(80 mg/kg)
PG-Paclitaxel
(160 mg/kg)
0
20
40
60
Zeit(Tage)

FIG.3B

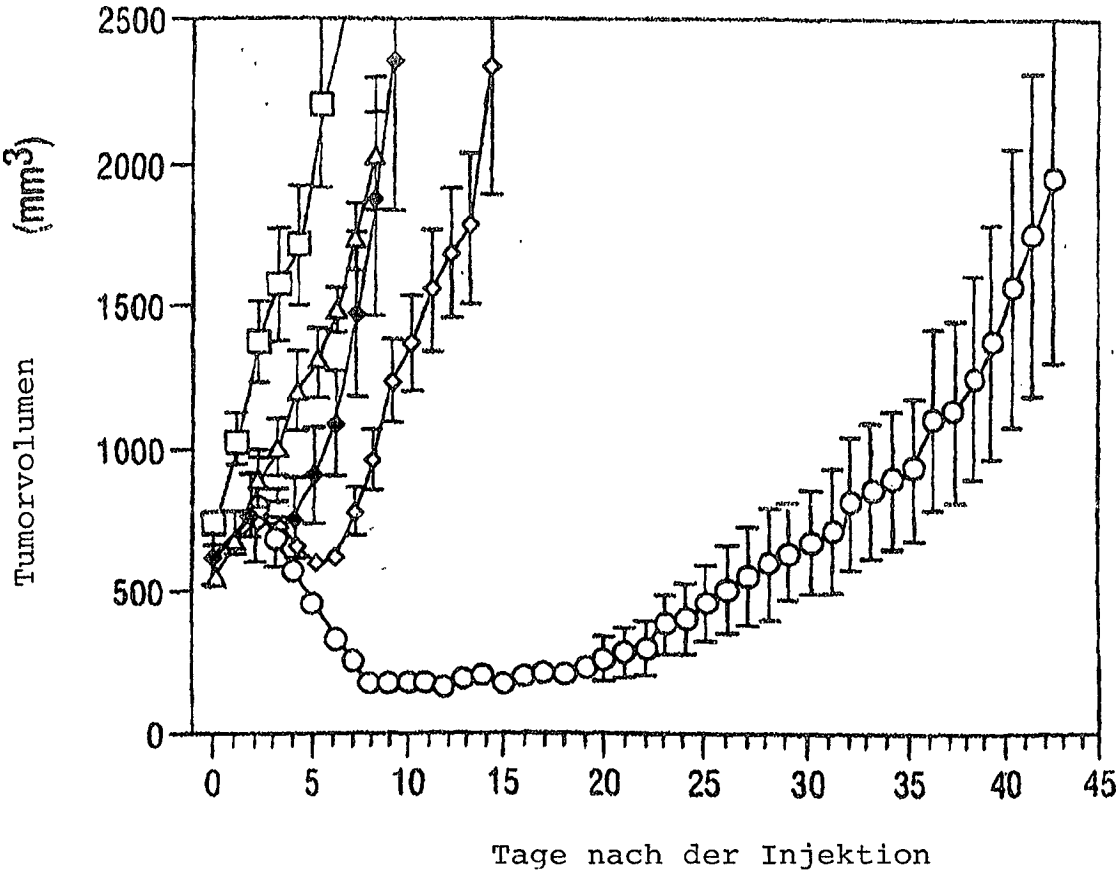
2500
2000
1500
1000
500
0
Tumorvolumen (mm3)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Tage nach der Injektion

FIG.3C

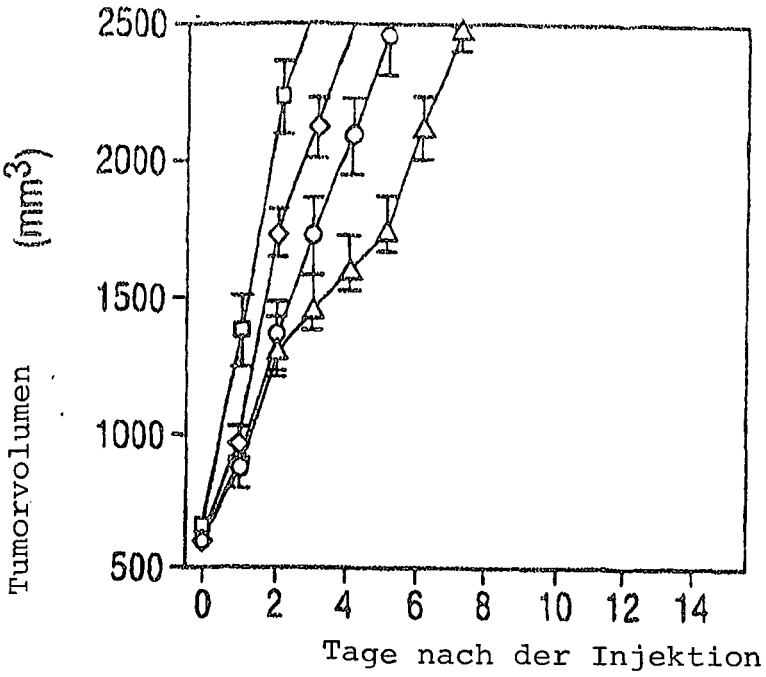
2500
2000
1500
1000
500
Tumorvolumen (mm3)
0 2 4 6 8 10 12 14
Tage nach der Injektion

FIG.3D

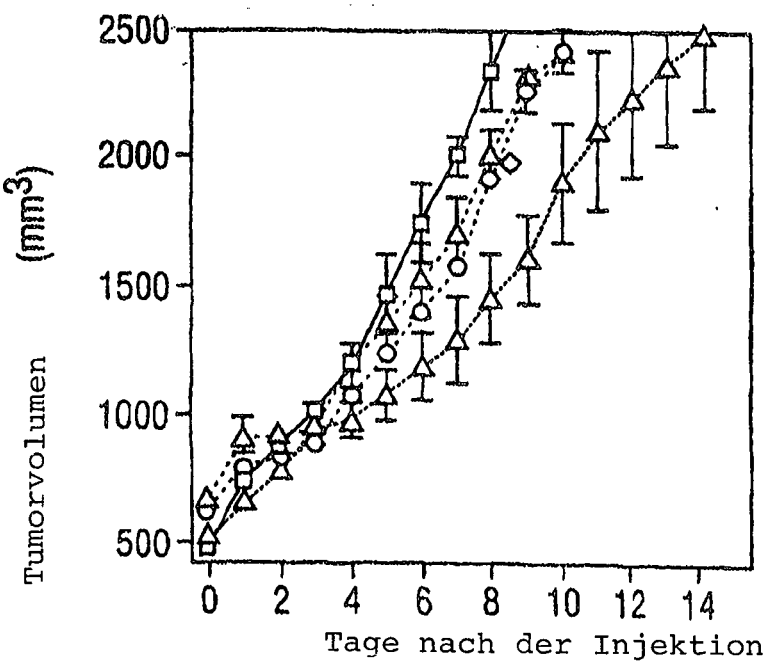
2500
2000
1500
1000
500
Tumorvolumen (mm3)
0 2 4 6 8 10 12 14
Tage nach der Injektion

FIG.3E