



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 30 217 T2** 2005.07.28

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 909 183 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 30 217.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/08867**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 926 723.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/044063**

(86) PCT-Anmeldetag: **22.05.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **27.11.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.04.1999**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **11.08.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **28.07.2005**

(51) Int Cl.⁷: **A61K 47/48**
A61P 35/00

(30) Unionspriorität:
651312 22.05.1996 US

(73) Patentinhaber:
Luitpold Pharmaceuticals, Inc., Shirley, N.Y., US

(74) Vertreter:
Patentanwälte
HANSMANN-KLICKOW-HANSMANN, 22767
Hamburg

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

(72) Erfinder:
BRADLEY, O., Matthews, Laytonsville, US;
SHASHOUA, E., Victor, Brookline, US; WEBB, L.,
Nigel, Bryn Mawr, US; SWINDELL, S., Charles,
Merion, US

(54) Bezeichnung: **DHA-PHARMAZEUTISCHES PRODUKT 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 eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

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

Beschreibung**Hintergrund der Erfindung**

[0001] Das Verbessern der Selektivität von Arzneimitteln für ein Zielgewebe ist ein anerkanntes Ziel in der Medizin. Im allgemeinen ist es erwünscht, ein Medikament selektiv an sein Ziel zu bringen, damit die Dosierung und, als Konsequenz, die Nebenwirkungen reduziert werden können. Dieses ist ganz besonders der Fall bei toxischen Agenzien wie es Krebsmedikamente sind, weil es oft die Nebeneffekte von Krebsmedikamenten auf gesundes Gewebe sind, die das Erreichen einer therapeutisch zur Krebsbekämpfung wirksamen Dosis einschränken. Die Probleme, die auf den Mangel an Selektivität zurückzuführen sind, lassen sich am Beispiel von Taxol® darstellen.

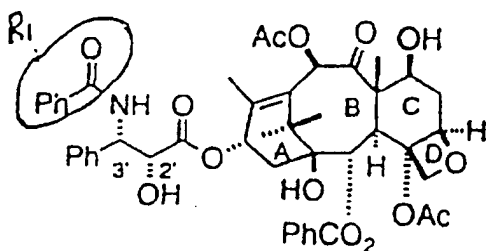
[0002] Taxol® (Paclitaxel) wurde zuerst 1971 aus der Rinde von *Taxus brevifolia* isoliert und wurde 1992 von der US-Lebens- und Arzneimittelbehörde für die Behandlung von metastasierendem Ovarialkrebs und später für Brustkrebs zugelassen. Es wird angenommen, daß sein Wirkungsmechanismus die Förderung der Bildung und eine Hyperstabilisierung von Mikrotubuli beinhaltet, wodurch der Abbau der Mikrotubuli verhindert wird, welcher für das Beenden der Zellteilung notwendig ist. Es ist ebenfalls berichtet worden, daß Taxol die Expression von Cytokinen induziert, die Aktivität von Kinasen beeinflusst, und Prozesse, die für die Metastasierung nötig sind, blockiert, durch bisher nicht charakterisierte Wirkungsmechanismen.

[0003] Taxol wurde eine ungewöhnlich starke wissenschaftliche Aufmerksamkeit gewidmet, nicht nur wegen seiner einzigartigen antiproliferativen Wirkungsweise, sondern auch weil es gegen nahezu alle Krebsformen, an denen es getestet wurde, wirksam ist und weil man über es herausfand, daß es ein Analogon vieler nahe verwandter natürlich vorkommender Substanzen ist. Diese Substanzen, die Taxane, sind nunmehr als neue Klasse von Antikrebsverbindungen erkannt worden.

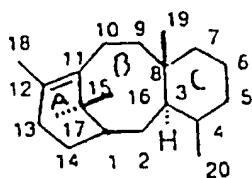
[0004] Die Wirksamkeit von Taxol gegenüber Krebsformen mit verschiedener Gewebeherkunft stellt auch einen gravierenden Nachteil dar. Ein idealer Wirkstoff gegen Krebs hat Gewebsspezifität, wodurch Nebeneffekte auf normale (sich teilende) Zellen minimiert werden. Daher sind Taxol-Analoga mit Gewebsspezifität erwünscht. Ein weiterer Nachteil von Taxol ist seine extreme Unlöslichkeit. Taxol kann effektiv in einem Lösungsmittel, welches Cremophor enthält, verabreicht werden, eine Kombination, die schwere hypersensitive Immunantworten provozieren kann. Als eine Folge dieser Nachteile, und ebenso als Folge der Möglichkeit, Taxol an vielen Stellen zu modifizieren, wie es von den natürlich vorkommenden Taxanen mit Anti-Krebs-Wirkung vorgemacht wird, wurde eine Suche nach stärker selektiven Taxanen begonnen.

[0005] Bis heute wurden mehr als 200 Taxane synthetisiert (oder isoliert) und in vitro oder in vivo auf Anti-Krebs Aktivität untersucht. Die Ergebnisse waren jedoch so enttäuschend, daß das Nationale Krebsinstitut (NCI) im allgemeinen nicht länger am Testen von Taxolanaloga interessiert ist. Grundsätzlich besteht bei Taxolanaloga das Problem der Löslichkeit, und/oder die Wirksamkeit ist deutlich vermindert, und/oder die Selektivität ist nicht verbessert, und/oder das Verhältnis der mittleren toxischen Dosis zur mittleren wirksamen Dosis ("therapeutischer Index") ist in unakzeptabler Weise vermindert.

[0006] Taxol weist die folgende Formel auf:



[0007] Taxane bestehen in der Grundstruktur aus drei Ringen (A, B und C), welche substituiert oder unsubstituiert sind. Die Kohlenstoffatome des Taxols werden konventionellerweise wie folgt nummeriert:



[0008] Auf Grundlage der bis heute untersuchten Taxane sind ebensoviele Fragen aufgeworfen worden wie beantwortet wurden, und allgemeine Regeln bezüglich der Vorhersagbarkeit von Selektivität, Aktivität und Löslichkeit konnten aus diesen Untersuchungen nicht leicht abgeleitet werden. Zum Ersten konnten keine Regeln hinsichtlich der Selektivität gefunden werden. Die Taxane, die eine hohe Aktivität haben, haben auch eine ebenso breite Aktivität wie Taxol, und es gibt anscheinend keinen Fortschritt, was die Entwicklung eines selektiveren Taxolanalogons betrifft.

[0009] Einige Informationen bezüglich der Aktivität wurden gefunden. Es wurde eine Vielzahl von Substitutionen an den Positionen C7, C9, C10, C19 und R1 und Kombinationen hiervon hergestellt, welche zur Beibehaltung einer beträchtlichen, aber gewöhnlich verringerten, Aktivität führten. Substitutionen an C2, C4 und 2'OH wurden jedoch grundsätzlich nicht toleriert. Diese Folgerungen sind nur Verallgemeinerungen, da, zum Beispiel, einige Substitutionen an C9-C10 (zyklische Derivate) nicht toleriert werden und einige Substitutionen an C2 (Meta-Substitutionen an der Phenylgruppe) toleriert werden. In ähnlicher Weise sind die C13-Seitenkette und insbesondere das 2'OH erforderlich, obwohl die Mindestanforderungen struktureller Art für die Seitenkette hinsichtlich therapeutischer Wirksamkeit nicht untersucht wurden.

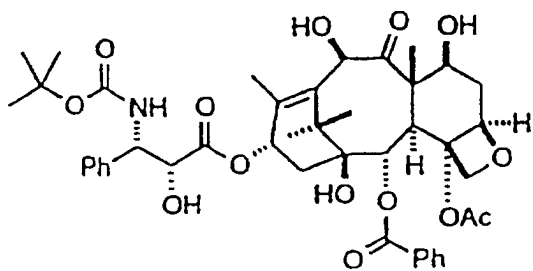
[0010] Die Versuche, die Löslichkeit von Taxol zu verbessern, haben nicht zu erfolgreichen klinischen Produkten geführt. Ein Ansatz war es, Pro-Pharmaka von Taxol herzustellen, welche in vivo in Taxol und ein anderes Produktumgewandelt werden. Es wurden Versuche unternommen, die C7 Hydroxy- und 2' Hydroxygruppen zu verestern, in der Hoffnung, daß die Bindung in Lösung stabil wäre (um eine bevorzugte Art der Verabreichung, i. v. über wenigstens 24 Stunden, zu erlauben), daß die Bindung in vivo jedoch leicht gespalten werden würde. Die getesteten Gruppen waren alle hydrophil und beinhalteten Amine, kurze Carboxylsäuren (unter Verwendung von z. B. Bernsteinsäureanhydrid und Glutarsäureanhydrid), Sulfonsäuren, Aminosäuren und Phosphate. Grundsätzlich war die Aktivität verringert, aber mit bestimmten Derivaten wurde ein gewisser Erfolg erzielt. Wiederum stellte sich kein bestimmtes Muster heraus, welches es erlaubt hätte, zuverlässig vorherzusagen, welche Gruppen an Taxol substituiert werden können, um ein therapeutisch einsetzbares Produkt zu erhalten, obwohl vorgeschlagen wurde, daß die 2'OH-Derivate sich leichter spalten würden als die C7-OH Derivate.

[0011] Verschiedene weitere Faktoren verschärfen das Problem der Vorhersage, welche Taxolanaloge wirksam sein werden. Mehrere Wirkungsmechanismen wurden in der Literatur vorgeschlagen, und eine Veränderung in einer Position mag keine Auswirkungen auf die Aktivität von einem solchen Mechanismus haben, während die Aktivität hinsichtlich eines anderen Mechanismus elimiert wird. Hinzu kommt, daß Änderungen, welche die Wirksamkeit positiv beeinflussen, die Bioverfügbarkeit gleichzeitig verschlechtern. Zum Beispiel beeinflusst Taxol die Mikrotubulubildung innerhalb einer Zelle, eine Änderung jedoch, welche die intrazelluläre Aktivität steigert, kann die Fähigkeit von Taxol, in die Zelle zu gelangen, verschlechtern. Es ist auch bekannt, daß Taxol an Proteine bindet, und die Folgen für die Wirksamkeit von Taxol, die aus einer Veränderung dieser Bindung von Taxol an Protein (bezüglich Konformation, zellulärer Absorption und Löslichkeit) resultieren, sind nicht bekannt.

[0012] Es wurde berichtet, daß Taxol, offenbar durch die Blut-Hirn-Schranke ausgeschlossen, nicht in das Gehirn gelangt. Die Gründe hierfür sind unbekannt, da Taxol als lipophile Substanz in Zellen gelangt und man daher erwarten könnte, daß es die Blut-Hirn-Schranke überschreitet.

[0013] Zu den vielversprechendsten der zweihundert getesteten Analoga gehört aufgrund seiner leicht gesteigerten Aktivität und Löslichkeit Taxotere (Docetaxel). Seltsamerweise jedoch, weicht Taxotere von Taxol an Stellen ab, welche die Aktivität normalerweise nicht stark beeinflussen, weshalb man aufgrund der Abweichungen die verbesserten Eigenschaften von Taxotere, auch im Nachhinein, nicht vorhersagen würde.

[0014] Taxotere weist die folgende Formel auf:



[0015] DHA (Docosahexaensäure) ist eine natürlich vorkommende, unverzweigte, Fettsäure mit 22 Kohlenstoffatomen, die bereits früher mit Medikamenten gekoppelt wurde, um dabei zu helfen, sie durch die Blut-Hirn-Schranke zu transportieren. DHA wird über die Säuregruppe an hydrophile Medikamente geknüpft und macht diese Medikamente stärker hydrophob (lipophil). DHA ist ein wichtiger Bestandteil des Gehirns und wurde kürzlich in Europa als Zusatzstoff für Säuglingsanfangsnahrung ("infant formula") zugelassen. Es ist in der Milch säugender Mütter vorhanden. Der Wirkungsmechanismus, durch den es an DHA konjugierten Medikamenten möglich ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überschreiten, ist unbekannt.

Zusammenfassende Darstellung der Erfindung

[0016] Die vorliegende Erfindung beinhaltet die unerwartete Entdeckung, daß Konjugate aus pharmazeutischen Mitteln und einer hochlipophilen Gruppe, einer unverzweigten C22-Kohlenstoffkette, eine, im Vergleich zu den unkonjugierten pharmazeutischen Mitteln, verschiedene Selektivität besitzen. Die Konjugate machen im allgemeinen die Aktivität dieser Präparate selektiv für Kolangewebe, Brustgewebe und Zentralnervengewebe ("Zielgewebe"). Ebenso unerwartet beschränken diese Konjugate, im Vergleich zu den unkonjugierten pharmazeutischen Mitteln, die Aktivität dieser Verbindungen auf Zelltypen innerhalb dieser Gewebekategorien. Weiterhin unerwartet, reduzieren diese Konjugate die Aktivität dieser Verbindungen bei Zelllinien aus Geweben, die nicht zum Dickdarm, zur Brust und zum Zentralnervensystem gehören, drastisch, wodurch potentielle Nebeneffekte der Konjugate, im Vergleich zu den unkonjugierten pharmazeutischen Wirkstoffen, vermindert werden. Der therapeutische Index der Konjugate kann im Vergleich zu den unkonjugierten pharmazeutischen Wirkstoffen, verbessert werden.

[0017] Nach einem Aspekt der Erfindung wird eine Zusammensetzung bereitgestellt, um ein Taxan gegen ein Nicht-Zentralnervengewebe zu richten, mit dem Ziel, einen Nicht-Zentralnervenzustand zu behandeln. Ein kovalentes Konjugat aus cis-Docosahexaensäure und einem pharmazeutischen Mittel (Pharmakon), das bei der Behandlung des Zustands wirksam ist, wird der einer Behandlung bedürftigen Person verabreicht. Vorzugsweise besteht das Konjugat nur aus cis-Docosahexaensäure und dem pharmazeutischen Mittel, wobei die cis-Docosahexaensäure direkt mit dem pharmazeutischen Mittel, ohne einen Linker, konjugiert ist, zum Beispiel über die Carboxylsäuregruppe der cis-Docosahexaensäure und eine reaktive Gruppe, wie zum Beispiel eine freie Amino- oder Hydroxylgruppe, des pharmazeutischen Mittels. In bevorzugten Ausführungsformen ist das Gewebe Brustgewebe, Gastrointestinalgewebe und Ovarialgewebe, und der Zustand erfordert die Behandlung von Brustgewebe, Gastrointestinalgewebe beziehungsweise Ovarialgewebe.

[0018] Die erfindungsgemäßen Konjugate können isolierte Konjugate sein. Ein isoliertes Konjugat ist eines, welches von anderen verschiedenen Docosahexaensäure-Pharmakon-Konjugaten getrennt ist.

[0019] Das pharmazeutische Mittel kann nach Wahl jedes pharmazeutische Mittel oder diagnostische Mittel sein. Hierin sind besonders die Taxane (z. B. Taxol und Taxotere) eingeschlossen. Konjugate aus cis-Docosahexaensäure und Taxoiden sind ebenfalls von der Erfindung umfaßt.

[0020] Cis-Docosahexaensäure ist bereits früher mit Medikamenten, die im Zentralnervensystem wirksam sind, konjugiert worden. Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von cis-Docosahexaensäure zur Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung eines Nicht-Zentralnervenzustands. Weiterhin betrifft die Erfindung Stoffzusammensetzungen, die kovalente Konjugate aus cis-Docosahexaensäure und nicht im Zentralnervensystem wirksames pharmazeutischen Mitteln sind. Ein nicht im Zentralnervensystem wirksames pharmazeutisches Mittel ist eines, das keine Funktion oder Verwendung im Zentralnervensystem hat. Seine einzige therapeutische Verwendung liegt außerhalb des Zentralnervensystems. Beispiele solcher Wirkstoffe umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf: Blut-Glukoseregulatoren wie z. B. Tolazamid, Tolbutamid, Chlorpropamid, Acetohexamid und Glipizid; HMGC_oA-Reduktase-Inhibitoren wie Lovastatin (Mevacor), Simvastatin (Zocor), Pravastatin (Pravachol) und Fluvastatin (Lescol); Mukosaprotektantien wie Misoprostol (Cytotec); Stoffe, die die gastrointestinale Beweglichkeit beeinflussen wie Cisaprid (Propulsid), Metoclopramid (Reglan) und

Hyoscyamin (Levsin); Antidiarrhöe-Mittel wie Diphenoxylathydrochlorid (Lomotil), Metronidazol (Flagyl), Methylprednisolon (Medrol) und Sulfasalazin (Azulfidin); und Hormone um, unter anderem, Eierstockzustände zu behandeln, wie beispielsweise Progesteron, Norgestrel, Norethynodrel, Norethindron, Levonorgestrel, Ethynodiol, Mestranol, Estron, Equilin, 17-Alpha-Dihydroequilin, Equilenin, 17-Alpha-Dihydroequilenin, 17-Alpha-Östradiol, 27-Beta-Östradiol, Leuprolid (Lupron), Testolacton, Climiphen, Urofollitropin, Bromocriptin, Gonadorelin, Danazol, Dehydroepiandrosteron, Androstendion, Dihydrotestosteron, Relaxin, Folliculostatin, Follikelregulierendes Protein, Gonadocrinine, Oocytenreifungsinhibitor und der Insulinwachstumsfaktor. Weitere Stoffe sind weiter unten detailliert aufgeführt.

[0021] Die erfindungsgemäßen Verfahren und/oder Produkte sind geeignet zur Behandlung einer Vielzahl medizinischer Zustände einschließlich Zuständen, die eine abnorme Vermehrung von Säugerzellen beinhalten. Sie sind ferner geeignet zur Behandlung von Diabetes und deren Komplikationen, übermäßiger Säureausscheidung, kardiovaskuläre Zustände unter Beteiligung von Cholesterin (z. B. Hyperlipidämie und Hypercholesterinämie), Diarrhoe, Eierstockerkrankungen (z. B. Endometriose, Ovarialcysten etc.) und als empfängnisverhütende Mittel. Andere nach der Erfindung behandelbare Zustände werden für den Fachmann aufgrund auf Grundlage der Offenbarung und der bereitgestellten Liste von Verbindungen offensichtlich sein.

[0022] Die Verfahren und Produkte dieser Erfindung sind geeignet, um Zuständen, die spezifisch sind für nicht zum Zentralnervensystem gehörendes Gewebe, zu behandeln. Solche Zustände können spezifisch für Brustgewebe, Gastrointestinalgewebe oder Ovarialgewebe sein. Das Gewebe kann aber auch andere, nicht zum zentralen Nervensystem gehörendes Gewebe sein. Nicht-Zentralnervensystemgewebe schließt folgende Gewebe ein: Blut und blutbildendes System einschließlich Blutplättchen, Blutgefäßwände und Knochenmark; das Herzkreislaufsystem einschließlich Herz und Gefäßsystem; Verdauungs- und Exkretionssystem einschließlich des Verdauungskanals, der Gallenwege, der Niere, Leber, Bauchspeicheldrüse und der Harnwege; das endokrine System einschließlich Nebennieren, Niere, Ovar, Hypophyse, Nierendrüse, Speicheldrüse, Talgdrüse, Hoden, Thymusdrüse und Schilddrüse; das Muskelsystem einschließlich der den Körper bewegenden Muskulatur; das Reproduktionssystem einschließlich Brust, Eierstöcken, Penis und Uterus; das respiratorische System einschließlich Bronchien, Lunge und Luftröhre; das Skelett einschließlich der Knochen und Gelenke; Gewebe, Fasern und Integumentsystem einschließlich Fettgewebe, Knorpel, Bindegewebe, Oberhaut, Dermis, Epidermis, Epithel, Faszien, Haarfollikel, Bänder, Knochenmark, Melanin, Melanocyten, Schleimhäute, Haut, Weichteile, Gelenkkapseln und Sehnen.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0023] [Fig. 1](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Konjugat 1 gegen das prozentuale Wachstum von Leukämiezellen aufgetragen ist.

[0024] [Fig. 2](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Konjugat 1 gegen das prozentuale Wachstum von Nicht-Kleinzellenlungenkrebszellen aufgetragen ist.

[0025] [Fig. 3](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Konjugat 1 gegen das prozentuale Wachstum von Kolonkrebszellen aufgetragen ist.

[0026] [Fig. 4](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Konjugat 1 gegen das prozentuale Wachstum von Krebszellen des Zentralnervensystems aufgetragen ist.

[0027] [Fig. 5](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Konjugat 1 gegen das prozentuale Wachstum von Melanomzellen aufgetragen ist.

[0028] [Fig. 6](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Konjugat 1 gegen das prozentuale Wachstum von Ovarialkrebszellen aufgetragen ist.

[0029] [Fig. 7](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Konjugat 1 gegen das prozentuale Wachstum von Nierenkrebszellen aufgetragen ist.

[0030] [Fig. 8](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Konjugat 1 gegen das prozentuale Wachstum von Prostatakrebszellen aufgetragen ist.

[0031] [Fig. 9](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Konjugat 1 gegen das prozentuale Wachstum von Brustkrebszellen aufgetragen ist.

- [0032] [Fig. 10](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Konjugat 2 gegen das prozentuale Wachstum von Leukämiezellen aufgetragen ist.
- [0033] [Fig. 11](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Konjugat 2 gegen das prozentuale Wachstum von Nicht-Kleinzellenlungenkrebszellen aufgetragen ist.
- [0034] [Fig. 12](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Konjugat 2 gegen das prozentuale Wachstum von Kolonkrebszellen aufgetragen ist.
- [0035] [Fig. 13](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Konjugat 2 gegen das prozentuale Wachstum von Krebszellen des Zentralnervensystems aufgetragen ist.
- [0036] [Fig. 14](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Konjugat 2 gegen das prozentuale Wachstum von Melanomzellen aufgetragen ist.
- [0037] [Fig. 15](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Konjugat 2 gegen das prozentuale Wachstum von Ovarialkrebszellen aufgetragen ist.
- [0038] [Fig. 16](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Konjugat 2 gegen das prozentuale Wachstum von Nierenkrebszellen aufgetragen ist.
- [0039] [Fig. 17](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Konjugat 2 gegen das prozentuale Wachstum von Prostatakrebszellen aufgetragen ist.
- [0040] [Fig. 18](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Konjugat 2 gegen das prozentuale Wachstum von Brustkrebszellen aufgetragen ist.
- [0041] [Fig. 19](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Taxol gegen das prozentuale Wachstum von Leukämiezellen aufgetragen ist.
- [0042] [Fig. 20](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Taxol gegen das prozentuale Wachstum von Nicht-Kleinzellenlungenkrebszellen aufgetragen ist.
- [0043] [Fig. 21](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Taxol gegen das prozentuale Wachstum von Kolonkrebszellen aufgetragen ist.
- [0044] [Fig. 22](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Taxol gegen das prozentuale Wachstum von Krebszellen des Zentralnervensystems aufgetragen ist.
- [0045] [Fig. 23](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Taxol gegen das prozentuale Wachstum von Melanomzellen aufgetragen ist.
- [0046] [Fig. 24](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Taxol gegen das prozentuale Wachstum von Ovarialkrebszellen aufgetragen ist.
- [0047] [Fig. 25](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Taxol gegen das prozentuale Wachstum von Nierenkrebszellen aufgetragen ist.
- [0048] [Fig. 26](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Taxol gegen das prozentuale Wachstum von Prostatakrebszellen aufgetragen ist.
- [0049] [Fig. 27](#) ist eine Darstellung, in der die Konzentration von Taxol gegen das prozentuale Wachstum von Brustkrebszellen aufgetragen ist.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0050] Cis-Docosahexaensäure (cis-Docosahexaenoic acid, DHA) ist eine natürlich vorkommende Fettsäure. Sie ist eine unverzweigte Fettsäure mit sechs Doppelbindungen, die alle in der cis-Konformation vorliegen. Die Struktur ist wie folgt:



[0051] DHA kann zum Beispiel aus Fischöl extrahiert werden, oder chemisch synthetisiert werden. Diese Verfahren können jedoch trans-Isomere ergeben, deren Abtrennung schwierig und teuer ist, und die für den Einsatz beim Menschen aus Sicherheitsaspekten problematisch sein können. Das bevorzugte Herstellungsverfahren ist die biologische Synthese, um ausschließlich cis-Isomere zu erhalten. Die bevorzugte Quelle von DHA ist die Martek Biosciences Corporation in Columbia, Maryland, USA. Martek hat ein patentiertes Verfahren, um DHR unter Verwendung von Mikroalgen herzustellen, wobei diese Mikroalgen nur ein einziges Isomer synthetisieren, das Voll-cis-Isomer. Marteks Patent umfaßt die U.S. Pat. mit den Nummern 5,374,657; 5,492,938; 5,407,957 und 5,397,591.

[0052] DHA kommt auch in der Milch säugender Mütter vor, und Marteks Lizenznehmer hat in Europa die Zulassung von DHA als Nahrungsergänzungsmittel in Säuglingsanfangsnahrung erhalten.

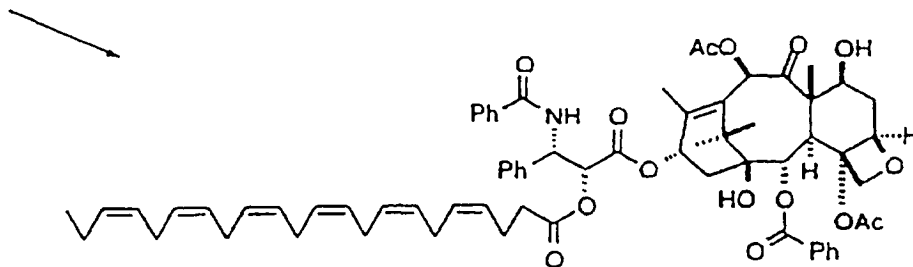
[0053] Es ist bekannt, daß DHA in Gegenwart von Sauerstoff instabil sein kann. Um DHA und seine Konjugate zu stabilisieren, ist es wichtig, dem Material nach seiner Synthese Antioxidantien hinzuzufügen. Ein Verfahren zur Stabilisierung besteht darin, neu synthetisiertes Material in folgender Lösung anzusetzen:

[0054] 100 g unverdünntes DHA-Taxol plus 100 g Trägersubstanz (100 ml Polyethylenglykol, 70 mg Alpha-Tocopherol, 5 mg Dilaurylthiodipropionsäure und 50 mg Ascorbinsäure) werden zubereitet und unter Argon in getönten versiegelten Fläschchen aufbewahrt, und bei vier Grad Celsius gelagert. Die folgenden Antioxidantien können ebenfalls eingesetzt werden: Ascorbinsäure, Ascorbylpalmitat, Dilaurylascorbat; Hydrochinon, butyriertes Hydroxianisol, Natriummetabisulfit, t-β Carotin und α-Tocopherol. Ein Schwermetallchelator wie zum Beispiel Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) kann ebenso verwendet werden.

[0055] Paclitaxel wurde zuerst aus der Rinde von *Taxus brevifolia* isoliert (Wani et al., J. Am. Chem. Soc., 93, 2325, 1971). Seine Isolierung und Synthese sind in der Literatur ausgiebig beschrieben worden. Die Antragsteller haben Paclitaxel von einer kommerziellen Quelle bezogen (Hauser Laboratories, Boulder, Colorado, USA).

Beispiel 1

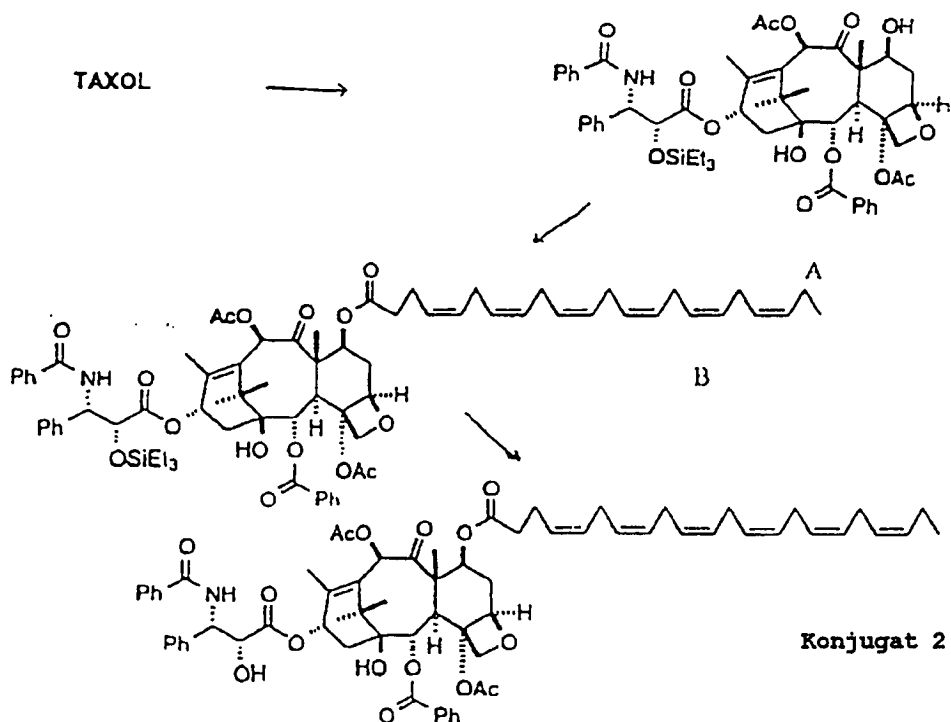
TAXOL



Konjugat 1

[0056] Eine unter Argon gehaltene Taxollösung (41 µmol) in Methylenchlorid (2,5 ml) wurde mit 4-Dimethylaminopyridin (41 µmol), Dicyclohexylcarbodiimid (82 µmol) und DHA (41 µmol) gemischt und die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur zwei Stunden lang gerührt. Nach Verdünnung mit Ether wurde die Reaktionsmischung mit 5%iger Salzsäure, mit Wasser und mit gesättigter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, getrocknet und aufkonzentriert. Radialchromatographie des Rückstandes ergab 45 mg (94%) kristallines Taxol-DHA Konjugat 1.

Beispiel 2



[0057] Die Herstellung von Analogon 2 involviert einige Schritte, die eine Reihe von Protektions-Acylierungs-Deprotektionsschritten beinhalten. Eine Taxollösung (59 μmol) in Methylenchlorid (2,5 ml) wurde bei Raumtemperatur unter Argon mit Imidazol (147 μmol) und Triethylsilylchlorid (147 μmol) gemischt. Die Reaktionsmischung wurde dreißig Minuten gerührt, danach mit zusätzlichem Methylenchlorid verdünnt, mit Wasser und mit gesättigter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, getrocknet und aufkonzentriert. Die Chromatographie des Rückstandes ergab 50 mg (88%) von Zwischenprodukt A und zusätzlich 5 mg des 2',7-Di(triethylsilyl)etherderivates. Eine Lösung von Zwischenprodukt A (52 μmol) in Methylenchlorid (3 ml) wurde bei Raumtemperatur unter Argon mit 4-Dimethylaminopyridin (52 μmol), Dicyclohexylcarbodiimid (104 μmol) und DHA (52 μmol) gemischt. Die Reaktionsmischung wurde zehn Stunden gerührt, mit Ether verdünnt, durch Celit gegeben und aufkonzentriert. Chromatographie des Rückstandes ergab 65,9 mg vom Zwischenprodukt B. Eine Lösung des Zwischenprodukts B (51 μmol) in Acetonitril (2 ml) wurde bei 0°C unter Argon mit 49%iger wässriger HF (0,2 ml) gemischt und die Reaktionsmischung für eine Stunde gerührt. Nach Verdünnung mit Ether wurde die Reaktionsmischung mit Wasser und danach mit gesättigter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, getrocknet und aufkonzentriert. Radialchromatographie des Rückstandes ergab 44,6 mg (75%) an Taxolkonjugat 2.

Beispiel 3

[0058] Die Konjugate 1 und 2 wurden an das Nationale US-Krebsinstitut (NCI) geschickt, um im NCI Anti-krebs-Screeningprogramm getestet zu werden. Die Konjugate wurden hierfür in ethanolischer Lösung bereitgestellt (näherungsweise 40 mg Analogon/2 ml Ethanol). Die Konjugate wurden in Fläschchen unter Argon eingeschlossen, um einen Kontakt der Konjugate mit Sauerstoff auszuschließen, da für die Konjugate Sauerstoffempfindlichkeit angenommen wurde. Es wurden Anweisungen bereitgestellt, die besagten, daß die Fläschchen bei 4°C zu lagern seien und nur unmittelbar vor dem experimentellen Einsatz zu öffnen seien. Weiterhin wurden Anweisungen beigefügt, die ethanolische Lösung, welche die Konjugate enthielt, entweder direkt zu verwenden, oder die Analoga in DMSO (Dimethylsulfoxid) auf geeignete Konzentrationen, ggf. mit Vortexen um eine adäquate Dispersion zu erreichen, weiter zu verdünnen.

[0059] Die Aktivität der Konjugate 1 und 2 wurde gegen 57 Krebszelllinien getestet. Die Ergebnisse sind in den [Fig. 1–Fig. 9](#) für Konjugat 1, in den [Fig. 10–Fig. 18](#) für Konjugat 2 und in den [Fig. 19–Fig. 27](#) für Taxol wiedergegeben. Um die Daten verständlich zu machen, sei auf die vom NCI bereitgestellten Informationen verwiesen, die im folgenden auszugsweise wiedergegeben sind:

Die berechnete Messung der Wirksamkeit: Prozent Wachstum (Percentage Growth, PG)

Die gemessene Wirkung der Verbindung auf eine Zelllinie wird gegenwärtig nach einem der beiden folgenden Ausdrücke berechnet:

Wenn $(\text{Mittlere OD}_{\text{Test}} - \text{Mittlere OD}_{\text{tNull}}) \geq 0$, dann

$$\text{PG} = 100 \times (\text{Mittlere OD}_{\text{Test}} - \text{Mittlere OD}_{\text{tNull}}) / (\text{Mittlere OD}_{\text{Ktrl}} - \text{Mittlere OD}_{\text{tNull}})$$

Wenn $(\text{Mittlere OD}_{\text{Test}} - \text{Mittlere OD}_{\text{tNull}}) < 0$, dann

$$\text{PG} = 100 \times (\text{Mittlere OD}_{\text{Test}} - \text{Mittlere OD}_{\text{tNull}}) / \text{Mittlere OD}_{\text{tNull}}$$

[0060] Hierbei sind:

[0061] Mittlere OD_{tNull} = Das Mittel von Messungen der optischen Dichte einer durch SRB (Sulforhodamin B) bedingten Färbung, direkt bevor die Zellen der Testsubstanz ausgesetzt werden.

[0062] Mittlere OD_{Test} = Das Mittel von Messungen der optischen Dichte von SRB-bedingter Färbung 48 Stunden nachdem die Zellen der Testsubstanz ausgesetzt wurden.

[0063] Mittlere OD_{Ktrl} = Das Mittel von Messungen der optischen Dichte von SRB-bedingter Färbung nach 48 Stunden, ohne daß die Zellen der Testsubstanz ausgesetzt wurden.

[0064] Die Versuchsdaten wurden für jede Zelllinie aufgenommen... Jede Konzentration wird ausgedrückt als \log_{10} (Molar oder $\mu\text{g/ml}$)... Die Antwortparameter G150, TGI (Total Growth Inhibition, Gesamte Wachstums-hemmung) und LC50 sind interpolierte Werte, welche die Konzentration angeben, bei der PG +50,0 bzw. -50,0 ist. Manchmal können diese Antwortparameter nicht durch Interpolation gewonnen werden. Wenn zum Beispiel alle PG-Werte einer gegebenen Versuchsreihe den Wert +50 überschreiten, kann keiner der drei Parameter durch Interpolation erhalten werden. In einem solchen Falle entspricht der angegebene Wert der Antwortparameter dem der höchsten getesteten Konzentration. ... Diese Vorgehensweise wird in ähnlicher Weise auf weitere mögliche Umstände ausgeweitet, unter denen ein Antwortparameter nicht durch Interpolation bestimmt werden kann.

Dosis-Wirkungs-Kurven

[0065] Die Seite mit den Dosis-Wirkungs Kurven des Datenanhanges wird durch Auftragen der jeweiligen PG-Werte gegen den \log_{10} der entsprechenden Wirkstoffkonzentration für jede Zelllinie erhalten. Die Kurven für die einzelnen Zelllinien sind in Rahmen gruppenweise zusammengefasst. Die PG-Werte von +50,0; 0 und -50,0 werden durch horizontale Linien repräsentiert. Die Konzentrationen, die den Schnittpunkten der Kurven mit diesen horizontalen Linien entsprechen, sind die jeweiligen G150, TGI und LC50 Werte.

[0066] Mehrere wichtige Unterschiede sind aus den Daten ersichtlich. Als wichtigster Punkt fällt auf, daß die Muster der Anti-Krebs-Aktivität sich für die Konjugate 1 und 2 von denen des Taxols unterscheiden. Unter einem Gesichtspunkt sind die Konjugate 1 und 2 Antikrebsmittel für eine eingeschränkere Gruppe von Krebszelllinien. So waren die Konjugate 1 und 2 zum Beispiel gegen die sechs getesteten Leukämie-Zelllinien nicht sehr wirksam, wohingegen Taxol eine gewisse Wirkung gegen die vier Leukämie-Zelllinien hatte, gegen die es getestet wurde (siehe [Fig. 1](#), [Fig. 10](#) und [Fig. 19](#)).

[0067] Die relative Wirksamkeit gegen Mitglieder innerhalb einer Krebsklasse war ebenfalls unterschiedlich. Zum Beispiel war Taxol bei TGI (horizontale Linie bei Null in den Figuren) wirksamer gegen die Nicht-Kleinzellenkrebszelllinie H522 als gegen H460 (um etwa drei Zehnerpotenzen), wohingegen die Konjugate 1 und 2 gegen H460 etwas wirksamer waren als gegen H522. Als ein weiteres Beispiel war Taxol bei TGI am wenigsten gegen CNSU251 wirksam, wohingegen Konjugat 1 gegen CNSU251 sehr stark und Konjugat 2 gegen CNSU251 ebenfalls stark wirksam war (relativ zu anderen CNS-Zelllinien). Als ein weiteres Beispiel war die Aktivität bei allen getesteten Konzentrationen gegen MDA-N- und MDA-MB-435-Brustkrebszelllinien äquivalent, die Konjugate 1 und 2 hingegen waren bei allen getesteten Konzentrationen gegen MDA-N wirksamer als gegen MDA-MB-435.

[0068] Um die Unterschiede der Aktivitäten der Konjugate 1 und 2 gegenüber Taxol noch weiter herauszuarbeiten, unterwarf das NCI die Daten einer vom NCI erstellten statistischen Analyse zur Darstellung der unterschiedlichen Wirkungsmuster von Antikrebsmitteln. Hiernach haben die Konjugate 1 und 2 ein statistisch vom Taxol verschiedenes Wirkungsmuster in dieser einzigartigen NCI-Messung.

[0069] Es sei ebenfalls darauf hingewiesen, daß die Konjugate 1 und 2 im allgemeinen ein- bis zehntausend

Mal weniger stark als Taxol gegen viele untersuchte Zelllinien wirkten. Diese Verminderung der Aktivität ist wesentlich, insbesondere weil die Konjugate 1 und 2 gegenüber einigen Zelllinien eine starke Aktivität behielten. Die Konjugate 1 und 2 werden gegen manche Zelllinien eine hinreichend hohe Aktivität besitzen, werden jedoch, im Durchschnitt, gegen andere Zelllinien eine wesentlich und unproportional verminderte Aktivität zeigen, was mögliche Nebenwirkungen verringert. Zum Beispiel liegt der TGI von Taxol gegen CNS SF-539 bei -6,95, der TGI von Konjugat 1 gegen diese Zelllinie ist -5,13 und der von Konjugat 2 ist -5,53. (Mit anderen Worten ist die Aktivität der Konjugate gegenüber Taxol um weniger als zwei Zehnerpotenzen verringert). Der GI50 von Taxol gegen CNS SF-539 liegt bei -7,52, die GI50-Werte der Konjugate 1 und 2 hingegen betragen -6,22 bzw. -5,56 (wiederum weniger als zwei Größenordnungen Unterschied). Im Gegensatz hierzu hat Taxol gegen die Zelllinie CNS SF-268 einen GI50 von weniger als -10,0, die Konjugate 1 und 2 hingegen haben gegen CNS SF-268 GI50 Werte von 5,36 bzw. 5,28. Dieses entspricht einer Verringerung der Aktivität der Konjugate gegenüber Taxol um mindestens rund 5 Größenordnungen! Im Mittel liegen die GI50-Werte für Taxol über alle untersuchten Zelllinien bei wenigstens -9,19. (Der Wert ist wahrscheinlich noch viel höher, da Konzentrationen unter -10 nicht untersucht wurden, und sofern Taxol bei -10 aktiv war, wurde -10 (anstelle des tatsächlich noch niedrigeren Wertes) zur Berechnung des Mittelwertes von -9,19 herangezogen. Dieser Fall kam 27mal vor). Die mittleren GI50-Werte für die Konjugate 1 und 2 lagen andererseits bei 5,49 bzw. 5,22. Daher beträgt der Aktivitätsunterschied von Taxol verglichen mit den Konjugaten mindestens zwischen 3 bis 4 Größenordnungen. Aus diesem Grund ist aus dem starken Aktivitätsverlust der Konjugate gegen viele Zelllinien bei einer gleichzeitigen weniger ausgeprägten Verminderung der Aktivität gegen andere Zelllinien eine Verminderung der Nebenwirkungen der Konjugate gegenüber Taxol bei einer wirksamen Dosis zu erwarten.

[0070] Andere Krebsformen als ZNS-, Brust- und Dickdarmkrebs können behandelt werden. Zum Beispiel gab es Aktivität gegen Nicht-Kleinzellenlungenkrebszellen Zellen, Melanomzellen und Ovarialkrebszellen. Diese Aktivität war relativ gering und war extrem spezifisch, was die generelle Verwendbarkeit der Konjugate für die Behandlung solcher Krebsformen einschränkt. Auf jeden Fall könnten Krebspatienten untersucht werden, um festzustellen, ob ein Konjugat gegen den Krebs des Patienten stark wirksam ist, bevor man die Konjugate als Antikrebsmittel der Wahl für diesen Patienten auswählt.

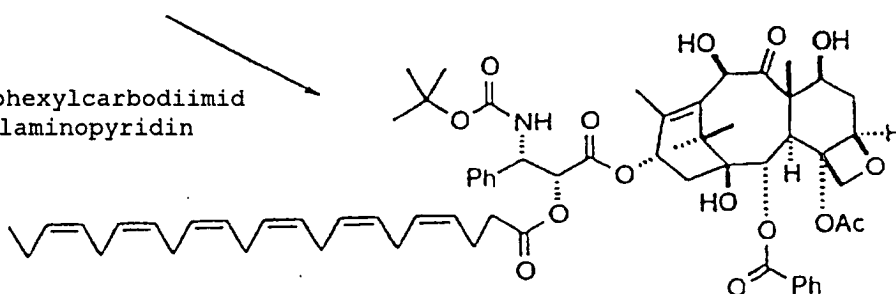
[0071] Die vorangegangenen Experimente stellen fest, daß DHA-Analoga eine verglichen mit Taxol andere Spezifität gegen Krebszelllinien haben. Aufgrund dieser veränderten Spezifität ist es offensichtlich, daß die Konjugate selber in die Zellen gelangen (statt einfach Taxol in die Umgebung der Zellen freizusetzen). So scheint die DHA-Gruppe, verglichen mit anderen, selektiv auf bestimmte Zelltypen zu zielen. Die Fähigkeit der Konjugate, Zugang in die Zellen zu erlangen, war vor dieser Erfindung unbekannt, und die Fähigkeit der DHA-Gruppe, selektiv auf bestimmte Zelltypen zu zielen, war unerwartet.

[0072] Das Gleiche gilt für kovalente DHA-Taxotere-Konjugate, wofür entsprechende Beispiele weiter unten aufgeführt werden. Die Synthese von Taxotere ist in der Literatur ausgiebig dargestellt worden. Ein Beispiel ist Kanazawa, A. et al., J. Organic Chemistry, 1994, Vol. 59 pp 1238-1240.

Beispiel 4

TAXOTERE

DHA / Dicyclohexylcarbodiimid
4-Dimethylaminopyridin

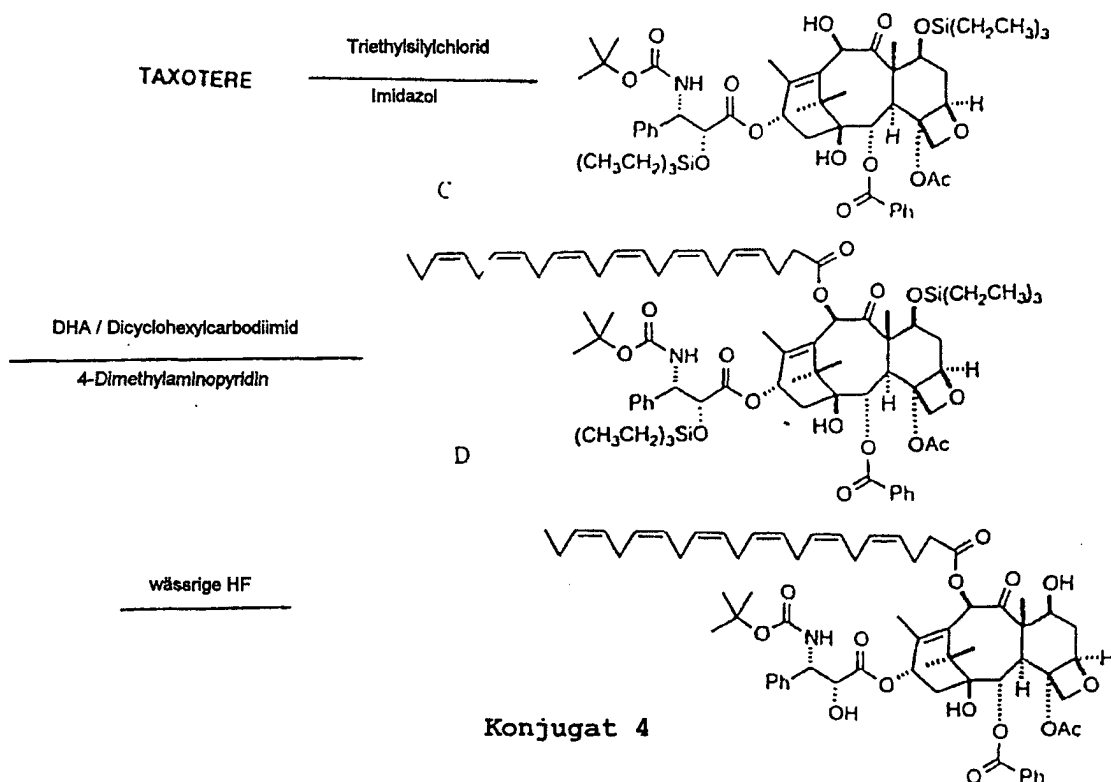


Konjugat 3

[0073] Eine Lösung von Taxotere in Methylenchlorid wird unter Argon mit 4-Dimethylaminopyridin, Dicyclohexylcarbodiimid und DHA gemischt. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur gerührt. Der Rückstand

ergibt nach Radialchromatographie das Taxotere-DHA-Konjugat 3.

Beispiel 5



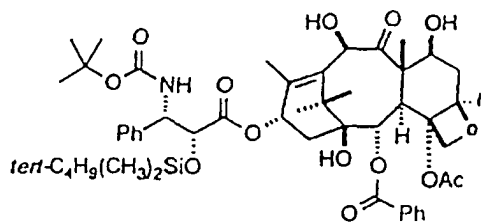
[0074] Eine Lösung von Taxotere in Dimethylformamid wird bei Raumtemperatur unter Argon mit Imidazol und Triethylsilylchlorid gemischt. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur gerührt, mit Methylenchlorid verdünnt, mit Wasser und danach mit gesättigter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, getrocknet und aufkonzentriert. Radialchromatographie des Rückstandes ergibt das Zwischenprodukt C. Eine Lösung des Zwischenprodukts C in Methylenchlorid wird bei Raumtemperatur unter Argon mit 4-Dimethylaminopyridin, Dicyclohexylcarbodiimid und DHA gemischt. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur gerührt, mit Ether verdünnt, durch Celit gegeben und aufkonzentriert. Radialchromatographie des Rückstandes ergibt das Zwischenprodukt D. Eine Lösung des Zwischenprodukts D in Acetonitril wird bei 0°C unter Argon mit 49%iger wässriger HF gemischt und die Reaktionsmischung bei der gleichen Temperatur gerührt. Nach Verdünnen mit Ether wird die Reaktionsmischung mit Wasser und gesättigter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, getrocknet und aufkonzentriert. Radialchromatographie des Rückstandes ergibt das Taxotere-DHA-Konjugat 4.

Beispiel 6

TAXOTERE

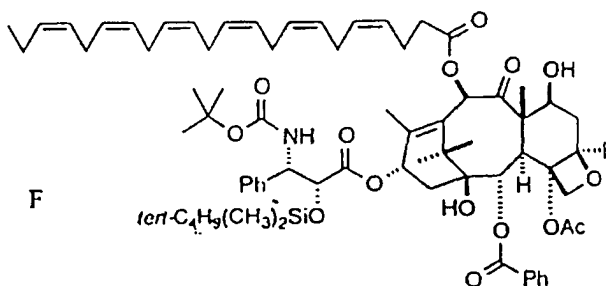
tert-Butyldimethylsilylchlorid

Imidazol

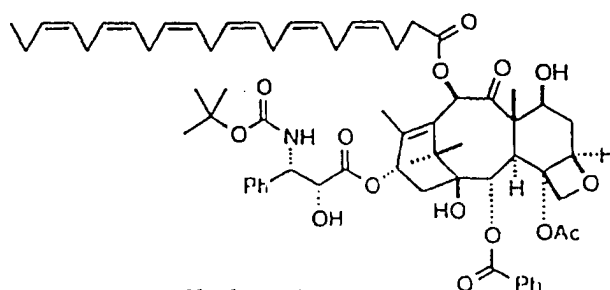


E

1 Äquivalent DHA

Dicyclohexylcarbodiimid
4-Dimethylaminopyridin

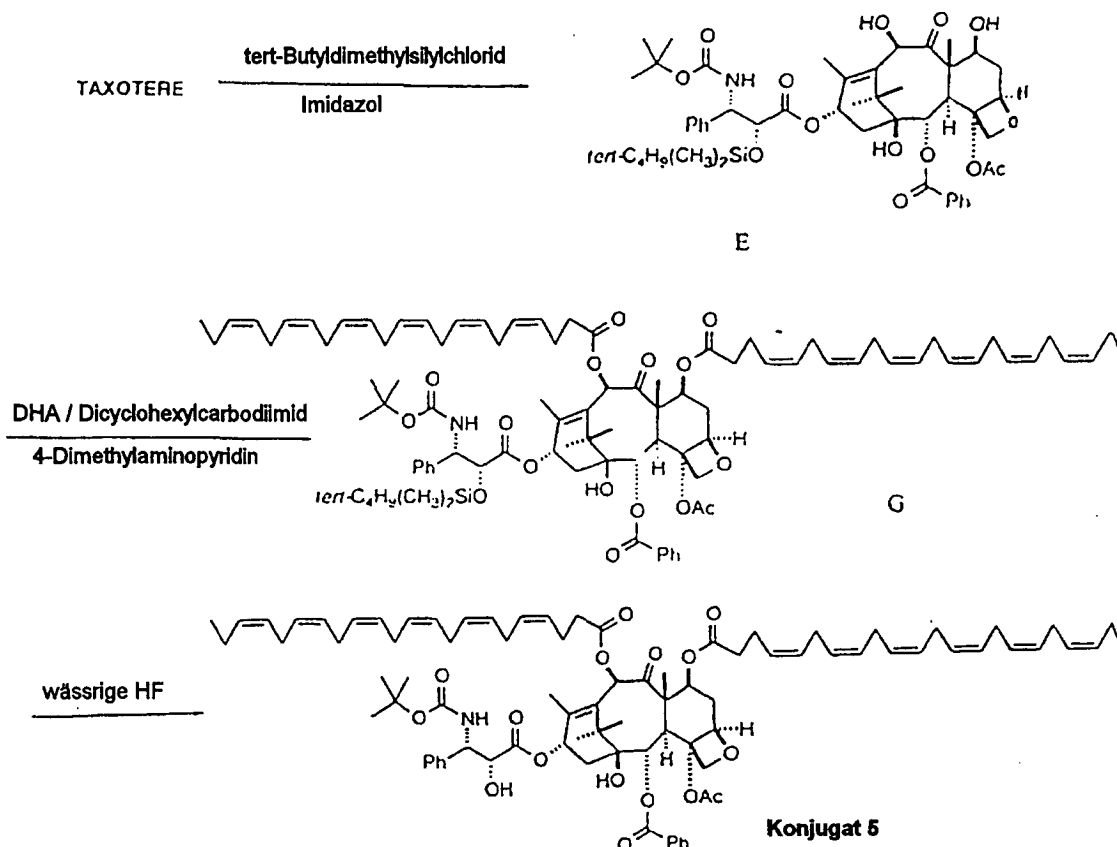
F

wässrige HF

Konjugat 4

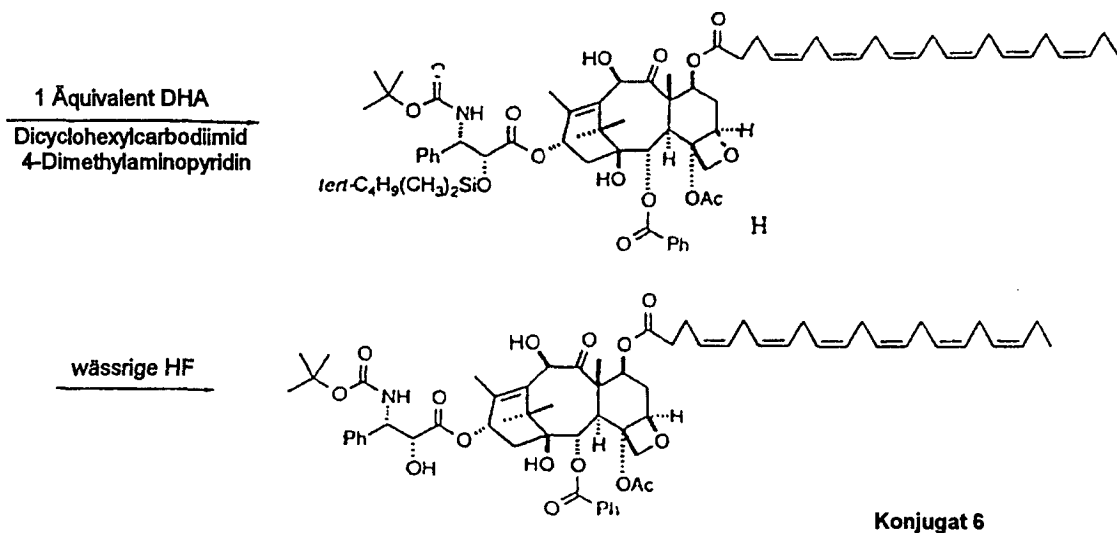
[0075] Eine Lösung von Taxotere in Dimethylformamid wird bei Raumtemperatur unter Argon mit Imidazol und tert-Butyldimethylsilylchlorid gemischt. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur gerührt, mit Methylchlorid verdünnt, mit Wasser und danach gesättigter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, getrocknet und aufkonzentriert. Radialchromatographie des Rückstandes ergibt das Zwischenprodukt E. Eine Lösung des Zwischenprodukts E in Methylchlorid wird bei Raumtemperatur unter Argon mit 4-Dimethylaminopyridin, Dicyclohexylcarbodiimid und einem Äquivalent DHA gemischt. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur gerührt, mit Ether verdünnt, durch Celit gegeben und aufkonzentriert. Radialchromatographie des Rückstandes ergibt das Zwischenprodukt F. (Ein Zwischenprodukt H wird hierbei ebenfalls gewonnen und in Beispiel 8 weiter unten verwendet). Eine Lösung des Zwischenprodukts F in Acetonitril wird bei 0°C unter Argon mit 49%iger wässriger HF gemischt und die Reaktionsmischung bei der gleichen Temperatur gerührt. Nach Verdünnen mit Ether wird die Reaktionsmischung mit Wasser und gesättigter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, getrocknet und aufkonzentriert. Radialchromatographie des Rückstandes ergibt das Taxotere-DHA-Konjugat 4.

Beispiel 7



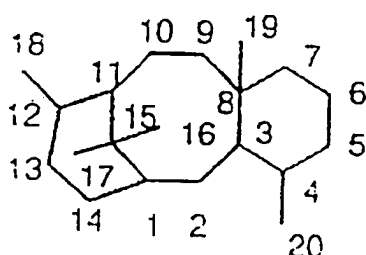
[0076] Eine Lösung von Taxotere in Dimethylformamid wird bei Raumtemperatur unter Argon mit Imidazol und tert-Butyldimethylsilylchlorid gemischt. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur gerührt, mit Methylenchlorid verdünnt, mit Wasser und danach gesättigter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, getrocknet und aufkonzentriert. Radialchromatographie des Rückstandes ergibt das Zwischenprodukt E. Eine Lösung von Zwischenprodukt E in Methylenchlorid wird bei Raumtemperatur unter Argon mit 4-Dimethylaminopyridin, Dicyclohexylcarbodiimid und DHA gemischt. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur gerührt, mit Ether verdünnt, durch Celit gegeben und aufkonzentriert. Radialchromatographie des Rückstandes ergibt das Zwischenprodukt G. Eine Lösung des Zwischenprodukts G in Acetonitril wird bei 0°C unter Argon mit 49%iger wässriger HF gemischt und die Reaktionsmischung bei der gleichen Temperatur gerührt. Nach Verdünnen mit Ether wird die Reaktionsmischung mit Wasser und gesättigter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, getrocknet und aufkonzentriert. Radialchromatographie des Rückstandes ergibt das Taxotere-DHA-Konjugat 5.

Beispiel 8



[0077] Eine Lösung von Taxotere in Dimethylformamid wird bei Raumtemperatur unter Argon mit Imidazol und tert-Butyldimethylsilylchlorid gemischt. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur gerührt, mit Methylenchlorid verdünnt, mit Wasser und danach gesättigter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, getrocknet und aufkonzentriert. Radialchromatographie des Rückstandes ergibt das Zwischenprodukt E. Eine Lösung von Zwischenprodukt E in Methylenchlorid wird bei Raumtemperatur unter Argon mit 4-Dimethylaminopyridin, Dicyclohexylcarbodiimid und einem Äquivalent DHA gemischt. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur gerührt, mit Ether verdünnt, durch Celit gegeben und aufkonzentriert. Radialchromatographie des Rückstandes ergibt das Zwischenprodukt H (und das Zwischenprodukt F welches weiter oben in Beispiel 6 verwendet wurde). Eine Lösung des Zwischenprodukts H in Acetonitril wird bei 0°C unter Argon mit 49%iger wässriger HF gemischt und die Reaktionsmischung bei der gleichen Temperatur gerührt. Nach Verdünnen mit Ether wird die Reaktionsmischung mit Wasser und gesättigter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, getrocknet und aufkonzentriert. Radialchromatographie des Rückstandes ergibt das Taxotere-DHA-Konjugat 6.

[0078] So wie hier verwendet ist ein Taxan ein Molekül, welches das folgende trizyklische Kohlenstoffatomgerüst besitzt, welches Kohlenstoff-Kohlenstoff-Mehrfachbindungen besitzen kann und welches durch das Einbeziehen von Kohlenstoffatom-Nicht-Kohlenstoffatom-Bindungen Substituenten, funktionelle Gruppen und zusätzliche Ringe einschließen kann.



[0079] Ein Taxoid ist ein mit den Taxanen strukturell verwandtes Molekül, in welchem das oben gezeigte Taxan-Kohlenstoffgerüst verändert ist, zum Beispiel durch Abspaltung eines oder mehrerer der Kohlenstoffringe, durch Wegfall oder Hinzufügen von Kohlenstoffsubstituenten, durch Verbinden von Kohlenstoffatomen, die normalerweise nicht miteinander verbunden sind, durch Trennen der Verbindung zwischen normalerweise verbundenen Kohlenstoffatomen, oder durch eine andere Art der Reorganisation des, oder Anpassung am Taxan-Kohlenstoffgerüst, bei der jedoch eine oder mehrere der Struktureigenschaften des Taxan-Kohlenstoffgerüsts erhalten bleiben.

[0080] Die für die Erfindung geeigneten Verbindungen können in Form eines Anti-Krebs-Cocktails verabreicht werden. Ein Anti-Krebs-Cocktail ist eine Mischung aus all den Verbindungen, die für die Erfindung geeignet sind, mit einem anderen Anti-Krebs-Mittel, wie zum Beispiel einem Krebsmedikament, einem Cytokin, und/oder ergänzenden wirkungssteigernden Agenzien. Der Einsatz von Cocktails in der Krebsbehandlung ist Routine. In diesem Ausführungsbeispiel würde ein übliches Vehikel zur Verabreichung (z. B. eine Pille, Tablette, ein Implantat, eine injizierbare Lösung usw.) sowohl das für die Erfindung geeignete Konjugat als auch ein Anti-Krebs-Medikament und/oder einen zusätzlichen wirkungssteigernden Stoff enthalten.

[0081] Die Wirkstoffe dieser Erfindung werden, wenn sie in Cocktails verwendet werden, in therapeutisch wirksamen Mengen verabreicht. Eine therapeutisch wirksame Menge wird durch die weiter unten beschriebenen Parameter bestimmt; in jedem Fall ist diese Dosis jedoch so hoch, daß die Konzentration am Ort des Tumors eine Höhe erreicht, die zur Hemmung des Tumorwachstums wirksam ist.

[0082] Bei der Verabreichung werden die Formulierungen der Erfindung in pharmazeutisch annehmbaren Mengen und Zusammensetzungen eingesetzt. Solche Zubereitungen können regelhaft Salze, Puffer, Schutzstoffe, kompatible Träger und optional weitere therapeutische Bestandteile enthalten. Bei Einsatz in Medikamenten sollten die Salze pharmazeutisch annehmbar sein, es können jedoch einfach pharmazeutisch nicht annehmbare Salze verwendet werden, um pharmazeutisch vertretbare Salze aus diesen herzustellen, so daß diese daher nicht aus dem Bereich der Erfindung ausgeschlossen sind. Solche pharmakologisch und pharmazeutisch annehmbaren Salzen schließen die aus den folgenden Säuren hergestellten ein, sind jedoch nicht auf diese begrenzt: Salzsäure, Bromwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Salpetersäure, Phosphorsäure, Äpfelsäure, Essigsäure, Salicylsäure, p-Toluolsulfonsäure, Weinsäure, Zitronensäure, Methansulfonsäure, Ameisensäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Naphthalin-2-Sulfonsäure, und Benzolsulfonsäure. Pharmazeutisch vertretbare Salze können außerdem als Alkali- oder Erdalkalimetallsalze, wie zum Beispiel Natrium-, Kalium- oder Calciumsalze hergestellt werden.

[0083] Geeignete Puffermittel beinhalten: Essigsäure und ein Salz (1–2% w/v); Zitronensäure und ein Salz (1–3% w/v), Borsäure und ein Salz (0,5–2,5% w/v), und Phosphorsäure und ein Salz (0,8–2% w/v).

[0084] Geeignete Konservierungsmittel schließen Benzalkoniumchlorid (0,003–0,03% w/v), Chlorbutanol (0,3–0,9% w/v); Paraben (0,01–0,25% w/v) und Thimerosal (0,004–0,02% w/v) ein.

[0085] Die erfindungsgemäßen wirksamen Verbindungen können eine pharmazeutische Zusammensetzung mit einer therapeutisch wirksamen Menge eines erfindungsgemäßen Konjugates sein, optional eingeschlossen in einen pharmazeutisch annehmbaren Träger, sein. Der hier verwendete Begriff "pharmazeutisch annehmbarer Träger" bedeutet einen oder mehrere kompatible feste oder flüssige Füllstoffe, Verdünnungsmittel oder einschließende Substanzen, die zur die Verabreichung an Menschen oder Tiere geeignet sind. Der Begriff "Träger" bezeichnet einen organischen oder anorganischen Bestandteil, natürlich oder synthetisch, mit dem der wirksame Bestandteil kombiniert wird, um die Anwendung zu erleichtern. Die Bestandteile der pharmazeutischen Zusammensetzungen können mit den erfindungsgemäßen Molekülen und miteinander in einer Weise zusammengebracht werden, daß keine Wechselwirkung auftritt, die die erwünschte therapeutische Wirkung wesentlich beeinträchtigen würde.

[0086] Zusammensetzungen, die für eine parenterale Verabreichung geeignet sind, bestehen in geeigneter Weise aus einer sterilen Zubereitung der erfindungsgemäßen Konjugate. Diese Zubereitung kann nach bekannten Verfahren formuliert werden. Formulierungen für Taxane können im Kapitel 9 von Taxol: Science and Applications, CRC Press Inc., 2000 Corporate Boulevard, N. W., Boca Raton, FL 33431, gefunden werden. Allgemein ist Taxol als 6 mg/ml-Cremophor-EL (polyoxiethyliertes Rhicinusöl)/Ethanol-Mischung formuliert worden, die auf das Endvolumen mit normalem Salz oder 5% Dextrose verdünnt wird. Eine Lösung von 15 mg/ml Taxotere wurde in Polysorbat-80 (Polyoxyethylen-Sorbitanmonooleat)/Ethanol-Mischung, verdünnt mit 5% Dextrose, formuliert.

[0087] Die sterile Zubereitung kann somit eine sterile Lösung oder Suspension in einem nicht-toxischen, parenteral annehmbaren Verdünnungs- oder Lösungsmittel sein. Zusätzlich werden sterile fette Öle konventionell als Lösungsmittel oder Suspensionsmedium eingesetzt. Zu diesem Zweck kann jedes farblose fette Öl eingesetzt werden, einschließlich synthetischer Mono- oder Diglyceride. Zusätzlich finden Fettsäuren, wie zum Beispiel Ölsäure Verwendung bei der Herstellung von Injektionsmitteln. Trägerformulierungen, die für orale, subkutane, intravenöse, intramuskuläre, usw. Verabreichung geeignet sind, können in Remingtons Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, gefunden werden.

[0088] Eine Person bedeutet hier Menschen, Primaten, Pferde, Kühe, Schweine, Schafe, Ziegen, Hunde, Katzen und Nagetiere.

[0089] Die erfindungsgemäßen Konjugate werden in wirksamen Mengen verabreicht. Eine wirksame Menge bedeutet die Menge, die nötig ist, um bei dem jeweils zu behandelnden Zustand den Ausbruch oder das Vorschreiten zu verzögern oder vollständig zu unterdrücken, oder den jeweiligen Zustand zu diagnostizieren. Im allgemeinen wird eine wirksame Menge bei der Krebsbehandlung die Menge sein, die erforderlich ist, um die Zellvermehrung bei Krebszellen von Säugern in situ zu unterdrücken. Wirksame Mengen werden, wenn sie einer Person verabreicht werden, natürlich abhängen von dem jeweils zu behandelnden Zustand; der Schwere des Zustands; individuellen Patientenparametern, einschließlich Alter, physischem Zustand, Größe und Gewicht; Parallelbehandlung; Häufigkeit der Behandlung; und der Art der Verabreichung. Diese Faktoren sind dem Durchschnittsfachmann gut bekannt und können bestimmt werden, ohne hierzu über Routineuntersuchungen hinausgehen zu müssen. Es ist im allgemeinen bevorzugt, daß eine Maximaldosis verwendet wird, das ist die höchste nach fundiertem medizinischem Sachverstand sichere Dosis.

[0090] Die Dosierung kann in geeigneter Weise angepaßt werden, um lokal oder systemisch eine gewünschte Medikamentenkonzentration zu erreichen. Im allgemeinen werden tägliche orale Dosen wirksamer Verbindungen von etwa 0,01 mg/kg und Tag bis zu 1000 mg/kg und Tag betragen. Es wird erwartet, daß IV-Dosen im Bereich von 1 bis 1000 mg/m² und Tag wirksam sein werden. Für den Fall, daß bei diesen Dosen keine hinreichende Wirkung bei einer Person auftritt, können sogar noch höhere Dosen (oder wirksame höhere Dosen durch einen anderen, mehr lokal wirkenden Zufuhrweg) bis hin zur Toleranzgrenze des Patienten eingesetzt werden. Kontinuierliche IV-Dosierung über zum Beispiel 24 Stunden oder mehrfache Gaben pro Tag werden für das Erreichen einer geeigneten systemischen Konzentration in Betracht gezogen.

[0091] Es gibt vielfältige Verabreichungswege. Der jeweils gewählte Weg hängt natürlich von dem gewählten Medikament ab, von der Schwere des zu behandelnden Krankheitszustands und von der zum Erreichen einer

therapeutischen Wirkung nötigen Dosis. Allgemein ausgedrückt, können die Verfahren dieser Erfindung mit jeder medizinisch vertretbaren Verabreichungsart praktiziert werden, d. h. mit jeder Form der Verabreichung, die wirksame Konzentrationen der wirksamen Verbindungen herbeiführt, ohne klinisch nicht annehmbare Nebenwirkungen zu erzeugen. Solche Verabreichungsarten sind unter anderem oral, rektal, sublingual, topisch, nasal, transdermal oder parenteral. Der Begriff "parenteral" schließt subkutan, intravenös, intramuskulär oder Infusion ein. Intravenöse Verabreichungswege sind bevorzugt.

[0092] Die Zusammensetzungen können einfach in einer Einheits-Dosierungsform bereitgestellt werden und können durch in der pharmazeutischen Fachwelt gut bekannte Verfahren hergestellt werden. All diese Verfahren schließen den Schritt des Inverbindungbringens der erfindungsgemäßen Konjugate mit einem Träger, der ein oder mehrere Zutat(en) bildet, ein. Im allgemeinen werden die Zusammensetzungen hergestellt, in dem die Verbindungen gleichmäßig und eng mit einem flüssigen Träger, einem fein verteilten festen Träger, oder beidem, in Verbindung gebracht werden, gefolgt von der Formung des Produktes, falls erforderlich.

[0093] Zusammensetzungen, die für eine orale Verabreichung geeignet sind, können als diskrete Einheiten, wie zum Beispiel Kapseln, Kacheten, Tabletten oder Pillen, die jeweils eine vorbestimmte Menge der wirksamen Verbindung enthalten, hergestellt werden. Andere Zusammensetzungen beinhalten Suspensionen in wässrigen oder nichtwässrigen Flüssigkeiten, wie zum Beispiel einen Sirup, ein Elixier oder eine Emulsion.

[0094] Andere Zuführsysteme können Systeme mit zeitabhängiger, verzögerter oder anhaltender Abgabe beinhalten. Solche Systeme können wiederholte Verabreichungen der erfindungsgemäßen wirksamen Verbindungen vermeiden, wodurch sich die Annehmlichkeit für die Person und den Arzt erhöhen. Viele Arten von Freisetzungszuführsystemen sind verfügbar und dem Fachmann bekannt. Sie beinhalten polymerbasierte Systeme wie Polymilchsäure und Polyglykolsäure, Polyanhydride und Polycaprolactone; nichtpolymere Systeme, die Lipide sind, schließen Sterole wie Cholesterin, Cholesterinester und Fettsäuren oder Neutralfette wie Mono-, Di- und Triglyceride ein; Hydrogel-Freisetzungssysteme; silastische Systeme, peptidbasierte Systeme; Wachsüberzüge, komprimierte Tabletten, die konventionelle Bindemittel und Arzneimittelträger einsetzen, teilweise verschmolzene Implantate und dergleichen. Zusätzlich kann ein auf Pumpen basierendes Gerätesystem eingesetzt werden, von denen einige für eine Implantierung angepaßt sind.

[0095] Ein Implantat für anhaltende Langzeitfreisetzung kann ebenfalls verwendet werden. "Langzeit"-Freisetzung bedeutet hier, daß das Implantat so ausgestaltet und angeordnet ist, daß es therapeutische Niveaus des wirksamen Bestandteils für mindestens 30 Tage, vorzugsweise für 60 Tage abgeben kann. Implantate für anhaltende Langzeitfreisetzung sind dem Durchschnittsfachmann gut bekannt und schließen einige der oben beschriebenen Freisetzungssysteme ein. Solche Implantate können insbesondere bei der Behandlung solider Tumore nützlich sein, in dem sie nahe beim oder direkt in dem Tumor plaziert werden, wodurch hohe lokale Dosen der erfindungsgemäßen Verbindungen herbeigeführt werden.

[0096] Die erfindungsgemäßen Konjugate sind generell ebenfalls zur der Behandlung von nicht krebsartigen Störungen des Teilungsverhaltens von Säugerzellen, einschließlich Psoriasis, aktinischer Keratose etc., geeignet. Sie sind auch geeignet zur Behandlung von Diabetes und deren Komplikationen, übermäßiger Säuresekretion, Herz-Kreislaufzuständen unter Beteiligung von Cholesterin (z. B. Hyperlipidämie, Hypercholesterinämie), Diarrhöe, Eierstockerkrankungen (z. B. Endometriose, Ovarialzysten, usw.) und als empfängnisverhütende Mittel.

[0097] Der Fachmann wird in der Lage sein, mit Routineversuchen vielfältige Äquivalente zu den spezifischen oben aufgeführten Produkten und Verfahren zu erkennen. Solche Äquivalente sollen in den Schutzbereichs der angefügten Ansprüche fallen.

Patentansprüche

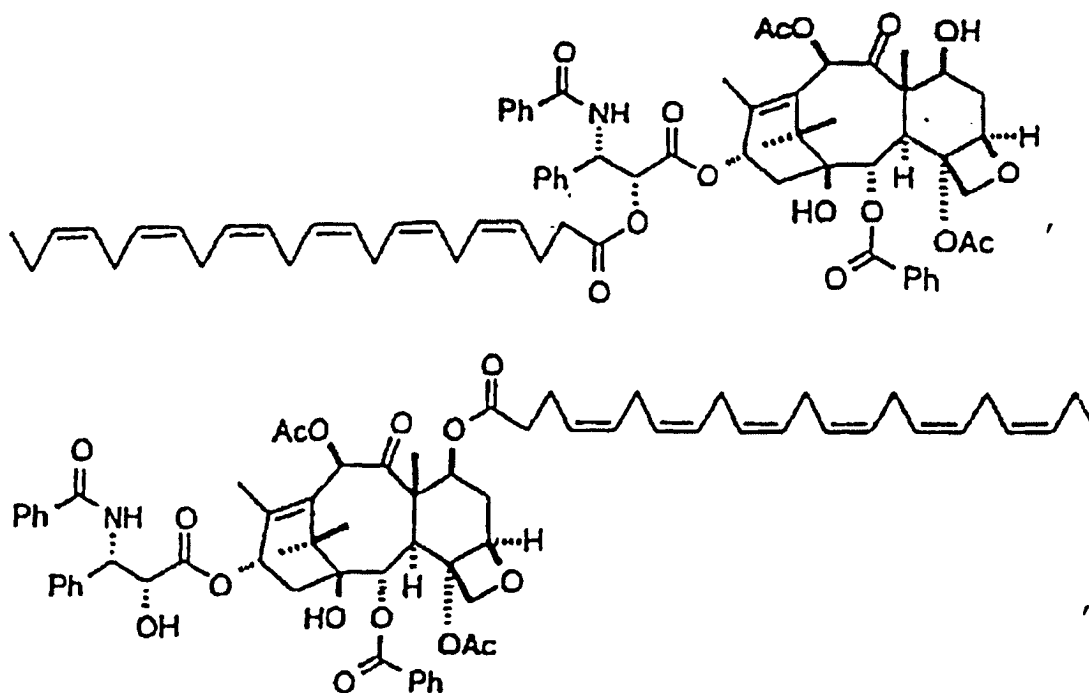
1. Zusammensetzung zur Behandlung eines Zustandes in einem Nicht-Zentralnervengewebe, umfassend ein kovalentes Konjugat aus cis-Docosahexaensäure und einem zur Behandlung des Zustands wirksamen pharmazeutischen Mittel, wobei das pharmazeutische Mittel ein Taxan ist.

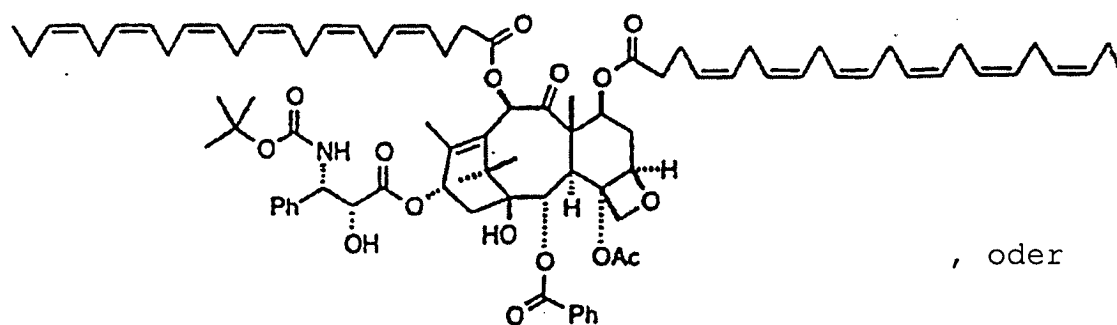
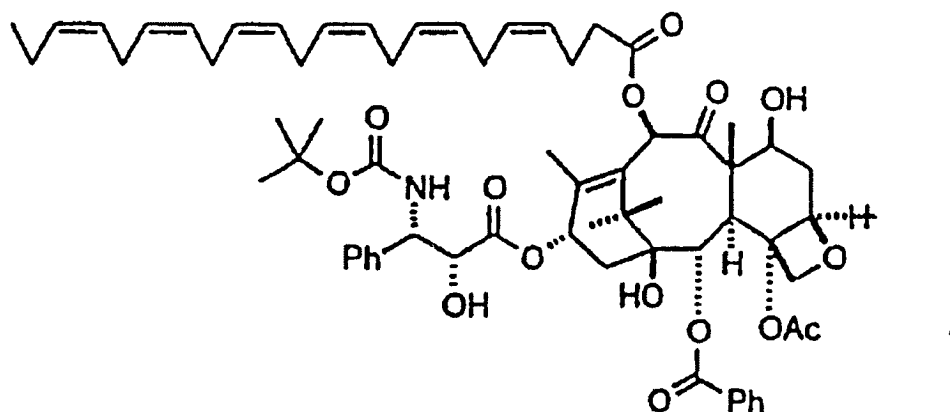
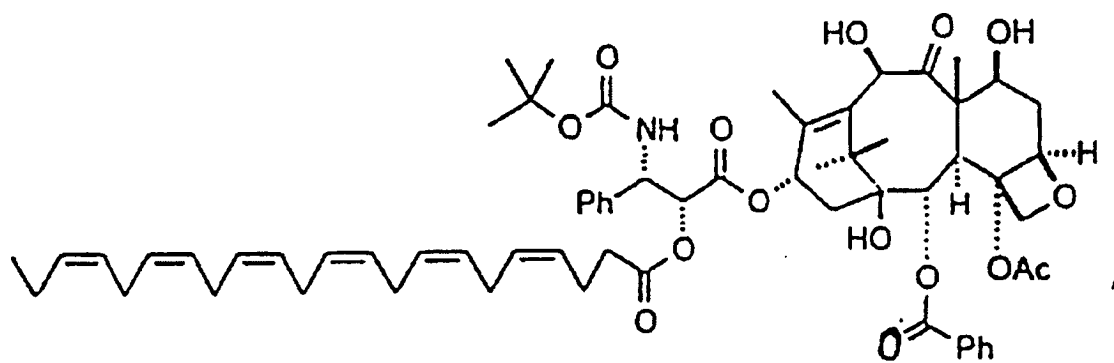
2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei die cis-Docosahexaensäure direkt mit dem pharmazeutischen Mittel konjugiert ist.

3. Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Gewebe ein Brust-, Gastrointestinal- oder Ovarialgewebe ist.

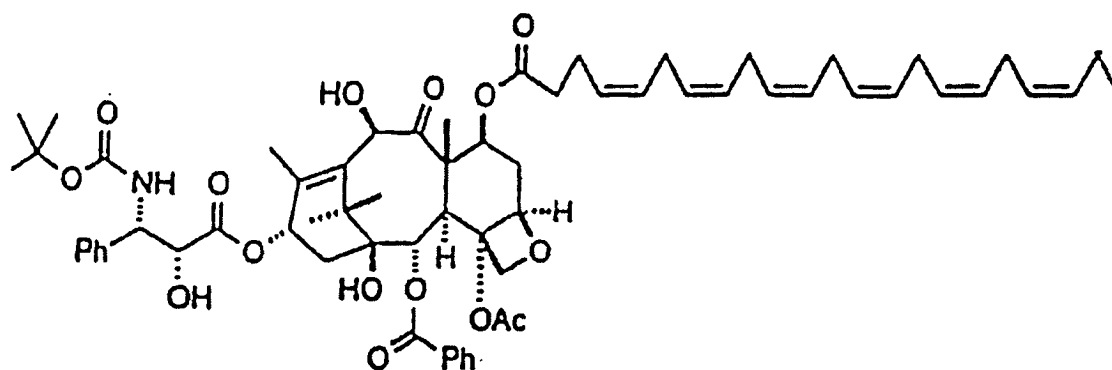
4. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Taxan Taxol oder Taxoter ist.

5. Zusammensetzung nach Anspruch 4, wobei das Konjugat





, oder

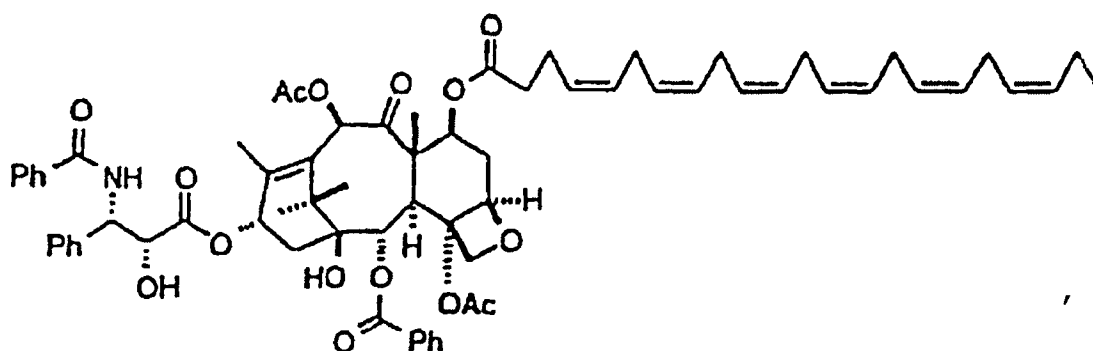
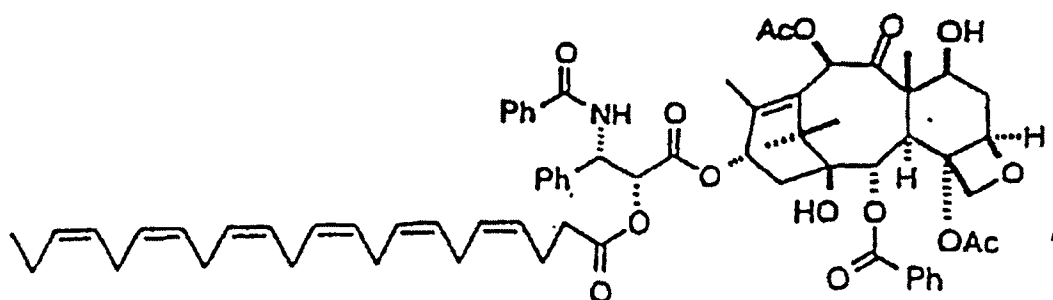


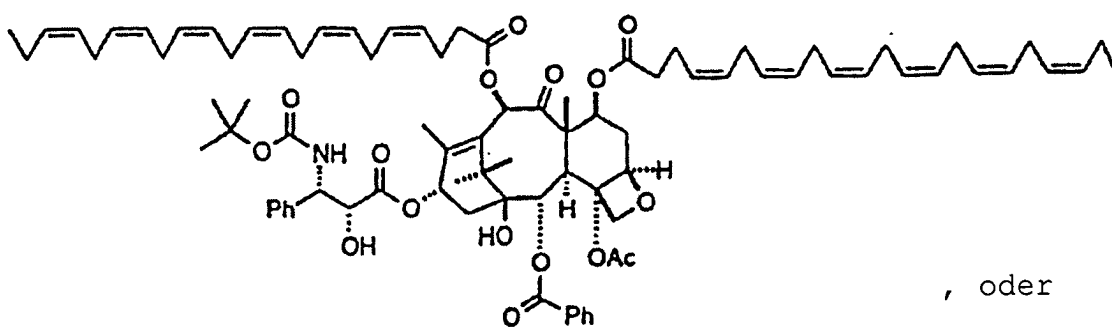
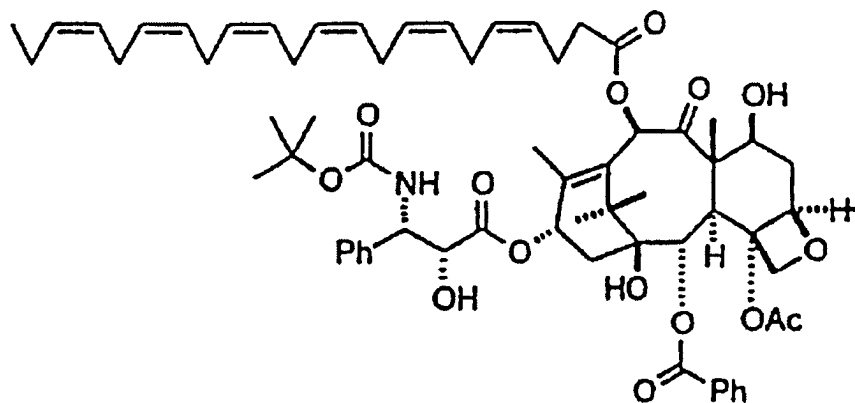
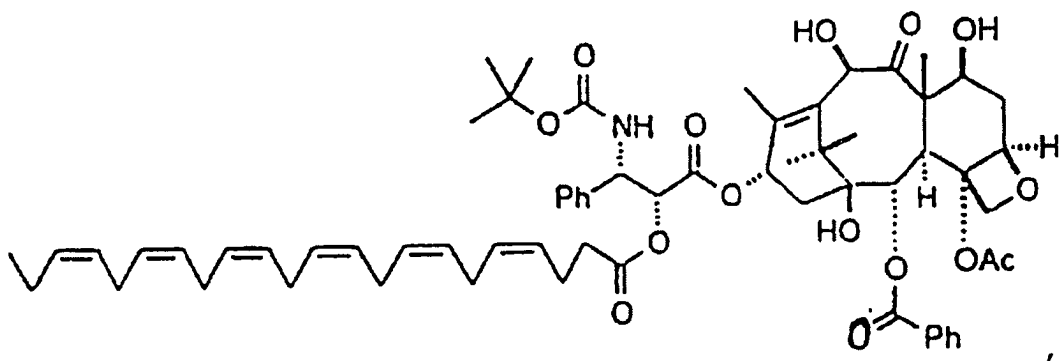
ist.

6. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Zustand Brustkrebs, Kolonkrebs oder Ovarialkrebs ist.

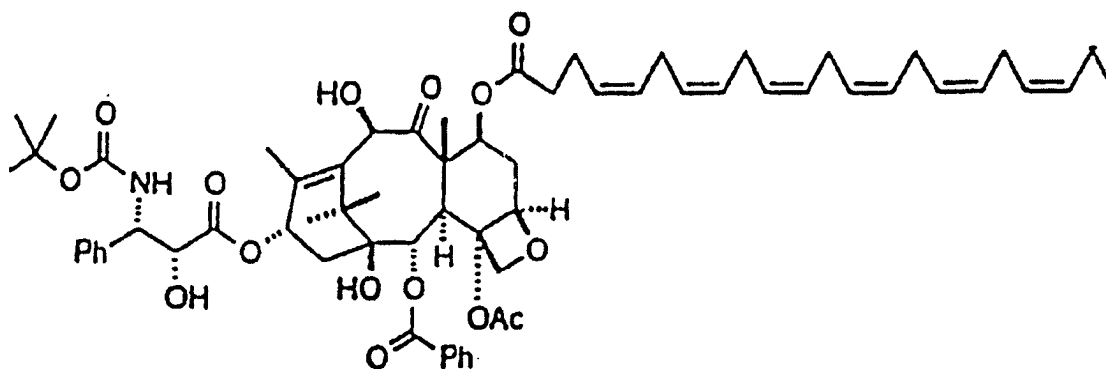
7. Pharmazeutisches Mittel, umfassend ein kovalentes Konjugat aus cis-Docosahexaensäure und einem Taxan und einem pharmazeutisch annehmbaren Träger.

8. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7, wobei die cis-Docosahexaensäure direkt mit dem Taxan konjugiert ist.
9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7 oder 8, wobei das Taxan Taxol oder Taxoter ist.
10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 9, wobei das Konjugat





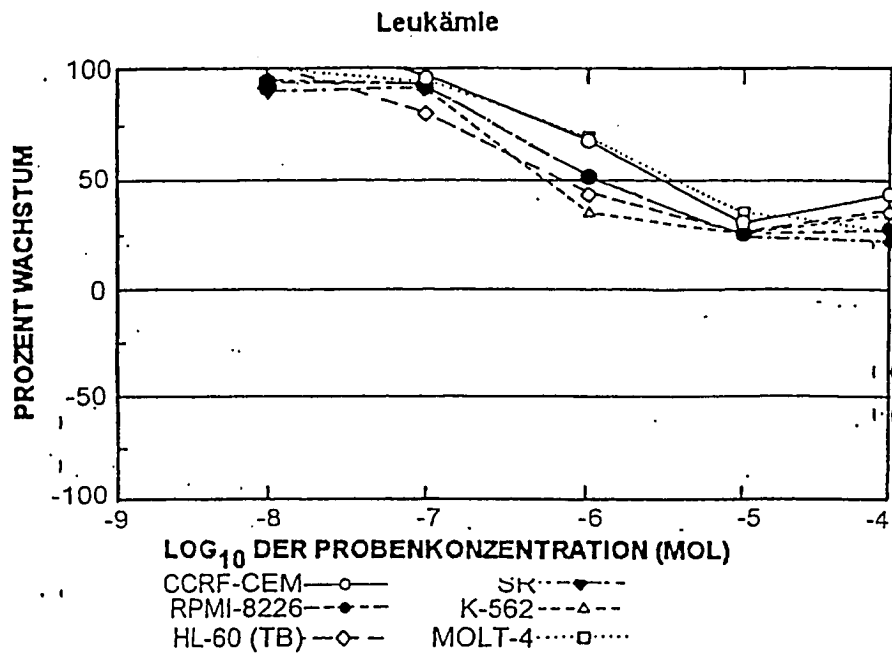
, oder

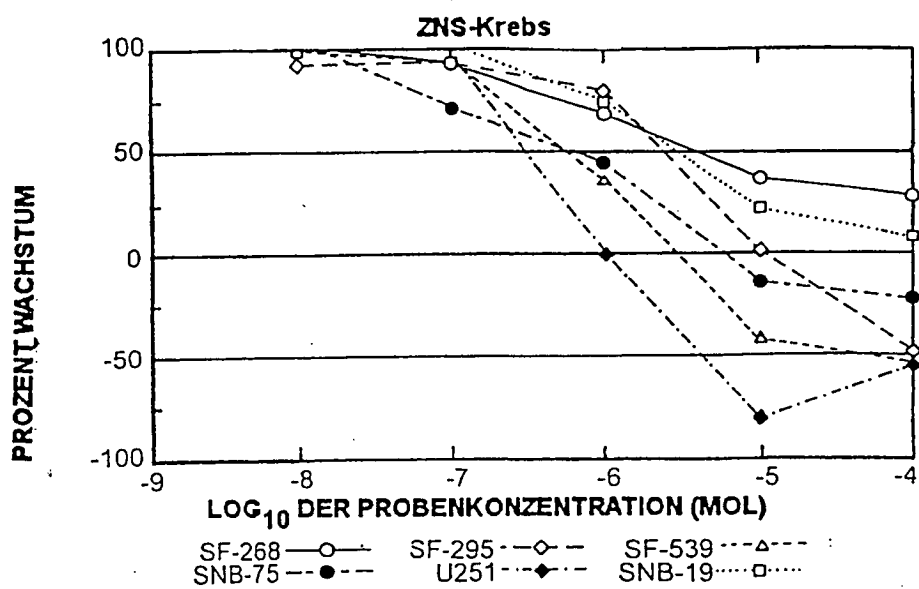
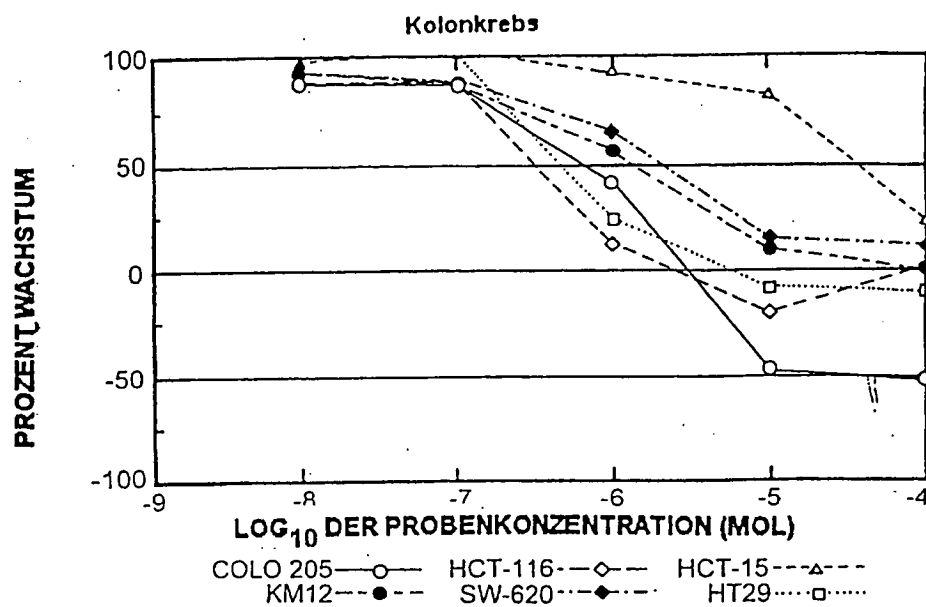


ist.

Es folgen 14 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen





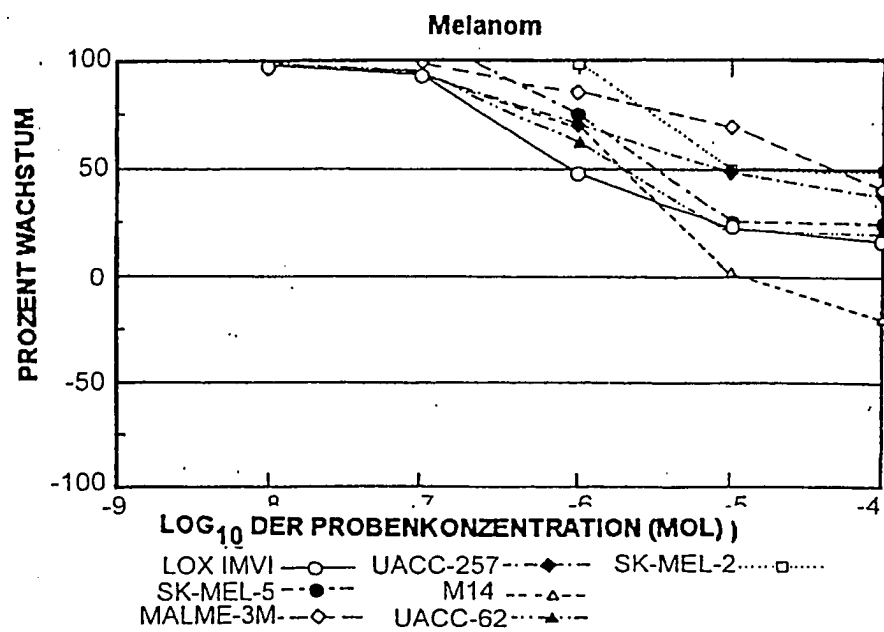


Fig. 5

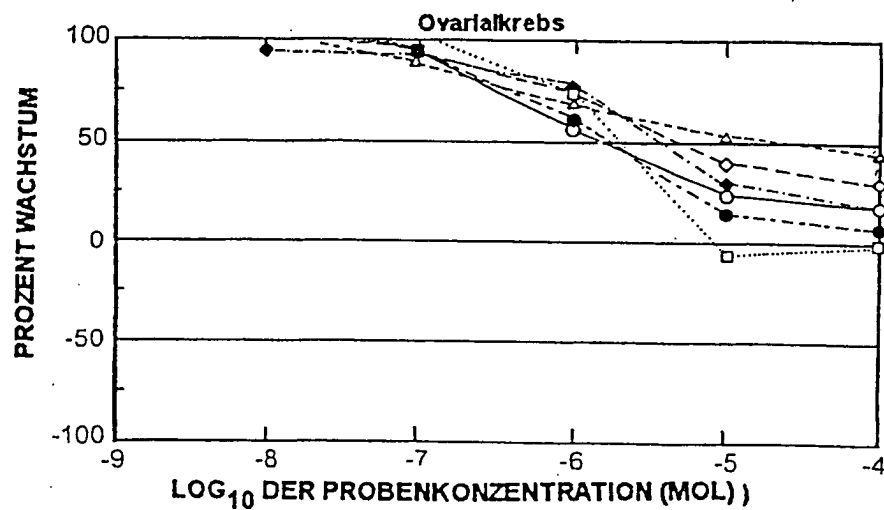


Fig. 6

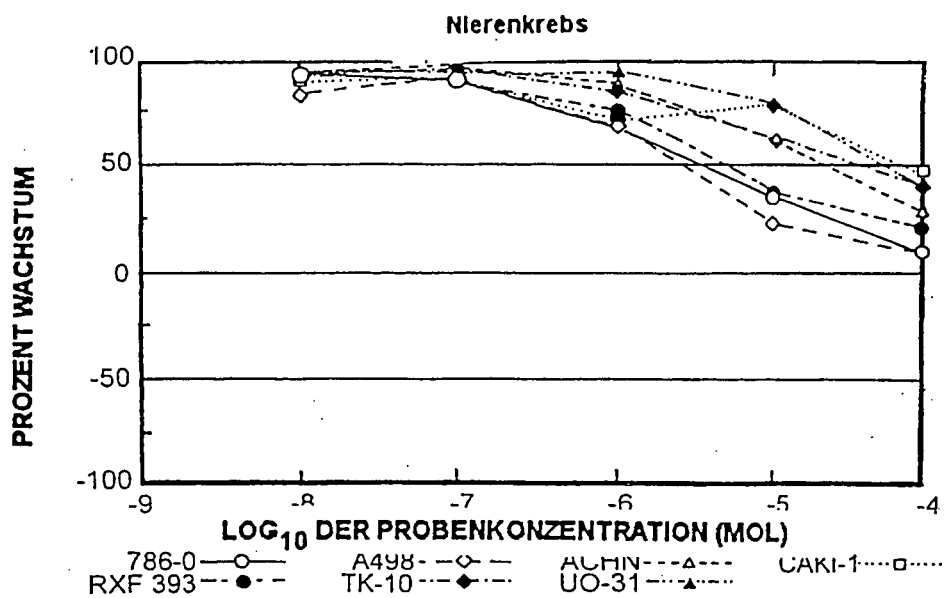


Fig. 7

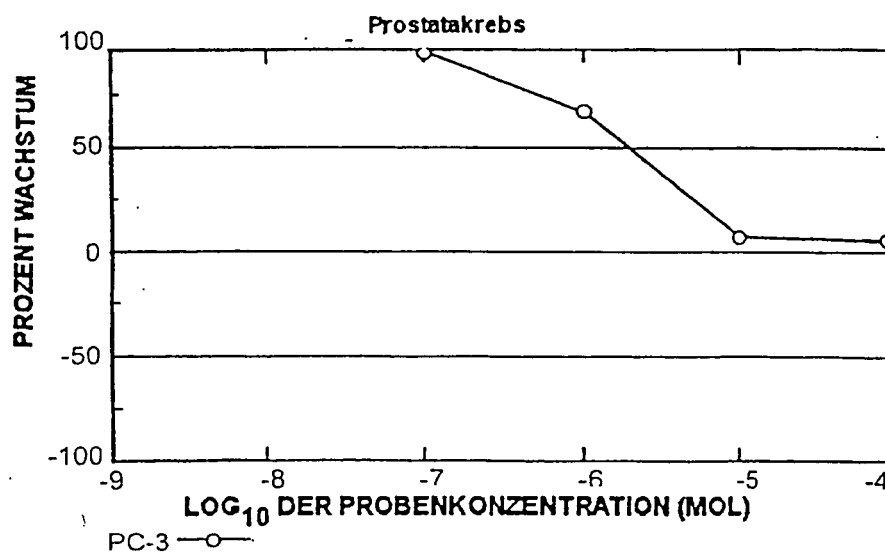


Fig. 8

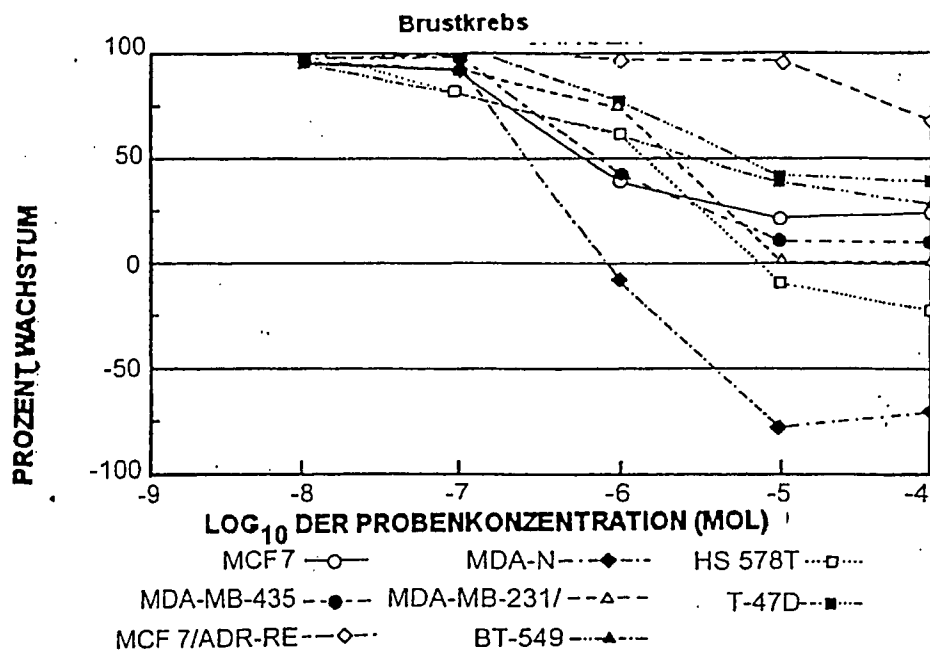


Fig. 9

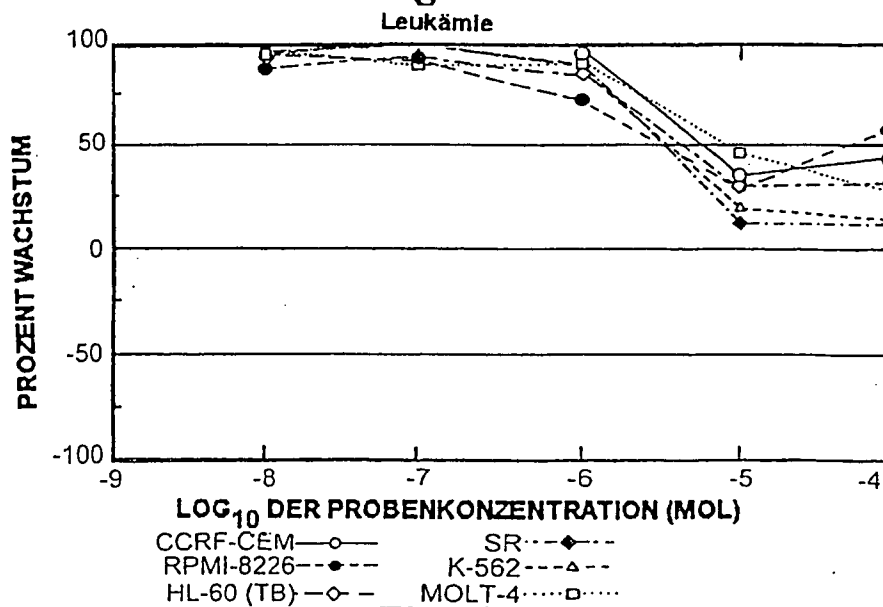
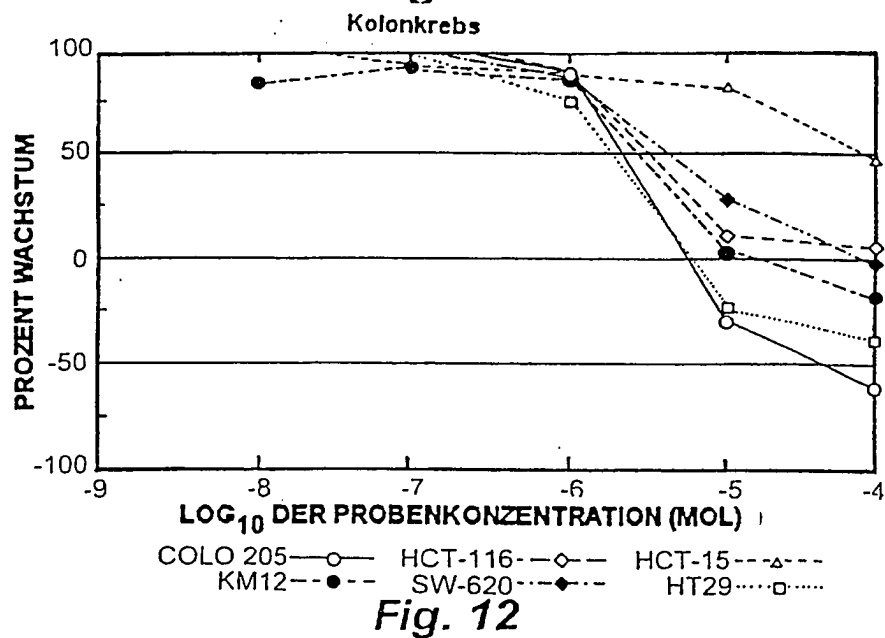
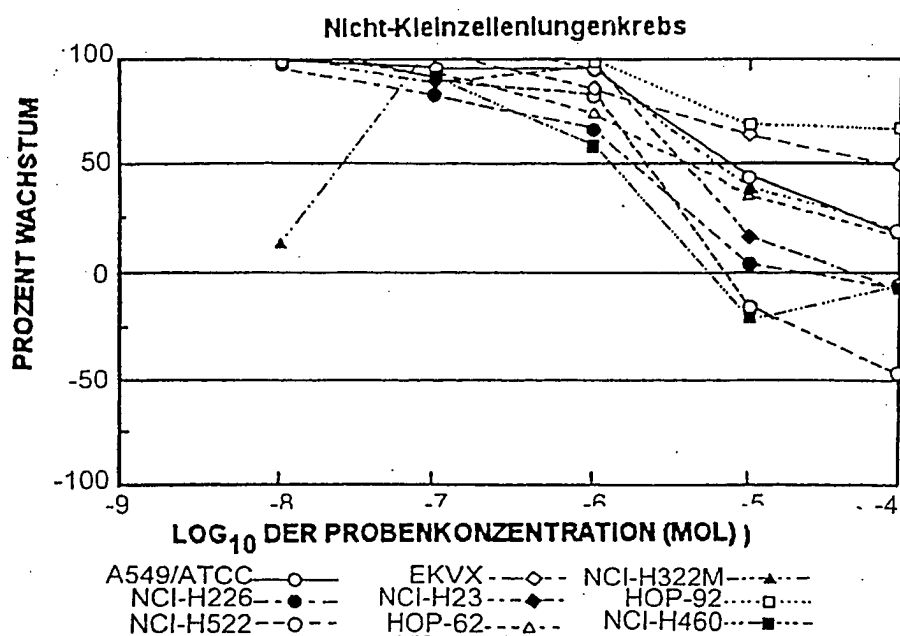
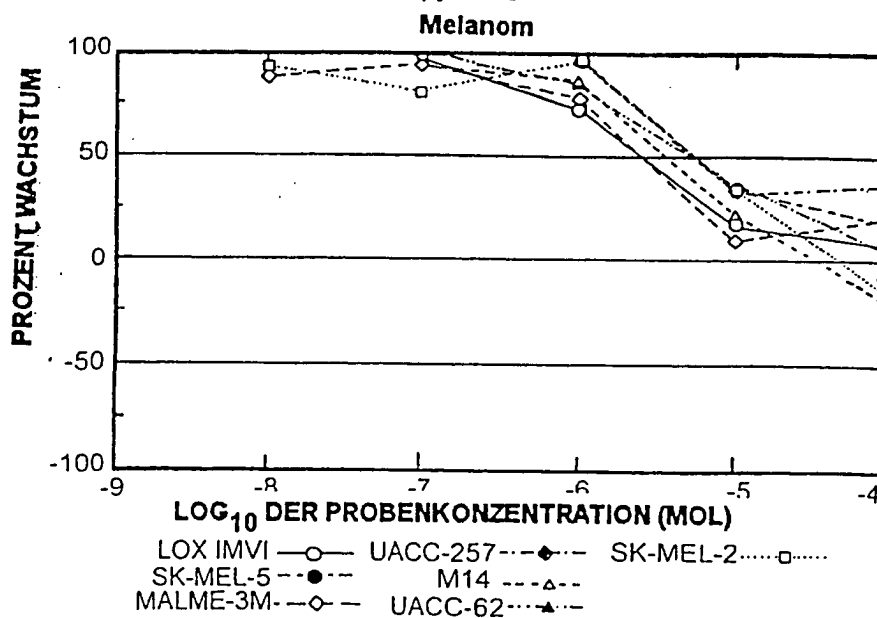
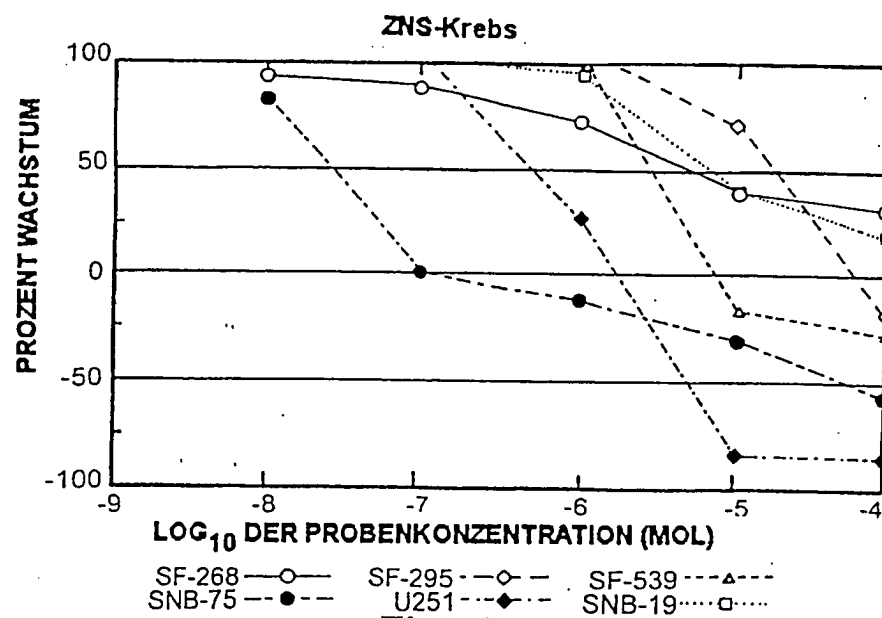
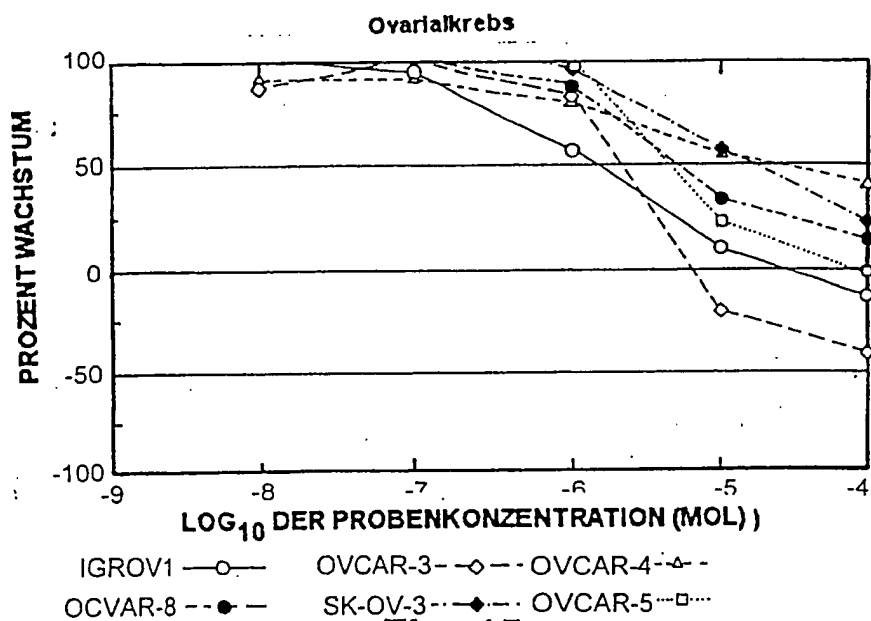
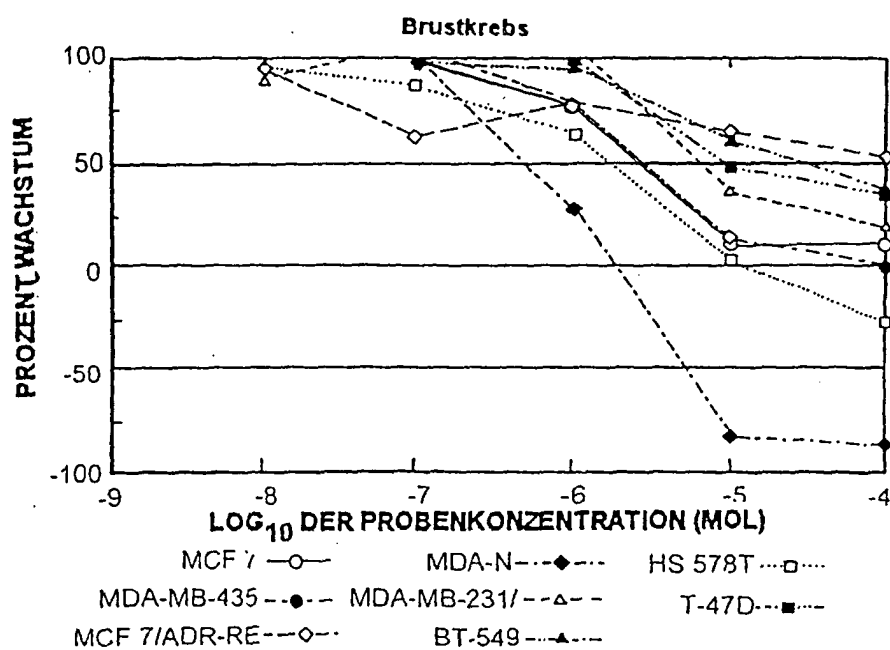
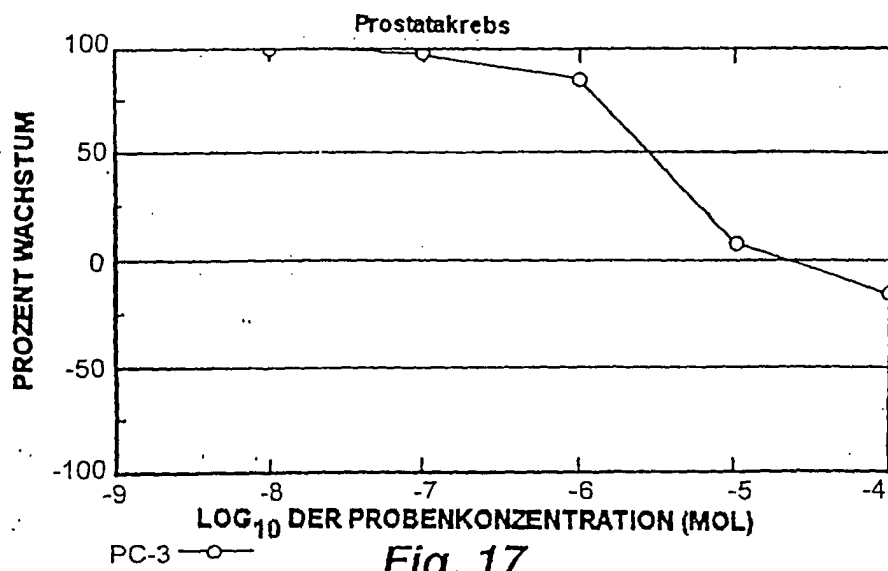


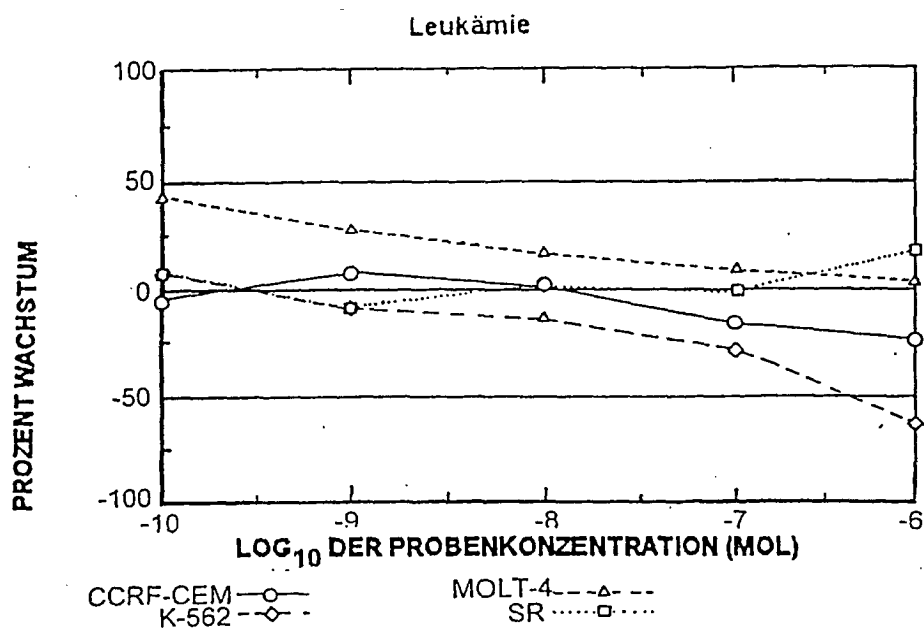
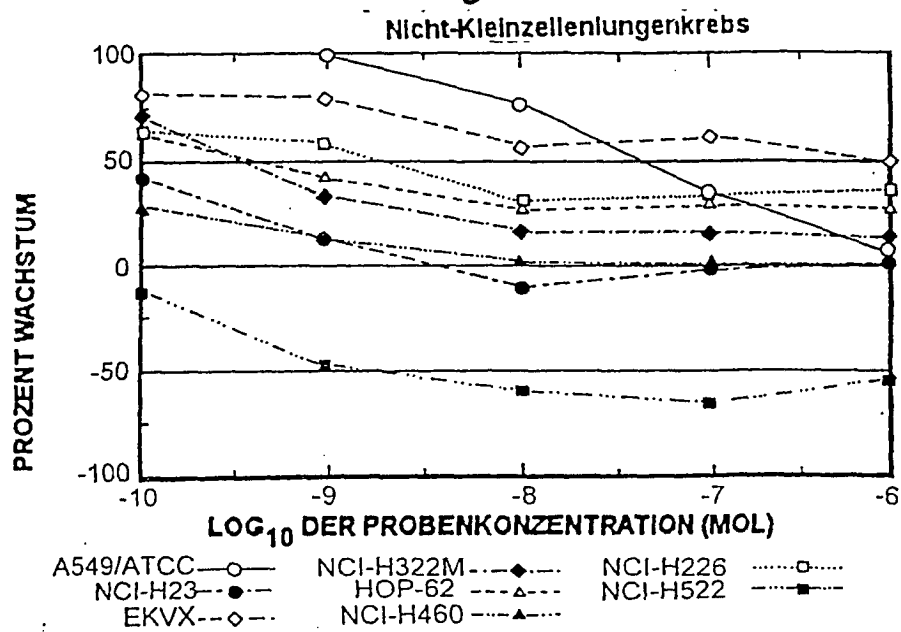
Fig. 10









**Fig. 19****Fig. 20**

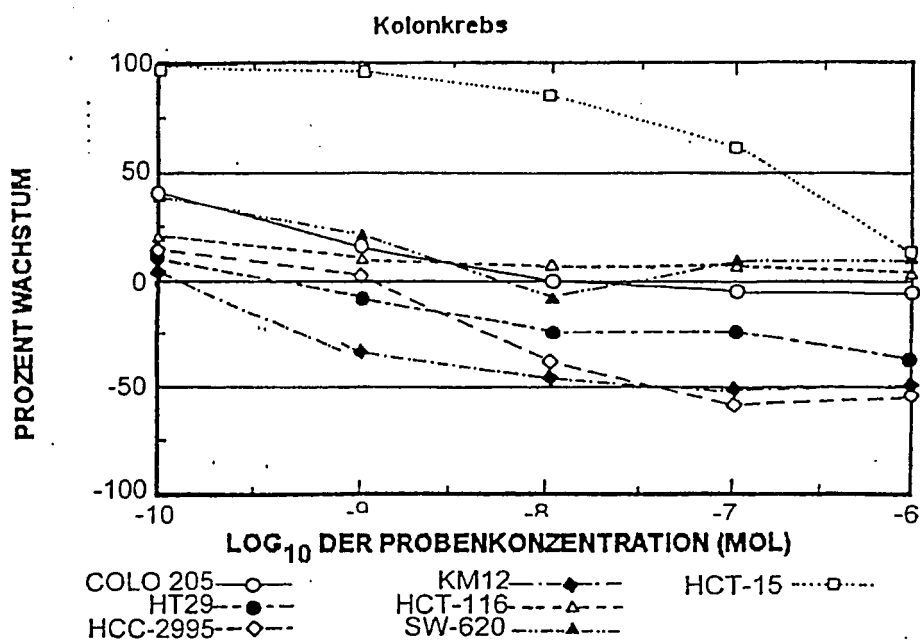


Fig. 21

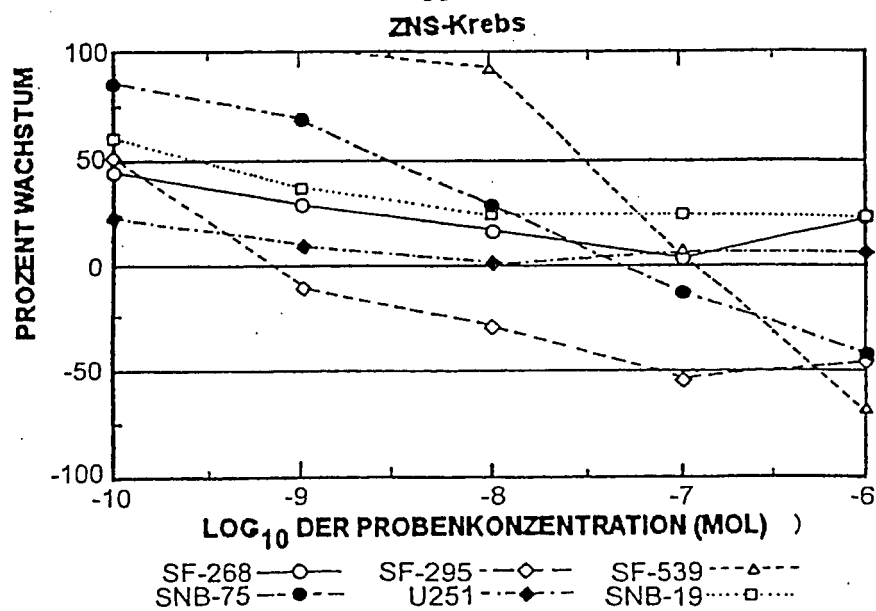
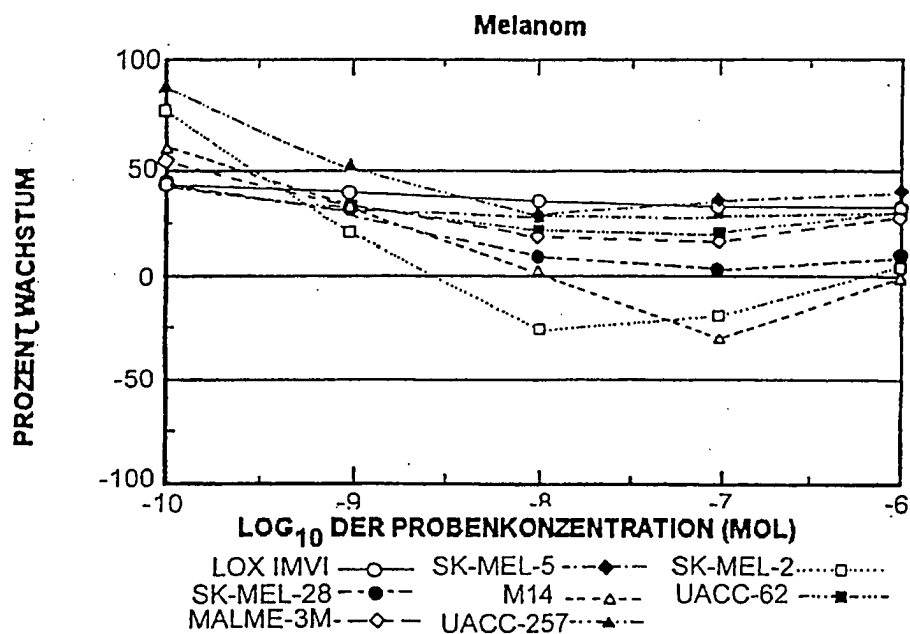
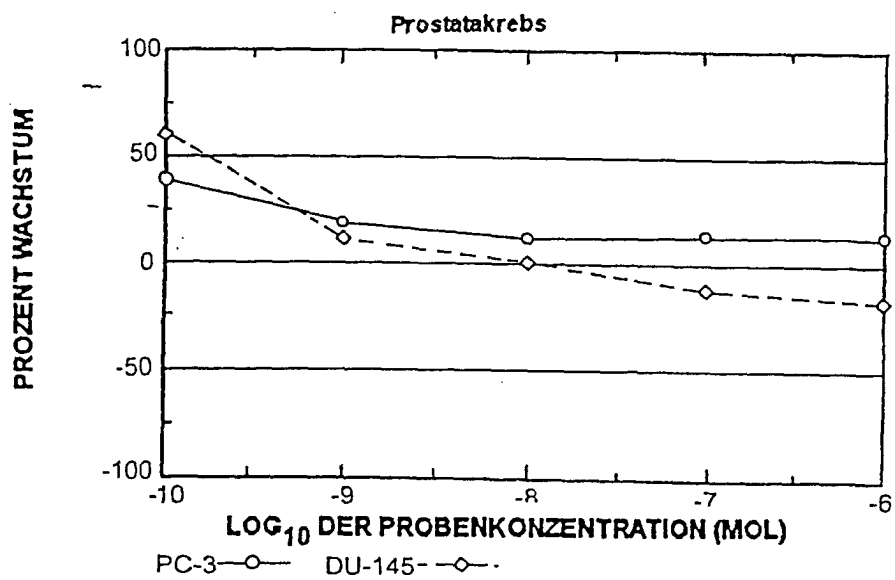
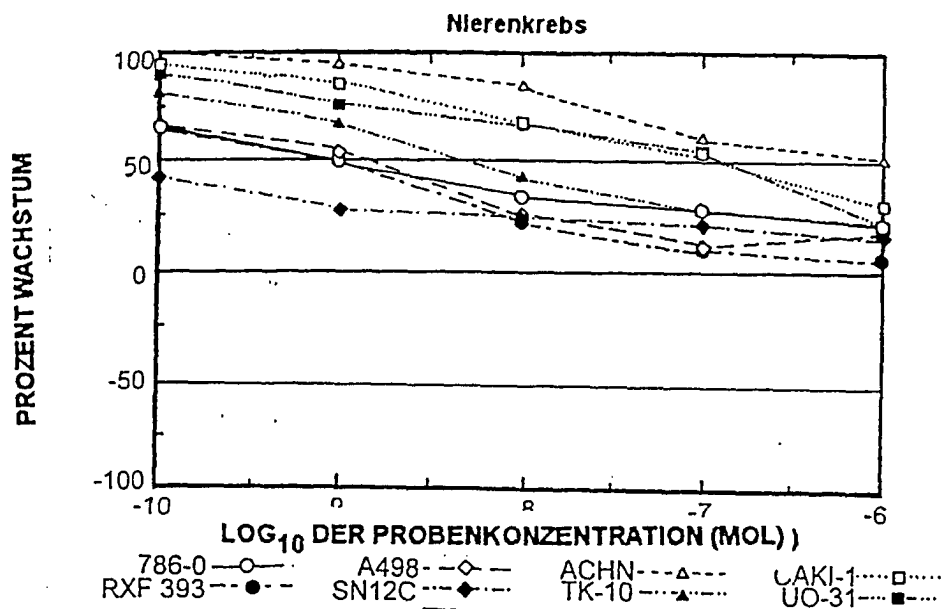


Fig. 22





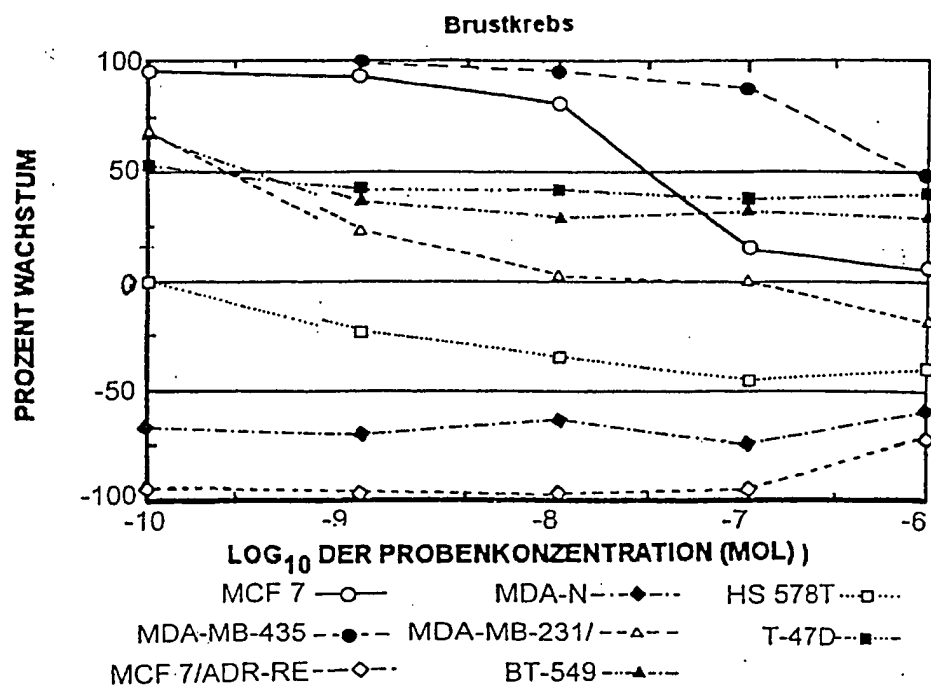


Fig. 27