



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 13 633 T2** 2007.11.08

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 435 941 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 13 633.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US02/29365**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 766 286.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/024183**

(86) PCT-Anmeldetag: **16.09.2002**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **27.03.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.07.2004**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **02.08.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.11.2007**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 31/352** (2006.01)

C07D 311/94 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

322139 P **14.09.2001** **US**

322143 P **14.09.2001** **US**

(73) Patentinhaber:

**ARIZONA BOARD OF REGENTS, on behalf of THE
UNIVERSITY OF ARIZONA, Tucson, Ariz., US;
University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pa., US**

(74) Vertreter:

Murgitroyd & Company, 48149 Münster

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**WIPF, Peter, Pittsburgh, PA 15213, US; POWIS,
Garth, Tucson, AZ 85750, US**

(54) Bezeichnung: **WORTMANNINANALOGUE UND VERFAHREN ZU DEREN VERWENDUNG**

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

ALLGEMEINER STAND DER TECHNIK

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Wortmannin-Analoga und bietet Einsatzmöglichkeiten für Verfahren, die diese Derivate verwenden, um PI-3-Kinase-Aktivität zu hemmen und gewisse bösartige Tumore zu behandeln. Wortmannin ist ein bekannter wirksamer Hemmer der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-Kinase) und eine bekannte wirksame antineoplastische Substanz. Wortmannin ist eine natürlich vorkommende Verbindung, die aus Kulturflüssigkeiten des Pilzes *Penicillium wortmannii* isoliert wird und die in US Patent Nr. 5,480,906, welches hier unter Verweis inkorporiert ist, gezeigte Grundstruktur aufweist.

[0002] Einer der Nachteile von Wortmannin ist seine Toxizität gegenüber Lebewesen. Selbst in geringen Dosierungen war Wortmannin in seiner reinen Form für Labortiere oft tödlich.

[0003] Norman et al. (J. Med. Chem. (1996) 39: 1106-1111) untersuchten gewisse Wortmannin-Analogien auf ihre Fähigkeit, Phosphatidylinositol-3-Kinase zu hemmen. Die Substitution der C21-Position auf dem Furanring führte jedoch nicht zu sehr aktiven Verbindungen.

[0004] GB-A-2302021 beschreibt verschiedene Wortmannin-Analoga auf der Grundlage der in Norman et al. (oben) beschriebenen Arbeit.

[0005] Haefliger et al. (Helvetica Chimica Acta (1975) 58: 179-180) beschreiben die Produktion von anderen Wortmannin-Analogen, aber sie beschreiben nicht deren Aktivität als Hemmer der Phosphatidylinositol-3-Kinase.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0006] Die Erfindung stellt neuartige Wortmannin-Analoga sowie ein Verfahren des Hemmens von Krebs bei einer Versuchsperson bereit, wobei das Verfahren das Verabreichen einer pharmazeutisch effektiven Dosis einer Verbindung, die aus der aus den in [Fig. 1](#) beschriebenen Wortmannin-Analogen bestehenden Gruppe ausgewählt ist, an eine Versuchsperson beinhaltet.

[0007] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung Wortmannin-Analoga bereit, die bei der Hemmung von Restenose bei einer Versuchsperson nützlich sind. Die Erfindung beinhaltet Stents oder andere Vorrichtungen wie etwa bioprothetische Implantate, die mit den Wortmannin-Analogen beschichtet werden können. Die vorliegende Erfindung richtet sich auch auf Verfahren, die das Verabreichen von Wortmannin-Analogen an eine Versuchsperson in einer pharmazeutisch effektiven Dosis einer Verbindung beinhaltet. Die Wortmannin-Analoga können beliebige von denen hier als DJM2-166 beschriebenen, wie in [Fig. 1](#) gezeigt, sein.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0008] [Fig. 1](#) veranschaulicht die Struktur der Wortmannin-Analog-Strukturen DJM2-166 gemäß der vorliegenden Erfindung;

[0009] [Fig. 2](#) veranschaulicht die Struktur gewisser anderer Wortmannin-Analog-Strukturen;

[0010] [Fig. 3](#) veranschaulicht die Struktur gewisser anderer Wortmannin-Analog-Strukturen;

[0011] [Fig. 4](#) veranschaulicht den Effekt von Wortmannin und Analogen (siehe [Fig. 2](#)) gegen menschlichen PC-3-Prostatakrebs;

[0012] [Fig. 5](#) veranschaulicht den Effekt von Wortmannin und Analogen gegen menschlichen HT-29-Dickdarmkrebs;

[0013] [Fig. 6](#) veranschaulicht den Effekt von Wortmannin-Analogen gegen menschlichen OVCAR-3-Eierstocktumor;

[0014] [Fig. 7](#) veranschaulicht den Effekt von Wortmannin und Analogen auf Gewichtsverlust;

[0015] [Fig. 8](#) veranschaulicht die Antitumoraktivität von Wortmannin; und

[0016] [Fig. 9](#) ist eine Zusammenfassung der Daten für Wortmannin und die in [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) gezeigten Wortmannin-Analoga.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0017] Die gegenwärtige Erfindung betrifft die Entdeckung, dass Wortmannin-Analoga bei der Hemmung von Krebs nützlich sind. [Fig. 1](#) veranschaulicht die spezifische Struktur der Wortmannin-Analoga DJM2-166 gemäß der vorliegenden Erfindung. [Fig. 2](#) veranschaulicht gewisse andere Wortmannin-Analoga und [Fig. 3](#) veranschaulicht gewisse andere Wortmannin-Analoga.

[0018] Die biosynthetische Produktion von Wortmannin ist auf dem Fachgebiet wohl bekannt, und die Analoga werden aus Wortmannin synthetisiert. US Patent Nr. 5,480,906, das hier unter Verweis in seiner Ganzheit inkorporiert ist, beschreibt typische Syntheseprogramme. Typischerweise wird Wortmannin durch die Fermentation eines beliebigen einer Reihe zuvor offenbarer Mikroorganismen wie etwa *Talaromyces wortmannii* und *Penicillium wortmannii*, *Myrothecium rostratum* und *Fusarium* produziert. Im Anschluss an die Fermentation wird Wortmannin mittels bekannter Verfahren extrahiert und gereinigt. Wortmannin wird vorzugsweise mikrobiell synthetisiert und in im Wesentlichen reiner Form aus einer Fermentationskultur isoliert (eine derartige Fermentationskultur ist als A24603.1 gekennzeichnet).

[0019] Wortmannin wird produziert, indem der Stamm unter submersen aerobischen Bedingungen in einem geeigneten Kulturmedium als Kultur angelegt wird, bis eine gewinnbare Menge von Wortmannin produziert wurde. Wortmannin kann unter Verwendung verschiedener, auf dem Fachgebiet verstandener Isolier- und Reinigungsprozeduren gewonnen werden.

[0020] Das Medium, das zum Züchten der Kultur verwendet wird, kann eines einer Reihe von Medien sein. Zur Einsparung in der Produktion, für einen bestmöglichen Ertrag und zur Erleichterung der Produktisolierung werden bei Fermentation im großen Maßstab jedoch Glukose und lösliche Stärke wie etwa Maisstärke als Kohlenstoffquellen bevorzugt. Maltose, Ribose, Xylose, Fruktose, Galaktose, Mannose, Mannitol, Kartoffeldextrin, Methyloleat, Öle wie etwa Sojabohnenöl und dergleichen können ebenfalls verwendet werden.

[0021] Bevorzugte Stickstoffquellen sind enzymhydrolysiertes Casein und feines Baumwollsaamenmehl, obwohl pepsinierte Milch, verdautes Sojabohnenmehl, Fischmehl, Maisquellwasser, Hefeextrakt, säurehydrolysiertes Casein, Rinderextrakt und dergleichen ebenfalls verwendet werden können.

[0022] Unter den anorganischen Nährsalzen, die in dem Kulturmedium inkorporiert werden können, befinden sich die üblichen löslichen Salze, die Kalzium, Magnesium, Natrium, Ammonium, Chlorid, Carbonat, Sulfat, Nitrat, Zink und ähnliche Ionen ergeben können. Essenzielle Spurenelemente, die für das Wachstum und die Entwicklung des Organismus notwendig sind, sollten ebenfalls in dem Kulturmedium umfasst sein. Derartige Spurenelemente kommen üblicherweise als Unreinheiten in anderen Substituenten des Mediums in ausreichenden Mengen vor, um die Wachstumserfordernisse des Organismus zu erfüllen.

[0023] Zur Produktion von wesentlichen Quantitäten an Wortmannin wird eine submerse aerobische Fermentation in Bioreaktoren mit Rührer bevorzugt. Geringe Quantitäten an Wortmannin können durch Schüttelgefäßkultur erhalten werden. Aufgrund der zeitlichen Verzögerung bei der Produktion, die üblicherweise mit der Inokulation großer Bioreaktoren mit der Sporenform des Organismus assoziiert ist, ist es vorzuziehen, ein vegetatives Inokulum zu verwenden. Das vegetative Inokulum wird hergestellt, indem ein geringes Volumen des Kulturmediums mit der Sporenform oder Myzelfragmenten des Organismus inokuliert wird, um eine frische, aktiv wachsende Kultur des Organismus zu erhalten. Das Medium für das vegetative Inokulum kann das gleiche sein wie das, das für größere Fermentationen verwendet wird, aber andere Medien eignen sich ebenfalls.

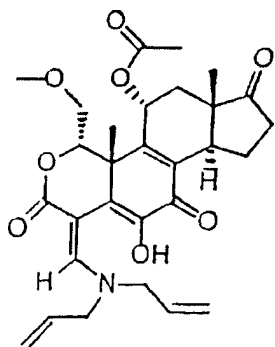
[0024] Im Anschluss an seine Produktion kann Wortmannin durch auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren aus dem Fermentationsmedium gewonnen werden. Das während der Fermentation produzierte Wortmannin des A24603.1-Organismus kommt zum Beispiel hauptsächlich in der Kulturflüssigkeit vor.

[0025] Wortmannin kann typischerweise mittels einer Vielfalt an Techniken aus der Biomasse gewonnen werden. Eine bevorzugte Technik involviert das Filtern der ganzen Fermentationsflüssigkeit mit einem Keramikfilter. Das Filtrat wird mit einem organischen Lösungsmittel wie etwa Ethylacetat eluiert und konzentriert. Das Konzentrat wird in Alkohol suspendiert, bis Kristallisation auftritt, und die Lösung wird gefiltert, gewaschen und getrocknet. Zur Bestätigung wird das kristalline Material in einem organischen Lösungsmittel aufgelöst und auf einem Umkehr-Kieselgelabsorbens (C_8 oder C_{18}) chromatografisch aufgeschlüsselt. Fraktionen werden in ei-

nem organisch-wässrigen Puffer wie etwa 60%igem Acetonitril eluiert.

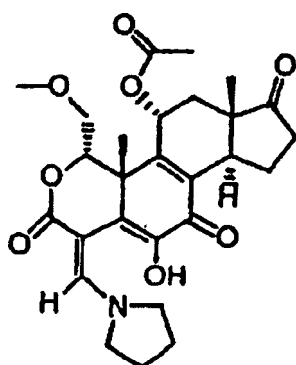
[0026] Wortmannin kann ferner so manipuliert werden, dass die Verbindungen der vorliegenden Erfindung erreicht werden. Obwohl die Synthese bestimmter Analoge von Wortmannin nachfolgend veranschaulicht ist, ermöglichen andere, auf dem Fachgebiet geläufige Syntheseprogramme dem durchschnittlichen Fachmann, Verbindungen gemäß der vorliegenden Erfindung zu synthetisieren, und die hier dargelegten Syntheseprogramme sollten in keiner Weise als beschränkend interpretiert werden.

Essigsäure-4-diallylaminomethylen-6-hydroxy-1- α -methoxymethyl-10 β ,13 β -dimethyl-3,7,17-trioxo-1,3,4,7,10,11 β ,12,13,14 α ,15,16,17-dodekahydro-2-oxa-cyclopenta[a]phenanthren-11-yl-ester (djm2-166).



[0027] Zu einer Lösung von Wortmannin (10,7 mg, 25,0 μ mol) in CH_2Cl_2 (125 μ l) wurde eine frisch hergestellte 0,2-M-Stammlösung von Diallylamin (138 μ l, 27,5 μ mol) in CH_2Cl_2 hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur 1 Std. lang gerührt. Das Lösungsmittel und überschüssiges Amin wurden in vacuo entfernt, und das Produkt wurde mittels Chromatografie auf SiO_2 (Hexane/Ethylacetat, 1:9) gereinigt, um djm2-166 (9,0 mg, 17 μ mol, 68%) als ein orangefarbenes Öl zu ergeben: $[\alpha]_D^{23}$ -630 (c 0.0015, CH_2Cl_2 , 23°C); IR (KBr) 3391, 1743, 1695, 1685, 1622, 1569, 1222, 1111, 1100 cm^{-1} ; ^1H NMR δ 8.20 (s, 1 H), 6.81 (s, 1 H), 6.06 (dd, 1 H, J = 7.4, 4.8 Hz), 5.85 (br s, 1 H), 5.62 (br, 1 H), 5.44-5.04 (m, 4 H), 4.48 (dd, 1 H, J = 7.2, 1.9 Hz), 4.05-3.60 (m, 4 H), 3.26 (s, 3 H), 3.27-3.20 (m, 1 H), 3.16 (dd, 1 H, J = 10.9, 7.2 Hz), 3.00-2.90 (m, 2 H), 2.59 (dd, 1 H, J = 19.4, 8.6 Hz), 2.40 (dd, 1 H, J = 14.4, 7.7 Hz), 2.35-2.07 (m, 2 H), 2.07 (s, 3 H), 1.83 (dd, 1 H, J = 14.4, 4.7 Hz), 1.54 (s, 3 H), 0.86 (s, 3 H); ^{13}C NMR δ 217.0, 178.5, 169.6, 164.8, 156.3, 151.5, 139.0, 136.9, 132.2, 131.3, 127.7 (2 C), 119.2, 89.0, 81.9, 73.1, 67.6, 59.1, 50.9 (2 C), 48.9, 42.3, 42.2, 37.5, 36.0, 24.6, 22.2, 20.8, 16.1; MS (EI) m/z (rel, Intensität) 525 (M^+ , 11), 466 (17), 391 (15), 350 (14), 323 (13), 266 (17), 239 (17), 60 (100); HRMS (EI) berechnet für $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{NO}_8$ 525.2363, gefunden 525.2386.

Essigsäure-6-hydroxy-1- α -methoxymethyl-10 β ,13 β -dimethyl-3,7,17-trioxo-4-pyrrolidin-1-yl-methylen-1,3,4,7,10,11 β ,12,13,14 α ,15,16,17-dodekahydro-2-oxa-cyclopenta[a]phenanthren-11-yl (djm2-167). (vergleichend)

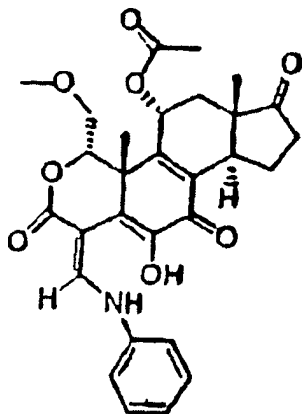


[0028] Zu einer Lösung von Wortmannin (30,0 mg, 70,0 μ mol) in CH_2Cl_2 (200 μ l) wurde Pyrrolidin (7,0 μ l, 84 μ mol) in CH_2Cl_2 hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur 1 Std. lang gerührt. Das Lösungsmittel und überschüssiges Thiol wurden in vacuo entfernt, und das Produkt wurde mittels Chromatografie auf SiO_2 (Hexane/Ethylacetat 9:1, dann 1:1) gereinigt, um djm2-167 (30,0 mg, 60,6 μ mol, 86%) als ein orangefarbenes Öl zu ergeben: $[\alpha]_D^{23}$ -390 (c 0.0073, CH_2Cl_2 , 23°C); IR (KBr) 3337, 1740, 1684, 1617, 1570, 1261, 1221, 1099, 1018 cm^{-1} ; ^1H NMR δ 8.29 (s, 1 H), 6.72 (s, 1 H), 6.07 (dd, 1 H, J = 6.9, 4.8 Hz), 4.47 (dd, 1 H, J = 7.0, 1.9 Hz), 3.80-3.70 (m, 2 H), 3.25 (s, 3 H), 3.25-3.14 (m, 2 H), 3.02-2.90 (m, 2 H), 2.69 (br s, 1 H), 2.58 (dd, 1 H, J = 19.1, 8.4 Hz), 2.39 (dd, 1 H, J = 14.6, 7.8 Hz), 2.32-2.08 (m, 2 H), 2.06 (s, 3 H), 1.99-1.95

(m, 5 H), 1.84 (dd, 1 H, $J = 14.5, 4.2$ Hz), 1.56 (s, 3 H), 0.86 (s, 3 H); ^{13}C NMR δ 217.5, 178.9, 169.9, 164.9, 153.9, 151.3, 137.6, 137.1, 129.2, 89.4, 82.1, 73.3, 67.7, 59.3, 55.2, 49.2, (2 C), 42.6, 42.4, 37.8, 36.3, 25.6 (2 C), 24.5, 22.4, 21.0, 16.3; MS (EI) m/z (rel. Intensität) 499 (M^+ , 1), 439 (2), 365 (7), 167 (35), 149 (100); HRMS (EI) berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{NO}_8$ 499.2206, gefunden 499.2191.

Essigsäure

4-[(benzylmethylamino)methylen]-6-hydroxy-1 α -methoxymethyl-10 β ,13 β -dimethyl-3,7,17-trioxo-1,3,4,7,10,11 β ,12,13,14 α ,15,16,17-dodekahydro-2-oxa-cyclopenta[a]phenanthren-11-yl-ester (djm2-181). (vergleichend)



[0029] Zu einer Lösung von Wortmannin (10,7 mg, 25,0 μmol) in CH_2Cl_2 (125 μl) wurde eine frisch hergestellte 0,2-M-Lösung von N-Methylbenzylamin (185 μl , 37,0 μmol) in CH_2Cl_2 hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur 2 Std. lang gerührt. Das Lösungsmittel wurde in vacuo entfernt, und das Produkt wurde mittels Chromatografie auf SiO_2 (Hexane/Ethylacetat, 1:9) gereinigt, um djm2-181 (13,3 mg, 24,2 μmol , 97%) als ein orangefarbenes Öl zu ergeben: $[\alpha]_D^{25}$ -835 (c 0.0014, CH_2Cl_2 , 23°C); IR (rein) 1742, 1685, 1618, 1589, 1575, 1224 cm^{-1} ; ^1H NMR δ 8.36 (br s, 1 H), 7.36-7.27 (m, 5 H), 6.60 (bs s, 1 H), 6.10-6.00 (m, 1 H), 4.68-4.63 (m, 1 H), 4.53-4.47 (m, 2 H), 3.25 (s, 3 H), 3.25-3.11 (m, 2 H), 2.99-2.84 (m, 2 H), 2.71 (br, 2 H), 2.55 (dd, 1 H, $J = 19.5, 8.9$ Hz), 2.38 (dd, 1 H, $J = 14.4, 7.6$ Hz), 2.32-2.05 (m, 2 H), 2.05 (s, 3 H), 1.85 (br s, 1 H), 1.80 (dd, 1 H, $J = 14.5, 4.7$ Hz), 1.52 (s, 3 H), 0.82 (s, 3 H); ^{13}C NMR δ 217.3, 178.9, 169.9, 164.7, 158.3, 151.7, 138.8, 137.1, 134.9, 129.0 (3 C), 128.6, 128.1 (2 C), 88.7, 82.2, 73.4, 67.9, 64.3, 59.4, 49.1, 42.7, 42.5, 37.8 (2 C), 36.3, 25.2, 22.5, 21.1, 16.3; MS (EI) m/z (rel. Intensität) 549 (M^+ , 14), 489 (37), 415 (15), 120 (23), 91 (100); HRMS (EI) berechnet für $\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{NO}_8$ 549.2363, gefunden 549.2340.

[0030] Zur therapeutischen Behandlung der spezifizierten Indikationen kann ein Wortmannin-Analog DJM2-166, das in [Fig. 1](#) gezeigt ist, an sich verabreicht werden, oder es kann in pharmazeutischen Zusammensetzungen zur parenteralen, transdermalen, rektalen, nasalen, örtlichen intravenösen Verabreichung oder vorzugsweise zur oralen Verabreichung im Einheitsdosierungsformat compoundiert und formuliert werden. Derartige pharmazeutische Zusammensetzungen werden auf eine Art und Weise hergestellt, die auf dem Fachgebiet wohl bekannt ist, und beinhalten die Wortmannin-Analoga der DJM2-166-Verbindung aus [Fig. 1](#), die mit einem pharmazeutischen Träger assoziiert sind. Der Begriff „aktive Verbindung“, wie in dieser Patentschrift durchweg verwendet, bezeichnet mindestens eine Verbindung, die aus den Verbindungen der Formeln oder pharmazeutisch akzeptabler Salze davon ausgewählt ist.

[0031] Der Begriff „effektive Menge“, wie hier verwendet, bedeutet eine Menge einer Verbindung der vorliegenden Erfindung, die die Aktivierung, Migration oder Proliferation von Zellen hemmen, blockieren oder umkehren kann. Die durch die vorliegenden Verfahren bedachte Aktivität umfasst sowohl medizinische therapeutische als auch/oder prophylaktische Behandlung, wie angemessen. Die spezifische Dosis einer Verbindung, die zum Erhalt therapeutischer und/oder prophylaktischer Effekte gemäß dieser Erfindung verabreicht wird, wird selbstverständlich unter den besonderen Gegebenheiten, die einen Fall umgeben, einschließlich zum Beispiel der verabreichten Verbindung, der Verabreichungsrouten und des behandelten Leidens, bestimmt.

[0032] Die Verbindungen sind über einen breiten Dosierungsbereich effektiv, und eine Tagesdosierung fällt zum Beispiel normalerweise in den Bereich von 0,001 bis 10 mg/kg, üblicher in den Bereich von 0,01 bis 1 mg/kg. Es versteht sich jedoch, dass die verabreichte effektive Menge von dem Arzt in Hinblick auf die relevanten Umstände einschließlich des zu behandelnden Leidens, der Wahl der zu verabreichenden Verbindung und der gewählten Verabreichungsrouten bestimmt wird, und dass die oben angegebenen Dosierungsbereiche daher den Bereich der Erfindung in keiner Weise einschränken sollen.

[0033] Der Begriff „Hemmen“ umfasst die Verabreichung einer Verbindung der vorliegenden Erfindung, um den Beginn von Symptomen zu verhindern, die Symptome zu mindern oder die Krankheit, das Leiden oder die Störung zu eliminieren.

[0034] Bei einer derartigen Zusammensetzung ist die aktive Verbindung als „aktiver Inhaltsstoff“ bekannt. Bei der Zubereitung dieser Zusammensetzungen wird der aktive Inhaltsstoff üblicherweise mit einem Träger gemischt oder durch einen Träger verdünnt oder in einem Träger, der in der Form von einer Kapsel, einem Beutel, Papier oder einem anderen Behälter vorliegt, eingeschlossen. Wenn der Träger als Verdünnungsmittel dient, kann er ein festes, halbfestes oder flüssiges Material sein, das als Vehikel, Bindemittel oder Medium für den aktiven Inhaltsstoff wirkt. Auf diese Weise kann die Zusammensetzung in der Form von Tabletten, Pillen, Pulvern, Lutschtabletten, Beuteln, Oblatenkapseln, Elixieren, Emulsionen, Lösungen, Sirupen, Suspensionen, weichen und harten Gelatinekapseln, sterilen Injektionslösungen und sterilen verpackten Pulvern vorliegen.

[0035] Einige Beispiele geeigneter Träger, Bindemittel und Verdünnungsmittel umfassen Laktose, Dextrose, Saccharose, Sorbit, Mannitol, Stärken, Akaziengummi, Kalziumphosphat-alginate, Kalziumsilikat, mikrokristalline Zellulose, Polyvinylpyrrolidon, Zellulose, Tragant, Gelatine, Sirup, Methylzellulose, Methyl- und Propylhydroxybenzoate, Talk, Magnesiumstearat, Wasser und Mineralöl. Die Formulierungen können zusätzlich dazu Gleitmittel, Benetzungsmittel, Emulgier- und Suspendiermittel, Konservierungsmittel, Süßungsmittel oder Aromastoffe umfassen. Die Zusammensetzungen können so formuliert sein, dass sie eine schnelle, anhaltende oder verzögerte Freigabe des aktiven Inhaltsstoffes nach der Verabreichung an den Patienten bereitstellen, indem auf dem Fachgebiet wohl bekannte Prozeduren eingesetzt werden.

[0036] Für die orale Verabreichung kann eine Verbindung Trägern und Verdünnungsmitteln beigemischt, zu Tabletten geformt oder in Gelatinekapseln eingeschlossen werden. Die Mischungen können alternativ dazu in Flüssigkeiten wie etwa 10%iger wässriger Glukoselösung, isotonischer Salzlösung, sterilem Wasser oder dergleichen aufgelöst und intravenös oder durch Injektion verabreicht werden.

[0037] Mit „pharmazeutisch akzeptabel“ ist gemeint, dass der Träger, das Verdünnungsmittel oder das Bindemittel mit den anderen Inhaltsstoffen der Formulierung verträglich sein muss und für den Empfänger davon nicht schädlich sein darf.

[0038] Die örtliche Zuführung hemmender Mengen aktiver Verbindung für die Behandlung von Krebs kann durch eine Vielfalt von Techniken erfolgen, bei denen die Verbindung an oder nahe der Proliferationsstelle verabreicht wird. Beispiele der Techniken örtlicher Zuführung sollen nicht beschränkend sein, sondern die verfügbaren Techniken veranschaulichen. Beispiele umfassen Katheter zur örtlichen Zuführung, stellenspezifische Träger, Implantate, direkte Injektion oder direkte Auftragungen. Die örtliche Zuführung durch einen Katheter ermöglicht die Verabreichung eines pharmazeutischen Mittels direkt an die Proliferationsstelle.

[0039] Die örtliche Zuführung durch ein Implantat beschreibt die chirurgische Platzierung einer Matrix, die das pharmazeutische Mittel enthält, in die Proliferationsstelle. Die implantierte Matrix gibt das pharmazeutische Mittel durch Diffusion, chemische Reaktion oder Lösungsmittelaktivatoren frei.

[0040] Ein anderes Beispiel ist die Zuführung eines pharmazeutischen Mittels durch polymere endoluminale Abdichtung. Bei dieser Technik wird ein Katheter verwendet, um ein polymeres Implantat auf der inneren Oberfläche des Lumens zu implantieren. Das pharmazeutische Mittel, das in das biologisch abbaubare Polymerimplantat inkorporiert ist, wird dadurch an der Operationsstelle freigegeben. Dies ist in PCT WO 90/01969 (Schindler, 23. Aug. 1989) beschrieben.

[0041] Ein letztes Beispiel der örtlichen Zuführung durch ein Implantat erfolgt durch direkte Injektion von Vesikeln oder Mikropartikeln in die Proliferationsstelle. Diese Mikropartikel können aus Substanzen wie etwa Proteinen, Lipiden, Kohlenwasserstoffen oder synthetischen Polymeren zusammengesetzt sein. Diese Mikropartikel haben das pharmazeutische Mittel in sich überall in dem Mikropartikel oder als eine Beschichtung auf dem Mikropartikel inkorporiert. Zuführsysteme, die Mikropartikel inkorporieren, sind in Lange, Science 249: 1527-1533 (September 1990) und Mathiowitz et al., J. App. Poly. Sci., 26: 809 (1981) beschrieben.

[0042] Die örtliche Zuführung durch stellenspezifische Träger beschreibt das Anbringen des pharmazeutischen Mittels an einem Träger, der das Medikament zur Proliferationsläsion lenken wird. Beispiele dieser Zuführtechnik umfassen die Verwendung von Trägern wie etwa einem Proteinliganden oder einem monoklonalen Antikörper.

[0043] Die örtliche Zuführung durch direktes Auftragen umfasst die Verwendung topischer Anwendungen. Ein Beispiel einer örtlichen Zuführung durch direkte Auftragung ist das Auftragen des pharmazeutischen Mittels auf den arteriellen Tumor oder das Gebiet, das nach der Resektion des Tumors zurückbleibt.

[0044] Die Formulierung von Wortmannin-Analogen, genauso wie der Fermentationsvorgang, ist auf dem Fachgebiet wohl bekannt. Anstatt sich in ausführlichen Details hinsichtlich des Syntheseprogramms oder der Formulierung zu ergehen, verlässt sich die vorliegende Erfindung darauf, dass der sachkundige Praktiker diese geläufigen synthetischen Techniken und Formulierungstechniken verwendet, um die Verbindungen der Erfindung zu synthetisieren.

[0045] Die Proliferation von Zellen hängt von dem PI-3-Kinase-AKT-mTOR-Signalweg ab. Zusätzlich dazu scheinen die Signalgebung durch PI-3-Kinase und AKT die Apoptose zu hemmen.

[0046] Die folgende Tabelle I veranschaulicht die Aktivität und In-vivo-Toxizität der Enzym-Hemmung der Wortmannin-Analoge.

TABELLE I

Verbindung	NSC-Nr.	Maximal tolerierbare Dosis ^a mg/kg ip qD x 4	PI-3-Kinase-Hemmung IC ₅₀ (nM)	mTOR-Hemmung IC ₅₀ (μM)	Zytotoxizität NCI-Zelltafel IC ₅₀ (μM)	Lymphozytentoxizität in Bezug auf Wortmannin ^b	Lebertoxizität in Bezug auf Wortmannin ^b	Verhältnis Lebertoxizität/Lymphozytentoxizität ^d
Wortmannin	221019	2,5	0,3	0,1	8,9	1,0	1,0	1,0
DJM2-166	722134	20 ^f	0,5	> 3	2,2	2,2	0,3	0,1
DJM2-167*	722135	20	1,1	> 3	0,5	2,4	0,3	0,1
DJM2-168*	722136	> 20	0,1	> 3	11,9	0,6	0,1	0,2
DJM2-170*	722137	9	1,0	> 3	7,1	1,1	1,7	1,5
DJM2-171*	722138	6	0,1	> 3	10,2	0,7	1,1	1,6
DJM2-177*	722142	6	0,3	1,5	10,2	2,0	0,2	0,1
DJM2-180*	722139	> 30	10	2,0	8,1	0,5	0,3	0,6
DJM2-181*	722140	> 18	0,1	> 3	0,7	1,9	0,2	0,1
DJM2-182*	722141	> 18	0,4	> 3	1,0	0,8	0,1	0,1
DJM2-186*	722143	> 9	UB	> 3	27,7	0	0,4	>
DJM2-189*	722144	> 30	5	> 3	21,0	0	0,4	>
DJM2-190*	722145	NE	10	> 3	33,0	0,6	NE	NE

UB = unbestimmt, NE = nicht einschätzbar – nicht genügend Medikament

^a 2-Tage-MTT-Assay, Mittelwert 60 Zelllinien

^b Lymphozytentoxizität bei MTD oder der höchsten getesteten Dosis, ausgedrückt in Bezug auf Wortmannin

^c Lebertoxizität gemessen in % ALT und AST bei MTD oder der höchsten getesteten Dosis, ausgedrückt in Bezug auf Wortmannin

^d Lebertoxizität gemessen in Bezug auf Wortmannin/Abnahme von Blutlymphozyten in Bezug auf Wortmannin

^e MTD => 10% Körpergewichtsverlust

^f geschätzter Wert

* vergleichende Analoge

[0047] Die Fähigkeit des Wortmannins und der Analoge, Phosphatidylinositol-3-Kinase und mTOR zu hemmen, wird als die Dosis ausgedrückt, die eine 50%ige Hemmung (IC₅₀) bewirkt. Zytotoxizität-Wachstumshemmung menschlicher MCF-7-Brustkrebszellen wurde über 4 Tage unter Verwendung des MTT-Assays gemessen, ausgedrückt als die Dosis, die eine 50%ige Hemmung (IC₅₀) bewirkt. Toxizität-Gruppen von 3 C57BL6-Mäusen wurde Wortmannin in Dosen von 1, 2 oder 3 mg/kg oder die Analoge in 1, 3, 9 oder 18 mg/kg, wenn genügend Verbindung zur Verfügung stand, über die intraperitoneale Route 4 Tage lang täglich verabreicht. Die Tiere wurden 24 Stunden nach der letzten Dosis getötet, und Differentialblutbilder und Serumchemie wurden bestimmt. Die beobachteten Haupttoxizitäten waren Lebertoxizität und Lymphopenie mit verminderten Erythrozytenzahlen und erhöhter Serumglukose bei höheren Dosen. Die Toxizitäten werden mit der maximal tolerierbaren Dosis oder der höchsten getesteten Dosis gemessen. Die Lebertoxizität wird als die mittlere prozentuale Zunahme von ALT und AST im Serum, ausgedrückt in Bezug auf Wortmannin als 1,0, gemessen.

Lymphopenie wird als die prozentuale Abnahme der Lymphozytenzahl in Bezug auf Wortmannin als 1,0 ausgedrückt. Eine niedrige Lebertoxizität und eine hohe Lymphozytentoxizität als Ersatz für die Hemmung des Wachstums von Tumorzellen ist die wünschenswerte Eigenschaft. Hervorgehoben sind die Verbindungen, die zum Antitumor-Testen zubereitet sind.

[0048] Auf der Basis der oben genannten Anzeichen erscheint es, dass ein Hemmer der PI-3-Kinase Zellwachstum und -überleben hemmt. Zudem sollten PI-3-Kinase-Hemmer auch die örtliche Entzündungsreaktion hemmen, insbesondere in dem Fall eines bioprothetischen Implantats, was ein günstiger Faktor bei langfristiger Transplantation oder anderen bioprothetischen Implantaten sein könnte. Im Prinzip könnten die Wortmannin-Derivate ideale Mittel sein, um eine vorübergehende Blockierung des PI-3-Kinase-AKT-mTOR-Wegs zu induzieren.

[0049] [Fig. 4-Fig. 9](#) veranschaulichen den Effekt von Wortmannin und Analogen (siehe [Fig. 2](#)) gegen menschlichen PC-3-Prostatakrebs; gegen menschlichen HT-29-Dickdarmkrebs; gegen menschlichen OV-CAR-3-Eierstocktumor; auf Gewichtsverlust; und auf Antitumoraktivität.

[0050] In einer anderen Ausführungsform kann die vorliegende Erfindung genutzt werden, um vaskuläre Restenose zu behandeln. Vaskuläre Restenose ist eine schwere langfristige Komplikation im Anschluss an einen chirurgischen Eingriff bei blockierten Arterien durch perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA), Atherektomie, Laserangioplastie und arterielle Bypass-Transplantatchirurgie. Bei ungefähr 35% der Patienten, die sich PTCA unterziehen, tritt innerhalb von drei bis sechs Monaten nach der Prozedur eine erneute Okklusion auf. Die gegenwärtigen Strategien zur Behandlung von vaskulärer Restenose umfassen mechanischen Eingriff durch Vorrichtungen wie etwa Stents oder pharmakologische Therapien einschließlich Heparin, Heparin mit niedriger relativer Molekülmasse, Kumin, Aspirin, Fischöl, Kalziumantagonisten, Steroide und Prosta-zyklin.

[0051] Es wurde gezeigt, dass die vaskuläre Restenose nach perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA) eine Gewebereaktion ist, die durch eine frühe und eine späte Phase gekennzeichnet ist. Die frühe Phase, die Stunden bis Tage nach der PTCA auftritt, beruht auf einer Thrombose mit einigen Gefäßspasmen, während die späte Phase von exzessiver Proliferation und Migration glatter Muskelzellen beherrscht zu sein scheint. Bei dieser Krankheit tragen die erhöhte Zellmotilität und Kolonisierung durch glatte Muskelzellen und Makrophagen signifikant zu der Pathogenese der Krankheit bei. Die exzessive Proliferation und Migration vaskulärer glatter Muskelzellen kann der primäre Mechanismus für die erneute Okklusion von Koronararterien im Anschluss an PTCA, Atherektomie, Laserangioplastie und arterielle Bypass-Transplantatchirurgie sein.

[0052] Bei der Pathogenese von Restenose treten exzessive Zellproliferation und Migration in Folge von Wachstumsfaktoren auf, die von Zellbestandteilen im Blut und in der beschädigten arteriellen Gefäßwand produziert werden und die Proliferation glatter Muskelzellen bei der vaskulären Restenose vermitteln. Mittel, die die Proliferation und/oder Migration glatter Muskelzellen hemmen, sind bei der Behandlung und Verhinderung von Restenose nützlich. Des Weiteren sind Mittel, die die Entzündungsreaktion glatter Muskelzellen hemmen, bei der Behandlung und Verhinderung von Restenose nützlich. Die vorliegende Erfindung sieht die Verwendung von Wortmannin und gewissen Analogen als Restenosehemmer vor.

[0053] Die Erfindung beinhaltet Stents oder andere Vorrichtungen wie etwa bioprothetische Implantate, die mit den Wortmannin-Analogen beschichtet werden können. Die vorliegende Erfindung richtet sich auch auf Verfahren, die das Verabreichen von Wortmannin-Analogen an eine Versuchsperson in einer pharmazeutisch effektiven Dosis einer Verbindung beinhalten. Die Wortmannin-Analoga sind die DJM2-166-Wortmannin-Analoga, die in [Fig. 1](#) beschrieben sind. Es wird erwartet, dass die Wortmannin-Analoga der vorliegenden Erfindung bei der Behandlung von Restenose nützlich sind.

[0054] Wie oben angeführt, kann die örtliche Zuführung hemmender Mengen an aktiver Verbindung für die Behandlung von Restenose durch eine Vielfalt von Techniken erfolgen, die die Verbindung an oder nahe der Proliferationsstelle verabreichen. Beispiele der Techniken der örtlichen Zuführung sollen nicht beschränkend sein, sondern die verfügbaren Techniken veranschaulichen. Beispiele umfassen Katheter zur örtlichen Zuführung, stellenspezifische Träger, Implantate, beschichtete Implantate, direkte Injektion oder direkte Auftragungen. Die örtliche Zuführung durch einen Katheter ermöglicht die Verabreichung eines pharmazeutischen Mittels direkt an die Proliferationsläsion. Beispiele der örtlichen Zuführung unter Verwendung eines Ballonkatheters sind in EP 383 492 A2 und US Pat. Nr. 4,636,195 (Wolinsky, 13. Jan. 1987) beschrieben.

[0055] Die örtliche Zuführung durch ein Implantat beschreibt die chirurgische Platzierung einer Matrix, die das

pharmazeutische Mittel enthält, in die Proliferationsstelle. Die implantierte Matrix gibt das pharmazeutische Mittel durch Diffusion, chemische Reaktion oder Lösungsmittelaktivatoren frei.

[0056] Ein Beispiel der örtlichen Zuführung durch ein Implantat ist die Verwendung eines Stents. Stents sind entworfen, um den Kollaps und die erneute Okklusion der Koronararterien mechanisch zu verhindern. Das Inkorporieren eines pharmazeutischen Mittels in den Stent führt das Medikament direkt der Proliferationsstelle zu. Die örtliche Zuführung durch diese Technik ist in Kahn, Pharmaceutical Technology (Oktober 1990) beschrieben.

[0057] Ein anderes Beispiel ist ein Zuführsystem, bei dem ein Polymer, das das pharmazeutische Mittel enthält, in flüssiger Form in die Läsion injiziert wird. Das Polymer härtet dann aus, um das Implantat in situ zu bilden. Diese Technik ist in PCT WO 90/03768 (Donn, 19. Apr. 1990) beschrieben.

[0058] Die örtliche Zuführung durch stellenspezifische Träger beschreibt das Anbringen des pharmazeutischen Mittels an einem Träger, der das Medikament zur Proliferationsläsion lenken wird. Beispiele dieser Zuführtechnik umfassen die Verwendung von Trägern wie etwa eines Proteinliganden oder eines monoklonalen Antikörpers.

[0059] Die örtliche Zuführung durch direktes Auftragen umfasst die Verwendung topischer Anwendungen. Ein Beispiel einer örtlichen Zuführung durch direkte Auftragung ist das direkte Auftragen des pharmazeutischen Mittels auf das arterielle Bypass-Transplantat während der chirurgischen Prozedur.

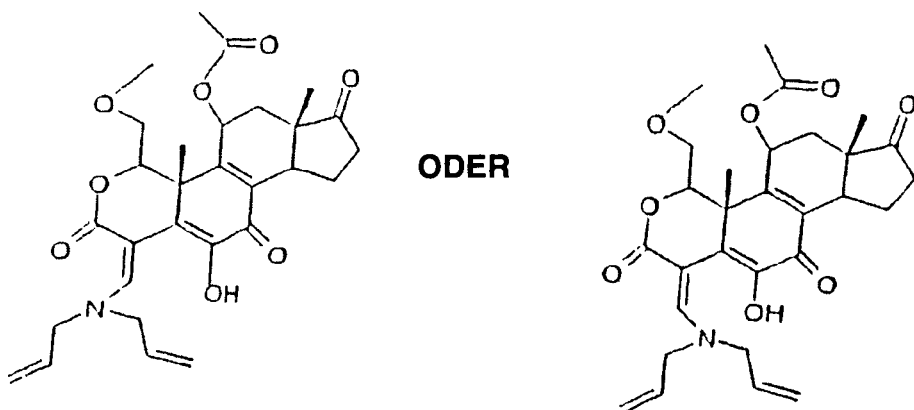
[0060] Die Restenose ist nach einem Koronareingriff mit Koronarstentimplantation ein schweres klinisches Problem. In diesem Szenario durchläuft der glatte Muskel, der die betroffene Koronararterie auskleidet, Hyperplasie und Proliferation, entweder aufgrund vorübergehender Hypoxie oder aufgrund einer Entzündungsreaktion (oder einer Kombination dieser Faktoren) als Folge des Eingriffes. Die Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen hängt stark von dem PI-3-Kinase-AKT-mTOR-Signalweg ab. Zusätzlich dazu erscheint die Signalgebung durch PI-3-Kinase und AKT die Apoptose glatter Muskelzellen zu hemmen, was auch die Masse der glatten Muskelschicht in der erkrankten Arterie erhöhen würde.

[0061] Auf der Basis der oben genannten Anzeichen erscheint es, dass ein Hemmer der PI-3-Kinase das Wachstum der glatten Muskelzellen und ihr Überleben hemmt, wenn er auf der Stentvorrichtung imprägniert ist. Zudem sollten PI-3-Kinase-Hemmer auch die örtliche Entzündungsreaktion gegen das Implantat hemmen, was ein günstiger Faktor bei langfristiger Stenttransplantation oder anderen bioprothetischen Implantaten sein könnte. Im Prinzip könnten die Wortmannin-Derivate ideale Mittel sein, um in der den implantierten Stent umgebenden Mikroumwelt eine vorübergehende Blockierung des PI-3-Kinase-AKT-mTOR-Wegs zu induzieren.

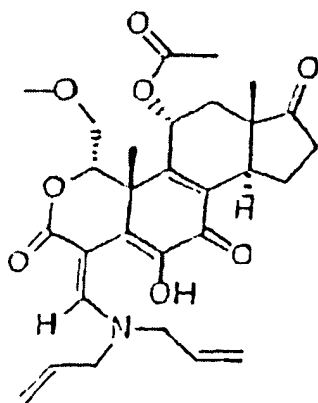
[0062] Es versteht sich, dass die hier beschriebenen Beispiele und Ausführungsformen nur zur Veranschaulichung dienen und dass sich dem Fachmann in Hinblick darauf verschiedene Abwandlungen oder Veränderungen anbieten.

Patentansprüche

1. Eine Verbindung gemäß einer der folgenden Formeln:



2. Verbindung gemäß Anspruch 1, wobei die chemische Formel Folgendem entspricht:



3. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 und 2 zur Verwendung bei der Behandlung von Krebs.
4. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 und 2 zur Verwendung bei der Hemmung der PI-3-Kinase-Aktivität bei Säugetieren.
5. Eine pharmazeutische Formulierung, die eine effektive Menge der Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 und 2 und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger, ein pharmazeutisch akzeptables Verdünnungsmittel oder ein pharmazeutisch akzeptables Bindemittel davon beinhaltet.
6. Ein bioprothetisches Implantat, das einen Körper beinhaltet, der mit einer Verbindung, die eine Entzündungsreaktion hemmt, beschichtet ist, wobei die Verbindung die allgemeine Formel gemäß Anspruch 1 aufweist.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

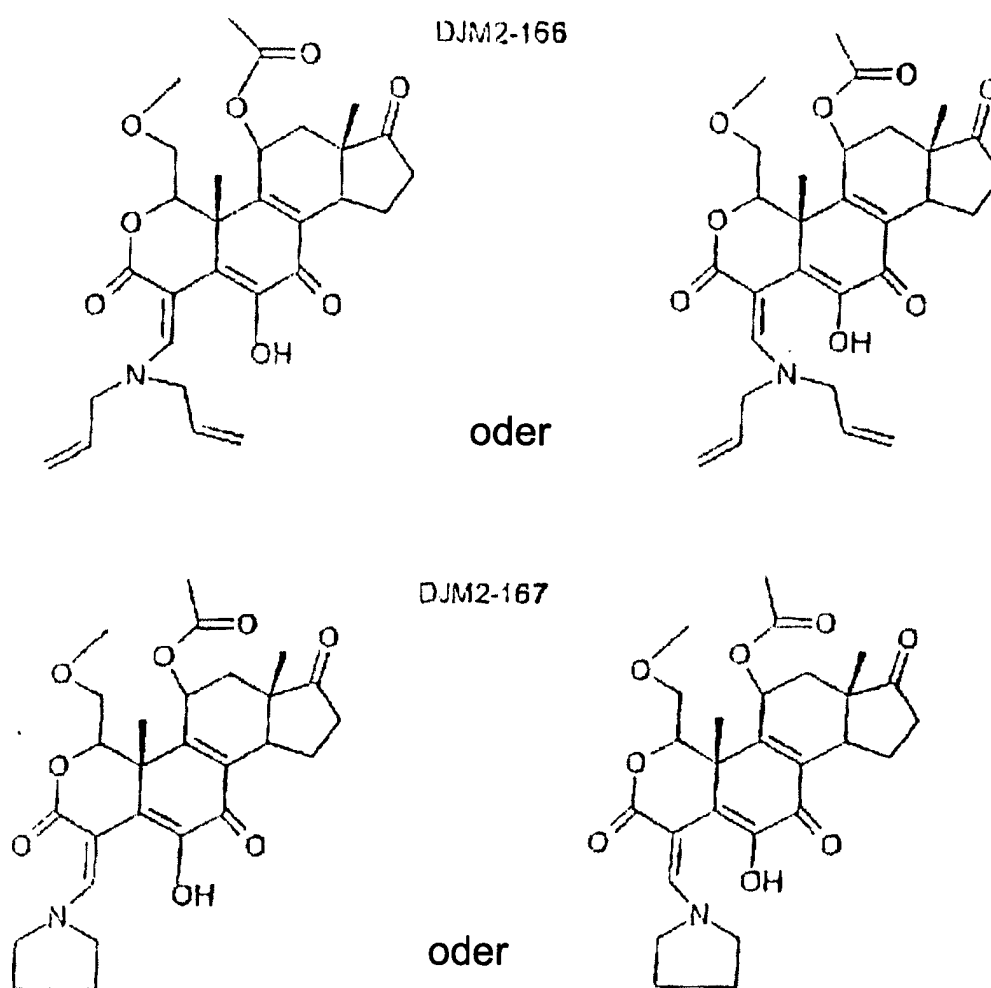


Fig. 1

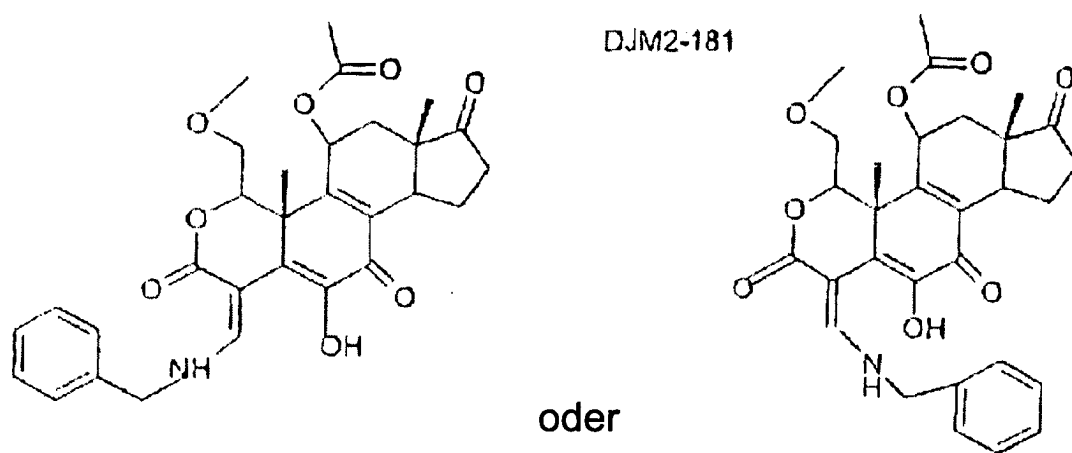
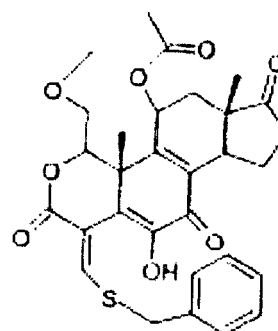
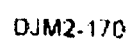
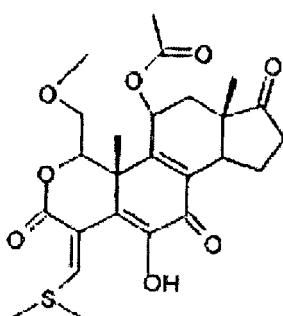


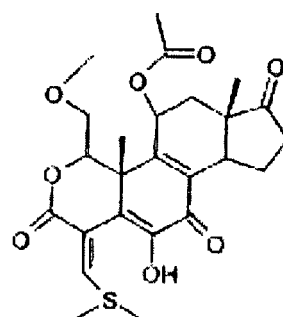
Fig. 2



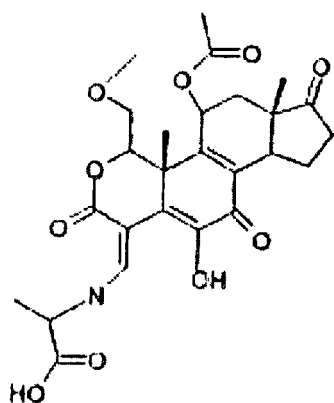
oder



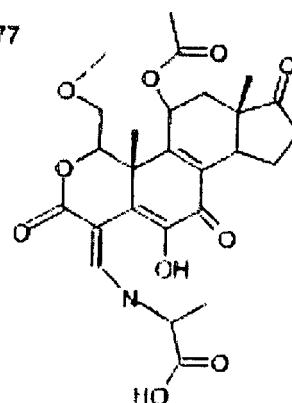
DJM2-171



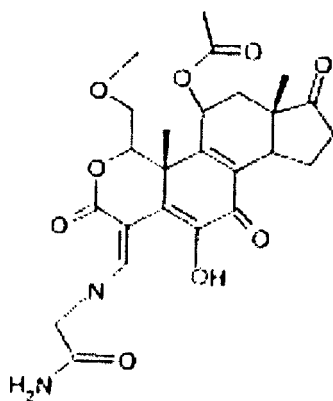
oder



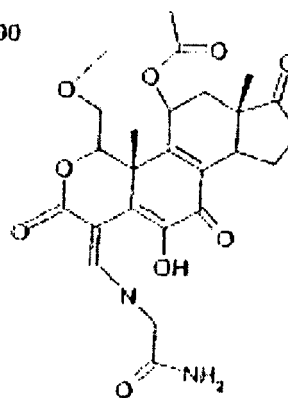
DJM2-177



oder



DJM2-190



oder

Fig. 3

Wortmannin und Analoge gegen menschlichen PC-3-Prostatakrebs

(8 Mäuse pro Gruppe)

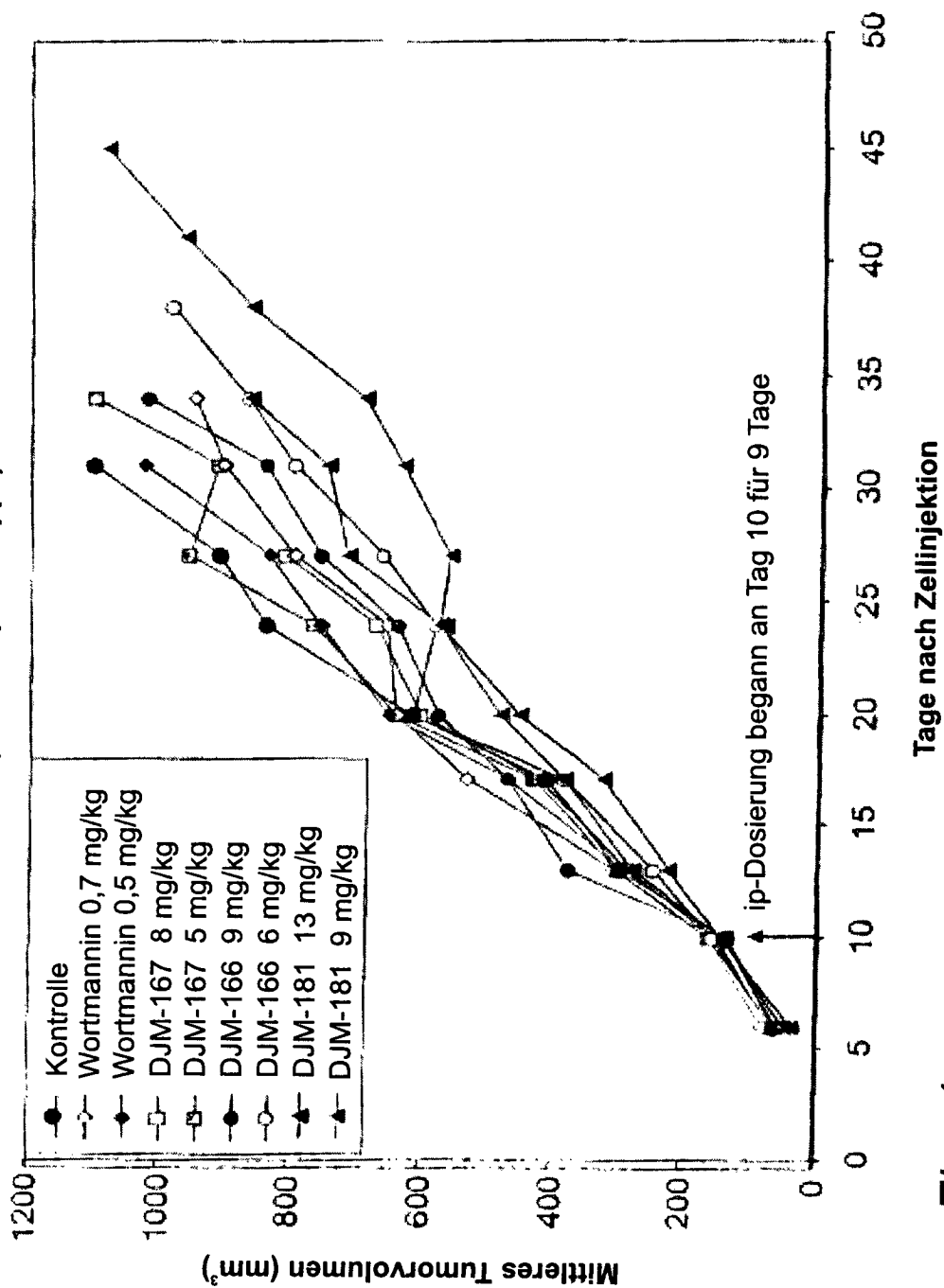
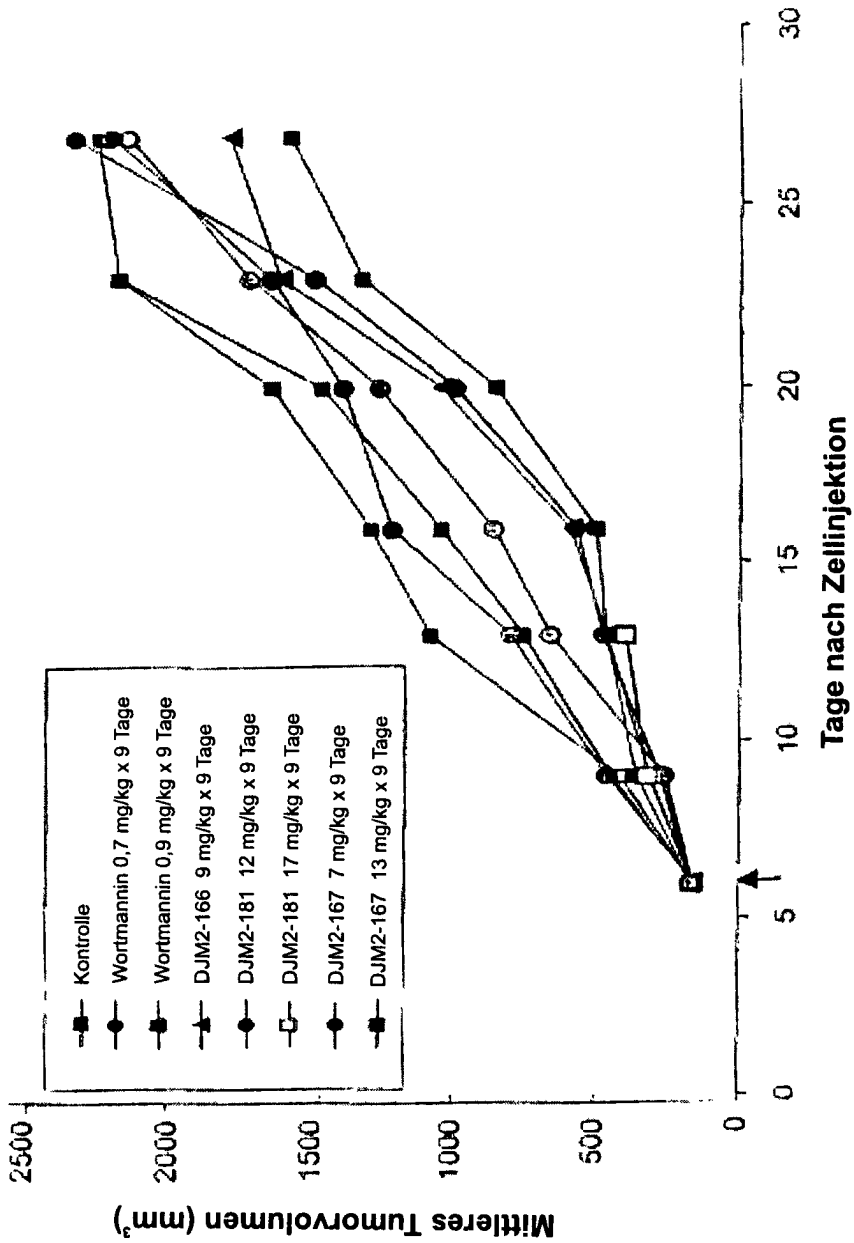


Fig. 4

Wortmannin und Analoge gegen menschlichen HT-29-Dickdarmkrebs

(8 Mäuse pro Gruppe)

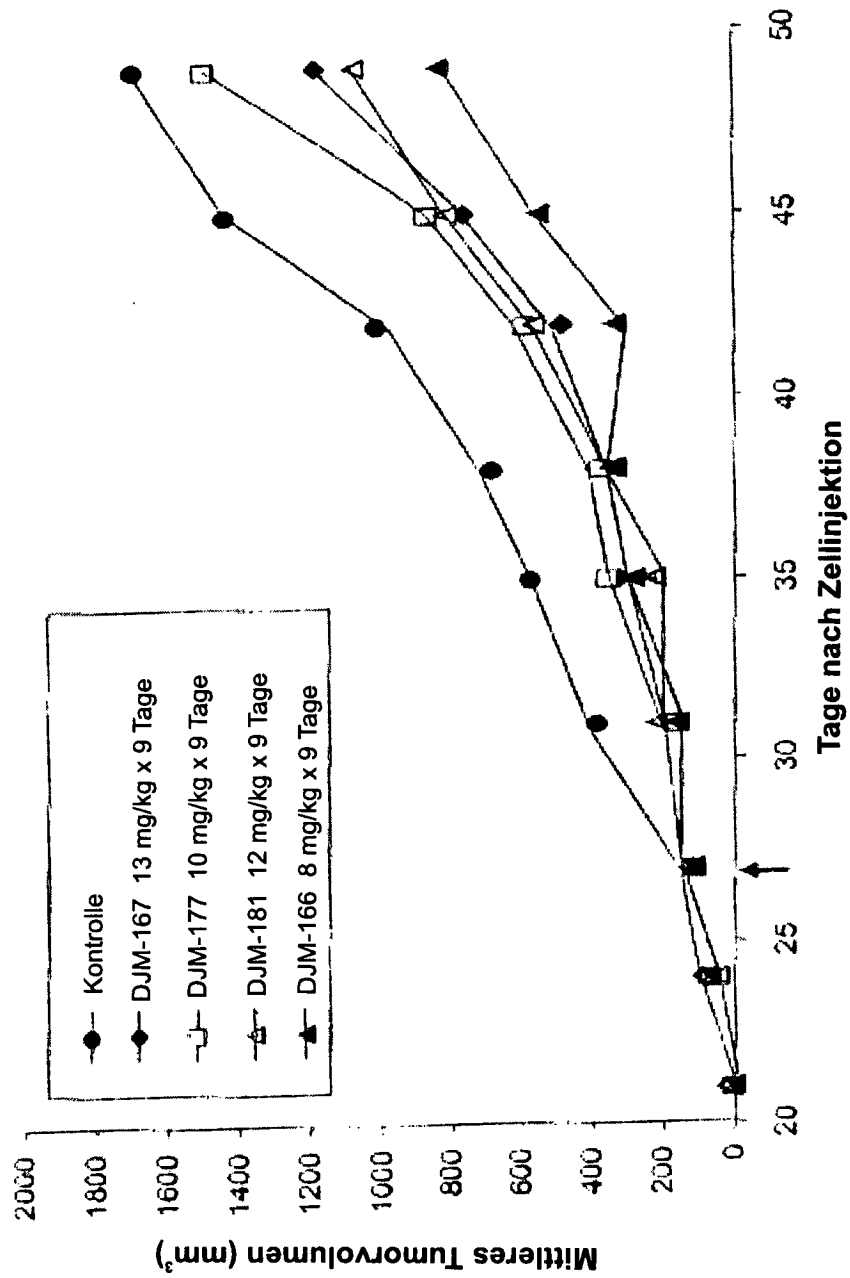


↑ = randomisiert an Tag 6 und ip-Medikamentinjektion angefangen

Fig. 5

Wortmannin-Analoga gegen menschlichen OVCAR-3-Eierstocktumor

(8 Mäuse pro Gruppe)

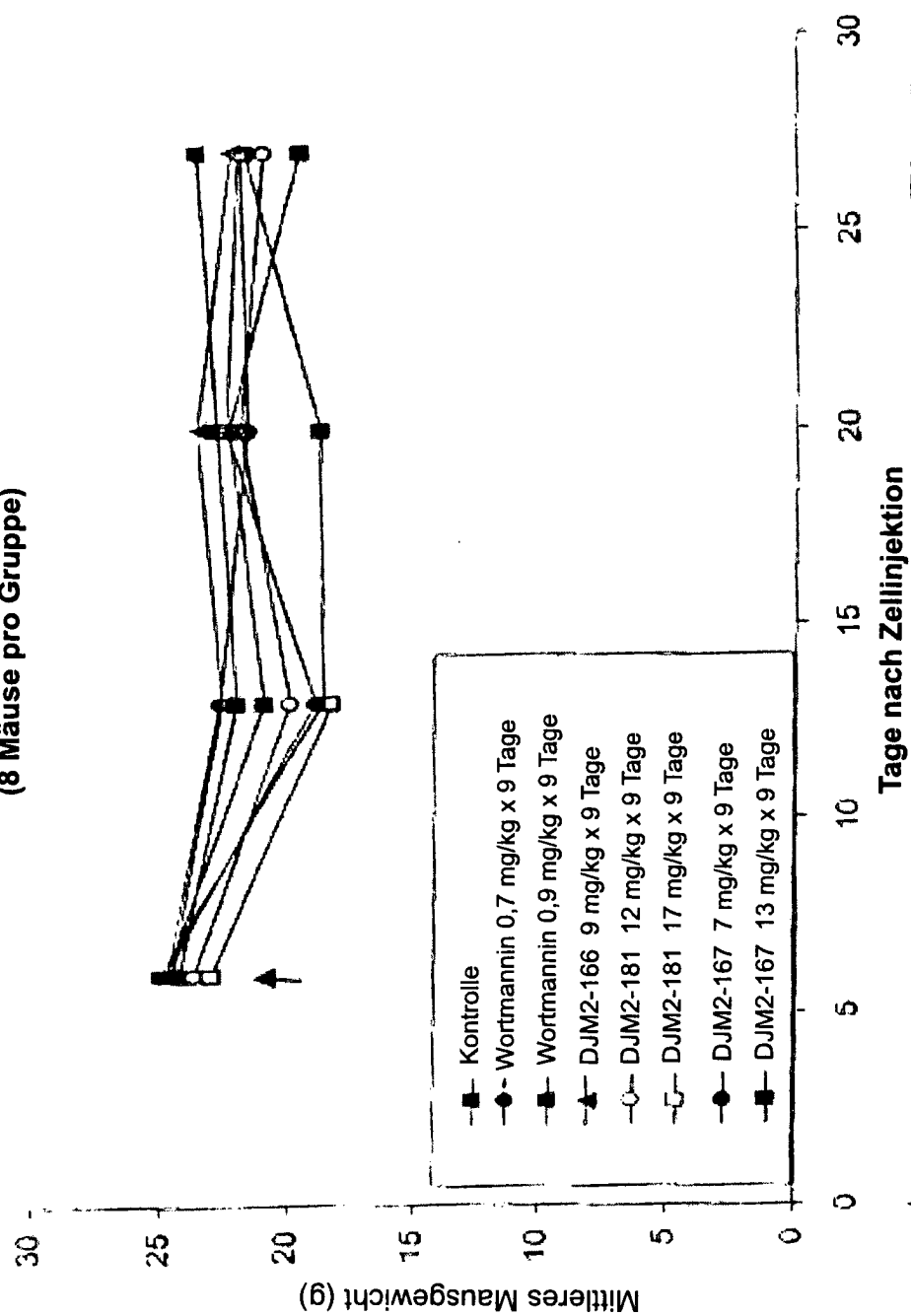


↑ T27 = Tiere stratifiziert und ip-Medikamentverabreichung angefangen

Fig. 6

Gewichtsverlust durch Wortmannin und Analoge

(8 Mäuse pro Gruppe)



↑ = Tiere randomisiert und ip-Medikamentinjektion begonnen an Tag 6

Fig. 7

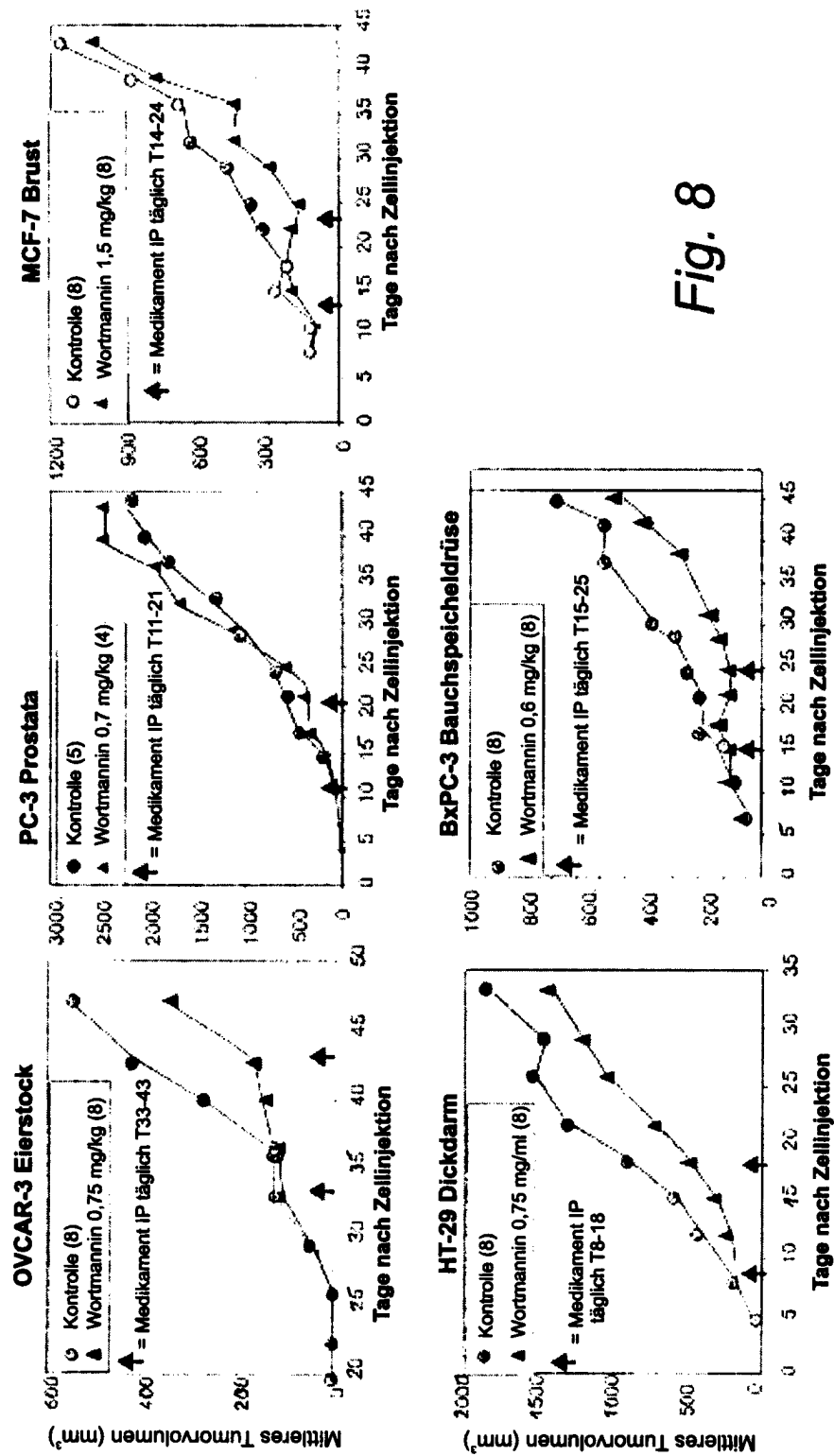
Antitumoraktivität von Wortmannin

Fig. 8

