



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 602 23 499 T2 2008.10.16

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 362 053 B1

(51) Int Cl.⁸: C07D 491/22 (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: 602 23 499.9

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US02/04781

(96) Europäisches Aktenzeichen: 02 721 033.5

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2002/065988

(86) PCT-Anmeldetag: 19.02.2002

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 29.08.2002

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 19.11.2003

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 14.11.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 16.10.2008

(30) Unionspriorität:

270009 P 20.02.2001 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR

(73) Patentinhaber:

Enzon, Inc., Piscataway, N.J., US

(72) Erfinder:

CHOE, Yun Hwang, Green Brook, NJ 08812, US;
GREENWALD, Richard B., Somerset, NJ 08873, US

(74) Vertreter:

Patent- und Rechtsanwälte Bardehle, Pagenberg,
Dost, Altenburg, Geissler, 81679 München

(54) Bezeichnung: TERMINAL VERZWEIGTE, POLYMERE LINKER UND DIESE ENTHALTENDE POLYMERE KONJUGATE

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 eingelebt, 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**FACHGEBIET**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft neue Typen von terminal aktivierten polymeren Materialien, die beim Bilden von langwirkenden Konjugaten von bioaktiven Materialien nützlich sind. Insbesondere betrifft die Erfindung Konjugate auf Polymerbasis mit erhöhten therapeutischen Nutzladungen und Verfahren zu deren Herstellung.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Im Laufe der Jahre sind etliche Verfahren zum Verabreichen von biologisch wirksamen Materialien an Säuger vorgeschlagen worden. Viele Medikamente sind als wasserlösliche Salze verfügbar und können relativ leicht in pharmazeutische Formulierungen eingeschlossen werden. Probleme treten auf, wenn das gewünschte Medikament entweder in wässrigen Fluida unlöslich ist oder in vivo rasch abgebaut wird. Alkaloide sind häufig besonders schwierig anzulösen.

[0003] Bei einem Weg zum Anlösen von Medikamenten handelt es sich darum, sie als Teil einer löslichen Prodrug einzuschließen. Prodrugs schließen chemische Derivate einer biologisch aktiven Ausgangsverbindung ein, die bei Verabreichung die Ausgangsverbindung in vivo letztendlich freisetzen. Prodrugs ermöglichen es dem Fachmann, den Einsatz und/oder die Dauer der Wirkung eines Mittels in vivo zu modifizieren, und können den Transport, die Verteilung oder Löslichkeit eines Wirkstoffs im Körper modifizieren. Weiterhin reduzieren Prodrug-Formulierungen häufig die Toxizität und/oder überwinden ansonsten Schwierigkeiten, auf welche man beim Verabreichen von pharmazeutischen Präparaten stößt. Typische Beispiele für Prodrugs schließen organische Phosphate oder Ester von Alkoholen oder Thioalkoholen ein. Siehe Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. Aufl., A. Osol, Hrbg. (1980), wobei die Offenbarung davon hier unter Bezugnahme eingebracht ist.

[0004] Prodrugs sind häufig biologisch inerte oder im Wesentlichen inaktive Formen der Ausgangs- oder Wirkverbindung. Die Freisetzungsgeschwindigkeit des Arzneiwirkstoffs, d. h. die Hydrolysegeschwindigkeit wird durch etliche Faktoren, jedoch insbesondere durch den Bindungstyp, der den Ausgangswirkstoff mit dem Modifikationsmittel verbindet, beeinflusst. Es ist darauf zu achten, dass die Herstellung von Prodrugs vermieden wird, die durch die Niere oder das retikuläre Endothelialsystem usw. beseitigt wird, bevor ein ausreichender Hydrolysebetrag der Ausgangsverbindung erfolgt ist.

[0005] Das Einbringen eines Polymers als Teil eines Prodrug-Systems wurde zum Erhöhen der Zirkulationslebensdauer eines Wirkstoffs vorgeschlagen. Allerdings wurde bestimmt, dass, wenn nur ein oder zwei Polymere mit weniger als ungefähr 10.000 Dalton jeweils an bestimmte biologisch aktive Substanzen wie Alkaloidverbindungen konjugiert werden, die resultierenden Konjugate, insbesondere dann, wenn eine einigermaßen hydrolyseresistente Bindung verwendet wird, in vivo rasch beseitigt werden. Tatsächlich werden derartige Konjugate so rasch aus dem Körper beseitigt, dass selbst dann, wenn eine hydrolyseanfällige Esterbindung verwendet wird, in vivo nicht genügend des ursprünglichen Moleküls gebildet wird, um therapeutisch zu sein.

[0006] Camptothecin und verwandte biologisch aktive Analoga sind häufig schlecht wasserlöslich und Beispiele für Substanzen, die aus der PEG-Prodrub Technologie Nutzen ziehen würden. Ein kurzer Überblick für einige frühere Arbeiten auf dem Gebiet ist nachstehend bereitgestellt.

[0007] Ohya, et al., J. Bioactive and Compatible Polymers Bd. 10 Jan., 1995, 51–66 offenbaren Doxorubicin-PEG-Konjugate, die durch Verbinden der beiden Substituenten über verschiedene Ester einschließende Bindungen hergestellt werden. Das Molekulargewicht des verwendeten PEGs beträgt allerdings bestenfalls nur ungefähr 5.000. Folglich werden die Nutzen in vivo nicht vollständig verwirklicht, da die Konjugate vor einer ausreichenden Bindungshydrolyse weitgehend ausgeschieden werden.

[0008] US-Patent Nr. 4,943,579 offenbart bestimmte einfache 20(S)-Camptothecin-Aminosäureester in ihren Salzformen als wasserlösliche Prodrugs. Der Quelltext offenbart allerdings nicht die Verwendung einer Aminosäure als Teil einer Bindung, die das Alkaloid zum Bilden einer Prodrug an ein Polymer mit relativ hohem Molekulargewicht anlagern würde. Wie aus den in Tabelle 2 des '579-Patents bereitgestellten Daten ersichtlich, erfolgt eine rasche Hydrolyse. Demzufolge wird die unlösliche Base nach einer Injektion bei physiologischem pH-Wert rasch gebildet, bindet sich an Proteine und wird aus dem Körper schnell beseitigt, bevor eine therapeutische Wirkung erzielt werden kann. Ein dahingehender Versuch richtete sich auf die Entwicklung eines wasserlöslichen Camptothecin-Natriumsalzes. Unglücklicherweise blieb das wasserlösliche Natriumsalz von

Camptothecin für eine klinische Anwendung zu toxisch (Gottlieb et al., 1970 Cancer Chemother. Rep. 54, 461; Moertel et al., 1972 ebd., 56, 95; Gottlieb et al., 1972 ebd., 56, 103).

[0009] Die gemeinsam erteilte PCT-Veröffentlichung WO 96/23794 beschreibt Biskonjugate, in welchen ein Äquivalent des Hydroxyl enthaltenden Wirkstoffs an jede Endgruppe des Polymers angelagert wird. Trotz dieser Vorleistung sind Techniken gefragt, die die Nutzladung des Polymers, welches angestrebgt wurde, weiter erhöhen würden.

[0010] US-A-6 011 042 offenbart polymere Prodrugs von aromatischen Hydroxyl enthaltenden Verbindungen mit einer Esterbindung zwischen der aromatischen Verbindung und dem Polymer. Beispiele für aromatische Hydroxyl enthaltende Verbindungen sind Wirkstoffe wie Hydroxycamptothecine, Etoposid, Tetracycline usw.

[0011] US-A 5 965 566 offenbart Prodrub Zusammensetzungen, die hydrolysierbare Bindungen, vorzugsweise Esterbindungen zwischen einem Polymeranteil und einer biologisch aktiven Einheit oder eines Wirkstoffs, wie Paclitaxel, Taxotter, Camptothecin und Podophyllotoxin, enthalten.

[0012] WO 98/07713 offenbart wasserlösliche Prodrugs mit einer biologisch aktiven Einheit, die durch eine hydrolysierbare Bindung an ein wasserlösliches Polymer angelagert ist.

[0013] WO 93/24476 offenbart ein Taxol-Derivat, wobei Taxol an einen wasserlöslichen polymeren Träger kovalent gebunden ist. Der Träger kann verzweigtes oder unverzweigtes oder mehrarmiges Sternen-Polyethylenglycol (PEG) sein.

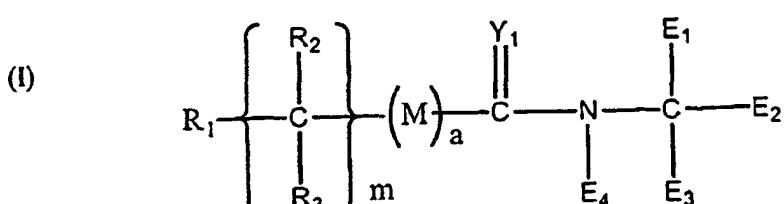
[0014] US-A-6 135 655 offenbart polymere Konjugate eines wasserlöslichen Polymers und einer Wirkstoffverbindung, die durch terminal verzweigte polymere Linker aneinander gebunden sind. Die Verzweigung liegt am Stickstoffatom in der Linker-Einheit vor, wodurch die Möglichkeit gewährleistet wird, zwei Wirkstoffmoleküle an eine Polymer-Einheit zu binden.

[0015] US-A-5 606 047 offenbart chemisch definierte nicht-polymere Valenzplattformmoleküle und diese umfassende Konjugate mit biologischen oder chemischen Molekülen, die Polynukleotid-Duplexe einschließen.

[0016] Folglich besteht ein anhaltender Bedarf nach der Bereitstellung von zusätzlichen Technologien zum Bilden von Prodrugs von therapeutischen Einheiten wie Camptothecin und verwandten Analoga. Die vorliegende Erfindung geht diesen Bedarf an.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0017] In einem Aspekt der Erfindung sind Verbindungen der Formel (I) bereitgestellt:



worin:

R₁ ein polymerer Rest ist;

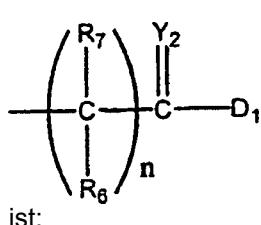
Y₁ O, S oder NR₄ ist;

M O, S oder NR₅ ist;

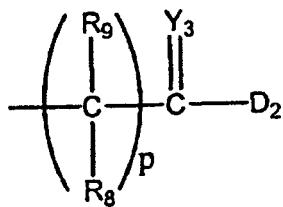
(m) Null oder eine ganze positive Zahl, vorzugsweise 1 oder 2 ist;

(a) Null oder Eins ist;

E₁



E_{2-4} unabhängig voneinander H, E₁ oder

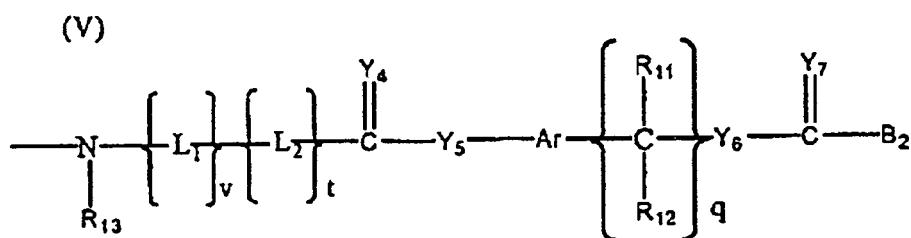
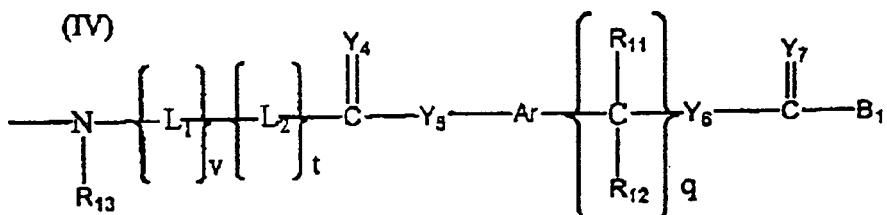


sind;

(n) und (p) unabhängig voneinander 0 oder eine ganze positive Zahl sind;

Y₂₋₃ unabhängig voneinander O, S oder NR₁₀ sind;

R₂₋₁₀ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus Wasserstoff, C₁₋₆-Alkyl, verzweigtem C₃₋₁₂-Alkyl, C₃₋₈-Cycloalkyl, substituiertem C₁₋₆-Alkyl, substituiertem C₃₋₈-Cycloalkyl, Aryl, substituiertem Aryl, Aralkyl, C₁₋₆-Heteroalkyl, substituiertem C₁₋₆-Heteroalkyl, C₁₋₆-Alkoxy, Phenoxy und C₁₋₆-Heteroalkoxy; D₁ und D₂ unabhängig voneinander OH,



oder eine zusätzliche nachstehend beschriebene terminal verzweigte Gruppe sind.

[0018] In den Formeln (IV) und (V) sind die Variablen (v) und (t) unabhängig voneinander 0 oder eine ganze positive Zahl von bis zu ungefähr 6 und vorzugsweise ungefähr 1;

ist (q) Null oder eine ganze positive Zahl, vorzugsweise Eins;

sind L₁ und L₂ unabhängig voneinander ausgewählte bifunktionale Linker;

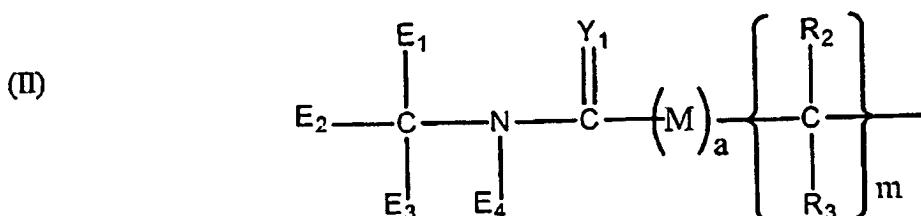
sind Y₄₋₇ unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus O, S und NR₁₄;

sind R₁₁₋₁₄ unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Wasserstoff, C₁₋₆-Alkyl, verzweigtem C₃₋₁₂-Alkyl, C₃₋₈-Cycloalkyl, substituiertem C₁₋₆-Alkyl, substituiertem C₃₋₈-Cycloalkyl, Aryl, substituiertem Aryl, Aralkyl, C₁₋₆-Heteroalkyl, substituiertem C₁₋₆-Heteroalkyl, C₁₋₆-Alkoxy, Phenoxy und C₁₋₆-Heteroalkoxy;

ist Ar eine Einheit, die, wenn in Formel (I) enthalten, einen mehrfach substituierten aromatischen Kohlenwasserstoff oder eine mehrfach substituierte heterocyclische Gruppe bildet; und

sind B₁ und B₂ unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Abgangsgruppen, OH, Resten von Hydroxyl enthaltenden Einheiten oder Amin enthaltenden Einheiten.

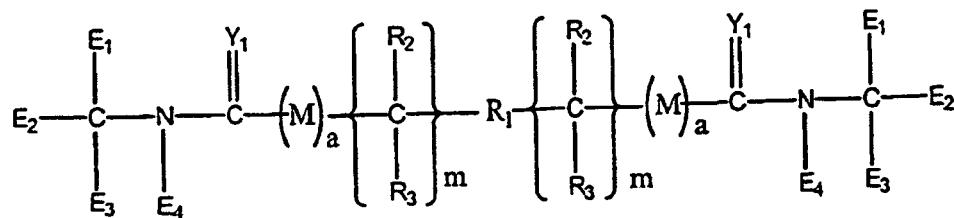
[0019] In einem besonders bevorzugten Aspekt der Erfindung ist der polymere Rest auch am entfernten Anteil mit einer Einheit der nachstehenden Formel (II) substituiert oder weist dort eine ebensolche Endgruppe auf:



worin sämtliche Variablen wie vorstehend definiert sind. Folglich werden bifunktionale Verbindungen gebildet, falls der polymere Rest (R₁) sowohl eine alpha- als auch eine Omega-terminale Verbindungsgruppe einschließt, sodass zwei, vier oder mehr Aquivalente eines biologisch aktiven Mittels, Wirkstoffs oder Proteins,

hier bezeichnet als B_1 oder B_2 , abgegeben werden können. Ein Beispiel für eine derartige bifunktionale Polymertransportform ist nachstehend als Formel (III) veranschaulicht:

(III)



worin sämtliche Variablen wie vorstehend beschrieben sind.

[0020] Zum Zwecke der vorliegenden Erfindung soll der Begriff „Rest“ so zu verstehen sein, dass er einen Anteil einer biologisch aktiven Verbindung bedeutet, der zurückbleibt, nachdem die biologisch aktive Verbindung eine Substitutionsreaktion durchgemacht hat, in welcher der Prodrug-Trägeranteil angelagert worden ist.

[0021] Zum Zwecke der vorliegenden Erfindung soll der Begriff „Alkyl“ so zu verstehen sein, dass er geradkettige, verzweigte, substituierte, z. B. Halogen-, Alkoxy- und Nitro-, C_{1-12} -Alkyl, C_{3-8} -Cycloalkyl oder substituierte Cycloalkyle usw. einschließt.

[0022] Zum Zwecke der vorliegenden Erfindung soll der Begriff „substituiert“ so zu verstehen sein, dass er das Addieren oder Ersetzen von einem oder mehreren in einer funktionellen Gruppe oder Verbindung enthaltenen Atomen mit einem oder mehreren anderen Atomen einschließt.

[0023] Zum Zwecke der vorliegenden Erfindung schließen substituierte Alkyle Carboxyalkyle, Aminoalkyle, Dialkylaminos, Hydroxyalkyle und Mercaptoalkyle ein; schließen substituierte Cycloalkyle Einheiten wie 4-Chlorcyclohexyl ein; schließen Aryle Einheiten wie Napthyl ein; schließen substituierte Aryle Einheiten wie 3-Bromphenyl ein; schließen Aralkyle Einheiten wie Toluyl ein; schließen Heteroalkyle Einheiten wie Ethylthiophen ein; schließen substituierte Heteroalkyle Einheiten wie 3-Methoxythiophen ein; schließt Alkoxy Einheiten wie Methoxy ein; und schließt Phenoxy Einheiten wie 3-Nitrophenoxy ein. Halogen- soll so zu verstehen sein, dass es Fluor, Chlor, Iod und Brom einschließt.

[0024] Der Begriff „ausreichende Mengen“ zum Zwecke der vorliegenden Erfindung soll eine Menge bedeuten, die eine therapeutische Wirkung erzielt, wobei eine derartige Wirkung dem Durchschnittsfachmann bekannt ist.

[0025] Einer der Hauptvorteile der Verbindungen der vorliegenden Erfindung liegt darin, dass die Prodrugs eine höhere Nutzladung pro Polymereinheit als bei früheren Techniken aufweisen. Es ist allgemein bevorzugt, dass das Polymer zuerst die Prodrug-Zwischenverbindung auf der Basis einer Benzyleliminierung (BE) durch Hydrolyse freisetzt und dann die resultierende Zwischenverbindungs- oder „zweite Prodrug“-Einheit eine 1,4- oder 1,6-Aryl-(z. B. Benzyl-)Eliminierungsreaktion durchmacht, um z. B. erneut eine Einheit zu bilden, bei welcher es sich entweder um eine biologisch aktive Verbindung oder eine weitere Prodrug umfassende Zusammensetzung handelt. Die Polymerkonjugate mit hoher Nutzladung der vorliegenden Erfindung sind folglich einzigartige Abgabesysteme, die bis zu vier oder eine größere Anzahl an Molekülen eines Wirkstoffs enthalten können.

[0026] Verfahren zur Herstellung und Verwendung der hier beschriebenen Verbindungen und Konjugate sind ebenfalls bereitgestellt.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

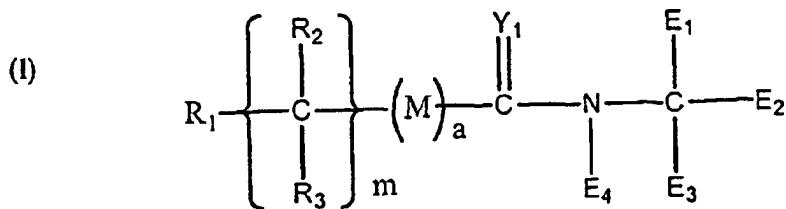
[0027] Die [Fig. 1–Fig. 5](#) veranschaulichen schematisch Verfahren zum Bilden von in den Beispielen beschriebenen Verbindungen der vorliegenden Erfindung.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

A. FORMEL (I)

[0028] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind Verbindungen der folgenden Formel bereit-

gestellt:



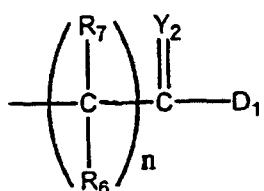
worin:

R_1 ein polymerer Rest ist;

Y_1 O, S oder NR_4 ist;

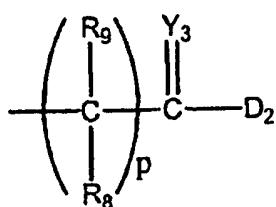
M O, S oder NR_5 ist;

E_1



ist;

E_{2-4} unabhängig voneinander H, E_1 oder



sind;

(a) Null oder Eins ist;

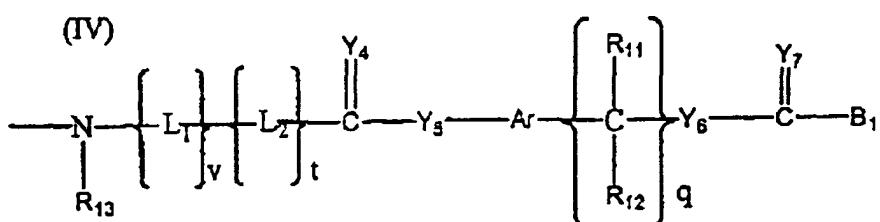
(m) Null oder eine ganze positive Zahl ist;

(n) und (p) unabhängig voneinander 0 oder eine ganze positive Zahl sind;

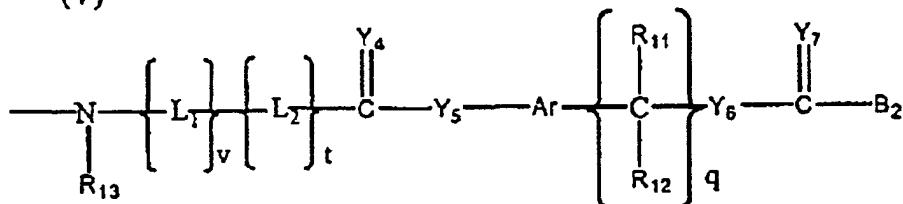
Y_{2-3} unabhängig voneinander O, S oder NR_{10} sind;

R_{2-10} unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus Wasserstoff, C_{1-6} -Alkylen, verzweigten C_{3-12} -Alkylen, C_{3-8} -Cycloalkylen, substituierten C_{1-6} -Alkylen, substituierten C_{3-8} -Cycloalkylen, Arylen, substituierten Arylen, Aralkylen, C_{1-6} -Heteroalkylen, substituierten C_{1-6} -Heteroalkylen, C_{1-6} -Alkoxy, Phenoxy und C_{1-6} -Heteroalkoxy;

D_1 und D_2 unabhängig voneinander OH,



(V)



sind, worin

(v) und (t) unabhängig voneinander 0 oder eine ganze positive Zahl bis zu ungefähr 6 und vorzugsweise un-

gefähr 1 sind;

(q) Null oder eine ganze positive Zahl, vorzugsweise Eins ist;

L_1 und L_2 unabhängig voneinander ausgewählte bifunktionale Linker sind;

Y_{4-7} unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus O, S und NR_{14} ;

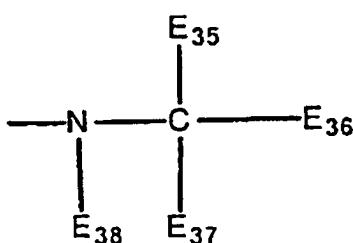
R_{11-14} unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus Wasserstoff, C_{1-6} -Alkyl, verzweigtem C_{3-12} -Alkyl, C_{3-8} -Cycloalkyl, substituiertem C_{1-6} -Alkyl, substituiertem C_{3-8} -Cycloalkyl, Aryl, substituiertem Aryl, Aralkyl, C_{1-6} -Heteroalkyl, substituiertem C_{1-6} -Heteroalkyl, C_{1-6} -Alkoxy, Phenoxy und C_{1-6} -Heteroalkoxy;

Ar eine Einheit ist, die, wenn in Formel (I) enthalten, einen mehrfach substituierten aromatischen Kohlenwasserstoff oder eine mehrfach substituierte heterocyclische Gruppe bildet;

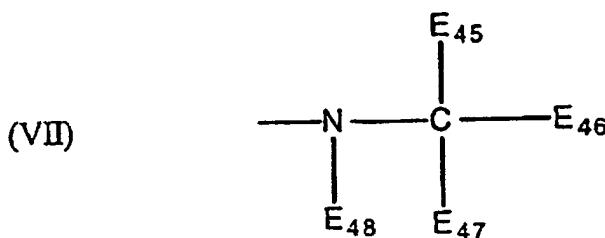
B_1 und B_2 unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus Abgangsgruppen, OH, Resten von Hydroxyl enthaltenden Einheiten oder Amin enthaltenden Einheiten.

[0029] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform sind D_1 und D_2 unabhängig voneinander ausgewählte terminal verzweigten Gruppen der Formel (VI)

(VI)



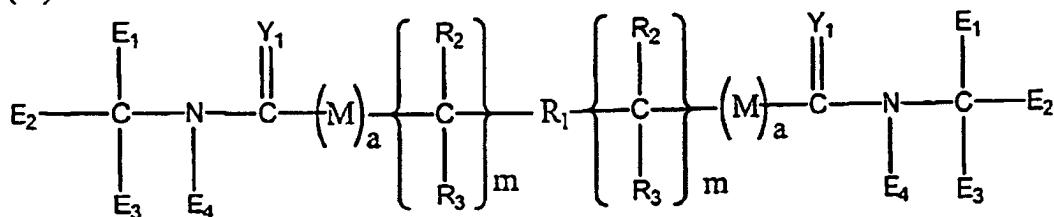
worin E_{35-38} ausgewählt sind aus derselben Gruppe, die vorstehendes E_{1-4} definiert, außer dass in der Definition D_1 und D_2 mit D'_1 und D'_2 , die nachstehend definiert sind, ausgetauscht sind. In dieser Ausführungsform können D'_1 und D'_2 unabhängig voneinander OH, eine Einheit der Formel (IV) oder (V) oder



sein, worin E_{45-48} ausgewählt sind aus derselben Gruppe, die vorstehendes E_{1-4} definiert, außer dass in der Definition D_1 und D_2 mit D''_1 und D''_2 ausgetauscht sind und D''_1 und D''_2 unabhängig voneinander OH, Formel (IV) oder Formel (V) sind. Wie aus Vorstehendem verständlich, können, falls die terminale Verzweigung zu ihrem vollsten Ausmaß mit einem bifunktionalen Polymer R_1 verwendet wird, bis zu sechzehn (16) Äquivalente Wirkstoff auf die polymere Plattform geladen werden.

[0030] In denjenigen Aspekten dieser Ausführungsform, in welchen bissubstituierte polymere Reste erwünscht sind, sind einige bevorzugte polymere Transportsysteme der Erfindung nachstehend als Formel

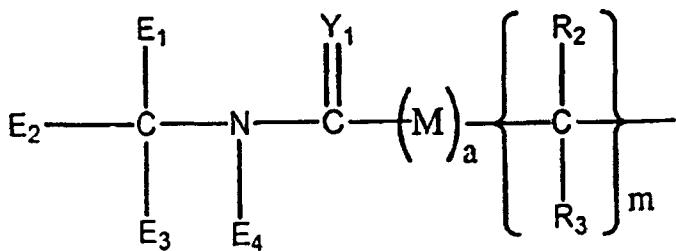
(III):



dargestellt, worin sämtliche Variablen wie vorstehend beschrieben sind.

[0031] Das mehrfach beladene Polymertransportsystem der vorliegenden Erfindung basiert größtenteils auf dem hier als R_1 bezeichneten polymeren Rest. Wahlweise schließt R_1 eine Capping Gruppe A ein. Die Capping Polymergruppe A schließt z. B. Einheiten wie Wasserstoff, CO_2H , C_{1-6} -Alkyleinheiten und Verbindungen der

nachstehend dargestellten Formel (II), die ein Bissystem bildet, ein (II)



worin sämtliche Variablen wie vorstehend beschrieben sind. Es ist klar und verständlich, dass die vorstehend beschriebene mehrfache terminale Verzweigung in diesen Bissystemen ebenfalls gleichermaßen gilt.

[0032] Im Hinblick auf die anderen Variablen, die in den Formeln der vorliegenden Erfindung umfasst sind, sind die Folgenden bevorzugt:

Y_{1-4} und Y_7 sind jeweils Sauerstoff;

R_{2-14} sind vorzugsweise jeweils Wasserstoff oder Niederalkyl, z. B. C_{1-6} ;

(m) ist 1 oder 2;

(n) und (p) sind jeweils entweder Null oder eine ganze Zahl von 1–4;

(v) ist Null oder 1;

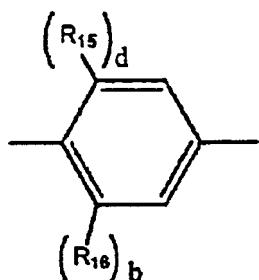
(t) ist 1;

L ist $-(CH_2CH_2O)_2-$; und

L_2 ist eines von $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, $-CH_2C(O)NHCH(CH_3)-$, $-(CH_2)_2-$, $-(CH_2)_2-NH-$, $-CH_2C(O)NHCH_2-$, $-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_2NH-$ oder $-CH_2C(O)NHCH(CH_2CH(CH_3)_2)-$.

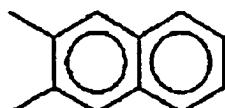
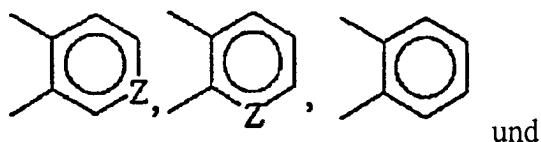
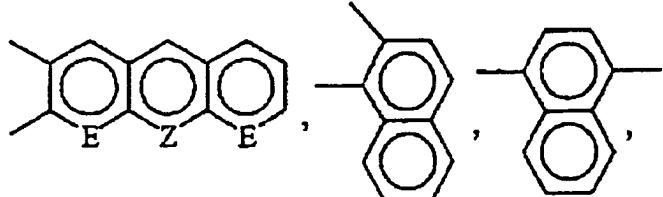
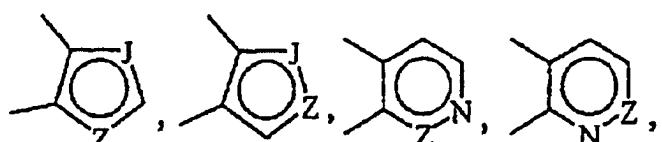
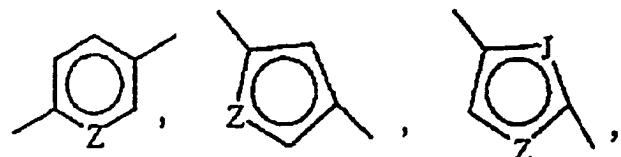
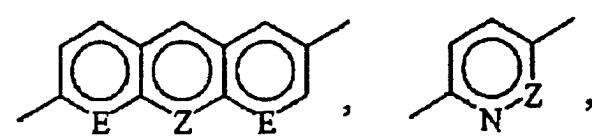
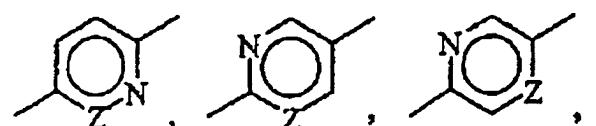
B. BESCHREIBUNG DER Ar-EINHEIT

[0033] In Bezug auf Formel (I) ist ersichtlich, dass das Ar eine Einheit ist, die, wenn in Formel (I) enthalten, einen mehrfach substituierten aromatischen Kohlenwasserstoff oder eine mehrfach substituierte heterocyclische Gruppe bildet. Ein Schlüsselmerkmal ist, dass die Ar-Einheit von aromatischer Natur ist. Um aromatisch zu sein müssen die n-Elektronen im Allgemeinen in einer „Wolke“ sowohl oberhalb als auch unterhalb der Ebene eines cyclischen Moleküls verteilt sein. Weiterhin muss die Anzahl an n-Elektronen die Hückel-Regel ($4n + 2$) erfüllen. Der Durchschnittsfachmann erkennt, dass unzählige Einheiten das aromatische Erfordernis der Einheit erfüllen und folglich zur Verwendung hier geeignet sind. Einige besonders bevorzugte aromatische Gruppen schließen ein:



worin R_{15-16} einzeln ausgewählt sind aus derselben Gruppe, die R_2 definiert, und (b) und (d) unabhängig voneinander ausgewählt sind aus Null oder Eins.

[0034] Andere bevorzugte aromatische Kohlenwasserstoffeinheiten schließen ohne Einschränkung ein:



[0035] In den vorstehend aufgelisteten aromatischen Einheiten ist J O, S oder N-R₁₇, sind E und Z unabhängig voneinander C-R₁₈ oder NR₁₉; und sind R₁₇₋₁₉ unabhängig voneinander ausgewählt aus derselben Gruppe, wie diejenige, die R₂ in Formel (I) definiert, z. B. Wasserstoff, C₁₋₆-Alkylen usw. Isomere der fünf- und sechsgliedrigen Ringe, sowie Benzo- und Dibenzosysteme und deren verwandten Kongenere werden ebenfalls erwogen. Es ist dem Durchschnittsfachmann auch verständlich, dass die aromatischen Ringe wahlweise mit Heteroatomen wie O, S, NR₁₇ usw. substituiert sein können, sofern die Hückel-Regel befolgt wird. Weiterhin können die aromatischen oder heterocyclischen Strukturen wahlweise mit (einem) Halogen(en) und/oder Seitenketten wie denjenigen, die allgemein auf dem Fachgebiet als solche verstanden werden, substituiert sein. Allerdings sind sämtliche Strukturen, die für Ar-Einheiten der vorliegenden Erfindung geeignet sind, in der Lage, es zu ermöglichen, dass sich die Y₅- und C(R₁₁)(R₁₂)-Einheiten in einer para- oder einer ortho-Anordnung in derselben Ebene befinden.

C. ARZNEISTOFFBILDUNG ÜBER HYDROLYSE DER PRODRUG

[0036] Die Prodrug-Verbindungen der vorliegenden Erfindung sind derart aufgebaut, dass $t_{1/2}$ der Hydrolyse < $t_{1/2}$ -Beseitigung im Plasma ist.

[0037] Die in den Verbindungen eingeschlossenen Bindungen weisen Hydrolysegeschwindigkeiten im Plasma des zu behandelnden Säugers auf, die kurz genug sind, zu ermöglichen, dass ausreichende Mengen der Ausgangsverbindungen, d. h. der Amino oder Hydroxyl enthaltenden bioaktiven Verbindung vor der Beseitigung freigesetzt werden. Einige bevorzugte Verbindungen der vorliegenden Erfindung weisen eine $t_{1/2}$ für die Hydrolyse in Plasma im Bereich von ungefähr 5 Minuten bis ungefähr 12 Stunden auf. Vorzugsweise weisen die Zusammensetzungen eine Plasma- $t_{1/2}$ -hydrolyse im Bereich von ungefähr 0,5 bis ungefähr 8 Stunden und am meisten bevorzugt von ungefähr 1 bis ungefähr 6 Stunden auf.

D. IM WESENTLICHEN NICHT-ANTIGENE POLYMERE

[0038] Wie vorstehend angegeben ist R₁ ein wasserlöslicher polymerer Rest, der vorzugsweise im Wesentlichen nicht-antigen ist, wie Polyalkylenoxid (PAO) oder Polyethylenglycol (PEG). In bevorzugten Aspekten der Erfindung schließt R₁ ferner die vorstehend erwähnte als A bezeichnete Capping Gruppe ein, die die Bildung eines bifunktionalen oder Bispolymersystems ermöglicht.

[0039] Als ein Beispiel kann der PEG-Rest-Anteil der erfinderischen Zusammensetzungen ausgewählt sein aus der folgenden nicht-beschränkenden Liste:

- C(=Y₈)-(CH₂)_fO-(CH₂CHO)_x-A,
- C(=Y₈)-Y₉-(CH₂)_fO-(CH₂CH₂O)_x-A,
- (CR₂₁R₂₂)_e-O-(CH₂)_fO-(CH₂CH₂O)_x-A,
- C(=Y₈)-(CH₂)_fO-(CH₂CH₂O)_x-(CH₂)_f-C(=Y₈)-,
- C(=Y₈)-NR₂₀-(CH₂)_fO-(CH₂CH₂O)_x-(CH₂)_f-NR₂₀-C(=Y₈)-,
- (CR₂₁R₂₂)_e-O-(CH₂)_fO-(CH₂CH₂O)_x-(CH₂)_f-O-(CR₂₁R₂₂)_e-, und -NR₂₀-(CH₂)_fO-(CH₂CH₂O)_x-(CH₂)_f-NR₂₀ worin Y₈ und Y₉ unabhängig voneinander O, S oder NR₂₀ sind;

x der Polymerisationsgrad ist;

R₂₀, R₂₁ und R₂₂ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus H, C₁₋₆-Alkyl, verzweigtem C₃₋₁₂-Alkyl, C₃₋₈-Cycloalkyl, substituiertem C₁₋₆-Alkyl, substituiertem C₃₋₈-Cycloalkyl, Aryl, substituiertem Aryl, Aralkyl, C₁₋₆-Heteroalkyl, substituiertem C₁₋₆-Heteroalkyl, C₁₋₆-Alkoxy, Phenoxy und C₁₋₆-Heteroalkoxy; e und f unabhängig voneinander Null, Eins oder Zwei sind; und A eine Capping Gruppe ist.

[0040] Der Polymerisationsgrad für das Polymer (x) kann ungefähr 10 bis ungefähr 2.300 betragen. Dies stellt die Anzahl an Wiederholungseinheiten in der Polymerkette dar und hängt vom Molekulargewicht des Polymers ab. Die Einheit (A) ist eine wie hier definierte Capping Gruppe, d. h. eine Gruppe, die am Ende des Polymers zu finden ist, und kann in manchen Aspekten ausgewählt sein aus irgendeinem von H, NH₂, OH, CO₂H, C₁₋₆-Alkenen oder anderen PEG-aktivierenden terminalen Gruppen, wobei derartige Gruppen dem Durchschnittsfachmann klar sind.

[0041] Auch nützlich sind Polypropylenglycole, verzweigte PEG-Derivate wie diejenigen, die im gemeinschaftlich übertragenen US-Patent Nr. 5,643,575 beschrieben sind, „Sternen-PEGs“ und mehrarmige PEGs wie diejenigen, die im Katalog von Shearwater Polymers, Inc. „Polyethylene Glycol Derivatives 1997-1998“ beschrieben sind. Die Offenbarung von jedem des Vorstehenden ist hier unter Bezugnahme eingebracht. Es ist klar, dass das wasserlösliche Polymer, falls nötig, ohne übermäßige Versuchsführung zur Anlagerung an die bifunktionalen Verbindungsgruppen funktionalisiert werden kann.

[0042] In einer weiteren Ausführungsform ist R₁ wahlweise ausgewählt aus einem oder mehreren von Dextran, Polyvinylalkoholen, Polymeren auf Kohlenhydratbasis, Hydroxypropylmethacrylamid, Polyalkylenoxiden und/oder Copolymeren davon. Siehe auch das gemeinschaftlich übertragene US-Patent Nr. 6,153,655, wobei der Inhalt davon hier unter Bezugnahme eingebracht ist.

[0043] In vielen Aspekten der vorliegenden Erfindung sind bisaktivierte Polyethylenglycole bevorzugt, wenn di- oder mehrfach substituierte Polymerkonjugate erwünscht sind. Alternativ dazu sind Polyethylenglycole (PEGs), monoaktivierte, C₁₋₄-Alkylterminierte Polyalkylenoxide (PAOs) wie Mono-Methyl-terminierte Polyethylenglycole (mPEGs) bevorzugt, wenn monosubstituierte Polymere erwünscht sind.

[0044] Zum Bereitstellen der gewünschten hydrolysierbaren Bindung können Mono- oder Disäure-aktivierte Polymere wie PEG-Säuren oder PEG-Disäuren, sowie Mono- oder Di-PEG-Amine und Mono- oder Di-PEG-Diole verwendet werden. Geeignete PAO-Säuren können synthetisiert werden, indem zuerst mPEG-OH zu einem Ethylester umgewandelt und dieser anschließend verseift wird. Siehe auch Gehrhardt, H., et al. Polymer Bulletin 18: 487 (1987) und Veronese, F. M., et al. J. Controlled Release 10; 145 (1989). Alternativ dazu kann die PAO-Säure durch Umwandlung von mPEG-OH in einen t-Butylester, gefolgt von Säureabspaltung, synthe-

tisiert werden. Siehe z. B. das gemeinschaftlich übertragene US-Patent Nr. 5,605,976. Die Offenbarungen von jedem des Vorstehenden sind hier unter Bezugnahme eingebbracht.

[0045] Wenngleich das mittlere Molekulargewicht der PAOs und PEGs erheblich variieren kann, weist der Polymeranteil der Prodrug in den meisten Aspekten der Erfindung ein Gewichtsmittel von mindestens ungefähr 20.000 auf. Vorzugsweise weist R₁ ein gewichtsgemitteltes Molekulargewicht von ungefähr 20.000 bis ungefähr 100.000 und stärker bevorzugt ungefähr 25.000 bis ungefähr 60.000 auf. Das mittlere Molekulargewicht des zum Einschluss in die Prodrug ausgewählten Polymers muss derart ausreichend sein, eine ausreichende Zirkulation der Prodrug vor Hydrolyse des Linkers bereitzustellen.

[0046] Die hier eingeschlossenen polymeren Substanzen sind vorzugsweise bei Raumtemperatur wasserlöslich. Eine nicht beschränkende Liste derartiger Polymere schließt Polyalkylenoxidhomopolymere wie Polyethylenglycol (PEG) oder Polypropylenglycole, polyoxyethylenierete Polyole, Copolymeren davon und Blockcopolymere davon ein, mit der Maßgabe, dass die Wasserlöslichkeit der Blockcopolymere aufrecht erhalten wird.

[0047] Als eine Alternative für Polymere auf PAO-Basis können tatsächlich nicht-antigene Materialien wie Dextran, Polyvinylalkohole, Polymere auf Kohlenhydratbasis, Hydroxypropylmethacrylamid (HPMA) und Copolymeren davon usw. und dergleichen verwendet werden, wenn derselbe Aktivierungstyp, wie derjenige, der hier für PAOs wie PEG beschrieben ist, eingesetzt wird. Der Durchschnittsfachmann erkennt, dass die vorstehende Liste lediglich veranschaulichend ist, und dass sämtliche Polymermaterialien mit den hier beschriebenen Qualitäten erwogen werden. Zum Zwecke der vorliegenden Erfindung sollen „tatsächlich nicht-antigen“ und „im Wesentlichen nicht-antigen“ derart zu verstehen sein, dass sie sämtliche Polymermaterialien einschließen, die auf dem Fachgebiet als im Wesentlichen nicht-toxisch und als keine merkliche Immunantwort in Säugern auslösend verstanden werden.

[0048] Es ist aus dem Vorstehenden klar, dass andere Polyalkylenoxidderivate des Vorstehenden wie Polypropylenglycolsäuren usw. sowie andere bifunktionale Verbindungsgruppen ebenfalls erwogen werden.

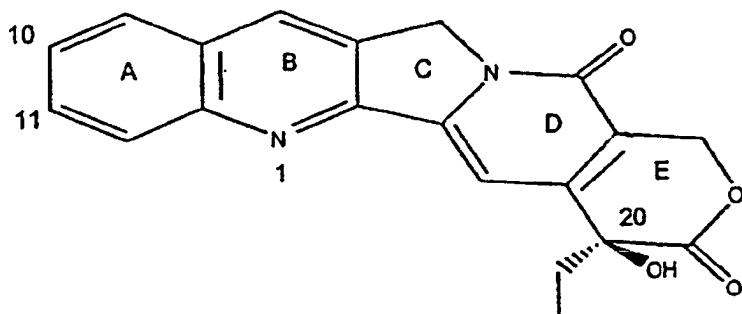
E. PRODRUGKANDIDATEN

1. Reste von Hydroxyl enthaltenden Verbindungen

a. Camptothecin und verwandte Topoisomerase-I-Hemmer

[0049] Camptothecin ist ein wasserunlösliches cytotoxisches Alkaloid, das durch in China heimische Bäume der Gattung Camptotheca accuminata und in Indien heimische Bäume der Gattung *Nothapodytes foetida* produziert wird. Camptothecin und verwandte Verbindungen und Analoga sind auch als potentielle Mittel gegen Krebs und Tumorhemmer bekannt, und es zeigte sich, dass sie diese Aktivitäten in vitro und in vivo aufweisen. Camptothecin und verwandte Verbindungen sind auch Kandidaten für die Umwandlung zu den Prodrugs der vorliegenden Erfindung.

[0050] Camptothecin und bestimmte verwandte Analoga haben die folgende Struktur gemeinsam:



[0051] Aus dieser Kernstruktur wurden bisher etliche bekannte Analoga hergestellt. Zum Beispiel kann der A-Ring in einer der beiden oder beiden der 10- und 11-Positionen mit einem OH substituiert sein. Der A-Ring kann auch in der 9-Position mit einem geradkettigen oder verzweigten C₁₋₃₀-Alkyl oder C₁₋₁₇-Alkoxy, wahlweise gebunden an den Ring durch ein Heteroatom, d. h. O oder S, substituiert sein. Der B-Ring kann in der 7-Position mit einem geradkettigen oder verzweigten C₁₋₃₀-Alkyl oder substituierten Alkyl-C₅₋₈-cycloalkyl-, -C₁₋₃₀-alkoxy, Phenylalkyl usw., Alkylcarbamat, Alkylcarbaziden, Phenylhydrazinderivaten, Amino-, Aminoalkyl-, Aralkyl usw. substituiert sein. Andere Substitutionen sind in den C-, D- und E-Ringen möglich. Siehe z. B. die US-Patente

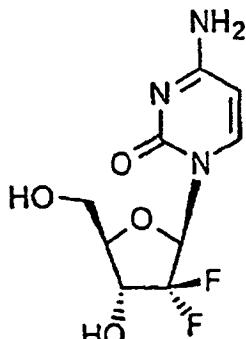
Nr. 5,004,758; 4,943,579; Re 32,518, wobei der Inhalt davon hier unter Bezugnahme eingebracht ist. Derartige Derivate können ohne übermäßige Versuchsführung unter Verwendung von bekannten Synthesetechniken hergestellt werden. Bevorzugte Camptothecinderivate zur Verwendung hier schließen diejenigen ein, die ein 2-OH oder eine andere OH-Einheit, die in der Lage ist, mit aktivierten Formen des hier beschriebenen Polymertransportsystems direkt oder den Zwischenverbindungen der Verbindungseinheit, z. B. Iminodiessigsäure usw., die dann an ein Polymer wie PEG angelagert werden, zu reagieren. Ein Bezug auf Camptothecinanaloga hier wurde zu Veranschaulichungs- und nicht zu Beschränkungszwecken erstellt.

b. Taxane und Paclitaxelderivate

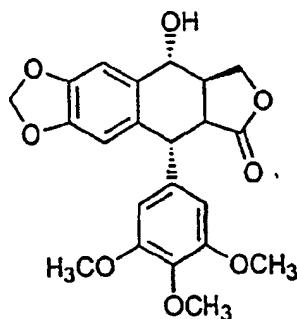
[0052] Bei einer Klasse von in den Prodrug-Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung eingeschlossenen Verbindungen handelt es sich um Taxane. Zum Zwecke der vorliegenden Erfindung schließt der Begriff „Taxan“ sämtliche Verbindungen in der Taxanfamilie von Terpenen ein. So befinden sich Taxol (Paclitaxel), 3'-substituierte tert-Butoxycarbonylamiderivate (Taxotere) und dergleichen sowie andere Analoga, die unter Verwendung von organischen Standardtechniken leicht synthetisiert werden können oder von kommerziellen Quellen wie Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, erhältlich sind, im Umfang der vorliegenden Erfindung. Diese Derivate wurden als wirksame Mittel gegen Krebs befunden. Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass die Mittel Aktivität gegen etliche bösartige Tumore aufweisen. Bis heute ist deren Verwendung u. a. durch deren kurze Zufuhr, schlechte Wasserlöslichkeit und einer Neigung zum Bewirken einer Überempfindlichkeit stark eingeschränkt. Es sollte klar sein, dass andere Taxane, einschließlich 7-Arylcarbamate und 7-Carbazate, die in den gemeinschaftlich übertragenen US-Patenten Nr. 5,622,986 und 5,547,981 offenbart sind, ebenfalls in den Prodrugs der vorliegenden Erfindung eingeschlossen sein können. Der Inhalt der vorstehenden US-Patente ist hier unter Bezugnahme eingebracht. Paclitaxel ist ein bevorzugtes Taxan.

c. Zusätzliche biologisch aktive Einheiten

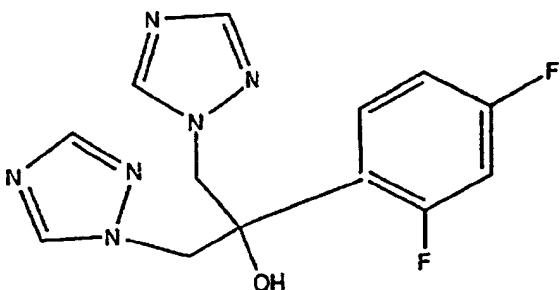
[0053] Zusätzlich zu den vorstehenden Molekülen können die Prodrugformulierungen der vorliegenden Erfindung unter Verwendung von vielen anderen Verbindungen hergestellt werden. Zum Beispiel biologisch aktive Verbindungen wie Bis-PEG-Konjugate, die von Verbindungen wie Gemcitabin:



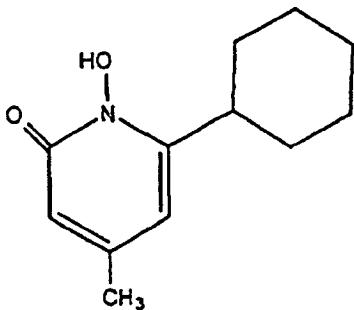
oder Podophyllotoxin:



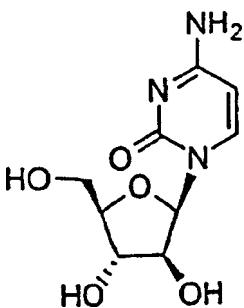
oder Mitteln gegen Pilze auf Triazolbasis wie Fluconazol:



oder Circlopirox:



oder Ara-C:



oder bekannten Derivaten davon, einschließlich N⁴-Aminosäurederivaten wie Leu-Ara-C abgeleitet sind.

[0054] Die für Prodrug-Formen ausgewählten Ausgangsverbindungen müssen nicht im Wesentlichen wasserunlöslich sein, wenngleich die Prodrugs auf Polymerbasis der vorliegenden Erfindung zur Abgabe derartiger wasserunlöslicher Verbindungen besonders gut geeignet sind. Andere nützliche Ausgangsverbindungen schließen z. B. bestimmte biologisch aktive Proteine, Enzyme und Peptide mit niedrigem Molekulargewicht, einschließlich Peptidoglycane sowie andere Tumorhemmer; kardiovaskuläre Mittel wie Forskolin; Antineoplastika wie Combretastatin, Vinblastin, Doxorubicin, Maytansin, usw.; Infekthemmer wie Vancomycin, Erythromycin, usw.; Mittel gegen Pilze wie Nystatin, Amphotericin B, Triazole, Papulocandine, Pneumocandine, Echinocandine, Polyoxine, Nikkomycine, Pradimicine, Benanomicine, usw., siehe „Antibiotics That Inhibit Fungal Cell Wall Development“ Annu. Rev. Microbiol. 1994, 48:471–97, wobei der Inhalt davon hier unter Bezugnahme ein gebracht ist; Mittel gegen Angstzustände, gastrointestinale Mittel, auf das zentrale Nervensystem wirkende Mittel, Analgetika, Fruchtbarkeits- oder empfängnisverhütende Mittel, entzündungshemmende Mittel, Steroide, Antiurecemika, kardiovaskuläre Mittel, Vasodilatoren, Vasokonstriktoren und dergleichen ein.

[0055] Vorstehendes ist für die biologisch aktiven Einheiten veranschaulichend, die für die Prodrugs der vorliegenden Erfindung geeignet sind. Es sollte klar sein, dass diejenigen biologisch aktiven Materialien, die nicht spezifisch erwähnt sind, aber geeignete esterbildende Gruppen, d. h. Hydroxyeinheiten aufweisen, ebenfalls vorgesehen sind und sich im Umfang der vorliegenden Erfindung befinden. Es sollte auch klar sein, dass die Prodrug-Konjugate der vorliegenden Erfindung auch geringe Mengen an Verbindungen einschließen können, die nicht nur ein Äquivalent Wirkstoff und Polymer, sondern auch eine Einheit, die die Bioaktivität in vivo nicht beeinflusst, enthalten. Zum Beispiel wurde gefunden, dass die Reaktionsbedingungen in manchen Fällen trotz einer Reaktion von Disäuren mit Wirkstoffmolekülen mit einem einzigen Bindungspunkt keine quantitativen Prodrugmengen mit zwei Äquivalenten Wirkstoff pro Polymer bereitstellen. Nebenprodukte der Reaktionen wie Acylharnstoffe, wenn Carbodiimide verwendet werden, können manchmal gebildet werden.

2. Reste von Amin enthaltenden Verbindungen

[0056] In manchen Aspekten der Erfindung ist B₁ oder B₂ ein Rest einer Amin enthaltenden Verbindung, wobei eine nicht-beschränkende Liste derartiger geeigneter Verbindungen Reste von organischen Verbindungen, Enzymen, Proteinen, Polypeptiden usw. einschließt. Organische Verbindungen schließen ohne Einschränkung Einheiten wie Anthracyclinverbindungen, einschließlich Daunorubicin, Doxorubicin; p-Aminoanilinsenf, Melphalan, Ara-C(Cytosinarabinosid) und verwandte Antimetabolitverbindungen, z. B. Gemcitabin usw. ein. Alternativ dazu kann B ein Rest eines Amin enthaltenden kardiovaskulären Mittels, Antineoplastikums, Infekthemmern, Mittels gegen Pilze wie Nystatin und Amphotericin B, Mittels gegen Angstzustände, gastrointestinalen Mittels, auf das zentrale Nervensystem wirkenden Mittels, Analgetikums, Fruchtarbeitsmittels, empfängnisverhüttenden Mittels, Entzündungshemmern, Steroids, Antiurecemicums, Vasodilators, Vasokonstriktors usw. sein.

[0057] In einem bevorzugten Aspekt der Erfindung ist die Amino enthaltende Verbindung eine biologisch aktive Verbindung, die zur medizinischen oder diagnostischen Verwendung bei der Behandlung von Tieren, z. B. Säugern, einschließlich Menschen auf Zustände, für welche eine Behandlung erwünscht ist, geeignet ist. Die vorstehende Liste dient nur der Veranschaulichung und nicht der Einschränkung auf die Verbindungen, die modifiziert werden können. Der Durchschnittsfachmann erkennt, dass andere derartige Verbindungen ohne übermäßige Versuchsführung gleichermaßen modifiziert werden können. Es sollte klar sein, dass diejenigen biologisch aktiven Materialien, die nicht spezifisch erwähnt sind, aber geeignete Aminogruppen aufweisen, ebenfalls vorgesehen sind und sich im Umfang der vorliegenden Erfindung befinden.

[0058] Die einzigen Einschränkungen in Bezug auf die Typen von Amino enthaltenden Molekülen, die zum Einschluss hier geeignet sind, liegen darin, dass mindestens eine (primäre oder sekundäre) Amino enthaltende Position verfügbar ist, die mit einem Trägeranteil reagieren und sich daran binden kann, und dass kein erheblicher Verlust an Bioaktivität vorliegt, nachdem das Prodrug-System die Ausgangsverbindung freisetzt und erneut bildet.

[0059] Es ist anzumerken, dass zum Einbringen in die Prodrug-Zusammensetzungen der Erfindung geeignete Ausgangsverbindungen selbst Substanzen/Verbindungen sein können, die nach einer hydrolytischen Freisetzung von der gebundenen Zusammensetzung nicht aktiv sind, sondern aktiv werden, nachdem sie einen weiteren chemischen Prozess/eine weitere chemische Reaktion durchgemacht haben. Zum Beispiel kann ein Wirkstoff gegen Krebs, der durch das Doppel-Prodrug-Transportsystem in den Blutstrom abgegeben wird, inaktiv bleiben, bis er in eine Krebs- oder Tumorzelle eintritt, worauf er durch die chemischen Vorgänge der Krebs- oder Tumorzelle, z. B. durch eine für diese Zelle einzigartige enzymatische Reaktion aktiviert wird.

3. Abgasgruppen

[0060] In denjenigen Aspekten, in welchen B₁ oder B₂ eine Abgangsgruppe ist, schließen geeignete Abgangsgruppen ohne Einschränkungen Einheiten wie N-Hydroxybenzotriazolyl, Halogen, N-Hydroxyphthalimidyl, p-Nitrophenoxy, Imidazolyl, N-Hydroxysuccinimidyl; Thiazolidinylthion oder andere gute Abgangsgruppen, wie sie dem Durchschnittsfachmann verständlich sind, ein. Die hier verwendeten und beschriebenen Synthesereaktionen sind dem Durchschnittsfachmann ohne übermäßige Versuchsführung klar.

[0061] Zum Beispiel kann eine acylierte Zwischenverbindung der Formel (I) mit einem Reaktanten wie 4-Nitrophenylchlorformiat, Disuccinimidylcarbonat (DSC), Carboonyldiimidazol, Thiazolidinthion usw. umgesetzt werden, um das gewünschte aktivierte Derivat bereitzustellen.

[0062] Die selektive Acylierung des phenolischen oder anilinischen Anteils des p-Hydroxybenzylalkohols oder des p-Aminobenzylalkohols und des o-Hydroxybenzylalkohols oder des o-Aminobenzylalkohols kann z. B. mit thiazolidinthionaktivierten Polymeren, succinimidylcarbonataktivierten Polymeren, carbonsäureaktivierten Polymeren, geblockten Aminosäurederivaten durchgeführt werden. Nachdem sie sich an Ort und Stelle befindet, ist die „aktivierte“ Form der PEG-Prodrug (oder geblockten Prodrug) zur Konjugation mit einer amin- oder Hydroxyl enthaltenden Verbindung bereit.

F. SYNTHESE DES POLYMEREN PRODRUGTRANSPORTSYSTEMS

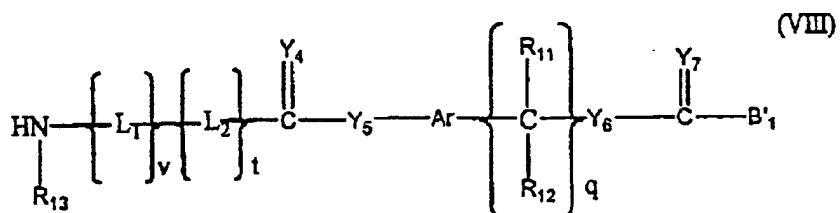
[0063] Die Synthese der jeweiligen Polymer-Prodrugs ist in den Beispielen dargelegt. Im Allgemeinen jedoch wird der polymere Rest in einem bevorzugten Verfahren zur Herstellung des Prodrug-Transportsystems zuerst an die verzweigten Gruppen angelagert. Getrennt davon wird die biologisch aktive Einheit oder der Wirkstoff,

z. B. Wirkstoff-OH oder Wirkstoff-NH₂ (B₁ oder B₂ der Formel I) an den BE-Bestandteil, der auch einen bifunktionalen Abstandhalter daran einschließen kann, an einem Anlagerungspunkt des Polymers angelagert. Als nächstes wird der die terminale Verzweigungen enthaltende polymere Rest mit dem Wirkstoff-BE-Anteil unter zum Bilden des Endprodukts ausreichenden Bedingungen umgesetzt.

[0064] Die Anlagerung des den BE-Wirkstoff-Bestandteil enthaltenden bifunktionalen Abstandhalters an den Polymeranteil wird vorzugsweise in Gegenwart eines Kupplungsmittels durchgeführt. Eine nicht-beschränkende Liste geeigneter Kupplungsmittel schließt 1,3-Diisopropylcarbodiimid (DIPC), sämtliche beliebigen geeigneten Dialkylcarbodiimide, 2-Halogen-1-alkylpyridiniumhalogenide, (Mukaiyama-Reagenzien), 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid (EDC), Propanphosphonsäurecycloanhidrid (PPACA) und Phenyl dichlorphosphate usw. ein, die z. B. von kommerziellen Quellen wie Sigma Aldrich Chemical erhältlich sind oder unter Verwendung bekannter Techniken synthetisiert werden können.

[0065] Vorzugsweise werden die Substituenten in einem inerten Lösungsmittel wie Methylenchlorid, Chloroform, DMF oder Gemischen davon umgesetzt. Die Reaktion wird vorzugsweise auch in Gegenwart einer Base wie Dimethylaminopyridin, Diisopropylethylamin, Pyridin, Triethylamin usw. zum Neutralisieren von jeglichen gebildeten Säuren und bei einer Temperatur von 0°C bis zu ungefähr 22°C (Raumtemperatur) durchgeführt.

[0066] Insbesondere schließt ein Verfahren zur Herstellung eines polymeren Transportsystems das Umsetzen einer Verbindung der Formel (VIII)



worin

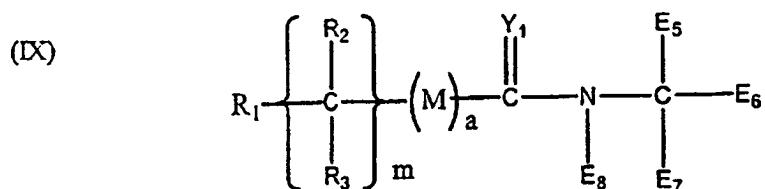
(v) und (t) unabhängig voneinander 0 oder eine ganze positive Zahl bis zu ungefähr 6 und vorzugsweise ungefähr 1 sind;

L₁ und L₂ unabhängig voneinander ausgewählte bifunktionale Linker sind;

Y₄₋₇ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus O, S und NR₁₄;

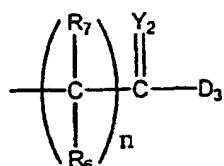
R₁₁₋₁₄ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus Wasserstoff, C₁₋₆-Alkyl, verzweigtem C₃₋₁₂-Alkyl, C₃₋₈-Cycloalkyl, substituiertem C₁₋₆-Alkyl, substituiertem C₃₋₈-Cycloalkyl, Aryl, substituiertem Aryl, Aralkyl, C₁₋₆-Heteroalkyl, substituiertem C₁₋₆-Heteroalkyl, C₁₋₆-Alkoxy, Phenoxy und C₁₋₆-Heteroalkoxy; Ar eine Einheit ist, die, wenn in Formel (I) enthalten, einen mehrfach substituierten aromatischen Kohlenwasserstoff oder eine mehrfach substituierte heterocyclische Gruppe bildet; und

B'₁ ein Rest einer Hydroxyl oder Amin enthaltenden Einheit ist, mit einer Verbindung der Formel (IX)



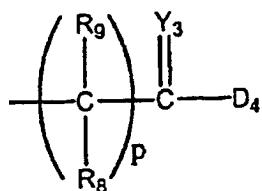
worin

E₅



ist;

E₆₋₈ unabhängig voneinander H, E₅ oder

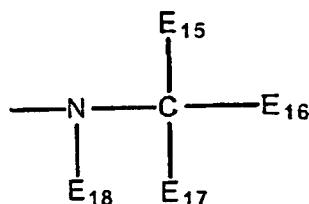


sind

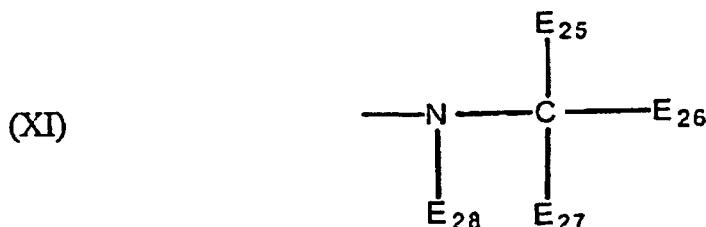
worin D_3 und D_4 unabhängig voneinander OH, eine Abgangsgruppe, die in der Lage ist, mit einem ungeschützten Amin oder Hydroxy oder einer terminal verzweigten Gruppe zu reagieren, ist; ein.

[0067] In weiteren Aspekten des Verfahrens sind D_3 und D_4 unabhängig voneinander ausgewählte terminal verzweigte Gruppen der Formel (X)

(X)



worin E_{15-18} ausgewählt sind aus derselben Gruppe, die E_{5-8} definiert, außer dass D_3 und D_4 mit D'_3 und D'_4 ausgetauscht sind, worin D'_3 und D'_4 unabhängig voneinander OH, eine Einheit der Formel (IV) oder (V) oder (XI)

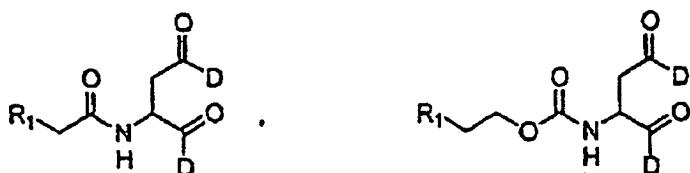


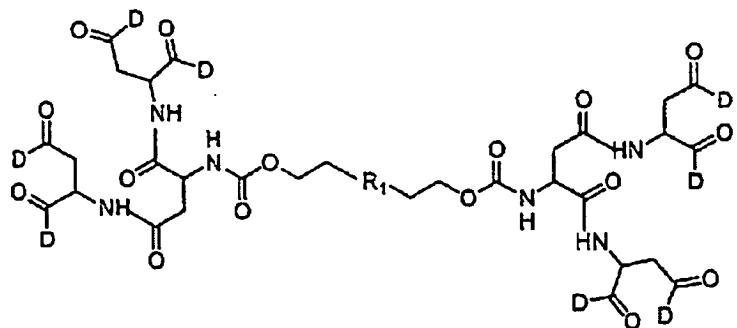
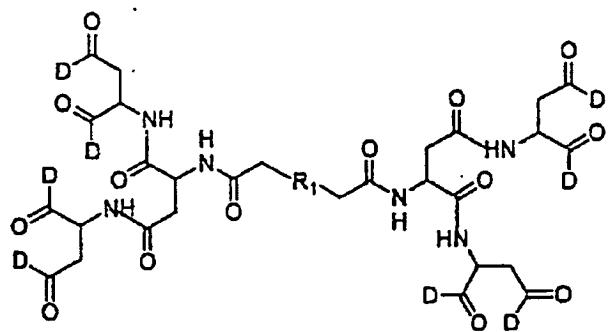
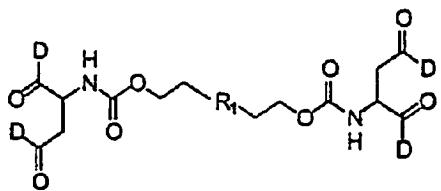
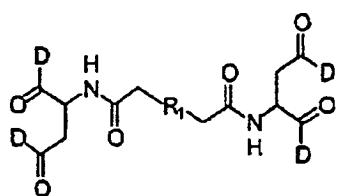
sind, worin E_{25-28} ausgewählt sind aus derselben Gruppe, die E_{5-8} definiert, außer dass D_3 und D_4 mit D''_3 und D''_4 ausgetauscht sind, die derart definiert sind, dass sie unabhängig voneinander OH oder eine Abgangsgruppe sind, die in der Lage ist, mit einem ungeschützten Amin oder Hydroxyl zu reagieren.

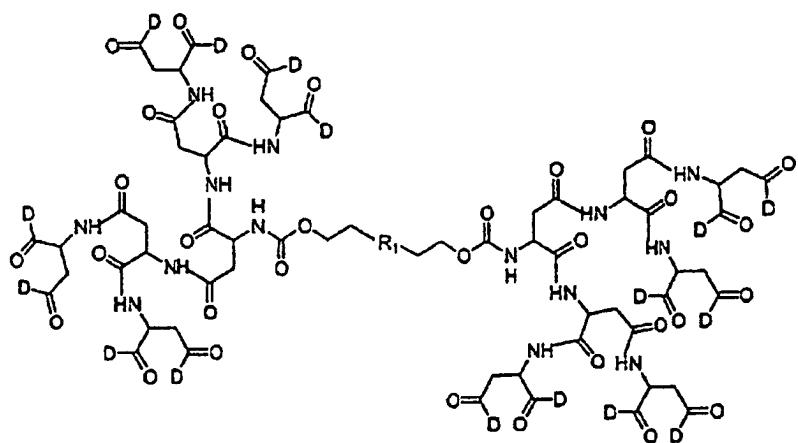
[0068] Derartige Synthesetechniken ermöglichen es, dass z. B. bis zu sechzehn (16) Äquivalente Carbonsäure oder aktivierte Carbonsäure angelagert werden. Wie in den bevorzugten Strukturen hier dargestellt, sind PEG-Reste mit terminal verzweigten Multisäuren bevorzugte Aspekte der Erfindung.

[0069] Wendet man sich Formel (IX) zu ist R_1 ein polymerer Rest; ist Y_1 , O, S oder NR_4 ; ist M O, S oder NR_5 ; sind (n) und (p) unabhängig voneinander 0 oder eine ganze positive Zahl; sind Y_{2-3} unabhängig voneinander O, S oder NR_{10} ; und sind R_{2-10} unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Wasserstoff, C_{1-6} -Alkylen, verzweigten C_{3-12} -Alkylen, C_{3-8} -Cycloalkylen, substituierten C_{1-6} -Alkylen, substituierten C_{3-8} -Cycloalkylen, Arylen, substituierten Arylen, Aralkylen, C_{1-6} -Heteroalkylen, substituierten C_{1-6} -Heteroalkylen, C_{1-6} -Alkoxy, Phenoxy und C_{1-6} -Heteroalkoxy.

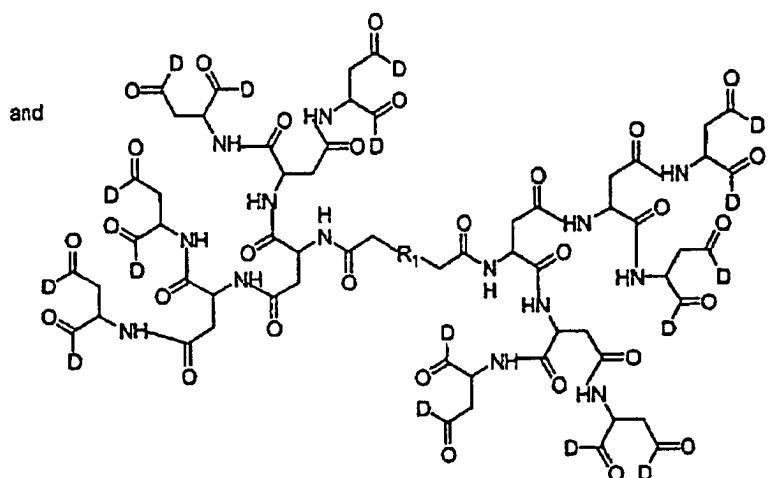
[0070] Ungeachtet der ausgewählten Synthese schließen einige der bevorzugten Verbindungen, die aus den hier beschriebenen Synthesetechniken resultieren, Folgende ein:



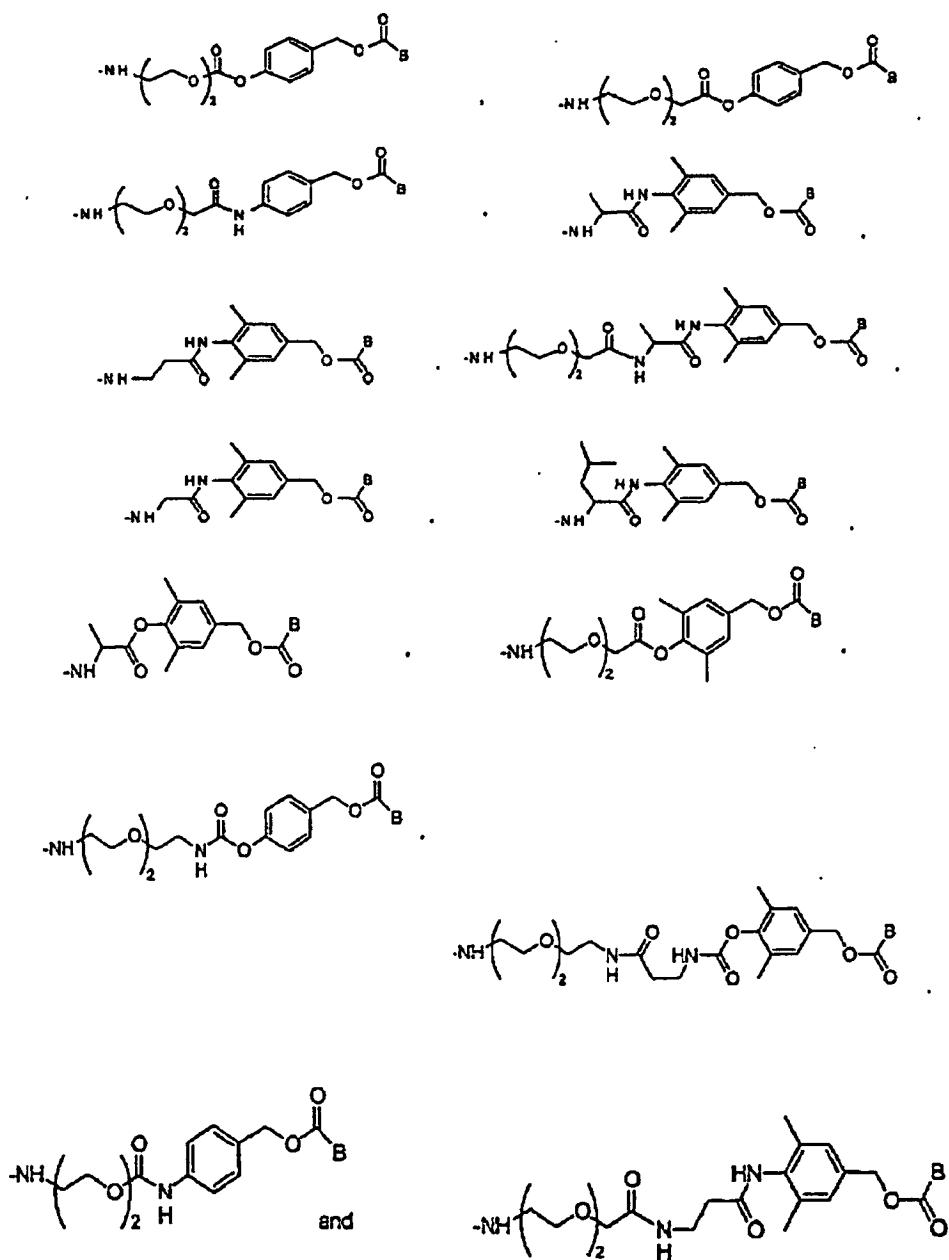




und

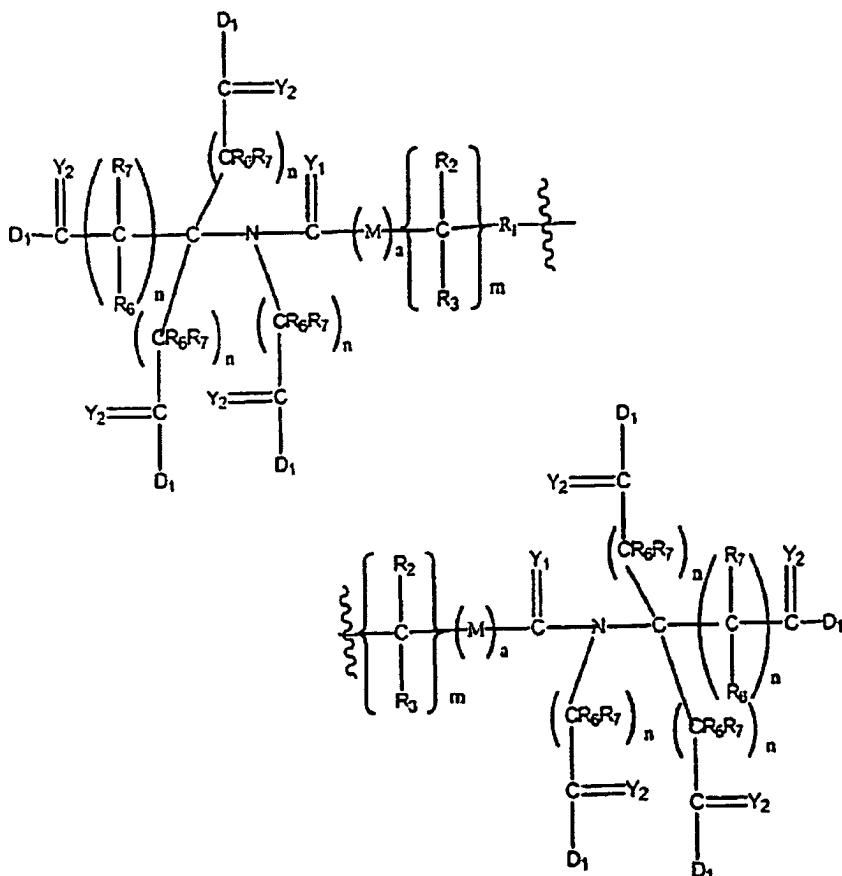


worin R₁ ein polymerer Rest wie PAO oder PEG ist und D OH, Formel (IV) oder (V) ist. Vorzugsweise ist D



worin B ein Rest eines Amin- oder Hydroxyl enthaltenden Wirkstoffs ist.

[0071] In einem anderen bevorzugten Aspekt der Erfindung weisen die Verbindungen der vorliegenden Erfindung die Formel (XII) auf:



worin sämtliche Variablen wie vorstehend definiert sind.

G. IN-VIVO-DIAGNOSTIKEN

[0072] Ein weiterer Aspekt der Erfindung stellt die Konjugate der Erfindung bereit, die wahlweise mit einer diagnostischen Markierung hergestellt sind, die an den vorstehend beschriebenen Transportverbesserer gebunden ist, wobei die Markierung für diagnostische oder bildgebende Zwecke ausgewählt ist. So wird eine geeignete Markierung hergestellt, indem sie an eine geeignete Einheit, z. B. einen Aminosäurerest, an einem beliebigen auf dem Fachgebiet standardmäßigen emittierenden Isotop, einem röntgendichten Marker, einem Magnetresonanzmarker oder anderen zur Magnetresonanzbildung geeigneten nicht-radioaktiven isotopischen Markern, Markern vom Fluoreszenztyp, Markern, die sichtbare Farben darstellen und/oder in der Lage sind, unter Ultraviolet-, Infrarot- oder elektrochemischer Stimulation zu fluoreszieren, um es zu ermöglichen, dass Tumorgewebe während chirurgischen Eingriffen abgebildet wird, usw. hergestellt. Wahlweise wird die diagnostische Markierung in eine konjugierte therapeutische Einheit eingebracht und/oder daran gebunden, wobei es ermöglicht wird, dass die Verteilung eines therapeutischen biologisch aktiven Materials in einem tierischen oder menschlichen Patienten überwacht wird.

[0073] In noch einem weiteren Aspekt der Erfindung werden die erfinderischen markierten Konjugate durch auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren mit einem geeigneten Marker, einschließlich z. B. Radioisotopmarkern, leicht hergestellt. Nur beispielsweise schließen diese ^{131}Iod , ^{125}Iod , $^{99\text{m}}\text{Technetium}$ und/oder $^{111}\text{Indium}$ zur Herstellung von radioimmunsintigrafischen Mitteln zur selektiven Aufnahme in Tumorzellen in vivo ein. Zum Beispiel gibt es eine Anzahl an auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren zum Binden von Peptid an Tc-99m, die nur beispielsweise diejenigen einschließen, die durch die US-Patente Nr. 5,328,679; 5,888,474; 5,997,844; und 5,997,845, hier unter Bezugnahme eingebracht, aufgezeigt wurden.

[0074] Allgemein wird zur anatomischen Lokalisierung von Tumorgewebe in einem Patienten die Konjugatmarkierung einem Patienten oder Tier verabreicht, welcher/welches im Verdacht steht, dass er/es einen Tumor aufweist. Nach einer ausreichenden Zeitdauer zum Ermöglichen einer Lokalisierung des markierten Immunoglobulins an der (den) Tumorstelle(n) wird das durch den Marker erzeugte Signal z. B. visuell, durch Röntgenradiografie, computerorientierte Transaxialtomografie, MRI, durch instrumentellen Nachweis einer lumineszierenden Markierung, durch eine Fotoabtastvorrichtung wie eine Gamma-Kamera oder ein beliebiges anderes Verfahren oder Instrument, das für die Beschaffenheit der ausgewählten Markierung geeignet ist, detektiert.

[0075] Das detektierte Signal wird dann in ein Bild oder eine anatomische und/oder physiologische Bestimmung der Tumorstelle umgewandelt. Das Bild ermöglicht es, den Tumor *in vivo* zu lokalisieren und eine geeignete therapeutische Strategie zu entwerfen. In denjenigen Ausführungsformen, in welchen die markierte Einheit selbst ein therapeutisches Mittel ist, stellt das detektierte Signal einen Nachweis der anatomischen Lokalisierung während einer Behandlung bereit, wobei eine Basislinie für nachfolgende diagnostische und therapeutische Eingriffe bereitgestellt wird.

H. BEHANDLUNGSVERFAHREN

[0076] Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung stellt Behandlungsverfahren für verschiedene medizinische Zustände bei Säugern bereit. Die Verfahren schließen das Verabreichen einer wirksamen Menge einer Prodrug wie eines wie hier beschrieben hergestellten mehrfach beladenen Ara-C-PEG-Konjugats dem eine derartige Behandlung benötigenden Säuger ein. Die Zusammensetzungen sind u. a. zur Behandlung einer neoplastischen Erkrankung, Reduzierung einer Tumorbelaistung, Verhinderung der Metastase von Neoplasmen und Verhinderung des erneuten Auftretens des Wachstums von Tumoren/Neoplasmen in Säugern nützlich.

[0077] Die Menge der verabreichten Prodrug hängt von dem darin eingeschlossenen Ausgangsmolekül ab. Im Allgemeinen ist die bei den Behandlungsverfahren verwendete Menge die Menge, die das gewünschte therapeutische Ergebnis in Säugern wirksam erzielt. Natürlich variieren die Dosierungen der verschiedenen Prodrug-Verbindungen in gewissem Maße je nach der Ausgangsverbindung, der Hydrolysegeschwindigkeit *in vivo*, dem Molekulargewicht des Polymers usw. Im Allgemeinen werden die Prodrug-Taxane allerdings in Mengen im Bereich von ungefähr 5 bis ungefähr 500 mg/m² pro Tag auf der Basis der Menge der Taxaneinheit verabreicht. Camptothecin-Prodrugs werden ebenfalls in Mengen im Bereich von ungefähr 5 bis ungefähr 500 mg/m² pro Tag verabreicht. Der dargelegte Bereich ist veranschaulichend, und der Fachmann wird die optimale Dosierung der ausgewählten Prodrug auf der Basis von klinischer Erfahrung und der Behandlungsindikation bestimmen. Tatsächliche Dosierungen sind dem Fachmann ohne übermäßige Versuchsführung verständlich.

[0078] Die Prodrugs der vorliegenden Erfindung können in ein oder mehrere geeignete pharmazeutische Zusammensetzungen zur Verabreichung an Säuger eingeschlossen werden. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können in Form einer Lösung, Suspension, Tablette, Kapsel oder dergleichen vorliegen, die gemäß auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren hergestellt sind. Es wird auch erwogen, dass die Verabreichung derartiger Zusammensetzungen je nach den Anforderungen des Fachmanns auf oralen und/oder parenteralen Wegen erfolgen kann. Eine Lösung und/oder Suspension der Zusammensetzung kann z. B. als Trägervehikulum zur Injektion oder Infiltration der Zusammensetzung durch auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren, z. B. durch intravenöse, intramuskuläre, subdermale Injektion und dergleichen eingesetzt werden.

[0079] Eine derartige Verabreichung kann auch durch Infusion in einen Körperraum oder -hohlräum sowie durch Inhalation und/oder auf intranasalen Wegen erfolgen. In bevorzugten Aspekten der Erfindung allerdings werden die Prodrugs an diese benötigende Säuger parenteral verabreicht.

I. BEISPIELE

[0080] Die folgenden Beispiele dienen der Bereitstellung eines weiteren Verständnisses der Erfindung, sollen jedoch den Wirkumfang der Erfindung in keiner Weise einschränken. Die unterstrichenen und fett gedruckten Zahlen in den Beispielen entsprechen denjenigen, die in den Figuren dargestellt sind. Es sollte auch klar sein, dass die bifunktionalen PEG-Derivate (alpha- und omega-substituiert) verwendet werden und dass die Figuren nur eine Seite der Verbindungen zeigen, die angesichts der Spiegelbilder der terminalen Gruppen tatsächlich gebildet werden.

[0081] Allgemeines. Sämtliche Reaktionen wurden unter einer Atmosphäre von trockenem Stickstoff oder Argon durchgeführt. Im Handel erhältliche Reagenzien wurden ohne weitere Reinigung verwendet. Sämtliche PEG-Verbindungen wurden vor der Verwendung unter Vakuum oder durch azeotrope Destillation (Toluol) getrocknet. ¹-H-Spektren wurden mit einem Gerät des Typs JEOL FT NMR System JNM GSX-270 oder Varian MercuryVX-300 unter Verwendung von Deuteriochloroform als Lösungsmittel, wenn nicht spezifiziert, erhalten. ¹³C-NMR-Spektren wurden bei 67,80 MHz an dem JNM GSX-270 oder bei 75,46 MHz an dem Varian MercuryVX-300 erhalten. Chemische Verschiebungen (δ) sind in Parts per Million (ppm) feldabwärts von Tetramethylsilan (TMS) angegeben, und Kupplungskonstanten (J-Werte) sind in Hertz (Hz) angegeben. Sämtliche konjugierte PEG-Verbindungen wurden in steriler Kochsalzlösung (0,9%ig) zur Injektion vor den *in-vivo*-Wirkstoffbehandlungen gelöst (45 mg/ml) und sind als ihre Ara-C-Äquivalente (absolute Menge von bereitgestelltem Ara-C) angegeben.

[0082] HPLC-Verfahren. Analytische HPLCs wurden unter Verwendung einer C8-Umkehrphasensäule (Beckman, Ultrasphere) unter isokratischen Bedingungen mit einem 80:20-Gemisch (V/V) von Methanol-Wasser als mobile Phase durchgeführt. Peakelutionen wurden bei 254 nm unter Verwendung eines UV-Detektors überwacht. Zum Nachweis der Gegenwart von jeglichem freiem PEG und auch zum Bestätigen der Gegenwart von PEGyliertem Produkt wurde ein Verdampfungslichtstreuungsdetektor (evaporative light scattering detector; ELSD), Modell PLEMD 950 (Polymer Laboratories) eingesetzt. Auf der Basis einer ELSD- und UV-Analyse waren sämtliche PEGylierten Endprodukte frei von nativem Wirkstoff und durch HPLC zu > 95% rein.

[0083] Analyse des Ara-C-Gehalts in PEG-Derivaten. Zur Bestimmung des Ara-C-Gehalts in PEG-Derivaten wurde wegen der Absorptionsänderung aufgrund der Acylierung von Ara-C N⁴-Acetylcytidin als die Basis verwendet. Die UV-Absorption von N⁴-Acetylcytidin in H₂O wurde bei 257 nm für sechs verschiedene Konzentrationen im Bereich von 0,01 µmol/ml bis 0,05 µmol/ml bestimmt. Aus einer grafischen Standarddarstellung der Absorption gg. die Konzentration wurde der Absorptionskoeffizient ε von N⁴-Acetylcytidin als 36,4 berechnet (O. D. bei 257 nm für 1 mg/ml mit einem Lichtweg von 1,0 cm). PEGylierte Ara-C-Derivate wurden in H₂O mit einer ungefähren Konzentration von 0,015 µmol/ml (auf der Basis eines MG von 40 kDa) gelöst, und die UV-Absorption dieser Verbindungen bei 257 nm wurde bestimmt. Unter Verwendung dieses Werts und Einsatz des von Vorstehendem erhaltenen Absorptionskoeffizienten ε wurde die Ara-C-Konzentration in der Probe bestimmt. Durch Dividieren dieses Werts durch die Probenkonzentration wurde der Prozentanteil an Ara-C in der Probe bereitgestellt.

[0084] Analyse des Melphalangehalts in PEG-Derivaten. Zur Bestimmung des Melphalangehalts in PEG-Derivaten wurde Melphalan als Standard verwendet. Die UV-Absorption von Melphalan in DMF-H₂O (9:1, V/V) wurde bei 264 nm für fünf verschiedene Konzentrationen im Bereich von 0,02 µmol/ml bis 0,06 µmol/ml bestimmt. Aus einer grafischen Standarddarstellung der Absorption gg. die Konzentration wurde der Absorptionskoeffizient ε von Melphalan als 54,6 berechnet (O. D. bei 264 nm für 1 mg/ml mit einem Lichtweg von 1,0 cm). PEGylierte Melphalanderivate wurden in DMF-H₂O (9:1, V/V) mit einer ungefähren Konzentration von 0,013 µmol/ml (auf der Basis eines MG von 40 kDa) gelöst, und die UV-Absorption dieser Verbindungen bei 264 nm wurde bestimmt. Unter Verwendung dieses Werts und Einsatz des von Vorstehendem erhaltenen Absorptionskoeffizienten ε wurde die Melphalankonzentration in der Probe bestimmt. Durch Dividieren dieses Werts durch die Probenkonzentration wurde der Prozentanteil an Melphalan in der Probe bereitgestellt.

[0085] Abkürzungen. DCM (Dichlormethan), DIEA (N,N-Diisopropylethylamin), DMAP (4-(Dimethylamino)pyridin), DSC (N,N-Disuccinimidylcarbonat), EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid), HOBT (1-Hydroxybenzotriazol), IPA (2-Propanol), NMM (N-Methylmorpholin), TBDMSCl (tert-Butyldimethylsilylchlorid), TEA (Triethylamin), TFA (Trifluoressigsäure).

Beispiel 1.

[0086] 4-(tert-Butyldimethylsilyloxy)methyl)-2,6-dimethylphenol (2). Eine Lösung von Triethylamin (5 ml, 35,87 mmol) in DCM (5 ml) wurde langsam über eine Dauer von 1 Std. einer Lösung von 4-Hydroxy-3,5-dimethylbenzylalkohol (1, 1,0 g, 6,58 mmol) und TBDMS-Cl (1,61 g, 10,7 mmol) in DCM (10 ml) bei 0°C zugesetzt. Man ließ die endgültige Lösung auf Raumtemperatur aufwärmen, und sie wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in DCM gelöst und mit Wasser gewaschen, um 1,5 g (86%) 2 zu erhalten: ¹H-NMR δ 0,00 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0,84 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 2,11 (s, 6H, 2 × Ar-CH₃), 4,50 (s, 3H, Ar-CH₂OH), 6,82 (s, 2H, 2 × Ar-CH); ¹³C-NMR (67,80 MHz, CDCl₃) δ -3,25, 15,91, 18,48, 26,01, 64,91, 122,84, 126,93, 132,85, 151,15.

Beispiel 2.

[0087] 2-tert-Butoxycarbonylaminopropionsäure-4-(tert-butyldimethylsilyloxy)methyl)-2,6-dimethylphenylester (3). Ein Gemisch aus Boc-Ala-OH (1,279 g, 6,77 mmol), 2 (1,2 g, 4,511 mmol), EDC·HCl (1,299 g, 6,77 mmol) und DMAP (825,6 mg, 6,77 mmol) in DCM (50 ml) wurde bei 0°C gerührt, und man ließ es über Nacht bei Raumtemperatur aufwärmen. Die Lösung wurde mit 0,5 N HCl (25 ml × 4) gewaschen, über wasserfreiem MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, um 1,95 g (99%) 3 zu erhalten: ¹H-NMR δ 0,00 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0,84 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 1,36 (s, 9H, OC(CH₃)₃), 1,50 (d, 3H, J = 0,81 Hz, CHCH₃), 2,07 (s, 6H, 2 × Ar-CH₃), 4,51 (m, 1H, CHCH₃), 4,56 (s, 1H, Ar-CH₂O), 6,91 (s, 2H, 2 × Ar-CH); ¹³C-NMR δ -3,55, 16,34, 18,39, 18,53, 25,92, 28,26, 49,34, 64,43, 77,46, 126,28, 129,68, 138,97, 146,57, 155,17, 171,43.

Beispiel 3.

[0088] 2-tert-Butoxycarbonylaminopropionsäure4-hydroxymethyl-2,6-dimethylphenylester (4). Verbindung 3 (1,9 g, 4,35 mmol) wurde in Essigsäure (25 ml), THF (8 ml) und Wasser (8 ml) gelöst, und die Lösung wurde bei Raumtemperatur für eine Dauer von 1 Std. gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in DCM (100 ml) gelöst, mit 0,5%iger NaHCO₃-Lösung (50 ml) und Wasser (50 ml) gewaschen. Die organische Schicht wurde über wasserfreiem MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde durch Silicagelsäulenchromatografie gereinigt, um 0,85 g (55%) 4 zu erhalten: ¹H-NMR δ 1,46 (s, 9H, OC(CH₃)₃), 1,58 (d, 3H, J = 0,81 Hz, CHCH₃), 2,13 (s, 6H, 2 × Ar-CH₃), 4,51 (m, 1H, CHCH₃), 4,56 (s, 1H, Ar-CH₂O), 7,03 (s, 2H, 2 × Ar-CH); ¹³C-NMR (67,80 MHz, CDCl₃) δ 16,17, 18,31, 28,18, 49,30, 64,39, 79,98, 127,12, 129,99, 138,68, 146,95, 155,14, 171,38.

Beispiel 4.

[0089] 2-tert-Butoxycarbonylaminopropionsäure-4-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yloxycarbonyloxymethyl)-2,6-dimethylphenylester (5). Ein Gemisch aus 4 (730 mg, 2,26 mmol), DSC (752,1 mg, 2,94 mmol) und Pyridin (232,1 mg, 2,94 mmol) in wasserfreiem Chloroform (20 ml) wurde über Nacht bei 25–30°C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 0,5 N HCl (15 ml) gewaschen und die organische Schicht über wasserfreiem MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, um 5 als Feststoff (899,5 mg, 86%) zu erhalten: ¹³C-NMR δ 16,32, 18,45, 25,45, 28,28, 49,35, 72,25, 77,21, 80,10, 128,99, 129,02, 130,94, 130,91, 148,45, 151,04, 155,14, 168,57.

Beispiel 5.

[0090]

2-tert-Butoxycarbonylaminopropionsäure-4-[1-(3,4-dihydroxy-5-hydroxymethyltetrahydrofuran-2-yl)-2-oxo-1,2-dihydropyrimidin-4-ylcarbamoyloxymethyl]-2,6-dimethylphenylester (7). Ein Gemisch aus 5 (760 mg, 1,64 mmol), Ara-C (6, 996 mg, 4,1 mmol) und DIEA (634,3 mg, 4,92 mmol) in wasserfreiem DMF (40 ml) wurde über Nacht bei 40°C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde im Vakuum eingeengt und durch Silicagelsäulenchromatografie gereinigt. Die Ausbeute des reinen Produkts (7) betrug 200 mg (21%): ¹³C-NMR (CD₃OD + CDCl₃) δ 16,45, 17,61, 28,61, 50,41, 62,38, 67,74, 75,98, 77,75, 80,49, 86,77, 88,96, 95,68, 129,41, 131,48, 134,29, 147,18, 148,96, 154,14, 157,29, 157,43, 164,27, 172,98.

Beispiel 6.

[0091] TFA-Salz

von

2-Aminopropionsäure-4-[1-(3,4-dihydroxy-5-hydroxymethyltetrahydrofuran-2-yl)-2-oxo-1,2-dihydropyrimidin-4-ylcarbamoyloxymethyl]-2,6-dimethylphenylester (8). Verbindung 7 (200 mg, 0,34 mmol) wurde in DCM (4 ml) und TFA (2 ml) für eine Dauer von 2 Std. bei Raumtemperatur gerührt, und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde aus DCM-Ether umkristallisiert, um 200 mg (100%) 8 zu erhalten: ¹³C-NMR (CD₃OD) δ 16,28, 16,44, 49,86, 62,74, 67,97, 76,53, 78,08, 87,47, 89,47, 95,76, 129,96, 131,70, 135,76, 148,00, 148,89, 154,58, 164,68, 169,62.

Beispiel 7.

[0092] Verbindung 10. EDC-HCl (131,1 mg, 0,68 mmol) wurde einem Gemisch aus PEG-Aspartamsäure (9, MG. 40.000, 1,73 g, 0,043 mmol), 8 (210 mg, 0,43 mmol), NMM (137,9 mg, 1,37 mmol) und HOBT (69,1 mg, 0,51 mmol) in wasserfreiem DCM (25 ml) und DMF (15 ml) bei 0°C zugesetzt. Das Gemisch wurde bei 0°C für eine Dauer von 30 Min. gerührt, und dann ließ man es über Nacht auf Raumtemperatur aufwärmen. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand zweimal aus IPA umkristallisiert, um 1,4 g (82%) 10 zu erhalten. Die durch einen UV-Test gemessene Menge an im Produkt vorliegendem Ara-C betrug 2,26 Gew.-%. ¹³C-NMR (D₂O) δ 14,51, 18,19, 18,68, 33,67, 45,20, 52,46, 62,92, 63,44, 72–11–72,19 (PEG), 74,32, 77,64, 78,36, 87,15, 89,17, 95,46, 131,04, 133,19, 135,97, 148,93, 150,04, 155,76, 158,71, 165,46, 173,25, 174,46, 187,43.

Beispiel 8.

[0093] 4-(tert-Butyldimethylsilyloxy)methylphenol (12). Eine Lösung von 4-Hydroxymethylphenol (11, 9,3 g, 75 mmol) in DMF (50 ml) wurde mit wasserfreiem Stickstoffgas für eine Dauer von 10 Min. gespült, gefolgt von der Zugabe von TBDMS-Cl (12,44 g, 82 mmol). Das Reaktionsgemisch wurde auf 0°C abgekühlt, und dann wurde eine Lösung von TEA (30,36 g, 300 mmol) in DMF (25 ml) langsam zugesetzt. Die Reaktionslösung wur-

de über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde zweimal zwischen Wasser (100 ml) und DCM (200 ml) aufgeteilt. Die organischen Schichten wurden vereinigt und über wasserfreiem MgSO₄ getrocknet, gefolgt von der Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum, um 12 (16,3 g, 91%) zu erhalten: ¹³C-NMR δ -5,344 (2 × Si-CH₃), 18,285 (Si-C(CH₃)₃), 25,850 (Si-C(CH₃)₃), 64,840 (Ar-CH₂O), 115,221 (Ar-C²), 127,842 (Ar-C³), 132,962 (Ar-C⁴), 155,248 (Ar-C¹).

Beispiel 9.

[0094] Verbindung 14. Pyridin (983 mg, 12,43 mmol) wurde einer Suspension von 12 (2,7 g, 11,3 mmol) und DSC (3,18 g, 12,43 mmol) in CHCl₃ (140 ml) zugesetzt und das Gemisch über Nacht unter Rückfluss gekocht. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde 13 (3,398 g, 13,7 mmol) der Lösung zugesetzt und das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Gemisch wurde mit 0,1 N HCl (3 × 100 ml) und Kochsalzlösung (100 ml) gewaschen. Die organische Schicht wurde über wasserfreiem MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Hexan (100 ml) gelöst, gefolgt von der Abfiltration von unlöslichen Verunreinigungen. Das Hexanfiltrat wurde eingeengt, um Produkt 14 (5,1 g, 88%) zu erhalten: ¹³C-NMR δ -5,469 (2 × Si-CH₃), 18,235 (Si-C(CH₃)₃), 25,790 (Si-C(CH₃)₃), 28,263 (O-C(CH₃)₃), 40,230 (CH₂NH), 40,917 (CH₂NH), 64,392 (Ar-CH₂O), 69,892 (CH₂O), 70,192 (CH₂O), 70,253 (CH₂O), 79,305 (OC(CH₃)₃), 121,371 (Ar-C²), 126,943 (Ar-C³), 138,482 (Ar-C⁴), 149,960 (OC(=O)NH), 154,936 (OC(=O)NH), 156,096 (Ar-C¹).

Beispiel 10.

[0095] Verbindung 15. Verbindung 14 (5 g, 936 mmol) wurde in Acetonitril (30 ml) und Wasser (30 ml) gelöst, gefolgt von der Zugabe von HOAc (90 ml). Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur für eine Dauer von 1,5 Std. gerührt, gefolgt von der Entfernung des Lösungsmittels. Der Rückstand wurde in DCM (300 ml) gelöst, mit Wasser (3 × 300 ml) gewaschen und über wasserfreiem MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, um 15 (4,1 g, 80%) zu erhalten: ¹³C-NMR δ 28,233 (OC(CH₃)₃), 40,184 (CH₂NH), 40,871 (CH₂NH), 64,484 (Ar-CH₂O), 69,811–70,191 (4 × CH₂O), 79,228 (OC(CH₃)₃), 121,661 (Ar-C²), 127,950 (Ar-C³), 138,177 (Ar-C⁴), 150,418 (OC(=O)NH), 154,875 (OC(=O)NH), 156,111 (Ar-C¹).

Beispiel 11.

[0096] Verbindung 16. Eine Lösung von Verbindung 15 (800 mg, 2,01 mmol) und DSC (726 mg, 2,8 mmol) in DCM (80 ml) wurde auf 0°C abgekühlt, gefolgt von der Zugabe von Pyridin (224 mg, 2,8 mmol). Die Lösung wurde über Nacht bei 0–5°C gerührt, gefolgt von der Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum. Der Rückstand wurde in DCM (40 ml) gelöst, mit Wasser (2 × 20 ml) gewaschen, über wasserfreiem MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, um 16 (0,88 g, 88%) zu erhalten: ¹³C-NMR δ 24,852 (NHS's 2 × C(=O)CH₂), 27,834 (OC(CH₃)₃), 39,777 (CH₂NH), 40,443 (CH₂NH), 69,230–69,640 (4 × CH₂O), 71,624 (Ar-CH₂O), 78,690 (OC(CH₃)₃), 121,583 (Ar-C²), 129,468 (Ar-C³), 137,110 (Ar-C⁴), 148,092 (OC(=O)O), 151,203 & 154,134 (OC(=O)NH), 155,772 (OC(=O)NH), 168,752 (Ar-C¹), 172,809 (NHS's 2 × C(=O)CH₂).

Beispiel 12.

[0097] Verbindung 17. Verbindung wird ähnlichen Bedingungen wie in Beispiel 6–8 dargestellt unterzogen, um 19 zu erhalten.

Beispiel 13.

[0098] Verbindung 22. PEG-Diol (20, 55 g, 1,38 mmol) wurde in Toluol über eine Dauer von 2 Std. azeotrop gekocht, gefolgt von der Entfernung von 200 ml Lösungsmittel durch Rotationsverdampfung. Die Lösung wurde auf -30°C abgekühlt, und Triphosgen (0,544 g, 1,83 mmol) wurde als Feststoff zugesetzt, gefolgt von der Zugabe von wasserfreiem Pyridin (0,434 g, 5,49 mmol). Das Reaktionsgemisch wurde bei 50°C für eine Dauer von 1 Std. gerührt. N-Hydroxyphthalimid (21, 1,12 g, 6,88 mmol) und wasserfreies Pyridin (0,54 g, 6,88 mmol) wurden dem Chlorformiatgemisch zugesetzt, und die Reaktion wurde für eine weitere Dauer von 2 Std. bei 50°C und dann für eine Dauer von 12 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde durch Filterpapier filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde aus DCM-Ethylether (1100 ml, 8:2, V/V) umkristallisiert, um das Produkt (50,9 g, 92%) zu erhalten: ¹³C-NMR δ 123,62, 128,10, 134,55, 152,00, 160,00.

Beispiel 14.

[0099] PEG-cmc-Asp-O-t-Bu (24). Verbindung 22 (MG. 40.000, 20 g, 0,459 mmol) und Aspartamsäuredi-t-butylester-HCl (23, 1,0 g, 3,55 mmol) wurden in wasserfreiem DCM gelöst, gefolgt von der Zugabe von DMAP (0,433 g, 3,55 mmol). Die Lösung wurde über Nacht unter Rückfluss gekocht, gefolgt von der Ausfällung durch Zugabe von Ethylether (1 L). Der Feststoff wurde durch Filtration isoliert und zweimal aus IPA (1 l) umkristallisiert. Der Filterkuchen wurde mit IPA (200 ml) und Ether (200 ml) gewaschen, um nach Trocknen bei 45°C im Vakuum 15,6 g (78%) Produkt zu erhalten: $^{13}\text{C-NMR}$ δ 27,837 ($\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27,991 ($\text{CHCO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 37,752 (CHCH_2CO_2), 50,800 (NHCH), 64,212 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OC}(=\text{O})\text{NH}$), 81,333 ($\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 82,007 ($\text{CHCO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 155,924 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OC}(=\text{O})\text{NH}$), 169,674 ($\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 169,969 ($\text{CHCO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

Beispiel 15.

[0100] PEG-cmc-Asp-OH (25). Verbindung 24 (15 g, 0,375 mmol) wurde in DCM (150 ml) gelöst, gefolgt von der Zugabe von TFA (75 ml). Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für eine Dauer von 2 Std. gerührt, und Hexan (500 ml) wurde zugesetzt, um den Feststoff auszufällen. Der Feststoff wurde mit Hexan verrieben, um TFA zu entfernen, gefolgt von Umkristallisation mit gekühltem DCM-Ether. Der umkristallisierte Feststoff wurde erneut in DCM (150 ml) gelöst und mit Wasser (150 ml) gewaschen. Die organische Schicht wurde abgetrennt, über wasserfreiem MgSO_4 getrocknet, im Vakuum eingeengt und mit Ether ausgefällt, um 12,4 g (83%) Produkt zu erhalten: $^{13}\text{C-NMR}$ δ 36,441 (CHCH_2CO_2), 50,177 (NHCH), 64,390 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OC}(=\text{O})\text{NH}$), 81,333 ($\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 82,007 ($\text{CHCO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 156,172 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OC}(=\text{O})\text{NH}$), 171,944 ($\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 172,211 ($\text{CHCO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

Beispiel 16.

[0101] Meiphalan-Me-ester (27). Melphalan (26, 1,00 g, 3,28 mmol) wurde in 2,2-Dimethoxypropan (65,59 ml, 533,49 mmol) suspendiert. Der Suspension wurden wässrige HCl (36%ig, 3,28 ml) und absoluter Methanol (4 ml) zugesetzt. Das Gemisch wurde unter sanftem Rückfluss unter kräftigem Rühren erwärmt, bis die Lösung begann, leicht braun zu werden. Das Gemisch wurde dann für eine Dauer von 18 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde im Vakuum eingeengt und das Rohprodukt aus dem Rückstand mit Ether ausgefällt. Der Feststoff wurde filtriert, mit Ether gewaschen und durch Silicagelsäulenchromatografie ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 9:1$, V/V) gereinigt, um das gewünschte Produkt (0,47 g, 45%) zu erhalten: $^{13}\text{C-NMR}$ δ 39,751, 40,340, 51,912, 53,435, 55,803, 112,124, 126,076, 130,620, 145,033, 175,754.

Beispiel 17.

[0102] Verbindung 28. Ein Gemisch aus 16 (1,91 g, 3,55 mmol), 27 (1,7 g, 5,33 mmol) und DMAP (0,519 g, 4,25 mmol) in wasserfreiem Chloroform (30 ml) wurde bei Raumtemperatur über Nacht unter Stickstoff gerührt und dann im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde erneut in DCM (100 ml) gelöst und dreimal mit 1 N HCl (50 ml) gewaschen. Die organische Schicht wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, eingeengt und durch Silicagelsäulenchromatografie (EtOAc:Hexan = 8:2, V/V) gereinigt, um das gewünschte Produkt (0,8301 g, 32%) zu erhalten: $^{13}\text{C-NMR}$ δ 28,173, 36,571, 40,076, 40,680, 51,838, 52,956, 54,381, 54,933, 65,707, 68,390, 69,212, 69,610, 76,056, 76,480, 76,891, 78,547, 111,060, 120,575, 123,285, 128,087, 128,318, 129,333, 131,002, 132,029, 143,856, 149,544, 149,801, 153,127, 154,193, 154,565, 170,539.

Beispiel 18.

[0103] Verbindung 29. TFA (2,5 ml) wurde langsam einer Lösung von 28 (0,8306 g, 1,12 mmol) in DCM (5 ml) zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur für eine Dauer von 1,5 Std. gerührt, gefolgt von Einengung im Vakuum. Der Rückstand wurde mit DCM-Ether umkristallisiert, um das gewünschte Produkt (0,0838 g, 13%) zu erhalten: $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 37,218, 39,814, 40,715, 41,196, 52,521, 53,625, 55,091, 66,349, 66,635, 69,998, 70,107, 111,768, 121,357, 123,995, 128,781, 130,062, 132,927, 144,615, 150,218, 154,381, 154,988, 171,411.

Beispiel 19.

[0104] Verbindung 30. EDC (0,048 g, 0,253 mmol) und DMAP (0,077 g, 0,632 mmol) wurden einem Gemisch aus PEG-cmc-Asp-COOH (25, 1,26 g, 0,032 mmol) und 29 (0,191 g, 0,253 mmol) in wasserfreiem DCM (20 ml) und wasserfreiem DMF (5 ml) bei 0°C in einem Eisbad zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur über Nacht unter Stickstoff gerührt und dann im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde aus

DCM-Ether und aus IPA umkristallisiert, um das gewünschte Produkt (0,874 g, 64,2%) zu erhalten. Die durch einen UV-Test gemessene Menge an Melphalan im Produkt betrug 2,4 Gew.-%: ^{13}C -NMR δ 36,385, 38,995, 40,090, 40,606, 51,809, 52,949, 54,506, 61,039, 62,451, 65,683, 68300–72,780 (PEG), 111,372, 120,942, 123,754, 128,474, 129,733, 132,185, 144,332, 150,106, 153,868, 154,768, 160,141, 171,165.

Beispiel 20.

[0105] Verbindung 32. Eine Lösung von 31 (2,0 g, 5,78 mmol, 1 Äqu.), 2 (3,1 g, 11,56 mmol, 2 Äqu.) und DMAP (1,76 g, 14,45 mmol, 2,5 Äqu.) in wasserfreiem DCM (20 ml) wurde unter Stickstoff für eine Dauer von 4 Std. unter Rückfluss gekocht und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Lösung wurde mit DCM (100 ml) verdünnt und dreimal mit Wasser (50 ml) gewaschen. Die organische Schicht wurde über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, eingeengt und durch Silicagelsäulenchromatografie (5–25 % MeOH in DCM, V/V) gereinigt, um das gewünschte Produkt (2,50 g, 87%) zu erhalten: ^{13}C -NMR δ –5,421, 15,994, 18,324, 25,850, 28,282, 40,251, 64,392, 67,413, 68,641, 70,331, 79,304, 126,409, 129,878, 139,171, 147,209, 153,200, 156,041.

Beispiel 21.

[0106] Verbindung 33. Verbindung 32 (2,5 g, 5,027 mmol) wurde in Acetonitril (8 ml) und Wasser (8 ml) gelöst, gefolgt von der Zugabe von HOAc (23 ml). Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur für eine Dauer von 1 Std. gerührt, gefolgt der Entfernung des Lösungsmittels. Der Rückstand wurde in DCM (50 ml) gelöst, mit 0,5%iger Natriumbicarbonatlösung (3 × 25 ml) und dann mit Wasser (25 ml) gewaschen. Die organische Schicht wurde über wasserfreiem MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, um 33 (1,556 g, 80,8%) zu erhalten: ^{13}C -NMR δ 15,828, 28,206, 40,187, 53,320, 64,417, 67,489, 68,513, 70,241, 79,278, 82,760, 113,173, 127,279, 130,159, 138,915, 147,580, 153,020, 156,067.

Beispiel 22.

[0107] Verbindung 34. Pyridin (0,427 ml, 5,277 mmol) wurde einer Lösung von Verbindung 33 (1,556 g, 4,059 mmol) und DSC (1,352 g, 5,277 mmol) in wasserfreiem Chloroform (31,12 ml) zugesetzt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt, gefolgt von der Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum. Das Reaktionsgemisch wurde mit Chloroform auf 50 ml verdünnt, mit 0,5 N HCl dreimal gewaschen, über wasserfreiem MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, um 34 (1,722 g, 81%) zu erhalten: ^{13}C -NMR δ 15,857, 25,256, 28,210, 40,143, 67,568, 68,507, 70,270, 72,099, 79,249, 129,130, 130,959, 131,094, 148,918, 151,654, 152,845, 156,034, 168,773.

Beispiel 23.

[0108] Verbindung 35. Ein Gemisch aus 34 (1,37 g, 2,61 mmol), 27 (1,249 g, 3,91 mmol) und DMAP (0,382 g, 3,13 mmol) in wasserfreiem Chloroform (40 ml) wurde bei Raumtemperatur über Nacht unter Stickstoff gerührt und dann im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde erneut in DCM (100 ml) gelöst und dann dreimal mit 1 N HCl (50 ml) gewaschen. Die organische Schicht wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt, um das gewünschte Produkt (1,85 g, 97%) zu erhalten: ^{13}C -NMR δ 15,981, 28,321, 36,820, 39,943, 40,315, 52,244, 53,192, 53,358, 54,804, 66,325, 67,541, 68,539, 70,293, 79,266, 111,983, 112,329, 124,310, 128,610, 130,338, 130,479, 131,081, 133,961, 145,084, 148,028, 152,828, 155,542, 155,875, 172,041.

Beispiel 24.

[0109] Verbindung 36. TFA (4,6 ml) wurde langsam einer Lösung von 35 (1,85 g, 2,536 mmol) in DCM (10 ml) zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur für eine Dauer von 1,5 Std. gerührt, gefolgt von Einengung im Vakuum. Der Rückstand wurde mit DCM-Ether umkristallisiert, um das gewünschte Produkt (1,335 g, 71%) zu erhalten: ^{13}C -NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 15,905, 36,846, 39,431, 40,379, 52,321, 53,396, 54,932, 66,273, 66,670, 67,374, 68,936, 112,021, 124,386, 128,585, 130,364, 130,505, 134,204, 145,161, 148,003, 152,995, 155,644, 172,259.

Beispiel 25.

[0110] Verbindung 37. EDC (0,345 g, 1,79 mmol) und DMAP (0,77 g, 6,29 mmol) wurden einem Gemisch aus PEG-cmc-Asp-COOH (25; 7,25 g, 0,179 mmol) und 36 (1,34 g, 1,79 mmol) in wasserfreiem DCM (100 ml) und wasserfreiem DMF (25 ml) bei 0°C in einem Eisbad zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtempe-

ratur über Nacht unter Stickstoff geröhrt und im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde aus DCM-Ether und aus IPA umkristallisiert, um das gewünschte Produkt (5,10 g, 66,3%) zu erhalten. Die durch einen UV-Test gemessene Menge an Melphalan im Produkt betrug 2,85 Gew.-%: ^{13}C -NMR δ 5,498, 36,214, 38,855, 39,894, 51,706, 52,815, 54,444, 60947, 62,394, 63,756–73,461 (PEG), 111,438, 123,937, 128,080, 129,892, 133,572, 144,583, 147,462, 152,209, 155,116, 160,467, 170,411, 171,535.

Beispiel 26.

[0111] In-vitro- und in-vivo-Daten für Verbindung 10.

[0112] In diesem Beispiel sind in-vivo- und in-vitro-Daten bereitgestellt und mit unmodifiziertem Ara-C verglichen.

In Vivo

[0113] Athymische Nacktmäusen wurde subkutan ein von Spendermäusen erhaltenes Gewebefragment von LX-1 mit 4–5 mm³ implantiert. Die Tumortrokarstelle wurde zweimal wöchentlich betrachtet und einmal fühlbar gemessen. Das Tumorvolumen für jede Maus wurde durch Messen von zwei Maßen mit Messschiebern bestimmt und unter Verwendung der folgenden Formel berechnet: Tumorvolumen = (Länge × Breite²)/2. Als die Tumore das mittlere Volumen von 90 mm³ erreichten wurden die Mäuse in ihre Versuchsgruppen eingeteilt, die aus unmodifiziertem Ara-C und PEG-Ara-C (Verbindung 10) bestanden. Die Mäuse wurden in gleichmäßig verteilte Tumogröße sortiert, in Gruppen von 4 bis 6 Mäuse/Gruppe unterteilt und ihre Ohren zur dauerhaften Identifikation gestanzt. Wirkstoffe wurden intravenös q3d × 4 (Tag 1, 4, 7 und 10) mit einer ungefähren Geschwindigkeit von 0,5 ml pro Minute über die Schwanzvene verabreicht. Verbindungen wurden sowohl auf gleichmolarer Basis (absolute Wirkstoffmenge) von 20 mg/kg als auch in der Nähe ihres jeweiligen MTD (Ara-C, 100 mg/kg/Dosis (Toxizität); 10, 40 mg/kg/Dosis (Volumen) verabreicht. Das Gewicht der Mäuse und die Tumogröße wurden zu Beginn der Studie und zweimal wöchentlich über eine Dauer von 4 Wochen gemessen. Die Wirkstoffwirksamkeit wurde durch Vergleichen des Tumorwachstums bei behandelten gegenüber unbehandelten (kein Vehikulum) Kontrollmäusen bestimmt. Fünf Typen von Endpunkten wurden als Die Vergleichsgrundlage verwendet: (a) mittlere Tumorvolumina an Tag 28; (B) mittlere prozentuale Veränderung von einzelnen Tumorvolumina seit Beginn; (c) prozentualer Unterschied im Tumorvolumen (%T/C), gemessen, als das mittlere Tumorvolumen der Kontrollgruppe ungefähr 800–1100 mm³ erreichte (exponentielle Wachstumsphase); (d) prozentualer Unterschied im Tumorvolumen (%T/C) an Tag 21 (2000 mm³) und (e) die Zahl des Tumorrückgangs (kleineres Tumorvolumen an Tag 28 verglichen mit Tag 1) pro Gruppe.

Ergebnisse

[0114] Verbindung 10 zeigte bessere Antitumoraktivität als natives Ara-C bei nur 20% der Dosis der aktiven Ausgangsverbindung.

Verbindung	t _{1/2} (Std.) ^a	Rattenplasma	IC ₅₀ (nM) ^a P388/O	LX-1 %T/Cb
Ara-C	–		10	74,0 (100 mg/kg)
Verbindung 10	14		448	74,0 (20 mg/kg)

^a Sämtliche Versuche wurden bei 37°C zweifach durchgeführt und t_{1/2} wurde durch das Verschwinden von PEG-Derivaten gemessen. Standardabweichung der Messungen = +10%.

^b Das mittlere Basislinientumorvolumen betrug 1000 mm³.

in-vitro-Bioassay

[0115] Eine Reihe von in-vitro-Assays zum Bestimmen des IC₅₀ für unmodifiziertes Ara-C und Verbindung 10 wurde unter Verwendung der Zelllinie P388/O (Mäuselymphoidneoplasma, Southern Research Institute) durchgeführt. Man ließ die P388/O-Zellen in RPMI-1640-Medium (Whittaker Bioproducts, Walkersville, Maryland) +10% FBS (Hyclone Inc., Logan UT) wachsen. Bioassays wurden in ihren jeweiligen Medien, enthaltend Antibiotika und Fungizon, durchgeführt.

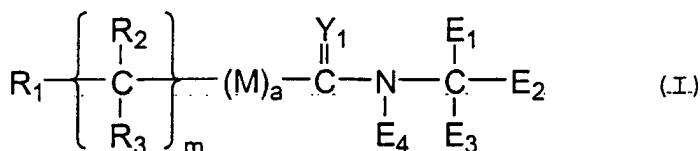
[0116] Ara-C wurde in DMSO gelöst und in Kulturmedien auf die geeignete Konzentration verdünnt. Das PEG-Ara-C wurde in Wasser gelöst und in Kulturmedien auf die geeigneten Konzentrationen verdünnt.

[0117] Die Assays wurden zweifach in 96-Mulden-Mikrotiterzellkulturplatten durchgeführt. Eine Zweifach-Reihenverdünnung der Verbindungen wurde in den Mikrotiterplatten durchgeführt. Zellen wurden durch Inkubieren mit 0,1% Trypsin/Versene bei 37°C abgelöst. Trypsin wurde durch Zugabe der geeigneten Medien für jede Zelllinie, enthaltend 10% FBS, inaktiviert. Jeder Mulde der Mikrotiterplatten wurden 10.000 Zellen zugesetzt. Nach drei Tagen wurde das Zellwachstum durch Zugabe eines Stoffwechselindikatorfarbstoffs, Alamar Blue, nach dem Protokoll des Herstellers gemessen. Der IC₅₀-Wert für die Testverbindung und die Bezugsverbindung sind vorstehend in der Tabelle bereitgestellt.

[0118] Während hier beschrieben wurde, was gegenwärtig als die bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung angenommen wird, erkennt der Fachmann, dass Änderungen und Modifikationen ohne Abweichen vom Geist der Erfindung durchgeführt werden können. Es ist beabsichtigt, sämtliche derartige Änderungen und Modifikationen, wie sie in den tatsächlichen Umfang der Erfindung fallen, zu beanspruchen.

Patentansprüche

1. Verbindung umfassend die Formel (I):



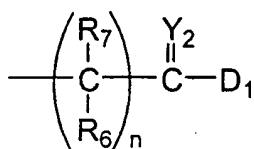
worin:

R₁ ein polymerer Rest ist;

Y₁ O, S oder NR₄ ist;

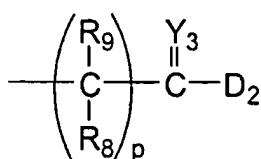
M O, S oder NR₅ ist;

E₁



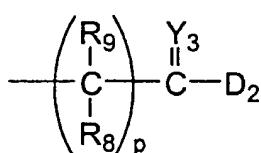
ist,

E₂ E₁ oder



ist,

E₃₋₄ unabhängig voneinander H, Ei oder



ist;

(a) Null oder eins ist;

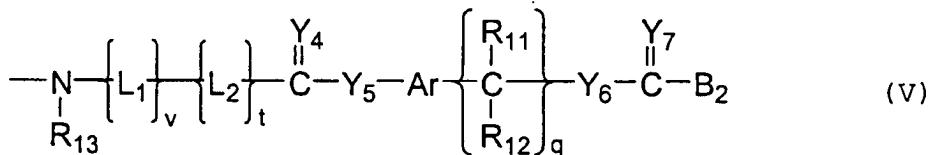
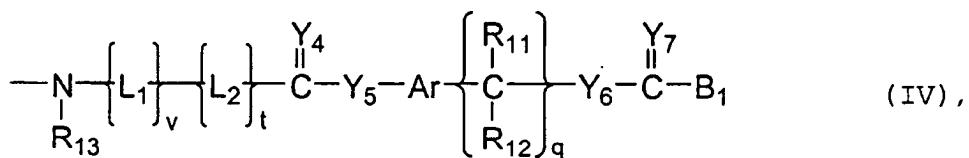
(m) Null oder eine ganze positive Zahl ist;

(n) und (p) unabhängig voneinander 0 oder eine ganze positive Zahl sind;

Y₂₋₃ sind unabhängig voneinander O, S oder NR₁₀;

R₂₋₁₀ sind unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, C₁₋₆-Alkyl, verzweigtem C₃₋₁₂-Alkyl, C₃₋₈-Cycloalkyl, substituiertem C₁₋₆-Alkyl, substituiertem C₃₋₈-Cycloalkyl, Aryl, substituiertem Aryl, Aralkyl, C₁₋₆-Heteroalkyl, substituiertem C₁₋₅-Heteroalkyl, C₁₋₆-Alkoxy, Phenoxy und C₁₋₆-Heteroalkoxy;

D₁ und D₂ sind unabhängig voneinander



oder eine terminal verzweigte Gruppe,

worin (v) und (t) unabhängig voneinander 0 oder eine ganze positive Zahl bis zu ungefähr 6 sind;

(q) ist Null oder eine ganze positive Zahl;

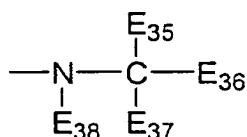
L_1 und L_2 sind unabhängig voneinander ausgewählte bifunktionale Linker;

Y_{4-7} sind unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus O, S und NR_{14} ;

R_{11-14} sind unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, C_{1-6} -Alkyl, verzweigtem C_{3-12} -Alkyl, C_{3-8} -Cycloalkyl, substituiertem C_{1-6} -Alkyl, substituiertem C_{3-8} -Cycloalkyl, Aryl, substituiertem Aryl, Aralkyl, C_{1-6} -Heteroalkyl, substituiertem C_{1-6} -Heteroalkyl, C_{1-6} -Alkoxy, Phenoxy und C_{1-6} -Heteroalkoxy; Ar ist eine Einheit, die, wenn in Formel (I) enthalten, einen mehrfach substituierten aromatischen Kohlenwasserstoff oder eine mehrfach substituierte heterocyclische Gruppe bildet;

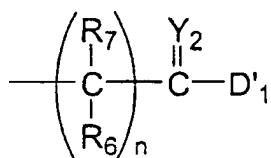
B_1 und B_2 sind unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Abgangsgruppen, OH, Resten von Hydroxyl enthaltenden Einheiten oder Amin enthaltenden Einheiten;

wobei die terminal verzweigte Gruppe die Formel



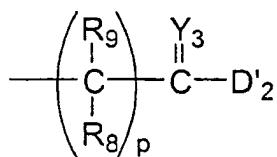
enthält, worin

E_{35}



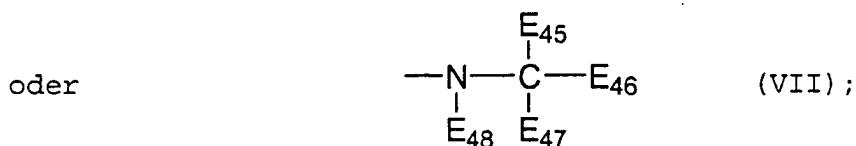
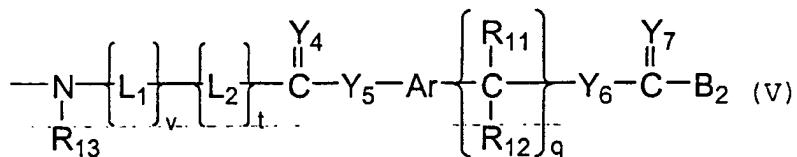
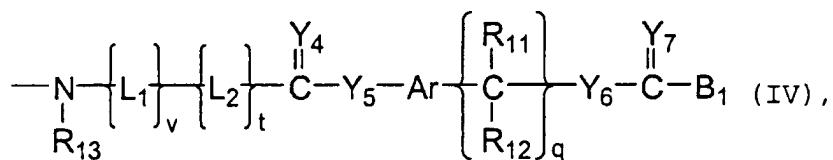
ist,

E_{36-38} sind unabhängig voneinander H, E_{35} oder

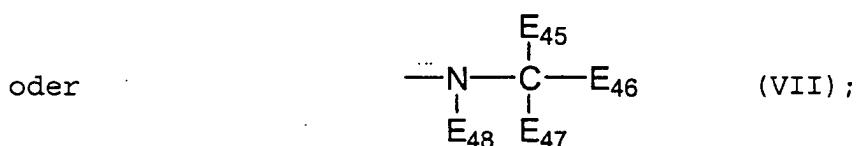
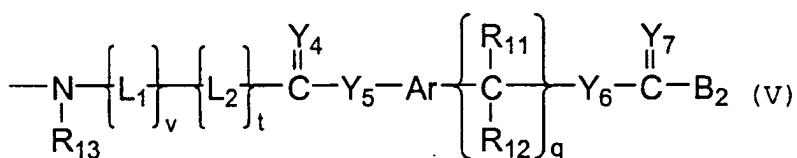
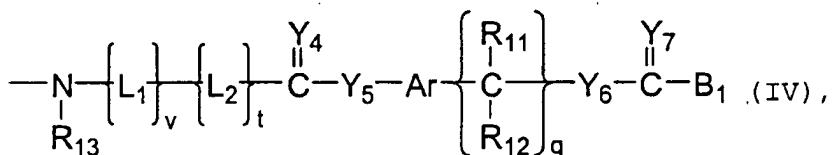


;

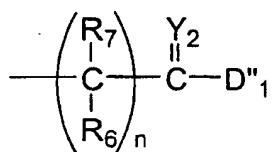
D'_1 ist



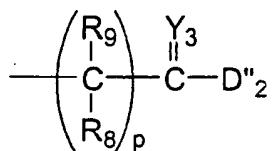
D'_2 ist OH,



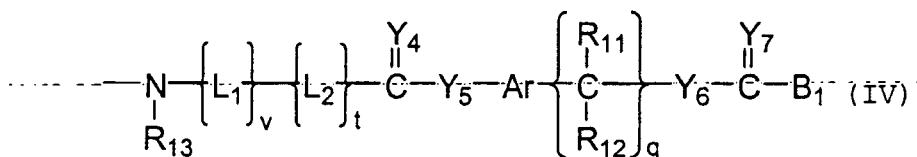
worin E_{45}



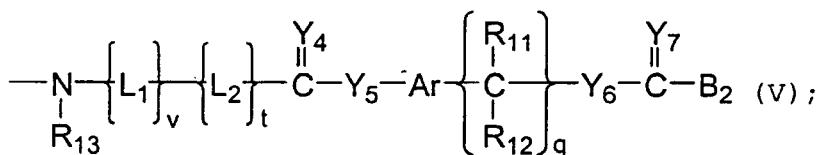
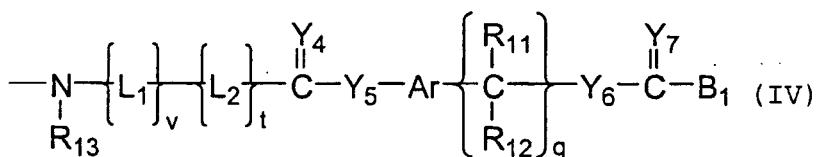
ist,
 E_{46-48} sind unabhängig voneinander H, E_{45} oder



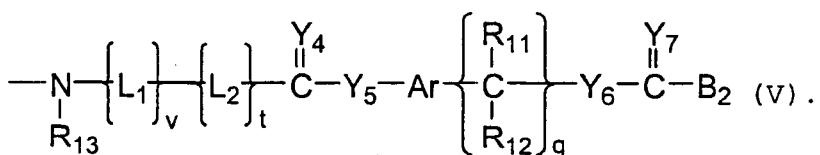
worin D''_1 ist



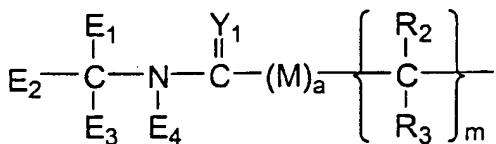
oder

 D''_2 ist OH,

oder

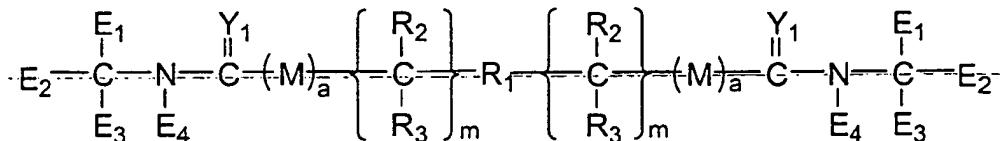


2. Verbindung gemäß Anspruch 1, worin R_1 zusätzlich eine Capping Gruppe A ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, NH_2 , OH , CO_2H , C_{1-5} -Einheiten und



umfaßt.

3. Verbindung gemäß Anspruch 2 umfassend die Formel:

4. Verbindung gemäß Anspruch 3, worin Y_1 O ist.5. Verbindung gemäß Anspruch 1, worin R_1 einen Polyalkylenoxidrest umfaßt.6. Verbindung gemäß Anspruch 5, worin R_1 einen Polyethylenglycolrest umfaßt.7. Verbindung gemäß Anspruch 3, worin R_1 einen Polyethylenglycolrest umfaßt.

8. Verbindung gemäß Anspruch 5, worin R_1 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
 $-\text{C}(=\text{Y}_8)\text{---}(\text{CH}_2)_f\text{---O}\text{---}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x\text{---A}$, $-\text{C}(=\text{Y}_8)\text{---Y}_9\text{---}(\text{CH}_2)_f\text{---O}\text{---}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x\text{---A}$, $-\text{C}(=\text{Y}_8)\text{---NR}_{20}\text{---}(\text{CH}_2)_f\text{---O}\text{---}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x\text{---A}$,
 $-(\text{CR}_{21}\text{R}_{22})_e\text{---O}\text{---}(\text{CH}_2)_f\text{---O}\text{---}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x\text{---A}$, $-\text{NR}_{20}\text{---}(\text{CH}_2)_f\text{---O}\text{---}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x\text{---A}$,

-C(=Y₈)-(CH₂)_f-O-(CH₂CH₂O)_x-(CH₂)_f-C(=Y₈)-, -C(=Y₈)-NR₂₀-(CH₂)_f-O-(CH₂CH₂O)_x-(CH₂)_f-NR₂₀-C(=Y₈)-, -(CR₂₁R₂₂)_e-O-(CH₂)_f-O-(CH₂CH₂O)_x-(CH₂)_f-O-(CR₂₁R₂₂)_e- und -NR₂₀-(CH₂)_f-O-(CH₂CH₂O)_x-(CH₂)_f-NR₂₀ worin:
Y₈ und Y₉ unabhängig O, S oder NR₂₀ sind;
x den Polymerisationsgrad darstellt;

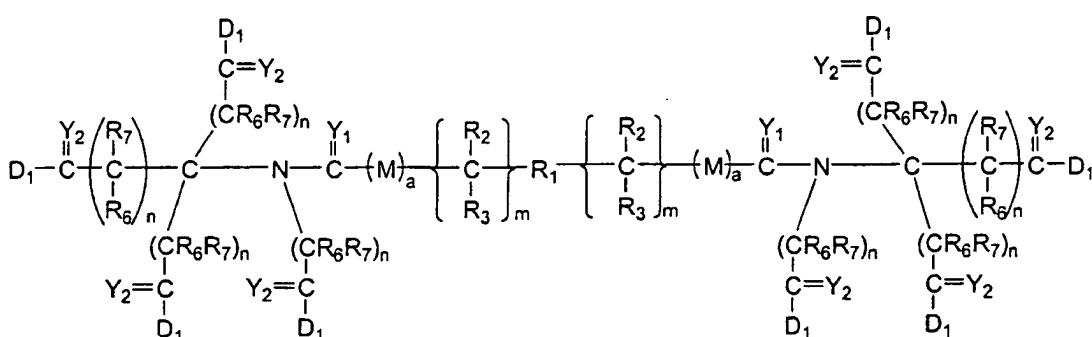
R₂₀, R₂₁ und R₂₂ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus H, C₁₋₆-Alkyl, verzweigtem C₃₋₁₂-Alkyl, C₃₋₈-Cycloalkyl, substituiertem C₁₋₆-Alkyl, substituiertem C₃₋₈-Cycloalkyl, Aryl, substituiertem Aryl, Aralkyl, C₁₋₆-Heteroalkyl, substituiertem C₁₋₆-Heteroalkyl, C₁₋₆-Alkoxy, Phenoxy und C₁₋₆-Heteroalkoxy;
e und f stellen unabhängig voneinander Null, eins oder zwei dar; und
A ist eine Capping Gruppe.

9. Verbindung gemäß Anspruch 8, worin R₁ -O-(CH₂CH₂O)_x umfaßt und x eine positive ganze Zahl ist, so daß das gewichtsgemittelte Molekulargewicht mindestens ungefähr 20.000 beträgt.

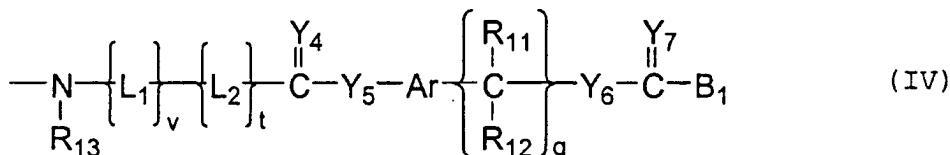
10. Verbindung gemäß Anspruch 3, worin R₁ ein gewichtsgemitteltes Molekulargewicht von ungefähr 20.000 bis ungefähr 100.000 hat.

11. Verbindung gemäß Anspruch 3, worin R₁ ein gewichtsgemitteltes Molekulargewicht von ungefähr 25.000 bis 60.000 hat.

12. Verbindung gemäß Anspruch 3 umfassend die Formel:

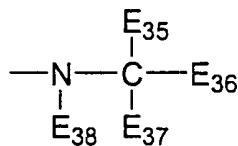


13. Verbindung gemäß Anspruch 12, worin D₁



darstellt.

14. Verbindung gemäß Anspruch 12, worin D₁

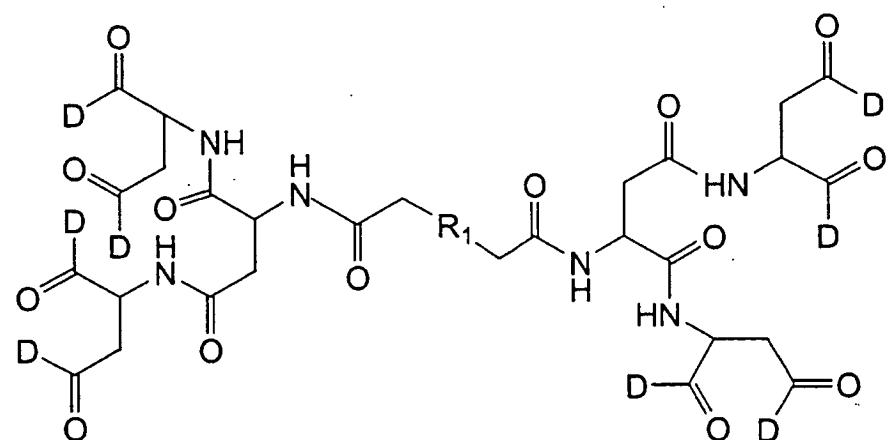
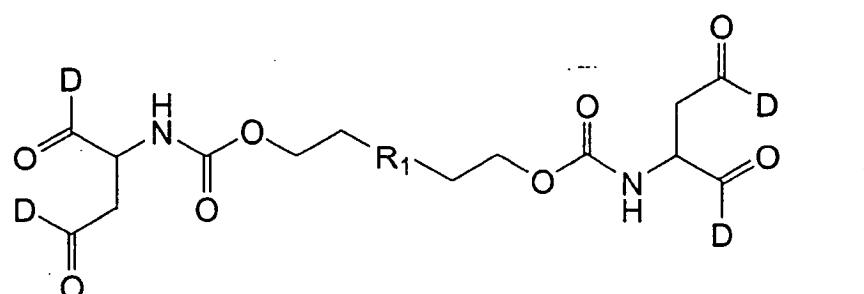
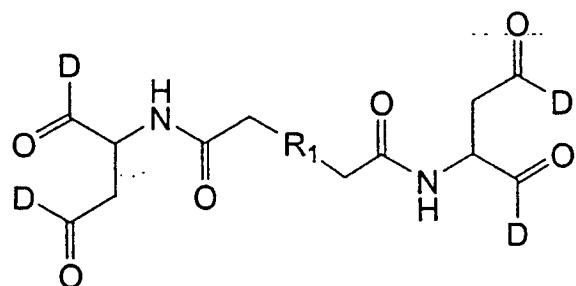
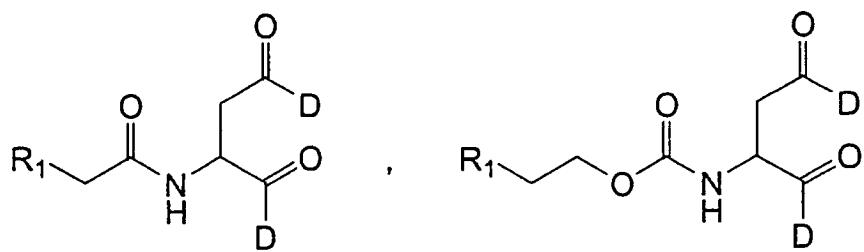


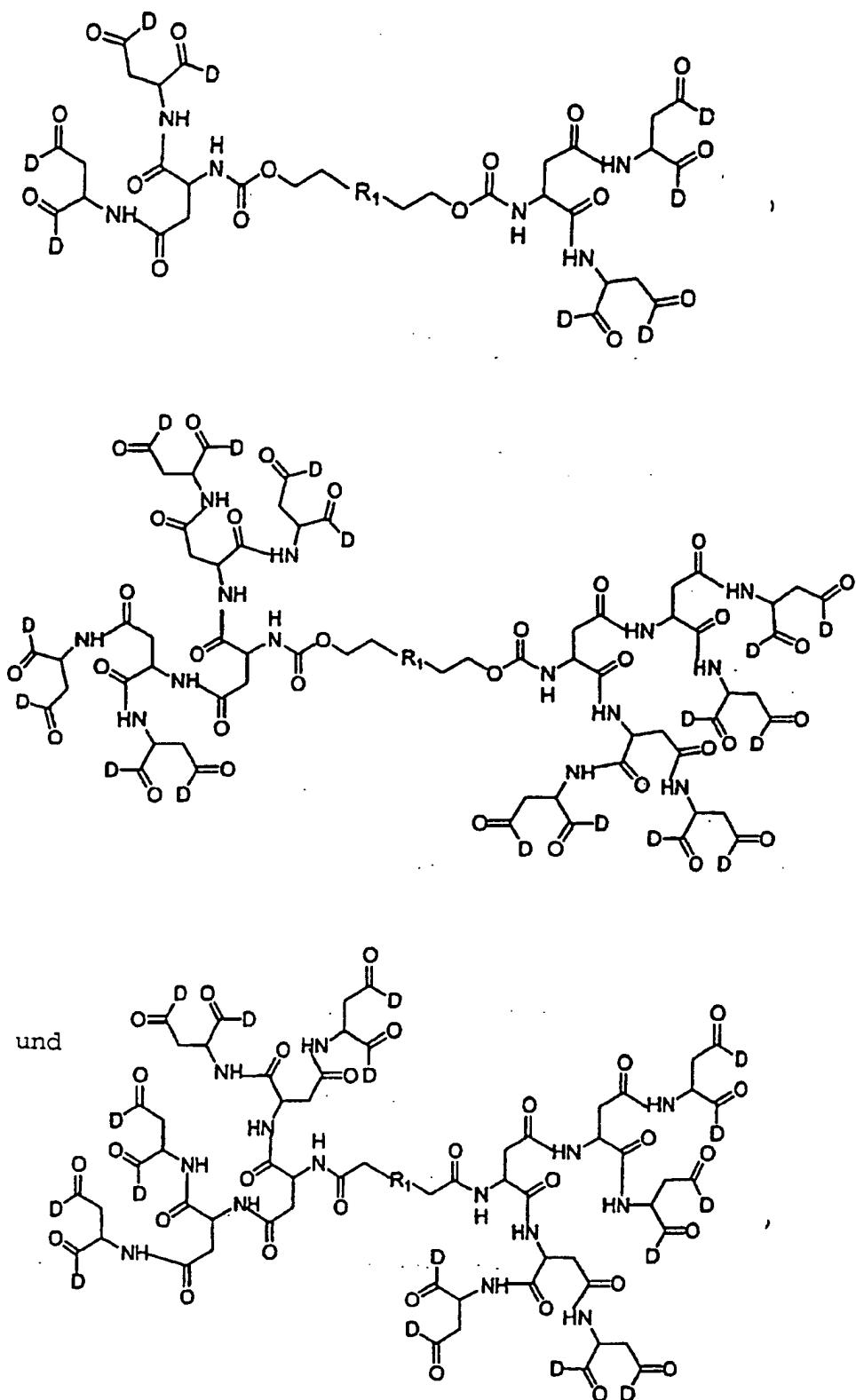
ist.

15. Verbindung gemäß Anspruch 1, worin L₁ (CH₂CH₂O)₂ ist.

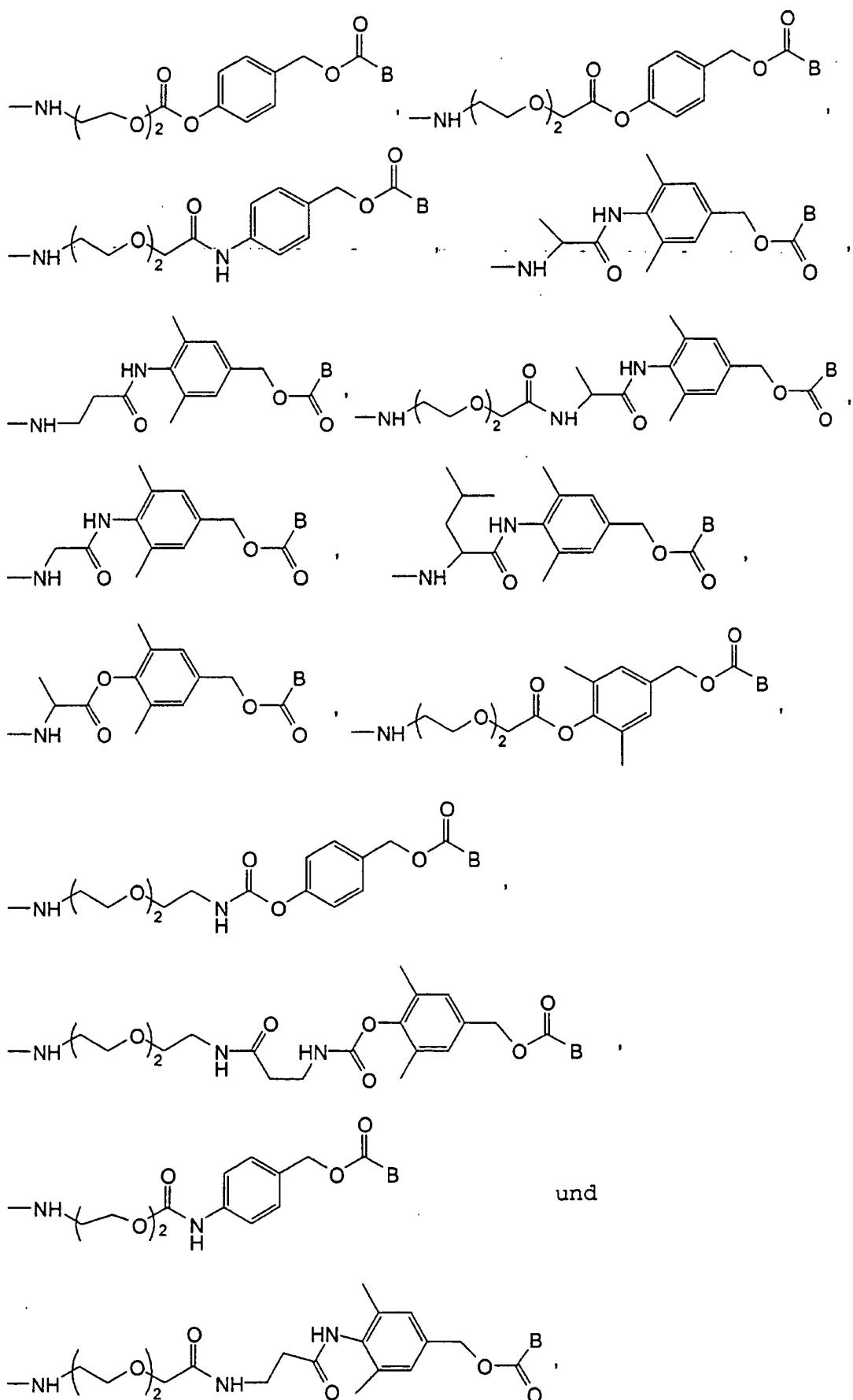
16. Verbindung gemäß Anspruch 1, worin L₂ ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus -CH₂-, -CH(CH₃)-, -CH₂C(O)NHCH(CH₃)-, -(CH₂)₂-, -CH₂C(O)NHCH₂-, -(CH₂)₂-NH-, -(CH₂)₂-NH-C(O)(CH₂)₂NH- und -CH₂C(O)NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)-.

17. Verbindung gemäß Anspruch 1, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:





worin R_1 ein PEG-Rest ist und D ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:



wobei B ein Rest eines Amins oder ein Hydroxyl enthaltender Wirkstoff ist.

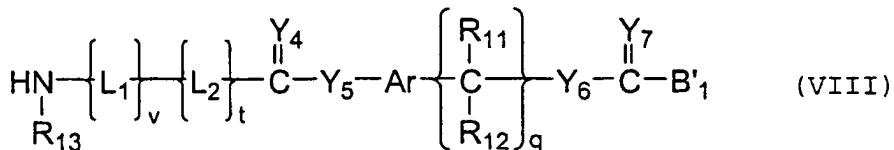
18. Verbindung gemäß Anspruch 17, worin B ein Rest eines Mitglieds der Gruppe bestehend aus Daunorubicin, Doxorubicin, p-Aminoanilinmustard (p-aminoaniline mustard), Melphalan, Ara-C (Cytosinarabinosid),

Leucin-Ara-C und Gemcitabin ist.

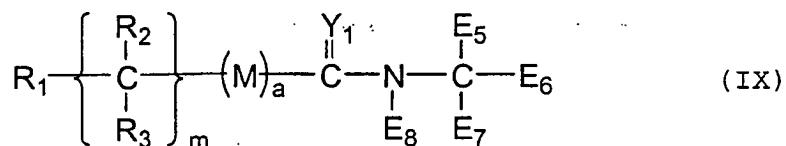
19. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend eine Prodrug-Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 18 und einen pharmazeutisch zulässigen Träger.

20. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 18 für die Verwendung in einem Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers.

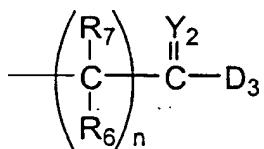
21. Verfahren zur Herstellung eines Polymerkonjugats umfassend die Reaktion einer Verbindung der Formel (VIII):



worin (v) und (t) unabhängig voneinander 0 oder eine positive ganze Zahl bis ungefähr 6 sind; L₁ und L₂ unabhängig voneinander ausgewählte bifunktionale Linker darstellen; Y₄₋₇ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus O, S und NR₁₄; R₁₁₋₁₄ sind unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, C₁₋₆-Alkyl, verzweigtem C₃₋₁₂-Alkyl, C₃₋₈-Cycloalkyl, substituiertem C₁₋₆-Alkyl; substituiertem C₃₋₈-Cycloalkyl, Aryl, substituiertem Aryl, Aralkyl, C₁₋₆-Heteroalkyl, substituiertem C₁₋₆-Heteroalkyl, C₁₋₆-Alkoxy, Phenoxy und C₁₋₅-Heteroalkoxy; Ar ist eine Einheit, die, wenn in Formel (I) enthalten, einen mehrfach substituierten aromatischen Kohlenwasserstoff oder eine mehrfach substituierte heterocyclische Gruppe bildet; und B'₁ ist ein Rest einer Hydroxyl- oder Amin-haltigen Einheit; mit einer Verbindung der Formel (IX):

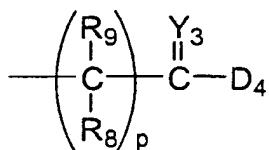


worin E₅



ist;

E₆₋₈ unabhängig voneinander H, E₅ oder



ist, wobei nicht alle E₆₋₈ H sind;

worin

D₃ und D₄ unabhängig voneinander OH, eine Abgangsgruppe, die zur Reaktion mit einem ungeschützten Amin oder Hydroxyl oder einer terminal verzweigten Gruppe wie in Anspruch 1 definiert geeignet ist, sind, wobei D₃ und D₄ nicht beide OH darstellen;

R₁ ist einpolymerer Rest;

Y₁ ist O, S oder NR₄;

M ist O, S oder NR₅;

(n) und (p) sind unabhängig voneinander 0 oder eine positive ganze Zahl;

Y₂₋₃ sind unabhängig voneinander O, S oder NR₁₀; und

R₂₋₁₀ sind unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, C₁₋₆-Alkyl, verzweigtem C₃₋₁₂-Alkyl, C₃₋₈-Cycloalkyl, substituiertem C₁₋₆-Alkyl, substituiertem C₃₋₈-Cycloalkyl, Aryl, substituiertem Aryl, Aralkyl, C₁₋₆-Heteroalkyl, substituiertem C₁₋₆-Heteroalkyl, C₁₋₆-Alkoxy, Phenoxy und C₁₋₆-Heteroalkoxy;

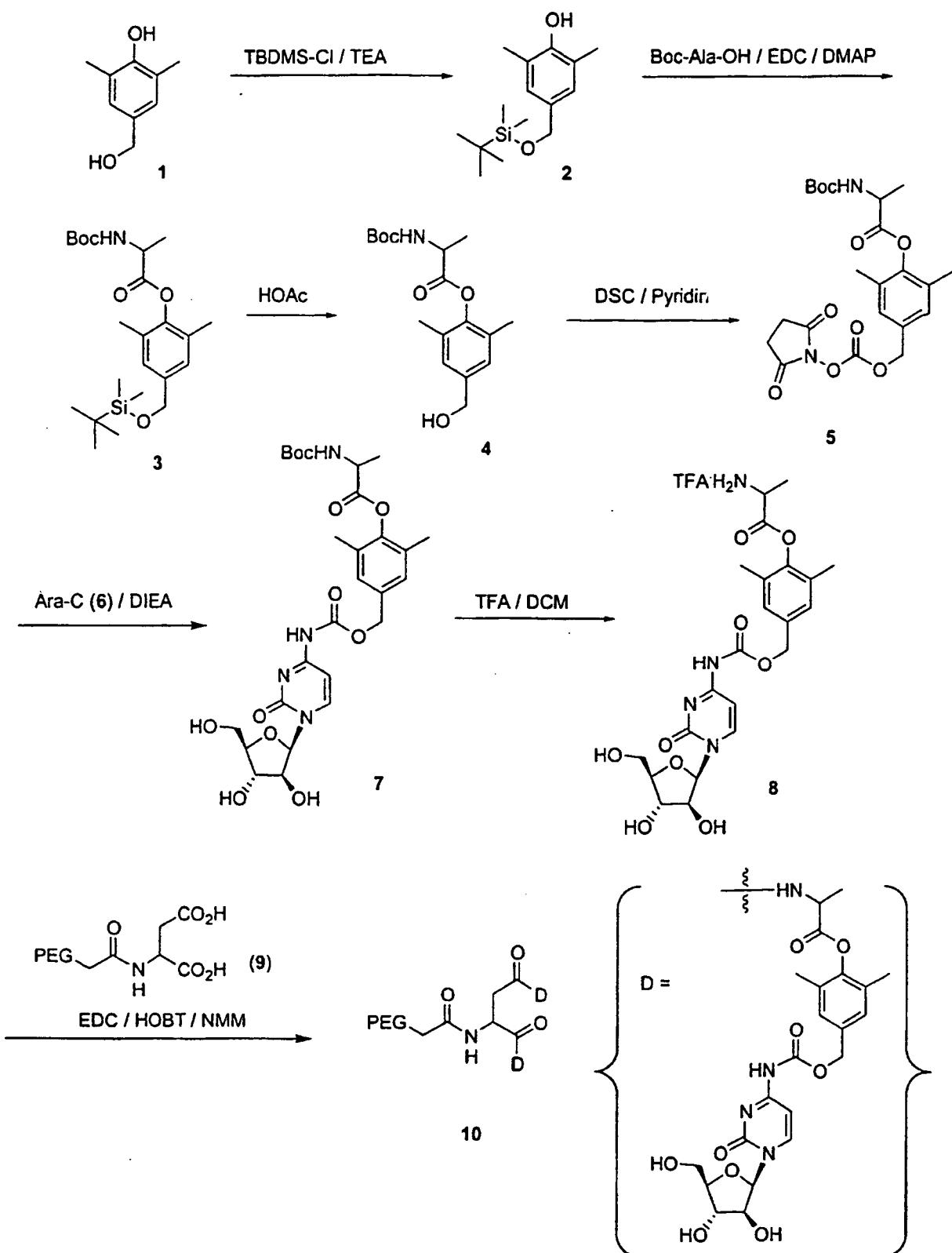
DE 602 23 499 T2 2008.10.16

unter Bedingungen, die geeignet sind, daß ein polymeres Konjugat gebildet wird.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Figur 1



Figur. 2

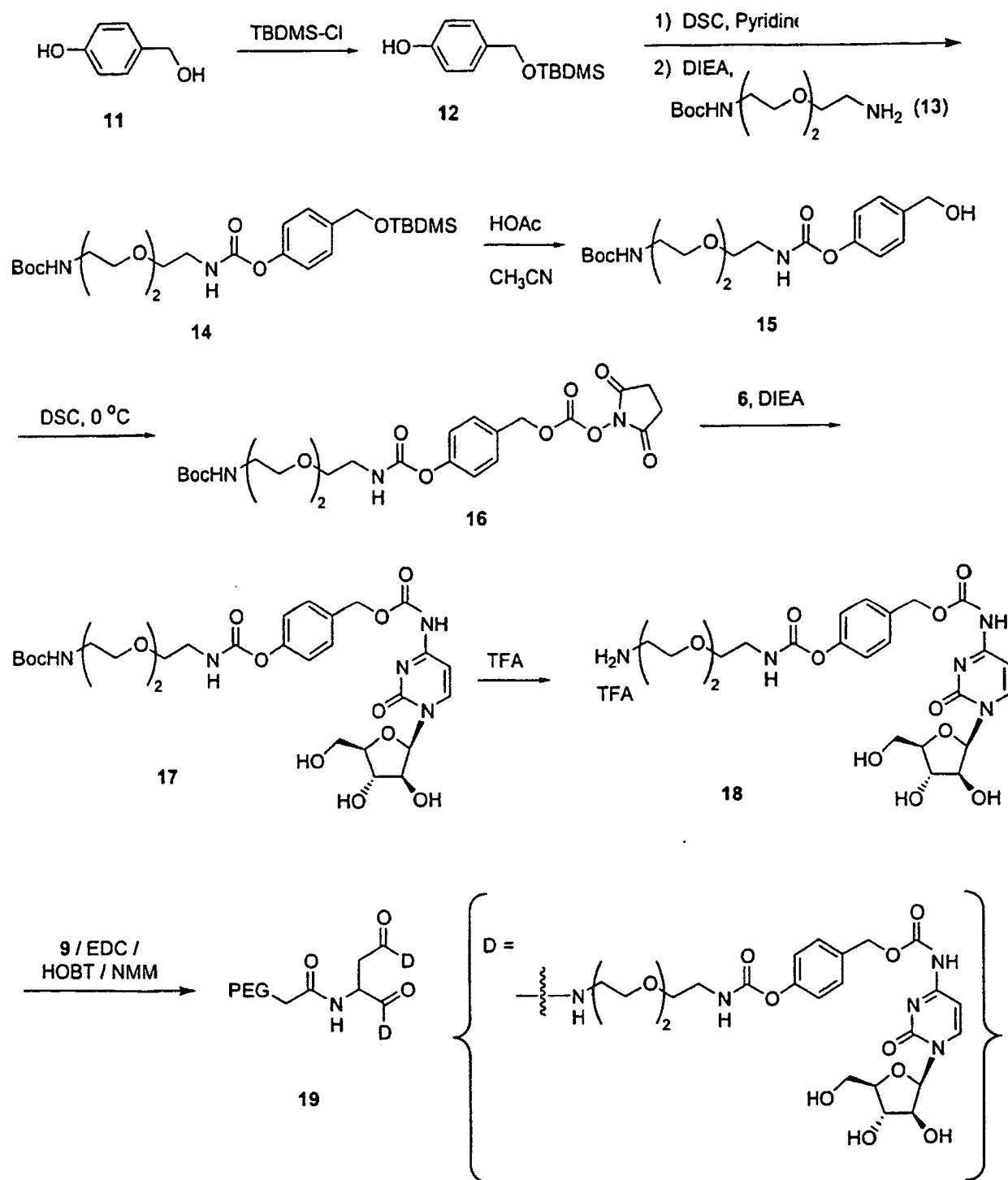


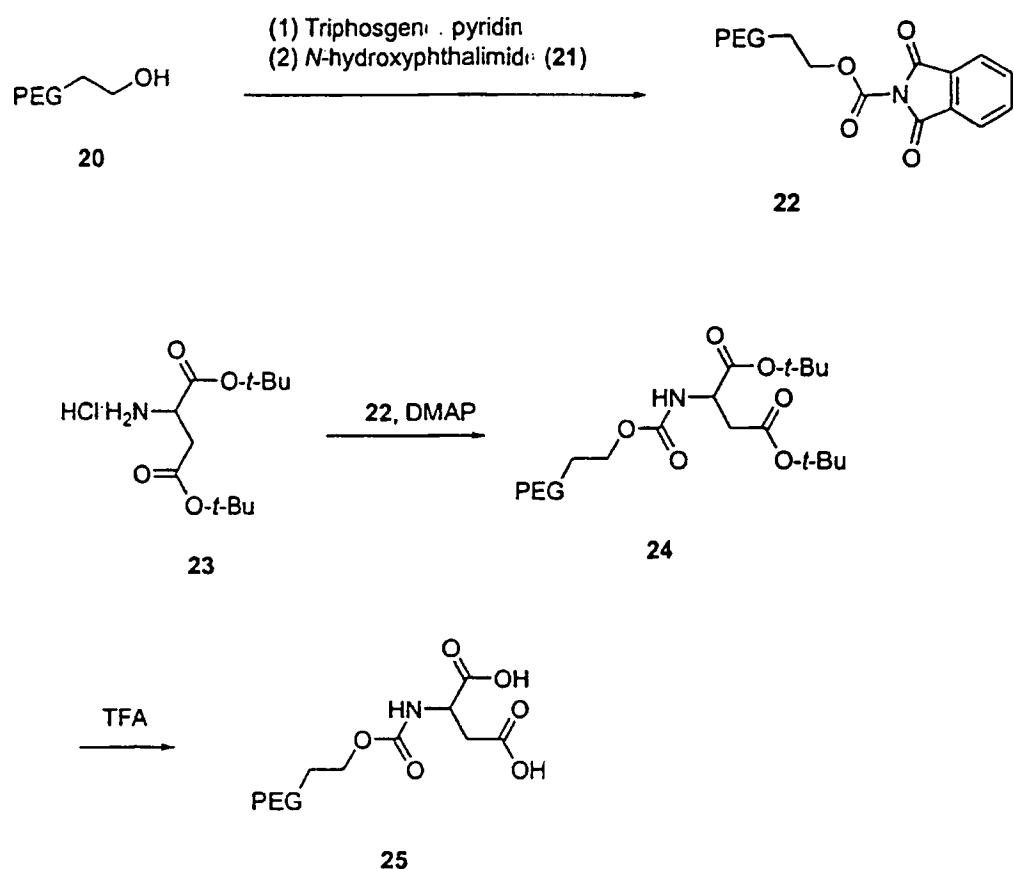
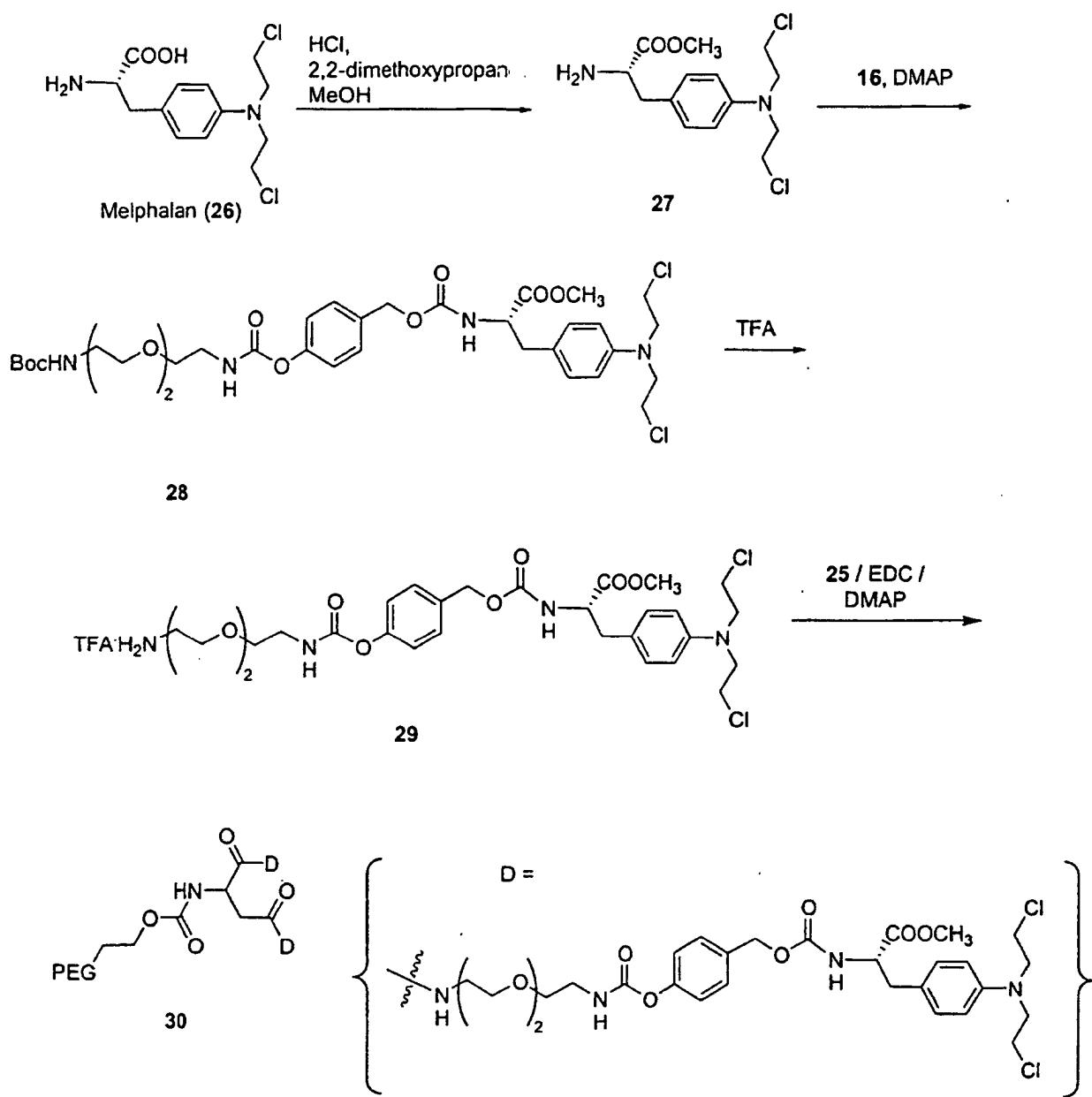
Figure 3

Figure 4

Figur. 5

