



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 20 497 T2 2006.02.09**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 124 820 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 20 497.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/25140**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 956 698.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/24734**

(86) PCT-Anmeldetag: **26.10.1999**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **04.05.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **22.08.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **22.09.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **09.02.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C07D 339/04 (2006.01)**

C07C 323/52 (2006.01)

C07F 19/00 (2006.01)

A61K 31/385 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

105628 P 26.10.1998 US

(73) Patentinhaber:

**The Research Foundation of State University of
New York, Albany, N.Y., US**

(74) Vertreter:

Weickmann & Weickmann, 81679 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**BINGHAM, M., Paul, Centereach, US; ZACHAR,
Zuzana, Centereach, US**

(54) Bezeichnung: **LIPONSAÜREDERIVATE UND DEREN VERWENDUNG BEI DER BEHANDLUNG VON KRANKHEITEN**

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

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

Beschreibung

[0001] Diese Anmeldung nimmt die Priorität der U.S. Provisional Patentanmeldung Nr. 60/105,628, eingereicht am 26. Oktober 1998, in Anspruch.

GEBIET DER ERFINDUNG

[0002] Die vorliegende Erfindung betrifft Therapeutika und Diagnostika für Krebs und andere mit veränderten metabolischen Enzymen assoziierte Krankheiten. Insbesondere betrifft die Erfindung eine neue Klasse von therapeutischen Mitteln, welche Tumorzellen und bestimmte andere Typen von Zellen, die in Krankheitsprozessen involviert sind, selektiv angreifen und abtöten.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0003] Alle Säugerzellen benötigen zum Leben und Wachsen Energie. Zellen erhalten diese Energie durch den Metabolismus von Nahrungsmolekülen. Die große Mehrheit normaler Zellen verwendet eine einzige Metabolismusroute, um ihre Nahrungsmittel abzubauen. Der erste Schritt in dieser Metabolismusroute ist der teilweise Abbau von Glucosemolekülen zu Pyruvat in einem Verfahren, das als Glykolyse oder glykolytischer Zyklus bekannt ist. Das Pyruvat wird weiter im Mitochondrium zu Wasser und Kohlendioxid abgebaut, welches anschließend eliminiert wird. Dies geschieht durch ein Verfahren, das als Tricarbonsäure (TCA)-Zyklus bezeichnet wird. Die kritische Verbindung zwischen diesen beiden Prozessen ist der große Enzymkomplex mit mehreren Untereinheiten, der als Pyruvat-Dehydrogenase ("PDH")-Komplex bezeichnet wird (nachfolgend "PDC"). PDC fungiert als Katalysator, welcher das Pyruvat vom glykolytischen Zyklus zum TCA-Zyklus leitet.

[0004] Die meisten Krebsarten zeigen eine tiefgreifende Störung des Energiemetabolismus. Diese Veränderung im Energiemetabolismus stellt eine der robustesten und am besten dokumentierten Korrelate bösartiger Transformationen dar.

[0005] Da Tumorzellen Glucose größtenteils glykolytisch abbauen, d.h. ohne den TCA-Zyklus, müssen große Mengen an Pyruvat auf andere alternative Arten abgebaut werden. Eine Hauptroute, die zum Abbau des überschüssigen Pyruvats verwendet wird, umfasst die Verbindung von zwei Pyruvatmolekülen, um die neutrale Verbindung Acetoin zu bilden. Die Bildung von Acetoin wird durch eine Tumor-spezifische Form von PDC katalysiert. Obgleich der TCA-Zyklus in Krebszellen immer noch funktioniert, ist der Tumorzellen-TCA-Zyklus ein abweichender Zyklus, der auf Glutamin als primärer Energiequelle beruht. Der Tumor-spezifische PDC spielt bei diesem abweichenden TCA-Zyklus eine regulatorische Rolle. Somit kann die Inhibition oder Inaktivierung eines einzigen Enzyms, nämlich des Tumor-spezifischen PDC, die Bildung großer Mengen an ATP sowie das Reduktionspotenzial in Tumorzellen blockieren.

[0006] Trotz der intensiven Arbeit zur Charakterisierung des Tumorzellmetabolismus hat man die systematische Veränderung des Tumorzell-Energiemetabolismus noch nicht als Ziel für eine Krebs-Chemotherapie genutzt. Viele bösartige Krankheiten stellen immer noch große Herausforderungen an die klinische Onkologie dar. Beispielsweise ist Prostatakrebs die zweihäufigste Ursache für Krebstod in Männern. Derzeitige Behandlungsmethoden beruhen primär auf hormonellen Manipulationen. Trotz der anfänglich hohen Ansprechraten entwickeln die Patienten jedoch oft Hormon-unempfindliche Tumore, was zu einem schnellen Krankheitsverlauf mit einer schlechten Prognose führt. Insgesamt waren die Ergebnisse einer cytotoxischen Chemotherapie enttäuschend, was auf einen lang bestehenden Bedarf an neuen Ansätzen zur Prävention und Behandlung von fortgeschrittenen Krebsarten hindeutet. Weitere Krankheiten, die von einer abnormen Zellreplikation herühren, beispielsweise metastatische Melanome, Hirntumore glialen Ursprungs (z.B. Astrozytome) und Lungen-Adenokarzinome sind ebenfalls hochaggressive bösartige Tumore mit einer schlechten Prognose. Die Häufigkeit von Melanomen und Lungen-Adenokarzinomen ist in den vergangenen Jahren signifikant angestiegen. Chirurgische Behandlungen von Hirntumoren erreichen oft keine vollständige Entfernung aller Tumorgebe, was zu Rückfällen führt. Systemische Chemotherapie wird durch Blutbarrieren behindert. Es besteht daher ein dringender Bedarf an neuen Ansätzen für die Behandlung von humanen bösartigen Tumoren, einschließlich fortgeschrittenem Prostatakrebs, Melanom, Hirntumoren und anderen bösartigen Tumoren wie etwa Neuroblastomen, Lymphomen und Gliomen.

[0007] Die Entwicklung von Verfahren und Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung wurde durch die Theorie geleitet, dass Metabolismuseigenschaften, welche Tumore von normalen Zellen unterscheiden, zu Zielen für eine therapeutische Intervention führen können. Beispielsweise scheinen Tumorzellen metabolisch über einen tumorspezifischen PDC zu funktionieren. Somit können Inhibitoren dieses Enzymkomplexes ver-

wendet werden, um den Tumorzellmetabolismus zu blockieren, was zu einem selektiven Tumorzelltod führt.

[0008] Antikrebsaktivität wurde für bestimmte Palladium-enthaltende Lipoat-Verbindungen vorgeschlagen, wobei das spezifische Mittel, welches den Antikrebseffekt zeigt, als Palladium identifiziert wurde. U.S. Patent Nr. 5,463,093 und 5,679,697. Anders als im Stand der Technik betrifft die vorliegende Erfindung eine neue Klasse von Lipoat-Verbindungen, welche kein Palladium enthalten, die jedoch überraschenderweise eine starke Antikrebsaktivität besitzen. Diese Verbindungen funktionieren anscheinend durch PDC und stellen daher eine wirksame Gegenmaßnahme gegen Krebs und andere pathologische oder pathogene Zellen bereit, welche einen entsprechend veränderten Energiemetabolismus zeigen.

[0009] Es ist somit eine allgemeine Aufgabe der Erfindung, eine neue Klasse von therapeutischen Mitteln bereitzustellen, welche Tumorzellen wirksam angreifen und abtöten.

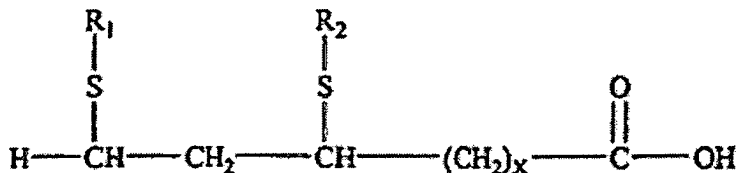
[0010] Es ist eine weitere Aufgabe der Erfindung, pharmazeutische Zusammensetzungen bereitzustellen, welche Liponsäurederivate und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger umfassen, die in der Lage sind, Tumorzellen spezifisch anzugreifen und abzutöten.

[0011] Es ist auch eine Aufgabe dieser Erfindung, ein Verfahren zur prophylaktischen und therapeutischen Behandlung einer Vielzahl von Krebsarten bereitzustellen unter Verwendung der hierin beschriebenen Liponsäurederivate.

[0012] Es ist eine weitere Aufgabe der Erfindung, eine prophylaktische oder therapeutische Behandlung von Pathologien, wie etwa bakteriellen, Pilz-, Pflanzen- und Protozoen-Infektionen von Menschen und anderen Tieren unter Verwendung der hierin beschriebenen Liponsäurederivate bereitzustellen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0013] Die vorliegende Erfindung stellt eine Klasse von Verbindungen zur Behandlung verschiedener Pathologien in einem Patienten bereit. Die Klasse von Verbindungen umfasst Liponsäurederivate und pharmazeutisch annehmbare Salze davon. Die Erfindung stellt eine Verbindung der Formel:



bereit, wobei:

x 0 bis 16 ist

R₁ und R₂ unabhängig Acyl CH₃(CH₂)_{n-1}C(=O)-; Alkyl C_nH_{2n+1}; Alken C_mH_{2m}; Alkin C_mH_{2m-2}; aromatisch; Aroyl; Alkylsulfid CH₃(CH₂)_t-S-; Thiocarbaminsäureester CH₃(CH₂)_{n-1}C=NH-; und Semithioacetal CH₃CH(OH)-S- sind; wobei n 1-10 ist; m 2-10 ist und t 0-9 ist, zur Verwendung bei der Behandlung oder Prävention einer Krankheit.

[0014] Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung einer oben definierten Verbindung zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung oder Prävention einer Krankheit in einem Patienten, die durch eine Empfindlichkeit auf Liponsäurederivate gekennzeichnet ist. Derartige Verwendungen können ein Verfahren zur Behandlung eines Säugetiers umfassen, einschließlich eines Menschen, das/der unter einer Krankheit leidet, wobei das Verfahren die Verabreichung in einer therapeutisch wirksamen Menge mindestens einer oben definierten Verbindung oder eines physiologisch annehmbaren Salzes davon an das Säugetier umfasst.

[0015] Die Verbindungen sind für ein Verfahren der Behandlung oder Prävention einer neoplastischen Krankheit in einem Patienten geeignet, umfassend das Verabreichen einer wirksamen Menge mindestens einer oben definierten Verbindung oder eines physiologisch annehmbaren Salzes davon. Dieses Verfahren umfasst ein Verfahren, bei dem die Verbindung allein oder in Kombination mit einem weiteren Reagenz verabreicht wird. Die Kombinationsbehandlungsmethode erlaubt die gleichzeitige, aufeinanderfolgende oder getrennte Verwendung zur Behandlung solcher Krankheiten.

[0016] Die hierin beschriebene Behandlung ermöglicht die Inhibition von Tumorzellen in einem Patienten. Alternativ kann die Zusammensetzung verwendet werden, um Zellen direkt zu kontaktieren und zu inhibieren

oder Tumorzellen in vitro abzutöten.

[0017] Es können jedoch auch andere Krankheitszustände eine Empfindlichkeit gegen die Liponsäurederivate zeigen. Demgemäß beinhaltet die Erfindung die Verwendung von Liponsäurederivaten als wirksame Mittel gegen Krankheiten eubakteriellen, archebakteriellen, Pilz-, Pflanzen-, Algen- und Protozoen-Ursprungs, da diese Krankheiten in Menschen und anderen Tieren auftreten.

[0018] Einige der oben beschriebenen Verbindungen sind per se neu. Demgemäß betrifft die vorliegende Erfindung solche Verbindungen wie in Anspruch 10 beansprucht und pharmazeutische Zusammensetzungen, welche eine oben definierte Verbindung oder ein physiologisch annehmbares Salz davon umfassen, zusammen mit einem oder mehreren physiologisch annehmbaren Trägern oder Arzneistoffträgern.

BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0019] Fig. 1: Gezeigt ist eine Krebszellen-spezifische Zellabtötung durch Bis-Benzoyl-Lipoat (120 µg/ml oder 120 mg/kg), ein Mitglied der neuen Klasse von Verbindungen, welche Gegenstand dieser Erfindung sind. Siehe BEISPIEL 7. Die linke Spalte enthält das Gewebe mit Krebsursprung und, in Klammern, die spezifische Bezeichnung der Zelllinie. Die oberen drei Reihen zeigen drei unterschiedliche Krebszelltypen – Lungenkrebs, Leberkrebs und Embryonalkrebs. Im Gegensatz dazu zeigt die untere Reihe eine normale (keine Krebszellen) Nieren-Epithelzelllinie. Die mittlere Spalte zeigt die unbehandelten Proben (Kontrollen), während die rechte Spalte die Wirkungen der Behandlung auf jeden Zelltyp zeigt (experimentelle Proben). Jede der drei Krebszelltypen wird wirksam abgetötet, während die normalen Zellen nicht nachweisbar beeinflusst werden. Diese Bilder wurden etwa 48 Stunden nach der Verabreichung des Bis-Benzoyl-Lipoats photographiert. Es wird darauf hingewiesen, dass fast alle der Krebszellen zu diesem Zeitpunkt abgetötet worden waren. Die wenigen verbleibenden Zellen oder Zellfragmente haben eine charakteristische Morphologie von Zellen, die den Zelltod durchlaufen (Apoptose; siehe BEISPIEL 9; siehe auch [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#)). Diese wenigen verbleibenden Zellen in den behandelten Feldern werden innerhalb der nächsten wenigen Stunden absterben. Im Gegensatz dazu wird darauf hingewiesen, dass die normalen, Nicht-Krebszellen (untere Reihe) nicht nachweisbar durch die Behandlung beeinflusst werden.

[0020] Fig. 2: Gezeigt ist die selektive Abtötung von ras-transformierten NIH3T3-Zellen in Kultur durch das Bis-Benzoyl-Lipoat (120 µg/ml oder 120 mg/kg), ein Mitglied der neuen Klasse von Verbindungen, die Gegenstand dieser Erfindung sind. Siehe BEISPIELE 7 und 8. Die linke Spalte beschreibt die nicht-karzinöse (nicht-transformierte), Ursprungs-NIH3T3-Zelllinie und eines ihrer Derivate (T24), das durch Einführung einer aktivierten Form des ras-Onkogens zu einem malignen (kanzerösen) Status transformiert wurde. Die mittlere Spalte zeigt diese beiden Zelltypen unbehandelt (Kontrollproben), und die rechte Spalte zeigt sie nach etwa 24 Stunden Behandlung mit Bis-Benzoyl-Lipoat. Zunächst sind die nicht-kanzerösen Ursprungs-Zellen durch diese Behandlung nicht beeinträchtigt. Zweitens sind im Gegensatz dazu nach 24 Stunden Behandlung ca. 50% der kanzeröse (transformierten) Zellen abgetötet und die verbleibenden Zellen sind gerundet und durchlaufen den Zelltod. Siehe [Fig. 1](#) und [Fig. 3](#) für Beispiele dieser charakteristischen Zellrundung und Zelltod. Nach etwa 48 Stunden Behandlung werden die Krebszellen fast vollständig vernichtet (getötet) sein, während die entsprechenden nicht-kanzerösen Ursprungs-Zellen unbeeinträchtigt bleiben.

[0021] Fig. 3: Gezeigt ist das Ergebnis eines TUNEL-Assays, der zeigt, dass das Bis-Benzoyl, ein Mitglied der neuen Klasse von Verbindungen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, Apoptose (programmierter Zelltod) in Krebszellen induziert. In diesem Experiment werden HeLa-Zellen (Gebärmutterhalskrebs) für ca. 24 Stunden so behandelt, dass der Zelltod begonnen hatte, aber so dass eine signifikante Anzahl von lebenden Zellen verblieb. Alle Krebszellen waren innerhalb von etwa 48 bis 60 Stunden unter diesen Bedingungen abgetötet. Siehe BEISPIEL 9. Die linken Photographien zeigen Phasenkontrast-Lichtmikrographie der Zelle. Eine Zelle, welche die stark abgerundete, intern fragmentierte Erscheinung einer Zelle zeigt, die Apoptose durchläuft, ist durch den Pfeil angegeben. Die mittleren Photographien zeigen dieselben Zellen, mit DAPI gefärbt und durch indirekte Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dieses zeigt die DNA, was zeigt, wo sich die Zellkerne befinden. Es wird auch auf die charakteristische ungleichmäßige Färbung der DNA in den apoptotischen Zellen hingewiesen (Pfeil). Die rechten Photographien zeigen das Ergebnis des TUNEL-Assays derselben Zellen, untersucht durch indirekte Fluoreszenzmikroskopie. Es wird auf den sehr geringen Grad der Färbung der meisten Zellkerne hingewiesen, was eine kleine Anzahl von DNA-Brüchen widerspiegelt (siehe BEISPIEL 9). Im Gegensatz dazu sieht man ein sehr starkes Fluoreszenzsignal bei der apoptotischen Zelle (Pfeil). Dies ist diagnostisch für die große Anzahl von DNA-Brüchen, die für Zellen charakteristisch sind, die den programmierten Zelltod durchlaufen (Apoptose).

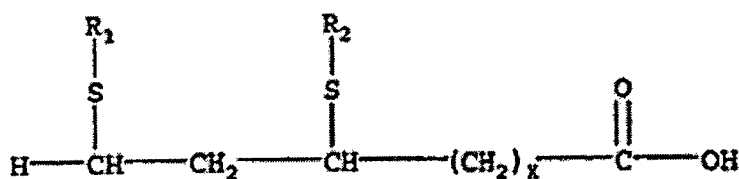
DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

Strukturelle Eigenschaften von Liponsäurederivaten

[0022] Die Verbindungen unserer Erfindung umfassen Liponsäure, die an der Thiolgruppe des Moleküls durch organische Gruppen derivatisiert wurde. Lipon-/Dihydroliponsäure-Spezies mit längeren oder kürzeren Kohlenstoffketten, mit einer Länge von bis zu 20 Kohlenstoffen, vorzugsweise zwischen 4 bis 10 Kohlenstoffen, können zur Ausführung dieser Erfindung verwendet werden. Die Varianten von Liponsäure der vorliegenden Erfindung umfassen solche, in denen die Carbonsäuregruppe unangetastet ist, und in denen ein oder beide Thiole und/oder Sulfhydryle durch Derivatisierung blockiert sind, um Tumorzellen durch Eingriff in Tumorzell-spezifische PDC-Funktionen gezielt abzutöten.

[0023] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Klasse von Liponsäurezusammensetzungen der Formel:

I.



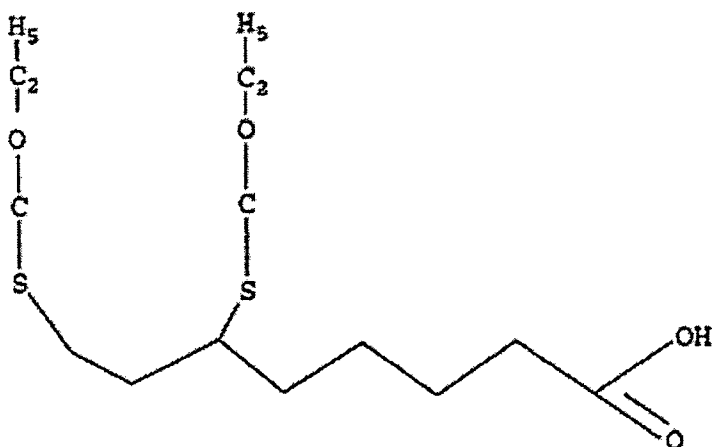
wobei: x von 0–16 ist und R₁ und R₂ unabhängig die Folgenden sein können:

- (1) Eine durch eine Thioester-Bindung gebundene Acylgruppe. Die Acylgruppe umfasst CH₃(CH₂)_{n-1}(C=O)-, wobei n von 1–10 ist. Beispiele von Acylgruppen umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf Acetyl und Butyryl. Ein spezielles Beispiel einer mit Acyl derivatisierten Liponsäure ist Bis-Acetyl-Lipoat (Beispiel 1).
- (2) Eine durch eine Thioester-Bindung gebundene aromatische Gruppe. Beispiele von aromatischen Gruppen umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf Benzoyl oder ein Benzoylderivat. Ein spezielles Beispiel einer mit Benzoyl derivatisierten Liponsäure ist Bis-Benzoyl-Lipoat (Beispiel 2).
- (3) Eine durch eine Thioether-Bindung gebundene Alkylgruppe. Die Alkylgruppe umfasst C_nH_{2n+1}, wobei n 1–10 ist. Solche Alkylgruppen können mit weiteren Gruppen, wie etwa z.B. OH, Cl oder NH₂, substituiert sein. Beispiele von Alkylgruppen umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf Methyl, Ethyl, Butyl, Decanyl und 6,8-Bis-Carbamoyl-methylipoat. (BEISPIEL 3).
- (4) Eine durch eine Thioether-Bindung gebundene Alkengruppe. Das Alken umfasst C_nH_{2n}, wobei n von 2–10 ist. Beispiele von Alkengruppen umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf Propylen, 2,3-Dimethyl-2-buten und Hepten.
- (5) Eine durch eine Thioether-Bindung gebundene Alkingruppe. Das Alkin umfasst C_nH_{2n-2}, wobei n 2–10 ist. Beispiele von Alkingruppen umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf Acetylen, Propin und Octin.
- (6) Alkyl-, Alken- und Alkingruppen können entweder offene Ketten oder alicyclisch sein. Alicyclische Gruppen können Additionen oder Substitutionen an jedem der Kohlenstoffe aufweisen, um Heterocyclen zu bilden. Beispiele von alicyclischen Gruppen umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf Cyclopropan, Cyclopenten und 6,8-Methylsuccinimidolipoat (BEISPIEL 4).
- (7) Alkyl-, Alken- und Alkingruppen können Additionen an jedem ihrer Kohlenstoffe aufweisen. Beispiele von Additionen umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf Hydroxyle und Amine.
- (8) Eine durch eine Thioether-Bindung gebundene aromatische Gruppe. Die aromatischen Gruppen können ein Benzol oder Benzolderivat sein. Beispiele von Benzolderivaten umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf Toluol und Anilin.
- (9) Alkylsulfid (CH₃(CH₂)_t-S-, wobei t 0–9 ist).
- (10) Thiocarbaminsäureestergruppe [CH₃(CH₂)_{n-1}C=NH-, wobei n 1–10 ist], die durch eine Thioamid-Bindung gebunden ist; und
- (11) Semithioacetalgruppe [CH₃CH(OH)-S-, wobei R auf Verbindungen beschränkt ist, die stark Elektronen-abziehende Substituenten haben. Beispiele umfassen Trichloracetaldehyd und Brenztraubensäure.

[0024] R₁ und R₂ können auch Thioester umfassen, die oxidiert sein können, um Sulfoxide oder Sulfone zu ergeben, z.B. C-S(O)-R und C-S(O)₂-R. R₁ und R₂ können weiterhin Disulfide umfassen, die oxidiert sein können, um Thiosulfin- oder Thiosulfonsäuren zu ergeben, beispielsweise C-S(O)-S-R und C-S(O)₂-S-R.

[0025] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Liponsäure der vorliegenden Erfindung durch Addition einer Blockierungsgruppe(n) an eine oder beide Sulfhydryle derivatisiert. Diese Blockierungsgruppen können jede Form haben, wie etwa aliphatische oder aromatische organische Substituenten, die an ein oder beide

Sulfhydryle gebunden werden. Die allgemeine Struktur dieser Klasse von Lipoatderivaten ist unten dargestellt. Ein spezielles Beispiel ist wie folgt:



Diethoxycarbonylierte Liponsäure

[0026] Die Verbindungen unserer Erfindung umfassen Liponsäure, die an der Thiolgruppe des Moleküls durch organische Gruppen derivatisiert wurde.

[0027] Es sind Verbindungen erhältlich, die spezifisch mit Thiolgruppen reagieren und die im Stand der Technik wohlbekannt sind. Beispiele solcher Thiol-spezifischen Reagenzien umfassen N-Ethylmaleimid (NEM), 5,5-Dithiobis (2-nitrobenzoesäure) (DNTB), p-Chlor-Quecksilberbenzoesäure (PCMB) und Ethylchloroformat (ECF). Im Allgemeinen bilden Thiol-reaktive Reagenzien Thioether oder Thioester mit den reagierenden Thiol(en), und alle derartigen Verbindungen sind von dieser Klasse umfasst.

Zusammensetzungen von Liponsäurederivaten für die therapeutische Verwendung

[0028] Für therapeutische Anwendungen wird eine pharmazeutische Zusammensetzung(en), umfassend eine wirksame Menge der oben beschriebenen Liponsäurederivate zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger direkt an einen Patienten verabreicht. Die Zusammensetzungen können in Form von Tabletten, Kapseln, Pulvern, Granulat, Pastillen, Zäpfchen, rekonstituierbaren Pulvern oder flüssigen Zusammensetzungen, wie etwa orale oder sterile parenterale Lösungen oder Suspensionen, vorliegen. Für die Konsistenz der Verabreichung ist es jedoch bevorzugt, dass die Liponsäurederivat-Zusammensetzung in Form einer Einzelpackung vorliegt. Für die orale Verabreichung können Tabletten und Kapseln herkömmliche Arzneiträger enthalten, wie etwa Bindemittel, Gleitmittel für die Tablettenherstellung, oder pharmazeutisch annehmbare Benetzungsmittel, wie etwa Natriumlaurylsulfat.

[0029] Feste orale Zusammensetzungen können durch herkömmliche Verfahren des Mischens, Füllens, Tablettierens oder dgl. hergestellt werden. Wiederholte Mischvorgänge können eingesetzt werden, um das Liponsäurederivat in jeder Zusammensetzung, die Füllmittel umfasst, zu verteilen. Solche Vorgänge sind natürlich im Stand der Technik bekannt. Siehe z.B. Remington's Pharmaceutical Sciences, 17. Auflage 1985, Gennaro Herausgeber, Mack Pub. Co., PA, USA. Die Tabletten können gemäß allen in der pharmazeutischen Praxis wohlbekannten Verfahren beschichtet werden, insbesondere mit einer magensaftresistenten Beschichtung. Orale flüssige Zusammensetzungen können in Form von beispielsweise Emulsionen, Sirupen oder Elixieren vorliegen, oder sie können als gefrorenes Produkt zur Rekonstituierung vor ihrer Verwendung mit Wasser oder anderen geeigneten Vehikeln bereitgestellt werden. Solche flüssigen Zusammensetzungen können herkömmliche Zusätze, wie etwa Suspensionsmittel, Emulgiermittel, nicht-wässrige Vehikel (welche essbare Öle umfassen können) enthalten, und, falls gewünscht, herkömmliche Geschmacksmittel oder Farbstoffe.

[0030] Für die parenterale Verabreichung werden Flüssig-Einzelpackungen hergestellt, welche das Liponsäurederivat in einem sterilen Vehikel verwenden, und, je nach der verwendeten Konzentration, kann dieses entweder in dem Vehikel suspendiert oder aufgelöst sein. Bei der Herstellung von Lösungen kann das Liponsäurederivat zur Injektion in Wasser gelöst und filtersterilisiert werden, bevor es in ein geeignetes Röhrchen oder eine Ampulle eingefüllt und verschlossen wird. Es können auch Adjuvantien, wie etwa Lokalanästhetika, ein Konservierungsmittel und Puffermittel im Vehikel gelöst werden. Um die Stabilität zu erhöhen, kann die Zusammensetzung nach dem Abfüllen in das Röhrchen gefroren werden und das Wasser unter Vakuum entfernt werden. Parenterale Suspensionen werden im Wesentlichen auf die gleiche Weise hergestellt, außer dass das

Liponsäurederivat in dem sterilen Vehikel suspendiert wird. Ein oberflächenaktives oder Benetzungsmittel kann in der Zusammensetzung umfasst sein, um eine gleichmäßige Verteilung des Liponsäurederivats sicherzustellen.

[0031] In den Verfahren zum Verhindern oder Inhibieren von Krebs können das Liponsäurederivat oder eine ein Liponsäurederivat umfassende pharmazeutische Zusammensetzung über eine oder verschiedene Routen verabreicht werden, einschließlich intravenös, intramuskulär, subkutan, intradermal, intraperitoneal, intrathoraxisch, intrapleurale, intrauterin, topisch oder intratumoral.

[0032] Der Fachmann auf dem Gebiet wird erkennen, dass die Art der Verabreichung des Liponsäurederivats vom Krebstyp oder dem zu behandelnden Symptom abhängt. Beispielsweise wäre eine bevorzugte Verabreichungsrouten der Liponsäure zur Behandlung von Leukämie eine intravenöse Verabreichung, wohingegen bevorzugte Verfahren zur Behandlung von Hautkrebs beispielsweise eine topische oder intradermale Verabreichung umfassen würden.

[0033] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen der Erfindung können von 0,1 Gew.-% bis 99 Gew.-%, vorzugsweise von 10 Gew.-% bis 25 Gew.-% des Liponsäurederivats enthalten, je nach Verabreichungsverfahren.

Verfahren zur Verwendung von Liponsäurederivaten

[0034] Die Liponsäurederivate der Erfindung können in einem Verfahren zum Verhindern oder Inhibieren von Krankheiten, welche eine veränderte oder spezifische zelluläre PDC-Aktivität umfassen, verwendet werden. Solche Krankheiten sind charakterisiert durch eine Empfindlichkeit gegen die Lipoatzusammensetzungen der vorliegenden Erfindung. Einer der wichtigsten Vorteile unserer Liponsäurederivate als chemotherapeutische Mittel ist ihre Spezifität. Zellen mit entsprechend verändertem oder gestörtem Energiemetabolismus, d.h. veränderte PDC-Aktivität, werden gezielt angegriffen und abgetötet, während die umgebenden gesunden Gewebe durch das Liponsäurederivat nicht beeinträchtigt werden. Der Fachmann kann Krankheiten mit einer veränderten PDC-Aktivität leicht identifizieren. Alternativ hierzu kann der Fachmann die zu behandelnde Krankheit auf ihre Empfindlichkeit auf die hier beschriebene Klasse von Verbindungen screenen.

[0035] In einem bevorzugten Behandlungsverfahren werden die hier beschriebenen Liponsäurezusammensetzungen für die Prävention und die Behandlung von Krebsarten, wie etwa primäres oder metastatisches Melanom, Thymom, Lymphom, Sarcom, Lungenkrebs, Leberkrebs, Nicht-Hodgkin's Lymphom, Hodgkin's Lymphom, Leukämien, Gebärmutterkrebs, Gebärmutterhalskrebs, Blasenkrebs, Nierenkrebs, Darmkrebs und Adenokarzinomen, wie etwa Brustkrebs, Prostatakrebs, Eierstockkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs, verwendet. Eine große Vielzahl an Tumorarten, einschließlich Gebärmutterhals-Karzinome und Brustkrebsarten reagieren empfindlich auf diese neue Klasse von Verbindungen. Zelluläre Ergebnisse zeigen, dass eine Krebs-spezifische Zellabtötung beobachtet werden kann, beispielsweise in der hierin unten beschriebenen Tabelle 1.

[0036] Die bevorzugte Dosis des Liponsäurederivats oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung daraus wird auf der Basis von weiteren Kriterien ausgewählt, einschließlich der besonderen verwendeten Zusammensetzung und dem Alter, Gewicht und Zustand des Patienten. Es ist wichtig, dass die Menge an Liponsäurederivat ausreichend ist, um Tumorzellen zu inhibieren oder abzutöten, während normale Zellen im Wesentlichen unverletzt bleiben sollten. Im Allgemeinen ist es wünschenswert, dem Patienten eine Dosis von Liponsäurederivat von mindestens etwa 10 μM , vorzugsweise mindestens 100 μM , stärker bevorzugt mindestens etwa 400 μM zu verabreichen, während ein Bereich von etwa 10 μM bis etwa 1 mM verwendet werden kann. Es kann natürlich eine niedrigere oder höhere Dosis verabreicht werden, wobei die in den hierin beschriebenen Beispielen offenbarten in vivo Daten als Richtschnur herangezogen werden können. Wie oben beschrieben, beeinflussen eine Vielzahl von klinischen Faktoren die bevorzugten Dosisbereiche.

[0037] Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Behandlung einer Krankheit, die gegen Lipoatderivate empfindlich ist, umfassend die Verabreichung einer wirksamen Menge einer Lipoatverbindung und eines zweiten Reagenzes, um die Krankheit zu behandeln. Dieses zweite Reagenz ist vorzugsweise ein Inhibitor des Energiemetabolismus in Mitochondrien und/oder eines, welches Apoptose induziert. Solche Reagenzien umfassen Metabolismus-inhibitorische Reagenzien. Viele solcher Reagenzien sind im Stand der Technik bekannt. Ein besonders bevorzugtes Reagenz ist Dichloracetat. Dieses zweite Reagenz kann nachfolgend, gleichzeitig oder separat verabreicht werden, um das Ansprechen des Patienten auf das Behandlungsverfahren zu verstärken.

[0038] Durch Anpassung der hierin beschriebenen Behandlungen können die Liponsäurederivate auch in Verfahren zur Behandlung von anderen Krankheiten als Krebs verwendet werden, bei denen die krankheitsverursachenden Zellen ein verändertes Metabolismmuster zeigen. Beispielsweise sind eukaryontische Pathogene von Menschen und anderen Tieren im Allgemeinen sehr schwieriger zu behandeln als bakterielle Pathogene, da eukaryontische Zellen den tierischen Zellen viel ähnlicher sind als bakterielle Zellen. Solche eukaryontischen Pathogene umfassen Protozoen, wie etwa jene, die Malaria verursachen, sowie Pilzpathogene und Algenpathogene. Aufgrund des bemerkenswerten Mangels an Toxizität der Liponsäurederivate der Erfindung gegenüber normalen Menschen- und Tierzellen und weil viele eukaryontische Pathogene Lebenszyklusstadien durchlaufen, in denen ihre PDCs gegenüber Mitgliedern der neuen Klasse von hierin beschriebenen Lipoatderivaten empfindlich sind, töten einige dieser Mitglieder der neuen Klasse von Lipoatderivaten bakterielle PDCs ab und stellen daher eine fundamental neue Klasse von antibakteriellen Mitteln dar. Da gegen traditionelle Antibiotika resistente Bakterien ein zunehmendes schwerwiegendes klinisches Problem darstellen, werden diese Verbindungen sich in diesem Zusammenhang als von therapeutischer Wichtigkeit erweisen.

[0039] In noch weiteren Anwendungen werden die Liponsäurederivate der vorliegenden Erfindung als diagnostische Mittel in vitro verwendet. Wie oben erwähnt, können die verschiedenen Liponsäurederivate, je nach der jeweiligen speziellen Tumorzelle oder Zelltyp mehr oder weniger wirksam bei der Inhibierung unterschiedlicher Tumorklassen sein. Somit stellt z.B. in Fällen, bei denen die Diagnose oder Selektion einer geeigneten chemotherapeutischen Strategie schwierig sein kann, das Testen einer Tumorzellkultur in vitro mit Liponsäurederivaten, von denen bekannt ist, dass sie spezifische Tumorzelltypen angreifen, einen alternativen Ansatz zur Identifizierung von Tumortypen und für wirksame Behandlungen dar.

Beispiel 1

[0040] Um die Existenz einer großen neuen Klasse von Antikrebsmitteln, die aus blockierten und/oder deaktivierten Liponsäurederivaten bestehen, zu bestätigen, wurde eine Anzahl neuer Liponsäurederivate hergestellt und getestet. In diesem und den folgenden fünf BEISPIELEN (1–5) werden die Synthese, Struktur und Aufreinigung von sechs Verbindungen beschrieben. Diese Verbindungen werden dann in späteren BEISPIELEN (6–13) getestet.

Herstellung von 6,8-Bisacetylmercaptooctansäure (Bis-Acetyl liponsäure)

[0041] 6,8-Bisacetylmercaptooctansäure (im Folgenden als Bis-Acetyl liponsäure bezeichnet) wurde aus gewerblich erhältlicher Liponsäure unter Verwendung eines dreischrittigen Verfahrens hergestellt. Diese Schritte waren wie folgt: Liponsäure wurde zunächst zu 6,8-Bismercaptooctansäure reduziert, welche anschließend acetyliert wurde, um 6,8-Bisacetylmercaptooctansäure-Essigsäureanhydrid zu ergeben. Dieses 6,8-Bisacetylmercaptooctansäure-Essigsäureanhydrid wurde dann selektiv hydrolysiert, um die 6,8-Bisacetylmercaptooctansäure zu ergeben.

[0042] Im Detail wurden diese Schritte wie folgt durchgeführt.

[0043] SCHRITT 1: 6,8-Bismercaptooctansäure: a-Liponsäure (5,15 g, 25,0 mmol) wurde in 125 ml Wasser suspendiert und es wurde Natriumbicarbonat (2,10 g, 25,0 mmol) hinzugefügt. Das Gemisch wurde mit Ultraschall behandelt, um das Natriumsalz zu bilden. Die resultierende blassgelbe Lösung wurde in einem Eisbad gekühlt, und es wurde festes Natriumborhydrid (1,90 g, 50,0 mmol) unter Rühren in kleinen Portionen über 20 Minuten hinzugefügt. Die Lösung wurde bei Eisbadtemperatur weitere 30 Minuten gerührt und anschließend bei Raumtemperatur für 30 Minuten gerührt. Die trübe Lösung wurde in einem Eisbad abgekühlt, und der pH-Wert durch die langsame Zugabe von 2M Salzsäure auf etwa 1 gebracht. Es erfolgte eine starke Freisetzung von Wasserstoff bei der Zersetzung des überschüssigen Natriumborhydrids, und es trennte sich eine ölige Flüssigkeit ab. Soweit als möglich wurden die folgenden Schritte unter Stickstoff durchgeführt. Das Gemisch wurde mit 3 × 50 ml Chloroform extrahiert. Die zusammengegebenen Chloroformextrakte wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter verringertem Druck bei Raumtemperatur verdampft. Das verbleibende Öl wurde weiter unter Vakuum getrocknet, um die letzten Spuren an Lösungsmittel zu entfernen. Die 6,8-Bismercaptooctansäure wurde als farbloses Öl isoliert, welches 5,2 g wog (100% Ausbeute). Das Produkt wurde bei -20° unter Stickstoff gelagert.

[0044] Die Analyse ergab die folgenden Ergebnisse: 1H-NMR (CDCl₃): 2,89 (Multipllett, 1H, S-C-H), 2,67 (Multipllett, 2H, S-CH₂), 2,34 (t, J = 7,1 Hz, 2H, CH₂C(O)), 1,4 – 1,92 (Multipletts, 8H, (CH₂)₂), 1,33 (t, J = 8,0 Hz, 1H, S-H), 1,30 (t, J = 7,6 Hz, 1H, S-H).

13C-NMR (CDCl₃): 180,0, 42,7, 39,2, 38,6, 33,8, 26,4, 24,2, 22,2

[0045] SCHRITT 2: 6,8-Bisacetylmercaptooctansäure-Essigsäureanhydrid: 6,8-Bismercaptooctansäure (5,20 g, 25 mmol) wurde in 125 ml trockenem Methylenchlorid unter Stickstoff gelöst, und es wurde Triethylamin (8,10 g, 80,0 mmol, 11,25 ml) hinzugefügt. Die Lösung wurde in einem Eisbad gekühlt und es wurde Acetylchlorid (6,30 g, 80,0 mmol) in 25 ml Methylenchlorid gelöst und tropfenweise unter Rühren über 15 Minuten hinzugegeben. Während dieser Zugabe fiel Triethylammoniumchlorid aus. Die Lösung selbst blieb farblos. Das Rühren wurde bei Raumtemperatur für 90 Minuten fortgeführt. Das Volumen wurde auf 300 ml mit mehr Methylenchlorid (alle Feststoffe gelöst) gebracht und die Lösung wurde in einen Separationstrichter überführt. Sie wurde schnell mit 300 ml 10 %iger Zitronensäure (der pH-Wert der wässrigen Phase wurde nach der Extraktion überprüft, um sicherzustellen, dass er sauer war) extrahiert. Sie wurde ein zweites Mal mit 200 ml der Zitronensäurelösung extrahiert und anschließend mit 200 ml halbgesättigter Salzlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Methylenchlorid verdampft. Es verblieb ein fast farbloses Öl, welches 8,0 g wog.

[0046] Die Analyse ergab die folgenden Ergebnisse: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 3,49 (Multipllett, 1H), 2,7 – 3,0 (Multipllett, 2H), 2,36 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$), 2,27 (s, 3H, CH_3), 2,26 (s, 3H, CH_3), 2,15 (s, 3H, CH_3), 1,3 – 1,9 (Multipllett, 8H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 195,4, 195,2, 168,9, 166,3, 43,2, 34,8, 34,5, 34,2, 30,6, 30,4, 26,3, 25,7, 23,7, 22,0. IR (KBr Pressling): 1821, 1749, 1691 cm^{-1} .

[0047] SCHRITT 3: 6,8-Bisacetylmercapfooctansäure: Das Anhydrid aus Schritt 2 (8,0 g) wurde mit 30 ml Wasser und 30 ml 2-Propanol gemischt und bei 40°C für 4,25 Stunden gerührt. Nach etwa 2 Stunden hatte sich eine klare Lösung gebildet. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum (2 mm) bei 25° verdampft. Das verbleibende Öl wurde mit 10 ml Wasser verdampft, um alles verbleibende 2-Propanol und Essigsäure zu entfernen. Es wurde ein fast farbloses Öl isoliert, welches 6,8 g wog.

[0048] AUFREINIGUNG: Ein Beispiel für eine Aufreinigung ist wie folgt. Das Material aus Schritt 3 wurde mit 5 ml Ethylacetat-Hexan-Essigsäure (100 : 100 : 1, v/v) gemischt, hinzugefügt, um es flüssiger zu machen. Die Lösung wurde auf eine 25 × 6,5 cm Silicagel 60-Säule (etwa 300 g Flash-Silica) in Ethylacetat-Hexan-Essigsäure (100 : 100 : 1, v/v) gepackt. Die Säule wurde mit diesem Lösungsmittel eluiert. 75 ml-Fractionen wurden etwa bei 5 ml/min gesammelt. In Fraktion 13 wurde ein etwa 1 : 1 Gemisch des Produkts und einer etwas schneller eluierenden Verunreinigung gesammelt (Fraktion 13, 0,86 g). Fractionen 14 (1,92 g) und 15 (1,61 g) enthielten das Produkt mit viel weniger dieser Verunreinigung. Reines Material wurde in den Fractionen 16–20 (2,36 g) als farbloses Öl gesammelt. Die Fractionen 14 und 15 wurden rechromatographiert (separat), auf einer 25 × 4,5 cm Säule (150 g Silicagel). Daraus wurden jeweils 1,72 und 1,55 g reines Produkt isoliert. Die Gesamtausbeute an reinem Produkt betrug 5,63 g (77% Ausbeute basierend auf 6,8-Bismercaptooctansäure).

[0049] Die Analyse ergab die folgenden Ergebnisse: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 3,50 (Multipllett, 1H), 2,7 – 3,0 (Multipllett, 2H), 2,27 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$), 2,27 (s, 3H, CH_3), 2,26 (s, 3H, CH_3), 1,1 – 1,8 (Multipllett, 8H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 195,76, 195,50, 179,59, 43,34, 34,60, 34,30, 33,71, 30,68, 30,48, 26,40, 26,01, 24,20.

IR (unverdünnte Flüssigkeit): 2935, 1736, 1691, 1423, 1355, 1134, 1118, 953, 744, 630.

TLC R_f = 0,40 (Ethylacetat-Hexan-Essigsäure, 100:100:1, v/v).

[0050] REINHEIT: Die Analyse zeigt, dass das Endprodukt dieser Synthese (Bis-Acetyl-Liponsäure) mehr als 98% Reinheit aufweist. Darüber hinaus wurden fünf unabhängige Chargen im Rahmen dieser Studien erhalten, und die biologischen Eigenschaften (in BEISPIEL 8 zusammengefasst) aller Chargen waren in jedem getesteten Detail identisch. Die Struktur dieser Verbindung ist unten dargestellt.

Beispiel 2

Herstellung von 6,8-Bisbenzoylmercaptooctansäure (Bisbenzoyl-Liponsäure)

[0051] Im Überblick wurde 6,8-Bisbenzoylmercaptooctansäure in einem dreischrittigen Verfahren aus gewerblicher α -Liponsäure hergestellt. Die Liponsäure wurde zunächst mit Natriumborhydrid in Wasser unter leicht alkalischen Bedingungen zu 6,8-Bismercaptooctansäure reduziert. Dieses Produkt wurde mit drei Äquivalenten an Benzoylchlorid in Gegenwart von Triethylamin benzyliert, um das HCl-Nebenprodukt abzufangen, um 6,8-Bisbenzoylmercaptooctansäure-Benzoesäureanhydrid zu ergeben. Das Anhydrid wurde selektiv mit Dioxan/Wasser hydrolysiert, um 6,8-Bisbenzoylmercaptooctansäure zu ergeben, ohne jedwede unerwünschte Hydrolyse der Benzoylthioestergruppen. Das Produkt wurde durch Säulenchromatographie auf Silicagel aufgereinigt. Die aufgereinigte Säure wurde in Methanol gelöst und durch die langsame Zugabe einer wässrigen Lösung, die ein Mol Äquivalent an Natriumbicarbonat enthielt, zu dem Natriumsalz konvertiert.

[0052] Im Detail wurden diese Schritte wie erläutert durch das folgende Beispiel durchgeführt:

[0053] SCHRITT 1: 6,8-Bismercaptopoctansäure wurde exakt wie in BEISPIEL 1 beschrieben hergestellt.

[0054] SCHRITT 2: 6,8-Bisbenzoylmercaptopoctansäure-Benzoesäureanhydrid: 6,8-Bismercaptopoctansäure (2,03 g, 10 mmol) wurde in 50 ml trockenem Methylenchlorid unter Stickstoff gelöst, und es wurde Triethylamin (3,24 g, 32 mmol, 4,50 ml) hinzugegeben. Benzoylchlorid (4,50 g, 32 mmol) wurde in 20 ml Methylenchlorid gelöst und tropfenweise unter Rühren über 20 Minuten hinzugegeben. Triethylammoniumchlorid fiel aus, wenn etwa die Hälfte des Benzoylchlorids hinzugefügt worden war. Die Lösung selbst blieb farblos. DA Rühren wurde für 9 Stunden bei 25–27° fortgeführt. Das Volumen wurde mit mehr Methylenchlorid (alle Feststoffe gelöst) auf 100 ml gebracht, und die Lösung wurde in einen Separationstrichter überführt. Sie wurde schnell mit 2 × 50 ml 10%iger Zitronensäure extrahiert (der pH-Wert der wässrigen Phase wurde nach der Extraktion überprüft, um sicherzugehen, dass er sauer war), und anschließend mit 50 ml gesättigter Salzlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Methylenchlorid verdampft. Es verblieb ein fast farbloses Öl, welches 5,48 g wog.

[0055] SCHRITT 3: 6,8-Bisbenzoylmercaptopoctansäure: Das Roh-Anhydrid (5,48 g) wurde in 20 ml Dioxan gelöst, und 20 ml Wasser wurden hinzugefügt. Dies führte dazu, dass das Material ausölte. Das Gemisch wurde bei 40–45° für 21 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum (2 mm) bei 30° verdampft. Das verbleibende Öl wurde in 80 ml Chloroform aufgenommen und mit 25 ml 5%iger wässriger Zitronensäure extrahiert. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel verdampft. Ein blassgelbes Öl wurde isoliert, welches 5,7 g wog. Die NMR-Spektren zeigten, dass nur etwa ein Drittel des Anhydrids hydrolysiert worden war. Daher wurde das Rohmaterial in 20 ml Dioxan wieder aufgelöst und 20 ml Wasser hinzugefügt. Das Gemisch wurde bei 45° weitere 32 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde in vacuo verdampft. Nach dieser Behandlung war die Hydrolyse des Anhydrids vollständig.

[0056] AUFREINGIUNG: Das Produkt wurde mit 2 ml Ethylacetat gemischt und auf eine 25 × 4,5 cm Silicagel 60-Säule (150 g Flash-Silica), die in Hexan-Ethylacetat-Essigsäure (100 : 50 : 1, v/v) gepackt war, gegeben. Die Säule wurde mit diesem Lösungsmittel eluiert. 40 ml-Fractionen wurden bei etwa 5 ml/min gesammelt. Schneller eluierendes Material wurde in den Fractionen 10–12 (133 g eines weißen Feststoffs – wahrscheinlich Benzoessäure) gesammelt. Eine kleine Menge dieses schneller eluierenden Materials wurde zusammen mit dem Produkt in den Fractionen 13–15 (0,66 g) gesammelt. Reines Produkt wurde in den Fractionen 16–21 (1,95 g farbloses Öl) gesammelt.

[0057] Die Analyse ergab die folgenden Ergebnisse: 1H-NMR (CDCl₃): 8,0 (Multiplett, 4H, ArH), 7,38 – 7,60 (Multiplett, 6H, ArH), 3,89 (Multiplett, 1H, CH-S), 3,0 – 3,3 (Multiplett, 2H, CH₂S), 2,34 (t, J = 7,1 Hz, 2H, CH₂C(O)), 1,1 – 2,2 (Multiplett, 8H, -CH₂-).

13C-NMR (CDCl₃): 191,71, 191,46, 179,72, 136,98, 136,92, 133,29, 128,51, 127,25, 127,14, 43,60, 34,98, 34,59, 33,76, 26,43, 26,19, 24,29.

TLC R_f = 0,30 (Hexan-Ethylacetat-Essigsäure, 100 : 50 : 1, v/v).

IR (unverdünnte Flüssigkeit): 2937, 1710, 1704, 1662, 1667, 1655, 1448, 1207, 1175, 911, 773, 757, 733, 648, 688 cm⁻¹.

[0058] NATRIUMSALZ: Das Natriumsalz dieses Derivats ist besser löslich und leichter handhabbar. Es ist daher im Allgemeinen bevorzugt, das Material in der Salzform, wie im folgenden Beispiel erläutert, herzustellen. Die Säure (1,95 g, 4,7 mmol) wurde in 10 ml Methanol gelöst, und eine Lösung aus Natriumbicarbonat (0,39 g, 4,7 mmol) in 10 ml Wasser wurde in kleinen Portionen unter heftigem Schwenken über etwa 10 Minuten hinzugegeben. Zunächst ölte Material aus, aber, nachdem die Zugabe vollständig war, ergab sich eine farblose homogene Lösung. Die Lösung wurde für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen, anschließend wurde das Lösungsmittel unter Vakuum (2 mm) bei 20° entfernt, was einen gummiartigen Feststoff ergab. Der Feststoff wurde in 10 ml Methanol gelöst und das Lösungsmittel in vacuo ausgeflasht. Dieses wurde ein zweites Mal wiederholt. Es wurde ein schaumiger weißer Feststoff erhalten. Dieser wurde in vacuo über P205 bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet. Es wurden 1,6 g des Salzes isoliert.

[0059] Die Analyse ergab die folgenden Ergebnisse: 1H-NMR (D₂O): 7,8 – 7,9 (Multiplett, 4H, ArH), 7,0 – 7,4 (Multiplett, 6H, ArH), 3,57 (Multiplett, 1H, -CH-S), 2,9 – 3,1 (Multiplett, 2H, CH₂S), 2,06 (t, 2H, CH₂C(O)), 1,0 – 2,1 (Multiplett, 8H, -CH₂-).

13C-NMR (D₂O): 193,49, 193,11, 183,39, 137,10, 137,00, 134,21, 129,21, 127,70, 127,58, 44,69, 38,15, 34,97, 27,23, 27,00, 26,46.

[0060] REINHEIT: Die Analyse zeigte, dass die Präparationen des Bis-Benzoyl-Lipoats zu mehr als 98% rein waren. Darüber hinaus zeigte jede der drei unabhängigen Präparationen dieses Mittels identische biologische Eigenschaften (siehe BEISPIEL 6).

[0061] Die Struktur dieser Verbindung ist unten erläutert.

Beispiel 3

Herstellung von 6,8-Biscarbamoylmethylmercaptooctansäure

[0062] 6,8-Biscarbamoylmethylmercaptooctansäure: Jodacetamid (1,11 g, 6,0 mmol) wurde zu einer Lösung aus 6,8-Bismercaptooctansäure (0,62 g, 3,0 mmol), gelöst in 30 ml entgastem Methanolwasser (9:1, v/v) bei 0°C hinzugefügt. Die Lösung wurde unter Stickstoff und unter gedämpftem Licht gerührt, und es wurde über 3 Minuten 1,0 M wässriges Natriumhydroxid (9,0 ml, 9,0 mmol) hinzugefügt. Die klare Lösung wurde bei 0°C für 10 Minuten und anschließend bei Raumtemperatur für 4 Stunden gerührt. Der Großteil an Methanol wurde unter verringertem Druck verdampft und das Volumen mit entgastem Wasser auf 25 ml gebracht. Der pH-Wert wurde mit 2 M Salzsäure auf 1 eingestellt. Das Wasser wurde in vacuo bei 25° verdampft und das verbleibende blassgelbe Öl mit 2 × 20 ml Ethylacetat geschüttelt. Das Ethylacetat-unlösliche Material wurde auf Silicagel unter Verwendung von Chloroform-Methanol-Essigsäure (120:60:1, v/v) als Eluent chromatographiert, was 1,0 g (100%) der 6,8-Biscarbamoylmethyl-Mercaptooctansäure als bräunlich-gelben Feststoff ergab.

[0063] Die Analyse ergab die folgenden Ergebnisse: 1H-NMR (D₂O): 3,44 (s, 2H, –CH₂C(O)NH₂), 3,43 (s, 2H, –CH₂C(O)NH₂), 3,00 (m, 1H, –CHS), 2,88 (t, J = 7,44 Hz, 2H, CH₂S), 2,51 (t, J = 7,1 Hz, 2H, –CH₂COOH), 1,95 (m, 2H, –CH₂-), 1,5 – 1,8 (m, 6H, –CH₂-).
13C-NMR (D₂O): 180,07, 175,51, 175,24, 46,00, 35,65, 35,09, 34,11, 34,09, 34,03, 30,29, 26,29, 25,13.
TLC R_f = 0,35; Silicagel G: Chloroform, Methanol, Essigsäure, 60 : 30 : 1, (v/v).

Beispiel 4

Herstellung von 6,8-Bis [S-(N-methylsuccinimido)]mercaptooctansäure

[0064] 6,8-Bis-[S-(N-methylsuccinimido)]mercaptooctansäure: 6,8-Bismercaptooctansäure (0,62 g, 3,0 mmol) wurde mit Natriumbicarbonat (0,25 g, 3,0 mmol), welches in 25 ml entgastem Wasser gelöst war, gemischt und unter Stickstoff bei Raumtemperatur gerührt, bis sich eine klare Lösung ergab. Es wurde N-Methylmaleimid (0,67 g, 6,0 mmol) hinzugefügt, und das Gemisch wurde bei Raumtemperatur unter Stickstoff für 3 Stunden gerührt. Die Lösung wurde filtriert, um Spuren von unlöslichem Material zu entfernen, anschließend mit 20 ml Chloroform gewaschen. Der pH-Wert der wässrigen Phase wurde mit 2 M Salzsäure auf 1,5 eingestellt und das Gemisch mit 3 × 15 ml Chloroform extrahiert. Die Chloroformextrakte wurden getrocknet (MgSO₄), filtriert und das Lösungsmittel verdampft. Es verblieb ein farbloser Sirup, der 1,30 g wog. Die TLC [Silicagel, (Chloroform-Methanol, 10:1, (v/v))] zeigte eine Anzahl überlappender Spots mit R_f = 0,27, wie erwartet für das Gemisch von Diastereomeren, was möglich ist.

[0065] Die Analyse ergab die folgenden Ergebnisse: 1H-NMR (CDCl₃): 3,72 (m, 2H), 2,7 – 3,3 (m, 5H), 2,93 (s, 6H, CH₃-), 2,25 – 2,55 (m, 4H), 2,0 – 1,35 (m, 8H).
13C-NMR (CDCl₃): 178,73, 176,81, 176,77, 176,65, 176,62, 176,54, 176,50, 174,75, 175,69, 45,22, 44,78, 44,57, 39,11, 38,96, 38,90, 38,77, 38,59, 38,51, 38,00, 37,68, 36,35, 36,30, 36,24, 35,87, 35,85, 35,78, 34,49, 34,34, 33,96, 33,79, 33,67, 33,52, 29,08, 28,70, 28,66, 28,45, 25,92, 25,86, 25,58, 25,45, 25,02, 24,98, 24,21, 24,14.

Beispiel 5

Herstellung von Natrium 6,8-dihydroxyoctanoat

[0066] Natrium 6,8-dihydroxyoctanoat: Methyl 6,8-dihydroxyoctanoat (0,15 g, 0,80 mmol; enthaltend etwa 10% des 6,7-Isomers) wurde in 3 ml Methanol gelöst, und es wurde 1,00 M Natriumhydroxid in Methanol (0,80 ml, 0,80 mmol) hinzugefügt. Die Lösung wurde unter Rückfluss für 3 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde in vacuo verdampft, was 0,15 g Natrium 6,8-dihydroxyoctanoat als weißes Pulver ergab. Die Ausbeute war quantitativ.

[0067] Die Analyse ergab die folgenden Ergebnisse: 1H-NMR (D₂O): 3,74 (m, 1H, –CHOH-), 3,70 (t, J = 6,6

Hz, 2H, -CH₂OH), 2,19 (t, J = 7,2 Hz, 2H, -CH₂COOH), 1,2 – 1,9 (m, 8H, -CH₂-).
13C-NMR (D₂O): 184,47, 69,25, 59,42, 39,01, 38,21, 36,77, 26,47, 25,32.

Beispiel 6

[0068] Die BEISPIELE 7–10 beschreiben Ergebnisse aus Kulturzellsystemen, was die Eigenschaften und die Wirksamkeit der Liponsäurederivat-Verbindungen, welche Gegenstand dieser Erfindung sind, zeigt. Tabelle 1 unten fasst alle Ergebnisse, die in den BEISPIELEN 7–10 gefunden wurden, in verkürzter und tabellenförmiger Form zusammen.

[0069] Im Überblick zeigten alle Beispiele, welche die Liponsäurederivate auf Gewebekulturzellen anwenden, dass die Liponsäurederivate die Fähigkeit besaßen, Tumorzellen abzutöten, während sie in den geeigneten Dosisbereichen kontaktinhibierte, normale Nicht-Krebszellen unverletzt ließen.

[0070] Zweitens wurde jeder getestete Krebszelltyp durch eine oder mehrere Mitglieder der Familie von blockierten Liponsäurederivaten abgetötet. Dies deutete darauf hin, dass diese Mittel ein breites Spektrum an potenziellen klinischen Anwendungen haben, einschließlich viele oder die meisten der humanen Krebsarten.

[0071] Drittens hatten unterschiedliche Liponsäurederivatverbindungen etwas unterschiedliche chemische Eigenschaften, einschließlich beispielsweise Löslichkeit in polaren und nicht-polaren Umgebungen, mit entsprechenden Wirkungen darauf, wie effizient verschiedene Derivate die Zellmembran durchqueren und in die Zelle eindringen. Darüber hinaus wiesen die Liponsäurederivate unterschiedliche Verbrauchsgeschwindigkeiten durch zelluläre Enzyme auf, die normalerweise Liponsäure selbst verarbeiten. Unter Berücksichtigung dieser Eigenschaften wurde beobachtet, dass die verschiedenen Liponsäurederivate etwas unterschiedliche Anti-Krebswirksamkeiten aufwiesen. Einige Derivate hatten eine hohe Wirksamkeit, während andere niedrigere, aber immer noch potenziell nützliche Wirksamkeiten aufwiesen.

[0072] Viertens könnten, da verschiedene Tumorzelltypen verschiedene physiologische Eigenschaften aufwiesen, diese Eigenschaften indirekte Wirkungen sowohl auf die Aufnahme und den Einbau von Liponsäurederivaten als auch auf die toxischen Wirkungen dieses Einbaus ausüben. Somit wurde herausgefunden, dass verschiedene Krebszelltypen signifikant unterschiedliche Grade der Empfindlichkeit zeigten. Diese Empfindlichkeit der verschiedenen Krebszellen variierte von relativ empfindlichen Krebszelltypen, die durch alle getesteten Liponsäurederivate abgetötet wurden, bis hin zu relativ resistenten Krebszelltypen, die nur durch die stärker wirksamen Liponsäurederivatverbindungen wirksam abgetötet wurden.

[0073] Trotz dieser Unterschiede in der Wirksamkeit ist es wichtig festzustellen, dass die Liponsäurederivate in den BEISPIELEN unten beschriebene gemeinsame Eigenschaften aufweisen.

TABELLE I

Zell- linie		Bis- Benzoyl- Lipoat	Mono- acetyl- lipoat	Bis- Acetyl- lipoat	Bis- Methyl- succinimid- lipoat	Bis- Carba- moyl- lipoat	Dihydroxy- octan- säure
Hep G2		+	+	+	+	+	--
SW480	Darm	+	+	+	+	--	--
A549	Lunge	+	+	+	+	--	--
LnCap	Prostata	+	+	+	+	--	--
MCF 7	Brust	+	+	+	+	--	--
HeLa	Gebär- mutter- hals	+	+	+	+	--	--
B16	Haut	+	+	+	+	--	--
RD	Embryo	+	+	+	+	--	--
Saos 2	Knochen	+	+	+	+	--	--
NIH 3T3	ras transfor- miert	+	+	+/-	--	--	--
NIH 3T3	Ursprung	--	--	--	--	--	--
MDCK	Niere	--	--	--	--	--	--
NHKC	Haut	--	--	--	--	--	--

[0074] Tabelle 1: Es ist das Ansprechen von Zellen in Kultur auf das Abtöten durch Beispielmitglieder der Familie von blockierten Lipoatderivaten zusammengefasst, welche Gegenstand dieser Erfindung sind, sowie durch eine Kontrollverbindung (Dihydroxyoctansäure). Auf der rechten Seite ist die spezifische Zelllinie angegeben, gefolgt vom Ursprungsgewebe der Zelllinie. Oben sind die spezifischen getesteten Verbindungen aufgelistet. Jedes blockierte Lipoatderivat wurde zwei- bis vierfach oberhalb seiner Schwellen-Abtötungskonzentration verwendet. [Diese Konzentrationen waren im Bereich von 0,15 mM (60 µg/ml oder 60 mg/kg) bis 2,5 mM (800 µg/ml oder 800 mg/kg) (siehe BEISPIEL 9).] Dihydroxyoctansäure wurde bis zu Konzentrationen von 5 mM (3200 µg/ml oder 3200 mg/kg) ohne nachweisbare Wirkung getestet. "+" zeigt, dass die Zellen durch die Behandlung abgetötet wurden, während "-" zeigt, dass sie nicht abgetötet wurden. "+/-" zeigt ein langsames geringfügiges Ansprechen, die nur in einigen speziellen Fällen mit experimentell durch das Einführen des ras-Oncogens transformierten Fibroblasten beobachtet wurde (BEISPIEL 10).

Beispiel 7

[0075] Dieses Beispiel beweist, dass die Liponsäurederivate dieser Erfindung Krebszellen mit hoher Spezifität abtöten. Genauer wird die Verwendung von Liponsäurederivaten in Kulturzellsystemen beschrieben. Die Ergebnisse zeigen, dass die Lipoatderivate Krebszellen (transformiert) unter Bedingungen, unter denen normale Nicht-Krebszellen (nicht-transformiert) scheinbar unbeeinträchtigt waren, effizient abtöteten. Die in TABELLE 1 in BEISPIEL 6 zusammengefassten Daten wurden unter Verwendung der folgenden Vorgehensweise erzeugt:

Zunächst wurde jeder zu testende Zelltyp bei geringen Dichten in die Vertiefungen einer Standardgewebekulturplatte mit 6 × 24 Vertiefungen plattiert. (Für jeden Zelltyp wurden mehrfache Vertiefungen ausgesät.)

[0076] Zweitens ließ man die Zellen auf mittlere Dichte wachsen. Transformierte Zellen sind in Kontakt, und nicht-transformierte Zellen sind kontakthinhibiert unter diesen Bedingungen.

[0077] Drittens wurden die zu testenden Lipoatderivate zu den einzelnen Vertiefungen hinzugefügt. In diesen Experimenten wurde jede Verbindung in einer zweifachen bis vierfachen Konzentration oberhalb der Schwellen-Abtötungskonzentration für Krebszellen hinzugefügt (BEISPIEL 9).

[0078] Viertens wurden die Zellen über die nächsten Tage überwacht.

[0079] Für alle getesteten blockierten Lipoatderivate wurde gefunden, dass jeder empfindliche Krebszelltyp

effizient abgetötet wurde, während jeder der vier verschiedenen normalen Nicht-Krebszelltypen, die getestet wurden, nicht beeinträchtigt wurde.

[0080] [Fig. 1](#) zeigt die Ergebnisse von Experimenten unter Verwendung der Liponsäurederivate, zum selektiven Abtöten einer Reihe von Tumorzelltypen.

Beispiel 8

[0081] In diesem Beispiel wurde das gut entwickelte Zellkultursystem NIH-3T3 zum Testen der Liponsäurederivate dieser Erfindung verwendet. NIH-3T3-Zellen sind relative normale, nicht-krebsartige Zellen. Wenn jedoch ein aktiviertes Allel des ras-Oncogens in diese Zellen eingeführt wird, werden sie stark bösartig (krebsartig), wie durch verschiedene Tests nachgewiesen werden kann (REFERENZ).

[0082] Unter Verwendung des in BEISPIEL 7 beschriebenen Verfahrens wurde die Empfindlichkeit auf Liponsäurederivate von Ursprungs-NIH 3T3-Zellen und dem ras-transformierten T24-Derivat dieser Zellen verglichen. Es wurde gefunden, dass die stärkeren blockierten Lipoatderivate (siehe TABELLE 1, BEISPIEL 6) die transformierten Zellen sehr effizient abtöteten, während die nicht-transformierten Ursprungs-Zellen unbeeinträchtigt blieben. Die Ergebnisse sind in [Fig. 2](#) gezeigt.

[0083] Somit stellen diese Ergebnisse zusätzliche Hinweise darauf dar, dass blockierte Lipoatderivate Krebszellen mit hoher Spezifität abtöten.

Beispiel 9

[0084] Dieses Beispiel prüft einige der Eigenschaften, welche die Liponsäurederivate der Erfindung gemeinsam haben.

[0085] Zunächst tötete jede Verbindung Krebszellen in Kultur bei oder oberhalb eines relativ schmalen, spezifischen Konzentrationsbereiches ab, aber nicht darunter. Die unten angegebenen Schwellenkonzentrationen stellen den ungefähren Mittelwert dieses Bereichs dar, welcher sich grob über zweifach bis dreifach erstreckt. Dieses Abtötungsprofil zeigte, dass diese Verbindungen einen oder mehrere zelluläre Prozesse oder Ziele absättigen, um eine Abtötung zu erreichen. Unterhalb dieser Absättigungsbereiche überlebten empfindliche Zellen und wuchsen. Sie konnten entfernt und replattiert werden, um, scheinbar unendlich, unter diesen Bedingungen weiterzuwachsen. Im Gegensatz dazu hielt oberhalb dieser spezifischen Konzentrationsbereiche des Liponsäuremittels das Zellwachstum an, und es folgte der Zelltod. Dies war ein sehr ungewöhnliches Dosis/Ansprech-Profil. Die Schwellen-Abtötungskonzentrationen (Bereiche) variierten zwischen einzelnen Verbindungen. Beispiele dieser Schwellen-Abtötungskonzentrationen waren wie folgt: Bis-Benzoyl-Lipoat (BEISPIEL 2) 60 mg/Liter (60 mg/kg); Bis-Acetylipoat (BEISPIEL 1) 600 mg/Liter (600 mg/kg).

[0086] Zweitens erzeugte jedes getestete Liponsäurederivat spezifische morphologische Veränderungen in empfindlichen Zielzellen über eine anfängliche 12–24-stündige Zeitdauer der Behandlung. Diese Veränderungen umfassten eine Abrundung sowie die häufige Bildung von Zellpaaren, die durch brückenartige Strukturen verbunden waren, die an zum Stillstand gebrachte Cytokinese erinnerten. Auf diese Veränderungen folgte letztendlich der Zelltod, wenn die Behandlung weitergeführt wurde. Diese morphologischen Veränderungen wurden jedoch rückgängig gemacht, und die Zellen erholten sich, wenn das Lipoatderivat während dieses anfänglichen Ausgesetztseins entfernt wurde. Wie mit dem Dosis/Ansprech-Profil des vorangegangenen Absatzes ist diese reversible Induzierung der morphologischen Veränderung, gefolgt von einer Zwangsläufigkeit des Zelltods stark idiosynkratisch. Die Erkenntnis, dass dieses Verhalten von allen getesteten Mitgliedern der Klasse von Verbindungen, die Gegenstand dieser Erfindung sind, gezeigt wurde, war wiederum ein sehr starker Hinweis darauf, dass diese Verbindungen tatsächlich eine funktionell kohärente Klasse sind.

Beispiel 10

[0087] Dieses Beispiel stellt Hinweise bereit, dass die Liponsäurederivate, die Gegenstand dieser Erfindung sind, Krebszellen durch die Induzierung von Apoptose (programmierter Zelltod) abtöten. Von Wichtigkeit ist, dass alle getesteten Mitglieder diese Eigenschaft aufwiesen. Dies stellt einen starken zusätzlichen Beweis dar (ebenso, siehe BEISPIELE 6, 7 und 9), dass diese Verbindungen auf die gleiche Art und Weise fungieren. Tatsächlich induzieren diese Verbindungen offensichtlich Krebszellen dahingehend, "Selbstmord zu begehen". Des Weiteren ist die Induzierung von Apoptose im Gegensatz zur Nekrose eine vorteilhafte Eigenschaft für die klinische Verwendung dieser Verbindungen. Unter apoptotischen Bedingungen ist der "Selbstmord" von Krebs-

zellen weniger störend als Nekrose der umgebenden normalen Zellen.

[0088] Um das in diesem Beispiel beschriebene Experiment zu verstehen, ist es notwendig, die Einzelheiten betreffend den speziellen in den Experimenten verwendeten Test zu betrachten. Zellkern-DNA von Zellen ist normalerweise in sehr langen Molekülen vorhanden, die Chromosome bilden. Diese sehr langen polymeren Moleküle haben nur sehr seltene freie Enden. Im Gegensatz dazu führt die Induzierung der Apoptose in der Zelle dazu, dass diese sich selbst zerstört, und in diesem Prozess wird eine extrem große Anzahl von Brüchen in die DNA eingeführt, und diese wird in ihre kleineren Monomer-Bestandteile zerkleinert. Das geeignete Enzym – terminale Transferase – addiert Nukleotide an die freien Enden von DNA-Molekülen. Darüber hinaus verwendet dieses Enzym Monomere (Nukleotide) für diese Additionsreaktion, welche stark fluoreszierende Gruppen aufweisen. Falls somit die Zellkerne von normalen Zellen – mit wenigen freien DNA-Enden – mit einer terminalen Transferase und fluoreszierenden Monomeren behandelt werden, wird sehr wenig Fluoreszenz zu diesen Zellkernen hinzugefügt. Im Gegensatz dazu wird, wenn diese Komponenten zu den Zellkernen von Zellen hinzugefügt werden, die einer Apoptose unterliegen, und eine große Anzahl von fluoreszierenden Monomeren hinzugefügt wird – zu den sehr vielen DNA-Enden, die vorhanden sind, resultiert dies in einer massiven Einführung von Fluoreszenz. Der herkömmliche Assay, der auf diesen Eigenschaften beruht, wird durch das Akronym TUNEL bezeichnet.

[0089] Das Folgende ist ein Beispiel der Experimente, welche zeigen, dass die Lipoatderivate, die Gegenstand dieser Erfindung sind, Apoptose induzieren. HeLa-Krebszellen wurden in mehrere Vertiefungen in einer Gewebekulturplatte ausplattiert. Einige Vertiefungen (experimentell) wurden mit dem Bis-Benzoyl-Lipoat-Derivat (BEISPIEL 2) bei einer etwa zweifach höheren Konzentration als der Schwellen-Abtötungskonzentration (BEISPIEL 9) behandelt, während andere Vertiefungen (Kontrollen) unbehandelt belassen wurden. Nach ca. 20 Stunden begannen die behandelten (experimentellen) Zellen, abzusterben. Die experimentellen und Kontroll-Zellen wurden dann fixiert, permeabilisiert und einer terminalen Transferase und fluoreszierende Monomeren (Nukleotiden) ausgesetzt. Dieser Test zeigt, dass dieser Untertyp von Krebszellen, welche in dem Moment des Tests aktiv absterben, das TUNEL-Fluoreszenzsignal zeigen, das bei Zellen erwartet wird, die eine Apoptose durchlaufen. Dies zeigt, dass alle getesteten Mitglieder der Liponsäureverbindungen, die Gegenstand dieser Erfindung sind, in Krebszellen Apoptose induzieren.

[0090] Die Ergebnisse des obigen Experiments sind in [Fig. 3](#) dargestellt.

Beispiel 11

[0091] Dieser Abschnitt bespricht die Toxikologie in der Maus für die Liponsäurederivate dieser Erfindung. Ein Schlüsselpunkt bei der Untersuchung der praktischen klinischen Eignung von neuen Anti-Krebsmitteln ist ihre Toxizität für Menschen und Tiere, in denen sie verwendet werden sollen. Um sehr gut geeignet zu sein, müssen solche Mittel unter Bedingungen, bei denen sie Krebszellen wirksam abtöten oder inhibieren, im menschlichen oder tierischen Wirt relativ unschädlich sein. Mitglieder der Familie von blockierten Lipoatderivaten zeigten diese wünschenswerte, essenzielle Eigenschaft, wie durch die folgenden Beobachtungen gezeigt wird.

[0092] Es ist seit vielen Jahren bekannt, dass selbst normal vorkommende, biogene Moleküle toxisch sind, wenn sie in ausreichend hohen Dosen verabreicht werden. Liponsäure ist offensichtlich keine Ausnahme. Bei ausreichenden Dosen kann sie eine Maus töten. Wir werden diese Tötung im Folgenden als nicht spezifische Toxizität bezeichnen. Die getesteten Mitglieder unserer neuen Klasse von Verbindungen haben nicht-spezifische Toxizitäten, die niedriger sind als bei normaler Liponsäure. Darüber hinaus haben die getesteten Mitglieder dieser Klasse, welche die höchste Wirksamkeit gegen Tumore in Zellkultur aufweisen, die niedrigsten nicht-spezifischen Toxizitäten.

[0093] Aus diesem Grund können stärker wirksame Mitglieder dieser Klasse von Verbindungen in Dosen in Tiere injiziert werden, die um ein Vielfaches höher sind als die Dosis, bei der eine ausreichende Abtötung von Tumorzellen in Zellkultursystemen erwartet wird, wobei keine sichtbare Toxizität in dem Tier auftritt.

[0094] Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass Mitglieder dieser Klasse von Mitteln an Mäuse und Menschen in Dosen verabreicht werden können, die höher sind als jene, die für die Behandlung von Tumoren erforderlich sind, und zwar ohne signifikante Nebenwirkungen.

[0095] Die relevanten Einzelheiten dieser Studie sind wie folgt:
Zunächst hat Liponsäure selbst (D, L razemisches Gemisch) eine LD-50 von ca. 500 mg/kg Körpergewicht in Mäusen. (Alle Studien, die in diesem Abschnitt beschrieben sind, wurden durch intraperitoneale (IP) Injektion

in C57/BL-Mäusen durchgeführt.)

[0096] Zweitens stellte sich heraus, dass die nicht-spezifische Toxizität des Bis-Acetylipoonsäurederivats eine LD-50 von ca. 500 mg/kg ergab, mit einer maximalen gut tolerierten Dosis von ca. 200 mg/kg. Es ist auch zu bemerken, dass dies eine signifikant geringere nicht-spezifische Toxizität als für normales Lipoat darstellt. [Es ist darauf hinzuweisen, dass die nicht-spezifische Toxizität dieser und aller anderen getesteten Lipoatverbindungen akut war – Tod des Tieres tritt innerhalb von Minuten der IP-Injektion auf. Sie schien daher mit dem Zelltod, der über eine Zeitdauer von Tagen in Krebszellen auftrat, die in Kultur mit blockierten Lipoatderivaten behandelt wurden, nicht zusammenzuhängen (siehe BEISPIELE 6–10).]

[0097] Drittens hatte das Bis-Benzylipoonsäurederivat eine LD-50 von ca. 1000 mg/kg Körpergewicht mit einer maximalen gut tolerierten Dosis von ca. 500 mg/kg. Dies war eine signifikant geringere Toxizität als die von Bis-Acetylipoat (oben) und viel geringer als normales Lipoat.

[0098] Viertens wurden auf der Grundlage dieser Ergebnisse die folgenden Berechnungen durchgeführt: Die Gesamtmasse des Tieres umfasste ca. 70 Wasser. Dies war wie folgt verteilt. Ca. 50% der adulten Masse war intrazelluläres Wasser, ca. 15% der Gesamtmasse war Nicht-Blutextrazelluläre Körperflüssigkeit (im Allgemeinen als "interstitielle Körperflüssigkeit" bezeichnet), und ca. 5% der Gesamtmasse war Blut. Dies führte zu der folgenden hochgerechneten Sequenz. Ca. 500 mg/kg des Bis-Benzylderivats wurde in die Bauchhöhle einer Maus injiziert. Dieses Material wurde schnell in das Blut aufgenommen. Die wirksame Dosis des Bis-Benzylderivats in Zellkultur betrug 60 µg/ml oder 60 mg/kg (siehe BEISPIELE 6 und 9). Es wurde erwartet, dass diese IP-Injektion rasch mit Blut äquilibrieren würde, was zu Konzentrationen führen würde, die übergangsweise annähernd 10000 mg/kg oder ca. 167 mal die wirksame Konzentration dieses Mittels im Blut erreichen würde. Es wurde weiter erwartet, dass dies mit der interstitiellen Körperflüssigkeit äquilibrieren würde, was zu Konzentrationen von annähernd 2500 mg/kg oder ca. 42 mal der wirksamen Konzentration in dieser Körperflüssigkeit ergeben würde. Dies äquilibrierte anschließend mit den Gesamtkörperflüssigkeiten, um Konzentrationen von annähernd 715 mg/kg oder ca. 12 mal der wirksamen Dosis in den gesamten Körperflüssigkeiten zu ergeben.

[0099] Zusammenfassend führen diese Ergebnisse zu zwei wichtigen Schlussfolgerungen. Erstens zeigen sie, dass die wirksamen Konzentrationen leicht durch die stärker wirksamen Mitglieder dieser Klasse von Mitteln erreicht werden konnten – einschließlich Bis-Benzoyl-Lipoat – von denen erwartet wurde, dass sie ausreichend sein würden, um Krebszellen in dem Tier abzutöten, ohne das Tier in anderer Weise sichtbar zu beeinflussen. Diese Kombination von niedriger, nicht-spezifischer Toxizität und hoher spezifischer Toxizität für Tumorzellen war hervorstechend und zeigte, dass diese Klasse von Mitteln ein hohes klinisches Potenzial haben. Zweitens zeigen die relativen Eigenschaften der Bis-Acetyl- und Bis-Benzoyl-Mitglieder der Liponsäurederivatfamilie diesen Punkt. Beide Derivate hatten eine spezifische Anti-Krebsaktivität, welche normales Lipoat nicht aufwies, wobei sie gleichzeitig einen geringeren Grad an nicht-spezifischer Toxizität haben. Des Weiteren wurde ein ähnliches Verhältnis zwischen den blockierten Lipoatderivaten beobachtet, und zwar wie folgt. Bis-Benzoyl-Lipoat hatte gleichzeitig eine niedrigere nicht-spezifische Toxizität und eine viel höhere Anti-Krebswirksamkeit als das Bis-Acetylderivat. Dieses und ähnliche Ergebnisse demonstrieren eindeutig, dass die Anti-Krebsaktivität und nicht-spezifische Toxizität unabhängig voneinander variieren.

Beispiel 12

[0100] Die oben beschriebenen Entdeckungen zeigen, dass es möglich sein sollte, Krebszellen abzutöten, ohne dem behandelten Menschen oder Tier Schaden zuzufügen, wobei Mitglieder der neuen Klasse von Verbindungen verwendet werden, die Gegenstand dieser Erfindung sind (siehe insbesondere BEISPIELE 6 und 11). In diesem Beispiel stützen die Ergebnisse von Studien in Mäusen diese Erwartung. Die relevanten Ergebnisse sind wie folgt.

[0101] Der B-16-Melanomstamm wurde entweder subkutan oder intraperitoneal in einzelne Mäuse des C57/BL syngeneischen Mäusestamms eingebracht (7). Wenn diese Mäuse nicht behandelt wurden, entwickelten sie massive Tumore in der unmittelbaren Umgebung der Injektion, sowie sekundäre Metastasen, die über das ganze Tier verteilt waren – einschließlich der Leber und der Lungen. Dieses bösartige Zellwachstum resultiert in dem frühen Tod der Tiere. Darüber hinaus bestand das resultierende bösartige Zellwachstum aus dunkel pigmentierten bösartigen Melanozyten – was ihre Untersuchung bequem und sehr verlässlich macht. Wir werden dieses im Folgenden als das "B-16-System" bezeichnen.

[0102] Unter Verwendung des B-16-Systems haben wir die Bis-Benzoyl- und Bis-Acetylipoatmitglieder verwendet, um zu demonstrieren, dass Mitglieder der neuen Klasse von Verbindungen, die Gegenstand dieser

Erfindung sind, eine Anti-Krebswirksamkeit aufweisen, die auf der Grundlage der in den vorangegangenen Beispielen beschriebenen Entdeckungen zu erwarten war. Die relevanten Ergebnisse sind wie folgt.

[0103] Zuerst wurden einer Gruppe von Mäusen IP B16-Zellen injiziert. Die injizierte Gruppe wurde nach dem Zufallsprinzip in zwei gleiche Untergruppen aufgeteilt. Einer Untergruppe (experimentell) wurde IP zwei mal am Tag 100 mg/kg des Bis-Benzoyl-Lipoatmitglieds der Verbindungsklasse in 200 µl 10 %igem Ethanol IP-injiziert. [Siehe BEISPIELE 2, 6 und 9 für Beschreibungen des Bis-Benzoyl-Lipoats.] Der zweiten Untergruppe (Kontrolle) wurden 200 µl 10 %iges Ethanol allein injiziert.

[0104] Nach 16 Tagen wurden die Tiere untersucht – einschließlich durch Sezieren, wo es angemessen war. Die Kontrolltiere hatten viele massive IP-Tumormassen. Im Gegensatz dazu hatten die entsprechenden experimentellen Tiere eine wesentlich verringerte Tumorzahl und -masse – weniger als 30–50% Masse als die Kontrollprobe.

[0105] Zweitens wurde einer Gruppe von Tieren an einer subkutanen Stelle B-16-Zellen injiziert. Nach 6–8 Tagen wurden große, sphärische, leicht fühlbare Tumore (ca. 3–5 mm im Durchmesser) an der ursprünglichen Zell-Injektionsstelle beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt begann eine Gruppe der Tiere (experimentell) mit einer zwei mal täglichen Serie von Injektionen des Bis-Acetylipoatderivats (100 mg/kg in 100 µl isotonischer Kochsalzlösung), und eine zweite Gruppe (Kontrollen) mit entsprechenden Injektionen des Kochsalzlösungsmittels allein. [Siehe BEISPIELE 1, 6 und 9 für die Einzelheiten des Bis-Acetylipoatderivats.] In den experimentellen Tieren – aber nicht in den Kontrollen – beobachteten wir häufig eine fühlbare Aufweichung und scheinbar teilweise Verflüssigung der Tumormasse, gefolgt von einer Stabilisierung oder einer Reduzierung der Größe. Dies zeigt, dass das Bis-Acetylderivat in diesen Tumoren unter diesen Bedingungen einen signifikanten Zelltod herbeiführt.

[0106] Drittens wurden, wie im vorangegangenen Abschnitt, in mehreren Tieren subkutane Tumore erzeugt. Nachdem die Tumore auf eine sichtbare, fühlbare Größe herangewachsen waren, erhielten diese Tiere sowohl eine zwei mal tägliche IP (systemische) Dosis von 50 mg/kg Bis-Benzoyl-Lipoat, sowie eine zwei mal tägliche direkte Injektion einer zweiten Dosis desselben Volumens direkt in die Tumormasse. Diese Tiere zeigten sichtbar eine besonders massives Ansprechen, einschließlich eines Falls, in dem die Tumormasse drastisch sank und im Verlauf der Behandlung im Wesentlichen oder vollständig verschwand.

[0107] Zusammenfassend zeigen diese Resultate ganz klar, dass die Bis-Benzoyl- und Bis-Acetylipoatderivate eine zu erwartende Anti-Krebswirksamkeit und Spezifität im intakten Tier aufweisen. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse kann der Fachmann auf dem Gebiet die Dosen und Dosisregimes so anpassen, um eine partielle oder vollständige Kontrolle und/oder Eliminierung dieser Tumore in diesen Tieren zu erreichen.

Beispiel 13

[0108] Ein möglicher Mechanismus der Wirkung der blockierten Lipoatderivate, die Gegenstand dieser Erfindung sind, ist, dass sie PDC spezifisch in Krebszellen inhibieren, was zu einem Verlust der Polarisierung der Mitochondrienmembran führt und daher zu einer Induzierung der Apoptose in Krebszellen. Es ist zu erwarten, dass blockierte Lipoatderivate synergistisch mit anderen Mitteln wechselwirken könnten, die entweder den Energiemetabolismus der Mitochondrien inhibieren und/oder auf die eine oder andere Weise Apoptose induzieren.

[0109] Dies wurde in diesem Beispiel mit Dichloracetat (im Folgenden als CDA abgekürzt) getestet (8). Diese Verbindung ist ein Pyruvatanalogon. Als solches ist eine ihrer erwarteten Wirkungen die kompetitive Inhibition von PDC. Es wurde gefunden, dass diese Verbindung synergistisch mit den blockierten Lipoatderivaten wechselwirkt, wie es zu erwarten war. Eine relevante experimentelle Beobachtung ist wie folgt.

[0110] HeLa-Zellen wurden in einer Serie von Vertiefungen in einer Gewebekulturplatte mit mehreren Vertiefungen bei mittleren Dichten plattiert, und man ließ sie sich anheften und für ca. 24 Stunden wachsen. Zu einzelnen Vertiefungen einer ersten Untergruppe (Kontrolle) wurden jeweils Bis-Acetylipoat oder Bis-Benzoyl-Lipoat, jedes bei einer Dosis, die etwa zweifach oberhalb der Schwellenabtötungsdosis lag (BEISPIEL 9) – hinzugefügt.

[0111] Zu einer gleichwertigen (experimentellen) Untergruppe von Vertiefungen wurden dieselben Verbindungen bei der gleichen Dosis zusammen mit einer gleichzeitigen Zugabe von DCA in einer 5 mM endgültigen Konzentration hinzugegeben. Wir beobachteten, dass die Zellen der experimentellen Untergruppe etwa zwei mal

so schnell wie in der Kontrolluntergruppe abgetötet werden.

[0112] Dies war eine bemerkenswerte Wirkung. 24 Stunden nach der Behandlung der experimentellen Gruppe war diese fast vollständig abgetötet, während ein ähnlicher Grad der fast vollständigen Abtötung in der Kontrolluntergruppe nicht bis ca. 48 Stunden danach beobachtet wurde.

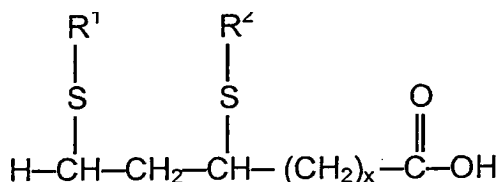
[0113] Auf der Grundlage dieser Art von experimentellen Beobachtungen ist es wahrscheinlich, dass diese Lipatderivate dieser Erfindung mit anderen Metabolismusinhibitoren und/oder anderen chemotherapeutischen Mitteln synergistisch wechselwirken, um Krebszellen effizienter abzutöten. Es ist in der Tat eine wirksame klinische Anwendung der neuen Verbindungen, die Gegenstand dieser Erfindung sind, dass sie zusammen mit weiteren Mitteln wirken können.

REFERENZEN

- (1) Baggetto, L G. 1992. Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. *Biochemie* 74: 959–974.
- (2) Garrett, R H und Grisham, C M. 1995. *Biochemistry*. New York: Saunders College Publishing.
- (3) Dvorak, H F. 1986. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *New England Journal of Medicine* 315: 1650–1659.
- (4) Whalen, G F. 1990. Solid tumors and wounds: transformed cells misunderstood as injured tissue? *Lancet* 136: 1489–1492.
- (5) Patel, M S und Roche, T E. 1990. Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. *FASEB Journal* 4: 3224–3233.
- (6) Johnson, L V, et al. 1980. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 77: 990–994.
- (7) Fidler, I.J., Gersten, D.M. und Budman, M.B. 1976. Characterization in vivo and in vitro of tumor cells selected for resistance to syngeneic lymphocytemediated toxicity. *Cancer Res.* 36: 3160–3165.
- (8) Stacpoole, P.W., Henderson, G.N., Yan, Z., Cornett, R und James, M.O. 1998. Pharmacokinetics, metabolism and toxicology of dichloroacetate. *Drug Metabolism Reviews.* 30: 499–539.
- (9) Hill, S.A., Wilson, S., Chamber, A.F. 1988. Clonal heterogeneity, experimental metastatic ability, and p21 expression in H-ras-transformed NIH 3T3 cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 80: 484–90.

Patentansprüche

1. Verbindung der Formel:



wobei

x 0–16 ist

R₁ und R₂ unabhängig Acyl CH₃(CH₂)_{n-1}C(=O)-; Alkyl C_nH_{2n+1}; Alken C_mH_{2m}; Alkin C_mH_{2m-2}; aromatisch; Aroyl; Alkylsulfid CH₃(CH₂)_t-S-; Thiocarbaminsäureester CH₃(CH₂)_{n-1}C=NH-; oder Semithioactetal CH₃CH(OH)-S- sind, wobei n 1–10 ist; m 2–10 ist und t 0–9 ist, zur Verwendung bei der Behandlung oder Prävention einer Krankheit.

2. Verbindung nach Anspruch 1, wobei R¹ und R² Acetylgruppen sind.

3. Verbindung nach Anspruch 1, wobei die aromatische Gruppe Benzol oder ein Benzolderivat ist.

4. Verbindung nach Anspruch 1, wobei R¹ und R² Benzoylgruppen sind.

5. Verbindung nach Anspruch 1, wobei x 4 ist.

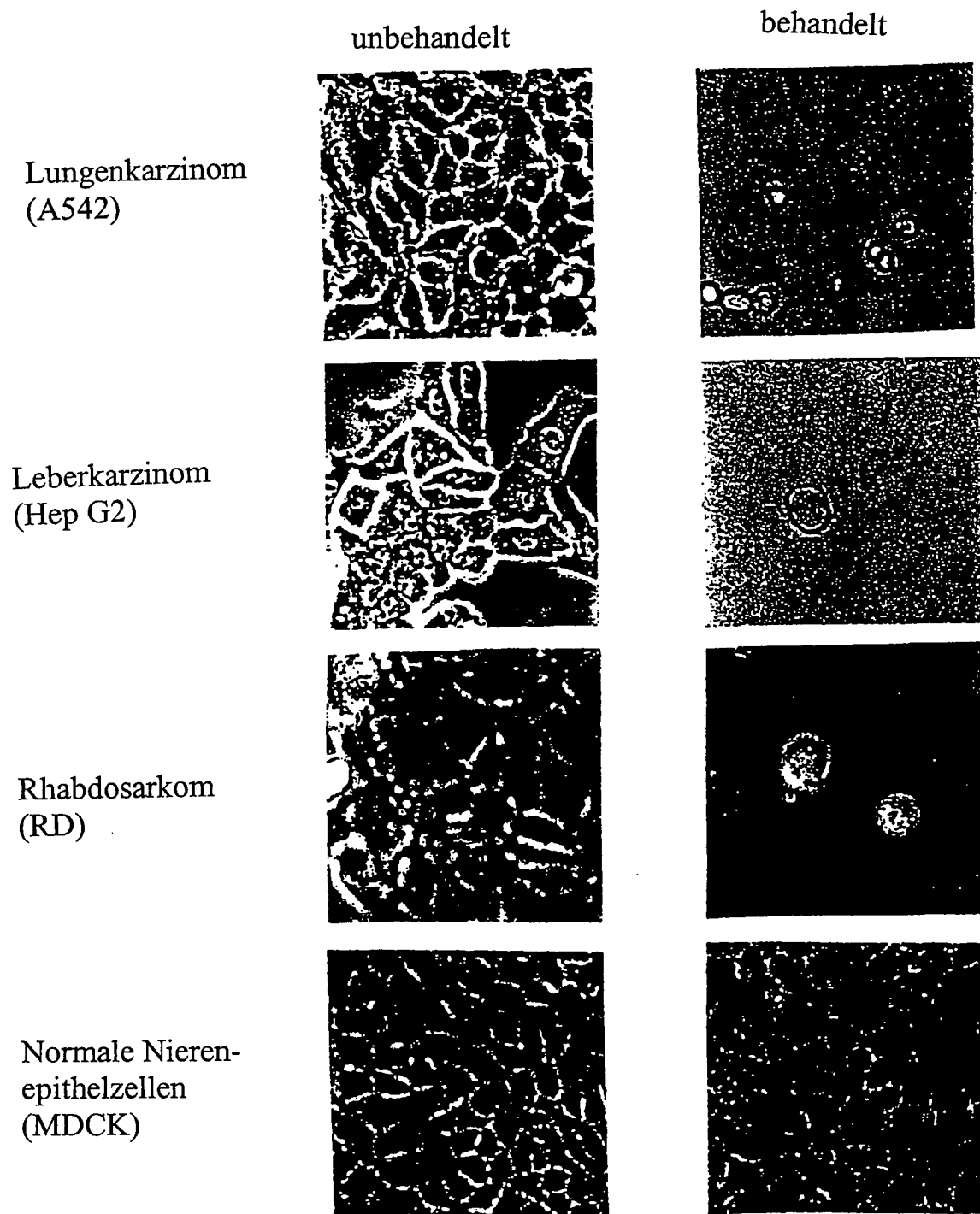
6. Verbindung nach Anspruch 1, wobei die Alkengruppe ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Propylen, 2,3-Dimethyl-2-buten und Hepten.

7. Verbindung nach Anspruch 1, wobei das Alkin ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Acetylen, Propin und Octin.

8. Verbindung nach Anspruch 1, wobei die Alkylgruppe Cyclopropan ist.
9. Verbindung nach Anspruch 1, wobei die Alkengruppe Cyclopenten ist.
10. Verbindung nach einem der Ansprüche 4 bis 9.
11. Verwendung einer therapeutischen Menge einer Liponsäureverbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung oder Prävention einer Krankheit, die durch eine Empfindlichkeit auf Liponsäurederivate gekennzeichnet ist, in einem Patienten.
12. Verwendung nach Anspruch 11, wobei die Krankheit eine neoplastische Krankheit umfaßt.
13. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger.
14. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 13, weiterhin umfassend ein zweites Reagens.
15. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 14, wobei das zweite Reagens Dichloracetat ist.

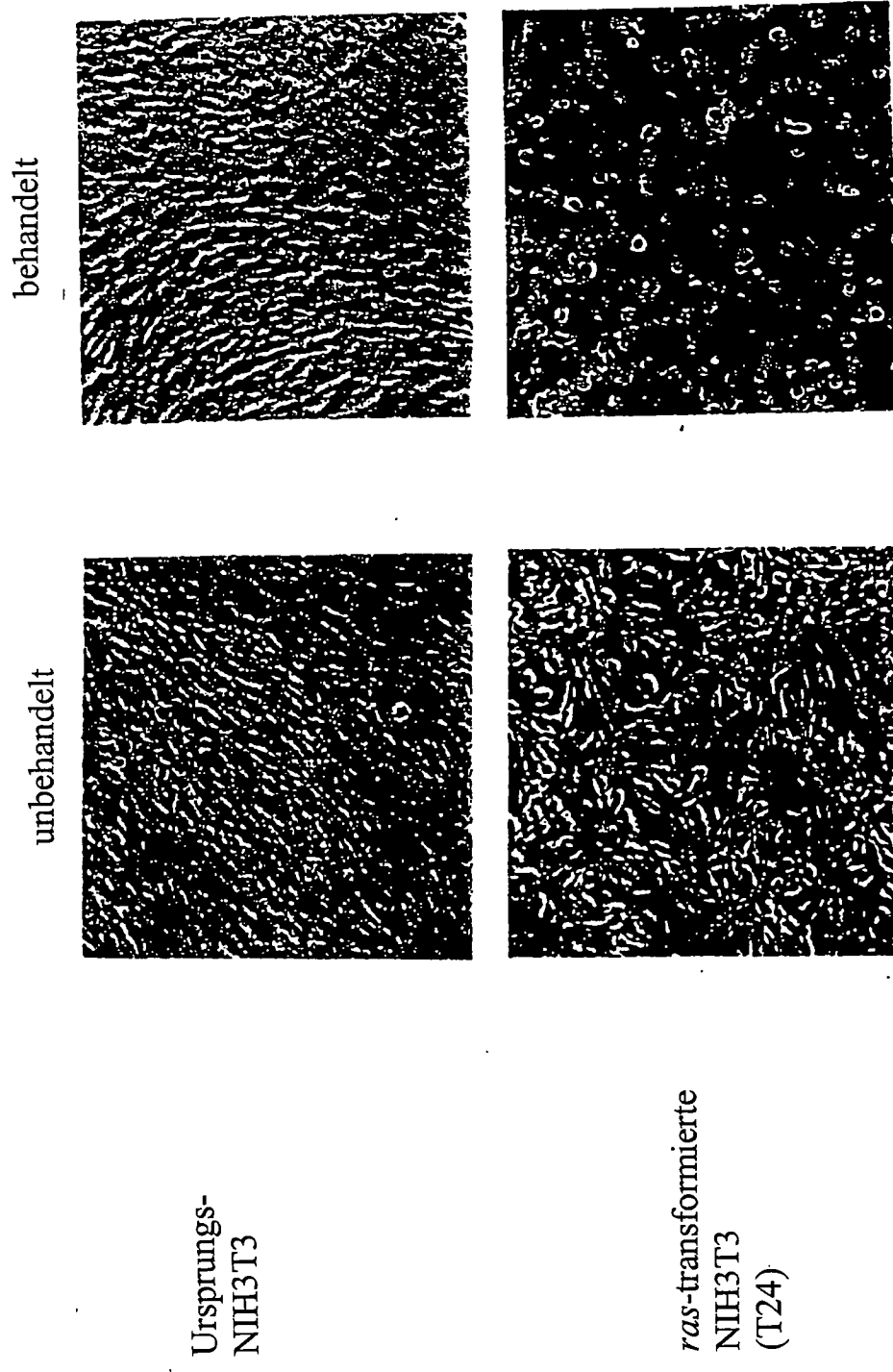
Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Selektive Abtötung verschiedener Tumorzelltypen durch Bis-Benzoyl-Lipoat



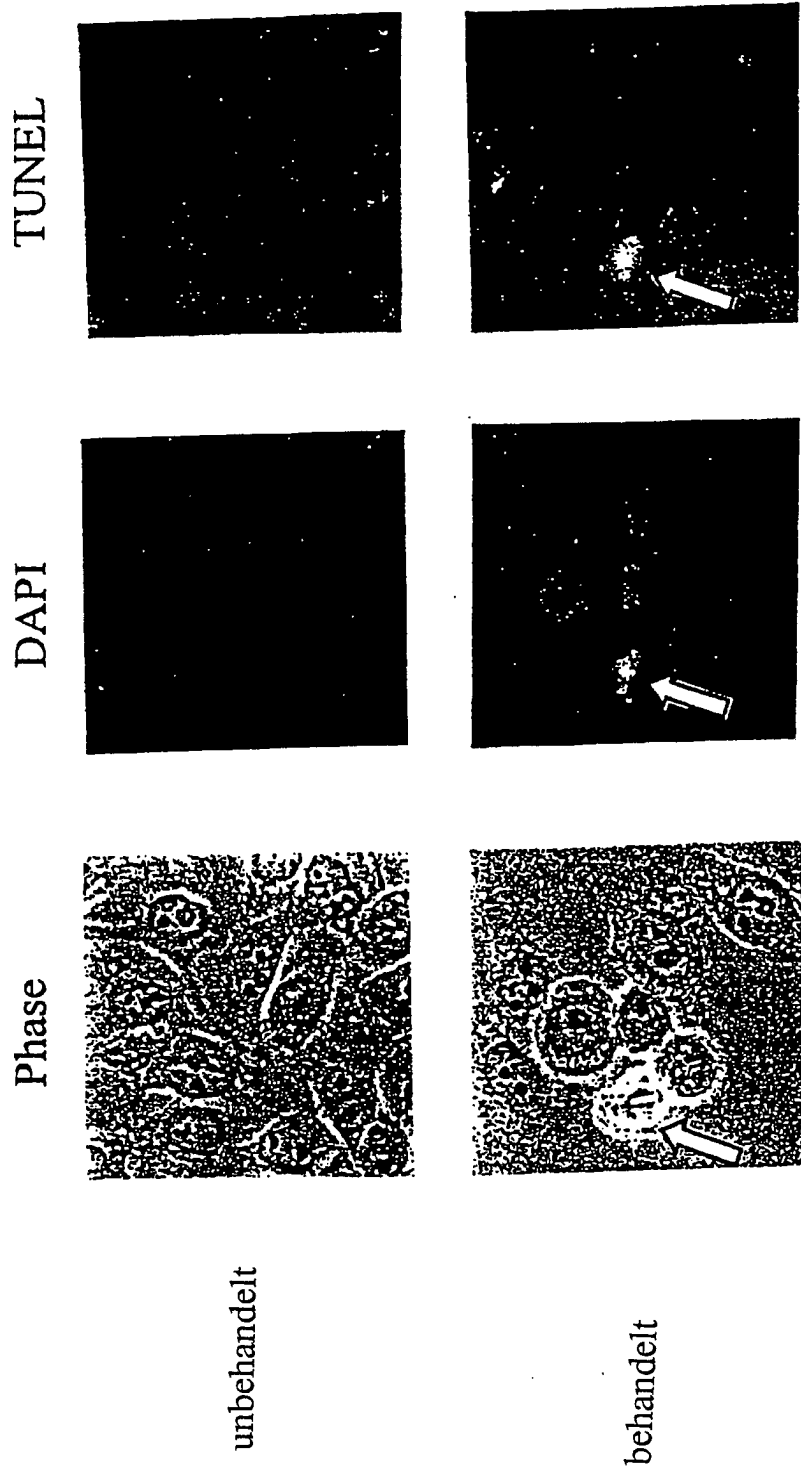
Figur 1

Selektive Abtötung von *ras*-transformierten NIH3T3 Zellen durch Bis-Benzoyl-Lipoat



Figur 2

Induzierung von Apoptose in Krebszellen durch Bis-Benzoyl-Lipoat



Figur 3