



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 602 20 642 T2 2008.02.21

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 357 944 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 602 20 642.1

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/IB02/00267

(96) Europäisches Aktenzeichen: 02 701 466.1

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2002/060482

(86) PCT-Anmeldetag: 29.01.2002

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 08.08.2002

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 05.11.2003

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 13.06.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 21.02.2008

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: A61K 41/00 (2006.01)  
A61P 37/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

264677 P 30.01.2001 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Altachem Pharma Ltd., Alberta, CA

(72) Erfinder:

LEVEUGLE, Beatrice, Edmonton, Alberta T5S 1G2,  
CA

(74) Vertreter:

Dr. Weber, Dipl.-Phys. Seiffert, Dr. Lieke, 65183  
Wiesbaden

(54) Bezeichnung: PERYLENEQUINONE ZUR ANWENDUNG MIT IMMUNOTHERAPEUTISCHEN MITTELN

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

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

**Beschreibung****Technisches Gebiet der Erfindung**

**[0001]** Die Erfindung beinhaltet Zusammensetzungen und Verfahren zur Behandlung von Krankheiten und dergleichen durch Verabreichung von Verbindungen, welche sowohl Photosensibilisatoren als auch Sonosen-sibilisatoren darstellen und welche beliebige Immuntherapien potenzieren, welche für die Behandlung dieser Krankheit(en) verwendet werden. Die Zusammensetzungen und Verfahren sind insbesondere zur Behandlung von Carcinomen bei Mensch und Tier geeignet sowie zur Modulation der Funktion des immuntherapeutischen Mittels.

**Hintergrund der Erfindung**

**[0002]** Die Immuntherapie beruht auf dem Prinzip der Induzierung oder Aktivierung des Immunsystems, um unerwünschte Zellen, wie neoplastische Zellen, zu erkennen und zu entfernen. Der Schlüsselvorgang bei jeder Immuntherapie besteht darin, das Immunsystem des Wirts zu initiieren oder zu triggern, um zunächst ein Molekül als unerwünschtes Ziel zu erkennen, und das System dann zu veranlassen, gegen das Molekül Maßnahmen zu ergreifen. In gesunden Wirten erkennt das Immunsystem Oberflächenmerkmale eines Moleküls, welche keine normalen Bestandteile des Wirts sind (d. h. für den Wirt „fremd“). Funktioniert die Erkennungsfunktion erst einmal, muss der Wirt dann eine Maßnahme gegen das spezielle Fremdmolekül ergreifen.

**[0003]** Sowohl das Erkennungs- als auch das Ansprechelement des Immunsystems beinhaltet eine hoch komplizierte Abfolge von biologischen Reaktionen. Bei den meisten immunologisch bedingten Störungen ist mindestens einer der Schritte der Erkennungsphase oder wenigstens einer der Schritte der Ansprechphase unterbrochen. Praktisch jede Unterbrechung eines dieser komplexen Abläufe führt zu einer schlechteren Ansprechung oder zum Ausfall irgendeiner Reaktion. Die Unfähigkeit des Immunsystems einen wachsenden Tumor zu zerstören, wurde unter anderen Faktoren, dem Vorliegen von Tumor-assoziierten Antigenen (TAA) zugeschrieben, die eine immunologische Toleranz und/oder Immununterdrückung induzieren. In manchen Fällen von Krebs kann zum Beispiel der Krebs selbst den Wirt dazu verleiten, die fremde Krebszelle als normalen Bestandteil anzusehen und so die Erkennungsphase des Immunsystems unterbrechen. Der immunologische Ansatz zur Krebstherapie beinhaltet die Modifizierung der Wirt-Tumor Beziehung, so dass das Immunsystem zu Gegenmaßnahmen gegenüber TAAs veranlasst wird oder diese verstärkt. Im Erfolgsfall kann die Induzierung oder Erweiterung des Immunsystems zur Tumorrückbildung, Tumorabstoßung und möglicherweise zur Tumorheilung führen.

**[0004]** Die Fähigkeit zur Up- und Downregulierung der Immunansprechung und zur Steuerung allfälliger autoreaktiver immunrelevanter Zellen ist für die normale Immunfunktion und deren Überleben lebenswichtig. Steuerungsmechanismen schließen die Induktion klonaler Energielosigkeit (über unpassende Antigene darstellende Zellen), periphere klonale Löschung/Apoptose, Cytokine (z. B. Umwandlung der  $\beta$ -Wachstumsfaktor (TGF- $\beta$ ) oder IL-10)-induzierten Nicht-Ansprechbarkeit, „veto“-Zellen, autoreaktive cytotlytische T-Zellen und sowohl unspezifische als auch antigenspezifische T-Suppressorzellen ein. Wenigsten theoretisch bringt jedes dieser Steuerungssysteme die mechanistischen Grundlagen für eine therapeutische Intervention mit.

**[0005]** Die ideale Modalität der Krebsbehandlung sollte nicht nur die Rückbildung und Ausrottung des Tumors bewirken, sondern auch eine systemische Antitumorimmunität induzieren, die für die Kontrolle metastatischer Tumore und für die langfristige Tumorresistenz wesentlich ist. Was dies betrifft, stellen die photodynamische Therapie (PDT) und die sonodynamische Therapie (SDT) viel versprechende neue Ansätze für die Krebsbehandlung dar. Diese Therapien beinhalten die systemische oder topische Verabreichung eines Sensibilisierungsmittels und dessen anschließende Aktivierung durch Licht einer spezifischen Wellenlänge oder die Aktivierung mit Schall einer spezifischen Frequenz (SDT). Die Aktivierung des Sensibilisierungsmittels führt zur Erzeugung von aktiviertem Sauerstoff und von radikalischen Spezies, die eine Abfolge von biochemischen Reaktionen auslösen, welche zur direkten Zellzerstörung, Schädigung des Gefäßsystems des Tumors und zu entzündlichen Immunreaktionen führen. Es wird angenommen, dass die Einführung einer entzündlichen Reaktion und die Erzeugung einer Tumor-spezifischen Immunität eine entscheidende Rolle bei der Erzielung der langfristigen Tumorkontrolle spielen [1, 2]. Dieses Konzept wird von vorklinischen und klinischen Untersuchungen gestützt. Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass die therapeutische Wirksamkeit von PDT in immungeschädigten Mäusen (nackt und SCID) stark verringert wird, verglichen mit frei lebenden Mäusen, und dass die adoptive Übertragung von T-Zellen oder Knochenmarkszellen in immungeschädigte Mäuse bei der Verzögerung des Wiederauftretens von PDT-behandelten Tumoren wirksam war [2, 3]. Darüber hinaus haben Abdel-Hady et al. (2001) kürzlich bewiesen, dass in Kranken mit vulvaler intraepithelialer Geschwulstbildung die klinische An-

sprechung auf PDT auf ALA-Basis in Beziehung gesetzt werden kann zu der Zahl der infiltrierenden Immunzellen und der HLA-Auspressung der Klasse I [4].

**[0006]** Es wird angenommen, dass die entzündliche Reaktion ein kritisches Anfangsstadium darstellt, welches Vorgänge bewirkt, die zur Erkennung der Antigene von PDT-behandelten Tumoren und einer sich daraus ergebenden Erzeugung einer langfristigen Tumor-immunisierenden Wirkung führt [5–9]. Die PDT-induzierte photooxydative Schädigung führt zur Freisetzung eines Blutstaus von vorentzündlichen Zwischenträgern, der aus Krebszellmembranen, endothelialen Gefäßen und stromalen Tumorelementen freigesetzt wurde, und zum nachfolgenden Angriff auf die Tumorstelle durch neutrophile und andere myeloische Effektorzellen. Nach der PDT-Behandlung wird im Tumor eine Reihe von Cytokinen erzeugt. Die aktivierten Immunzellen rufen zusammen mit der Freisetzung der Cytokinen die akute Entzündungsreaktion hervor und verstärken sie zu einer gezielten Schädigung. PDT freigesetzte Tumorzellenbruchstücke, Cytokine und infiltrierende Immunzellen, die in der Lage sind Tumorantigene einzuhüllen und sie den T-Lymphozyten anzubieten, könnten eine einzigartige Umgebung schaffen, um eine durch Zellen vermittelte Immunität zu erzeugen und eine lang anhaltende Immunansprechung einzuleiten.

**[0007]** Es wurde gefunden, dass die Aktivität von Neutrophilen, Makrophagen und CTLs zur therapeutischen Wirkung von PDT [3, 6, 10–12] beiträgt. Neutrophile und Makrophage sammeln sich im Tumorbereich bereits 5 Minuten nach der PDT-Behandlung an. Diese Zellen können Tumorzellen durch ihre direkte zytologische Aktivität oder indirekt durch das Zusammenwirken mit Lymphoidzellen abtöten und sich an der Entwicklung einer krebsspezifischen Immunität beteiligen [2, 5]. Es wurde gefunden, dass sowohl die Verarmung an Neutrophilen in Tumor-tragenden Mäusen als auch die an der Blockierung der Zellhaftungsmoleküle, welche an der Rekrutierung dieser Leukozyten in Geweben beteiligt sind, die PDT-vermittelte Antitumorwirkungen verringern [8, 13]. Auf ähnliche Weise verringert auch die Inaktivierung von Makrophagen durch Siliziumdioxidbehandlung die Heilung von PDT-behandelten Tumoren [4]. Bei Verwendung der Knochenmarktransplantation und der adoptiven Splenozyten/T-Zell-Übertragung zwischen Mäusen mit Immunsuppression und Immunmangel, sowie der spezifischen Verarmung an CD4+ und CD8+Zellen, wurde nachgewiesen, dass für eine durch PDT-vermittelte Tumorheilung eine Lymphoidzellenaktivität erforderlich ist [12, Korbelik, 1996 #15, 14]. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass PDT tumorspezifische T-Lymphozyten erzeugt, die selbst nach länger dauernder Lichtbehandlung [2, 3] von entfernten Lymphoidstellen gewonnen werden, wie von Lymphknoten oder von der Milz.

**[0008]** Die Lichtsensibilisierbarkeit und therapeutischen Eigenschaften natürlicher Perylenchinoidpigmente (PQPs), wie Hypocrellin, in biologischen Systemen sind während der letzten beiden Jahrzehnte erkannt worden. Vergl. Diwu et al., J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 64: 273 (1992); Zhang et al., (1989); und Wan et al., „Hypocrellin A, a new drug for photochemotherapy“, Kexue Tongbao (English edition) 26: 1040 (1981). Bezuglich ihrer allgemeinen chemischen Eigenschaften vergleiche Weiss et al., Prog. Chem. Org. Nat. Prod., 52: 1 (1987) und Diwu et al., Photochem. & Photobiol., 52: 609–616 (1990). Die allgemeinen photophysikalischen und photochemischen Eigenschaften von PQP's sind von Diwu et al., Pharmac. Ther., 63: 1 (1994) referiert worden. Hypocrelline gehören zur allgemeinen Klasse der Perylenchinoidpigmente und schließen Hypocrellin A (HA) und Hypocrellin B (HB) ein.

**[0009]** PQPs sind von Interesse, weil sie im nicht-aktivierten (oder nicht-toxischen) Zustand verabreicht werden können, um anschließend aktiviert zu werden. PQPs, und insbesondere Hypocrellinderivate, sind auch von Interesse, weil sie unter Verwendung unterschiedlicher Modalitäten aktiviert werden können, wie zum Beispiel mithilfe von Licht, Schall oder Kombinationen hieron.

**[0010]** Die Sonodynamische Aktivierung von Sensibilisatoren hat sich als nützlich erwiesen, weil Ultraschall einen geeigneten Gewebeverlustkoeffizienten für die Durchdringungen dazwischen liegender Gewebe aufweist, um die gewünschten Behandlungsvolumina zu erreichen und gleichzeitig die Fähigkeit beibehält, Energie auf vernünftig kleine Volumina zu konzentrieren. Diagnostischer Ultraschall ist ein allgemein anerkanntes, nicht-invasives Verfahren, welches in der zivilisierten Welt umfangreich im Gebrauch ist, und welches selbst für die fötale Abbildung als sicher angesehen wird. Der Frequenzbereich für diagnostischen Ultraschall liegt zwischen 100 kHz–12 MHz, wobei 50 kHz genügend Energie liefert, um durch mikroregionale Kavitation zelluläre Zerstörung zu bewirken.

**[0011]** Die biologischen Wirkungen beim Aussetzen an Ultraschall sind das Ergebnis ihrer physikalischen und chemischen Wirkungen. Die am meisten auffallende biologische Wirkung der Ultraschallbehandlung besteht in der Erhitzung des durchstrahlten Mediums. Eine solche Erhitzung wird bei der Physiotherapie verwendet, um verletzte Gewebe zu heilen (Lehmann et al., 1967; Patrick, 1966), und ist als potentielle Modalität für die Tumorbehandlung untersucht worden. Diese beruht auf der Empfindlichkeit vieler Tumore gegenüber Überhit-

zung, einem Zustand, bei dem die Gewebetemperaturen auf über 42°C angehoben werden (Doss und McCabe, 1976; Marmor et al., 1979; Sculier und Klastersky, 1981; Bleehen, 1982; Hynyen und Lulu, 1990). Ultraschall ist auch in Kombination mit Strahlentherapie verwendet worden, um das Ansprechen auf die Behandlung in vivo zu verbessern, verglichen mit der reinen Radiotherapie (Clarke et al., 1979; Repacholi et al., 1971, Mitsumori et al., 1996). Ein grundsätzliches Risiko bei der Verwendung von Ultraschall für Therapiezwecke ist die Bildung von „hotspots“ aufgrund von Bereichen mit konstruktiver Interferenz und bevorzugter Absorption von Ultraschallenergie durch Knochenbereiche mit niedrigen Krümmungsradien (Lehmann et al., 1967; Linke et al., 1973). Diese heißen Stellen können ernsthafte Schäden an in der Nähe befindlichen Geweben verursachen (Hill, 1968; Bruno et al., 1998).

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0012]** In Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung ist hier der „Anspruch 1“ vorgesehen. Solche Derivate von Perylenchinonpigmenten (PQPs), welche sowohl photosensibilisierende Eigenschaften als auch sensibilisierende Eigenschaften besitzen, werden zur Behandlung von Krankheiten und anderen Zuständen verwendet, indem sie das im Körper vorhandene Immunsystem modulieren und/oder werden bei irgendwelchen Immuntherapien zur Behandlung von Krankheiten und anderen Zuständen verwendet.

**[0013]** Unter einem anderen Gesichtspunkt sieht die vorliegende Erfindung den „Anspruch 12“ vor.

**[0014]** Der entzündliche/immunisierende Charakter von PDT macht es für das Kombinieren mit verschiedenen Formen von Immuntherapie besonders geeignet, wobei es die Heilungsraten von behandelten Tumoren wirksam verbessern kann. Es wurde gezeigt, dass eine Vielfalt von immuntherapeutischen Behandlungen in Verbindung mit PDT wirksam ist. Diese schließen die adoptive Übertragung von Immunzellen [3, 15], die Verwendung von unterschiedlichen Cytokinen [16, 17] und eine Vielfalt von Impfstoffen ein, welche als unspezifische Verstärker der Immunansprechung dienen. Was Letzteres betrifft, wurde die günstige Wirkung auf PDT-vermittelte Tumoransprechung für unterstützende Behandlungen mit Bacillus Calmette-Guerin (BCG) Impfstoff [18, 19], mycobakteriellen Zellwandextrakten [20] und Corynebacterium parvum Impfstoff [21] berichtet.

**[0015]** BCG ist ein abgeschwächter Stamm von Mycobacterium bovis, welcher für die Verwendung als Impfstoff gegen die Tuberkulose beim Menschen entwickelt wurde. BCG stimuliert bekanntlich die durch Zell vermittelte Immunität, die humorale Immunität und die Macrophagenfunktion, welche theoretisch zu einer erhöhten Tumorzerstörung führen kann. Oberflächlicher Blasenkrebs ist einer der wenigen Krankheiten beim Menschen, bei der sich eine unspezifische Immuntherapie mit BCG als wirksam erwiesen hat.

**[0016]** Hypocrelline sind als potentielle Photosensibilisatoren für PDT gewählt worden [22] und vorklinische Studien haben ihr Potential als Antikrebsmittel bewiesen [23]. Die vorliegende Erfindung umfasst die Potenzierung der Antitumoraktivität von aminosubstituierten Hypocrellinen, wie Demethoxyhypocrellin B (DMHB) bei Verwendung in Kombination mit einem immuntherapeutischen Mittel, z. B. BCG.

**[0017]** Die vorliegende Erfindung betrifft die Veränderung der Immunogenität in einer Weise, dass sie eine günstige oder therapeutisch erwünschte Wirkung ausübt. Eine günstige oder therapeutische Wirkung ist, wie hierin verwendet, eine solche, welche ein therapeutisch wünschenswertes Ergebnis liefert, z. B. die Kontrolle des Tumorwachstums in Tier und Mensch. Eine günstige therapeutische Antwort schließt typischerweise die Aktivierung des Immunsystems und/oder einer oder mehrerer Komponenten davon ein, die Induktion des Immunsystems und/oder eines oder mehrerer ihrer Komponenten, und/oder eine T-Zell Immunantwort, und/oder eine humorale Immunantwort. Für einen Krebs, wie zum Beispiel einen Eierstockkrebs, schließt eine günstige oder wünschenswerte Antwort die Produktion eines Antikörpers ein, der eine Immunreaktion mit einem vorher nicht immunreaktiven Eierstockkrebsantigen einleitet. In diesem Beispiel wird die Immunansprechung gegenüber einem Antigen erhöht. In einem anderen Beispiel, im Fall eines Zustands wie einer Entzündung, schließt eine günstige oder wünschenswerte Immunantwort die Produktion eines Antikörpers ein, der so eine Immunreaktion mit einem vorher immunreaktiven Antigen einleitet, dass er nicht-immunreaktiv wird. In diesem Beispiel nimmt die Immunansprechung ab. Bei einer Transplantation greift das Immunsystem das fremdartige MHC-Spendergewebe an, was zur Abstoßung des Transplantats führt; bei Autoimmunerkrankungen greift es normales Gewebe an; und bei Allergien ist das Immunsystem gegenüber sonst harmlosen Umweltantigenen hyper-ansprechbar. Es ist nunmehr erkennbar, dass eine Immunsuppressionstherapie für die Behandlung jeder dieser Störungen geeignet ist. Ein günstiges Ergebnis kann auch durch Modulation erreicht werden, d. h. Erhöhen oder Erniedrigen der Aktivität oder Funktion eines immuntherapeutischen Mittels selbst.

**[0018]** Die durch Licht und/oder Schall aktivierten Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung, weisen eine beträchtliche Absorption im roten Spektralbereich oder therapeutische Frequenzen im Ultraschall auf; erzeugen eine hohe Sauerstoff-Singulett Ausbeute; können in monomerer Form rein hergestellt werden; können derivatisiert werden, um die Absorptionseigenschaften im Bereich des roten Lichts, die Aktivierung mit Ultraschall, die Verteilung im Gewebe und die Toxizität zu optimieren; weisen eine verringerte Restphotosensibilität der Haut auf und werden rasch ausgeschieden. Sie benötigen bei der kovalenten Anbindung an flachere DNA-Kopplungsmittel der radioaktiven Indizierung, wie gestapelte Lexotropine, um die Phototoxizität zu verstärken. Sie sind nicht gentoxisch. Diese Eigenschaft ist im Zusammenhang mit der Behandlung von Sekundärkrankheiten wichtig, welche mit der Behandlung zusammen hängen.

**[0019]** Die photosensibilisierenden und sonosensibilisierenden Verbindungen verteilen sich bei systemischer Verabreichung über den ganzen Körper. Die Verbindungen trennen sich während einer kurzen Zeitspanne im Bereich von Stunden oder Tagen von normalem Gewebe, werden aber von wuchernden Zellen rasch bis zu sieben Tagen zurückgehalten (z. B. von Krebszellen oder Schuppenflechtenschäden). Die PQPs sind inaktiv und nicht-toxisch bis sie aktiviert werden, indem sie z. B. an Licht in einem spezifischen Wellenlängenbereich, an Schall in einem spezifischen Frequenzbereich oder an Kombinationen davon, ausgesetzt werden.

**[0020]** Die Verwendung von Verbindungen, welche durch Verwendung unterschiedlicher Aktivierungsverfahren aktiviert werden können, kann therapeutisch günstig sein. Licht, welches bis zu einer Tiefe von etwa 5 mm bis etwa 7 mm eindringen kann, kann Verbindungen für die Behandlung von Oberflächenschäden aktivieren oder jene Zielzellen, die sich innerhalb eines bestimmten Abstands von der Lichtquelle befinden. Ultraschall kann andererseits tief in den Körper eindringen, um tief sitzende Zellen zu behandeln, wie Tumormassen, welche für eine Lichtquelle unzugänglich sind.

**[0021]** Die Verbindungen sind zudem wegen ihrer doppelten Selektivität therapeutisch vorteilhaft. Die Verbindungen sind selektiv bezüglich ihrer Fähigkeit den Wirkstoff vorzugsweise an einer vorbestimmten Stelle, wie einer Krebszelle, zu deponieren, und sie sind insofern selektiv, als die genaue Abgabe von Licht und/oder Schall auf einen spezifischen Bereich begrenzt werden kann.

#### Beschreibung der Zeichnungen

**[0022]** [Fig. 1](#) gibt die Struktur von natürlich vorkommendem Hypocrellin ([Fig. 1A](#)) wieder und von synthetischen Derivaten als Beispiele wie HBBA-R2 ([Fig. 1B](#)), HBEA ([Fig. 1C](#)) und HBDP ([Fig. 1D](#)).

**[0023]** [Fig. 2](#) gibt verschiedene Strukturen der erfindungsgemäßen demethoxylierten HB-Verbindungen wieder, worin  $R_1, R_2, R_3, R_4$  sind  $OCH_3$  oder  $NHCH_2Ar$  (Ar sind Phenyl oder Pyridylgruppen,  $NHCH(CH_2)_n$  (worin  $-CH(CH_2)_n$  alicyclische Gruppen sind und  $n = 3, 4, 5, 6$ ), 2-BA-2-DMHB ist, wobei  $R_1, R_2, R_3 OCH_3$  und  $R_4 NH(CH_2)_3CH_3$  sind. Alternativ können  $R_1, R_2, R_3, R_4 OCH_3$  und  $R_4 NH(CH_2)_nAr$  sein, wobei Ar eine Phenyl-, Naphthyl-, polycyclisch aromatische oder heterocyclische Einheit und  $n 0-12$  ist.

**[0024]** [Fig. 3](#) gibt die prozentuale Zunahme des Tumorvolumens für PDT allein und PDT in Kombination mit BCG für Tiere wieder, die nur teilweise auf die PDT-Behandlung ansprachen. [Fig. 3A](#) zeigt die Ergebnisse im X-Y-Diagramm und [Fig. 3B](#) zeigt die Ergebnisse in Form eines Balkendiagramms.

#### Ausführungsformen der Erfindung

**[0025]** Die vorliegende Erfindung umfasst die Verwendung von aminosubstituierten Hypocrellinen, Perylenchinonderivaten (PQP) als photodynamische und sonodynamische Mittel, sowie die therapeutische Verwendung der erfindungsgemäßen Derivate als Modulatoren für das Immunsystem. Die bevorzugten Verbindungen zur Verwendung bei der vorliegenden Erfindung sind aminosubstituierte Hypocrellinderivate, gewählt aus der Gruppe, bestehend aus HBBA-R2, HBEA-R1, HBDP-R1 und DMHB.

**[0026]** Es kann eine Zusammensetzung zur Behandlung einer ausgewählten Krankheit oder eines Zustandes verwendet werden, umfassend das Verabreichen einer Zusammensetzung, umfassend ein Perylenchinonderivat, dem Perylenchinonderivat Gelegenheit geben sich in einem Teil des Körpers, vorzugsweise im ganzen Körper, zu verteilen und Aktivieren des Perylenchinonderivats.

**[0027]** Bei der vorliegenden Erfindung sind die Perylenchinonderivate aminosubstituierte Hypocrelline. Bei den am meisten bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung sind die Perylenchinonderivate demethoxylierte Hypocrelline (vgl. [Fig. 2](#)), worin  $R_1, R_2, R_3, R_4$  sind  $OCH_3$  oder  $NHCH_2Ar$  (Ar sind Phenyl- oder Pyridyl-

gruppen),  $\text{NHCH}(\text{CH}_2)_n$  (worin  $-\text{CH}(\text{CH}_2)_n$  alicyclische Gruppen sind und  $n = 3, 4, 5, 6$ ), 2-BA-2-DMHB ist, wobei  $\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3 \text{OCH}_3$  und  $\text{R}_4 \text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$  sind. Alternativ können  $\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3, \text{R}_4 \text{OCH}_3$  und  $\text{R}_4 \text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{Ar}$  sein, wobei Ar eine Phenyl-, Naphthyl-, polycyclisch-aromatische oder heterocyclische Einheit und  $n 0-12$  ist.

**[0028]** Die vorliegende Erfindung schließt auch Zusammensetzungen zur Veränderung des immunogenen Status des Wirtsorganismus ein. Bei der Veränderung des immunogenen Status erhöhen, erniedrigen oder halten die Zusammensetzungen den Zustand des Wirtsorganismus aufrecht und/oder verstärken, verschlechtern ihn oder halten die Funktion des immuntherapeutischen Mittels aufrecht. Ein Beispiel für die Ableitung eines therapeutischen Nutzens durch Verstärkung der Immunogenität schließt, ohne Beschränkung darauf, die Behandlung von Krebs oder einiger Infektionskrankheiten ein, wie Hepatitis. Ein Beispiel für die Erniedrigung der Immunogenität schließt, ohne Beschränkung darauf, die Behandlung von rheumatisch bedingter Arthritis ein. Ein Beispiel für die Aufrechterhaltung der Immunogenität schließt, ohne Beschränkung darauf, die Zusatzbehandlung von Kranken ein, welche nach anfänglicher Abstoßung gegenüber Antigenen tolerant geworden sind. Bei einer am meisten bevorzugten Ausführungsform der Erfindung vermindern die Methoden und Zusammensetzungen die Antigenwirkung der aktiven Komponente in der therapeutischen Zusammensetzung nicht.

**[0029]** Die Zusammensetzungen können auch in Kombination mit anderen verabreichten Immuntherapien verwendet werden. Die Zusammensetzungen können zum Beispiel mit Antikörpern, Antigenen, Cytokinen und/oder auf Immunhilfsmitteln basierenden Immuntherapien verwendet werden. Die Zusammensetzungen modulieren die Funktion oder Aktivität der Immuntherapie selbst. Immuntherapien oder Immunmodulatoren sind zum Beispiel beschrieben in Mandel, Principles and Practice of Infectious Diseases, 5. Ausg. Immunmodulatoren schließen zum Beispiel, ohne Beschränkung darauf, BCG, den die Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (Filgrastim), den die Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (Sargramostim), Interferon Alpha, Interferon Alpha-2a, Interferon Alpha-2b, Interferon Alphacon-1, Interferon Alpha-n3, intravenöses Immunoglobulin und Imiquimod ein.

**[0030]** Die vorliegende Erfindung kann auch die Gesamtansprechung eines Wirts auf eine Krankheit oder einen Zustand erhöhen und für den Empfänger von therapeutischem Nutzen sein.

**[0031]** Die vorliegende Erfindung schließt auch Zusammensetzungen ein, welche zur Induktion einer nützlichen Immunansprechung führen, insbesondere dort, wo ein Fachmann keine antigenspezifische Immunreaktion erwarten würde, z. B. bei Tumor-assozierten Antigenen sog. („selbst“) Antigenen.

**[0032]** Das PQP kann an einen Tracer konjugiert sein, wie an einen Antikörper, Antikörperreceptor oder dergleichen, oder an ein Bruchstück davon, um das Konjugat zur Verstärkung des Immunsystems zu verwenden und das Konjugat unter Verwendung von Licht und/oder Schall zu aktivieren.

**[0033]** Verstärkung des Immunsystems, wie hierin verwendet, bezieht sich auf die Modifizierung der Wirts-Tumor-Beziehung durch Modulation (Induzierung, Verstärkung und/oder Aktivierung) des Ansprechens des Immunsystems auf Krebs-assozierte Antigene. Eine solche Potenzierung des Immunsystems führt zu einer Rückbildung, Abstoßung und möglicherweise Heilung des Tumors. Die Potenzierung des Immunsystems bezieht sich auch auf die Modulation der Aktivität verschiedener Komponenten des Immunsystems, ohne Beschränkung einschließlich, Antikörper, Antigene, Cytokine, Immunadjuvantien und dergleichen. Es wird angenommen, dass das Potenzieren des Immunsystems zu einer Ansammlung von Makrophagen, sowohl an der Stelle des Tumors, als auch an entfernten Metastasen führt.

**[0034]** Die vorliegende Erfindung betrifft das Potenzieren des Immunsystems in einer Weise, dass es eine günstige oder therapeutisch wünschenswerte Wirkung ausübt. Eine günstige oder wünschenswerte Immunantwort ist, wie hierin verwendet, eine solche, welche zu einem therapeutisch wünschenswerten Ergebnis führt. Eine therapeutisch nützliche Antwort schließt typischerweise die Modulation des Immunsystems und/oder eines oder mehrerer ihrer Komponenten ein, z. B. die Aktivierung oder Inaktivierung einer bestehenden Immunantwort. Die Modulation kann die Induktion des Immunsystems und/oder eines oder mehrerer ihrer Komponenten und/oder eine T-Zellen Immunantwort und/oder eine humorale Immunantwort einschließen. Die Immunantwort auf ein Antigen kann verstärkt oder vermindert sein, je nachdem, welche Ansprechung ein günstiges Ergebnis liefert.

**[0035]** Ein umfassender Zugang zur Bereitstellung eines therapeutischen Nutzens, wie hierin verwendet, beinhaltet eines oder mehrere oder alle der folgenden Voraussetzungen: zelluläre Immunität und der an ihrer Herstellung beteiligten Moleküle; humorale Immunität und der an ihrer Herstellung beteiligten Moleküle; ADCC-Immunität und der an ihrer Herstellung beteiligten Moleküle; CDC-Immunität und der an ihrer Herstellung beteiligten Moleküle.

ligten Moleküle; natürliche Killerzellen; und Cytokine und Chemokine und an ihrer Herstellung beteiligte Moleküle und Zellen. Der Fachmann wird erkennen, dass eine günstige Immunantwort (unter Überschreitung der Immuntoleranz) nach einer Reihe von Methoden bestimmt werden kann. Die Aktivierung der vielfältigen Arme des Immunsystems kann zum Beispiel durch Messung der antigenspezifischen Immunantwort bei der Vor- und Nachbehandlung bestimmt werden. Eine spezifische Demonstration der Induktion einer nützlichen Immunantwort würde eine oder mehrere der folgenden Punkte einschließen:

- 1) eine humorale Antwort auf das verabreichte Immunogen einschließlich den Nachweis des Antikörpers;
- 2) eine humorale Antwort auf das Antigen, einschließlich den Nachweis des Auftretens von Antigen-spezifischen Antikörpern auf den gleichen oder unterschiedlichen Epitopen auf dem Antigen wie das Epitop für das Kopplungsmittel;
- 3) Antikörper-abhängige Zytotoxizität, einschließlich den Nachweis, dass das Post-Injektionsserum mit einem Antigen-spezifischen Antikörpertiter die Tumorabtötung vermittelt, wenn das Serum mit mononuklearen peripheren Blutzellen und Tumorzellentargets gegenüber dem Ausgangsserum der Vorinjektion inkubiert wird;
- 4) Komplement-abhängige Zytotoxizität, einschließlich den Nachweis, dass das Nachinjektionsserum, kombiniert mit Komplement enthaltendem Plasma, Tumorzellentargets gegenüber dem Ausgangsserum der Vorinjektion abtötet;
- 5) natürliche Killerzellenaktivität; einschließlich eine verstärkte Tumorzellenabtötung durch einkernige periphere Zellen (enthaltend NK Zellen) in Blutproben nach der Nachinjektion, abgenommen vor dem Auftreten einer messbaren Antikörperreaktion als Antwort auf das Tumor-assoziierte Antigen (TAA) gegenüber Vorbehandlung mit einkernigen peripheren Blutzellen;
- 6) Antigen-verstärkte Zytotoxizität, einschließlich eine verstärkte Abtötung von Tumorzellentargets durch einkernige periphere Blutzellen (in Anwesenheit von TAA-positiven Tumorzellen) gegenüber den Gehalten vor der Verabreichung; und
- 7) Zelluläre Immunität, einschließlich den Nachweis von T-Zellen-Wucherung oder Tumorzellenauflösung nach der Injektion gegenüber vor der Injektion.

**[0036]** „Perylenchinonderivat“ oder „Derivat“ bezieht sich, wie hierin verwendet, auf alle Verbindungen, die sich von nativen oder natürlichen Perylenchinonen (PQPs) ableiten und welche mit Licht einer vorbestimmten Wellenlänge und/oder Schall mit einer vorbestimmten Frequenz aktiviert werden können. Das Derivat kann eine Verbindung sein, welche sich von natürlich vorkommenden Chinonverbindungen ableitet. Ein Derivat kann auch mit einem anderen aktiven Reagenz komplexiert oder darin eingeschlossen sein, einschließlich chemotherapeutische Mittel oder Alkylierungsmittel, ohne darauf beschränkt zu sein. PQPs schließen Hypocrelline, Cercosporin, Phleichrom, Cladochrom, Elsinochrome, Erythroaphine und Calphostine ein, ohne darauf beschränkt zu sein.

**[0037]** „Perylenchinonderivat“ oder „Derivat“ bezieht sich, wie hierin verwendet, auch auf alle Verbindungen, welche sich von nativen oder natürlichen Perylenchinonen ableiten und die mit Licht einer vorbestimmten Wellenlänge und/oder Schall mit einer vorbestimmten Frequenz aktiviert werden können. Das Derivat kann eine Verbindung sein, die sich von natürlich vorkommendem Hypocrellin A oder Hypocrellin B und Hypocrellin-ähnlichen Verbindungen ableitet. Ein Derivat kann auch mit einem anderen aktiven Reagens komplexiert oder darin eingeschlossen sein, einschließlich, jedoch ohne Beschränkung darauf, chemotherapeutische Mittel oder Alkylierungsmittel. Wie nachstehend ausführlicher ausgeführt, kann die Zusammensetzung, welche eine PQP-aktives Mittel einschließt, eine breite Vielfalt zusätzlicher Komponenten einschließen, einschließlich zum Beispiel ein oder mehrere Gase, gasförmige Vorläufer, Flüssigkeiten, Öle, Stabilisatoren, Diagnosemittel, lichtempfindliche Mittel, bioaktive Mittel und/oder Targeting-Liganden.

**[0038]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das PQP-Derivat ein Aminosäurederivat von Hypocrellin B. Zurzeit verwenden die am meisten bevorzugten Immunkonjugate funktionalisiertes Hypocrellin B, damit sie eine Antikörperkopplungsstelle in Form einer Säure, eines Säurebromids, Thiols oder primären Amins aufweisen.

**[0039]** Ein bei der vorliegenden Erfindung verwendetes Hypocrellinderivat schließt auch 2-Butylamino-2-de-methoxy-hypocrellin B (2-BA-2-DMHB) ein. 2-BA-2-DMHB weist eine starke Absorption im roten Spektralbereich auf. Verglichen mit seiner Stammverbindung HB reichen seine Absorptionsbanden nach längeren Wellenlängen. Der Extinktionskoeffizient bei 583 nm betrug das 2,5-Fache von HB bei 548 nm und bei 621 nm mehr als das 3,8-Fache von HB bei 580 nm. Diese Eigenschaft bedeutet, dass DMHB eine günstigere Gewebedurchdringung aufweist und daher von größerer klinischer Bedeutung sein kann.

**[0040]** Die bei der vorliegenden Erfindung verwendeten Verbindungen können nach einem beliebigen Verfah-

ren hergestellt werden, welches eine gereinigte oder im Wesentlichen gereinigte Verbindung liefert, oder eine Verbindung, welche als photodynamisches Mittel oder sonodynamisches Mittel nützlich ist. Die Verbindungen können auch eine Zusammensetzung bilden, umfassend einen Cocktail von Verbindungen, d. h. von mehr als einer Verbindung. Diese Verfahren sind auf dem Fachgebiet bekannt, z. B. Liu et al., „Synthetic studies in novel hypocrellin B derivatives“, Tetrahedron, 49: 10785 (1993) und Diwu et al., Anti-Cancer Drug Design, 8: 129–143 (1993). Hypocrellinderivate können leicht aus der Stammverbindung Hypocrellin B, einem natürlichen Produkt aus fungus Hypocrella bambuase sacc., einem Phytopathogen von Bambus, synthetisiert werden. Die HB-Derivate, HBBA-R2 (butylaminiertes HB), HBDP-R1 (2-(N,N-dimethylamino)-propylamin-HB) und HBEA-R1 (ethanolaminiertes HB) werden durch Aminierung der phenolischen Hydroxylgruppen der Stammverbindung hergestellt.

**[0041]** Viele der PQP-Eigenschaften sind in Diwu et al., J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 64: 273 (1992) zusammengefasst. Manche Perylenchinone sind auch starke Inhibitoren für bestimmte Viren, insbesondere den menschlichen Immunschwächevirus (HIV) und auch für das Enzym Proteinkinase C (PKC). Sowohl die Anti-HIV- als auch die Anti-PKC-Aktivitäten sind lichtabhängig, eine Erscheinung, die mit der photodynamischen Krebstherapie verknüpft ist [Diwu et al., Biochem. Pharmacol., 47: 373–389 (1994)]. Der Artikel von Diwu et al. legt auch eine erfolgreiche Konjugation von HB an ein Protein offen.

**[0042]** Die PQP-Derivate können funktionalisiert werden, z. B. reaktive Gruppen eingeschlossen werden, einschließlich, ohne Beschränkung darauf, eine Säure, Hydroxyl und ein Säurehalogenid (vorzugsweise Bromid), ein Hydrazin, ein Thiol oder ein primäres Amin. Das Kopplungsmittel kann reaktive Gruppen einschließen, einschließlich, ohne Beschränkung darauf, Aminosäuren wie Cystein, Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und andere zweibasische Aminosäuren sowie andere tri- oder polyfunktionelle Aminosäurederivate.

**[0043]** Die bei der vorliegenden Erfindung verwendeten Perylenchinonderivate sind für die therapeutische Verwendung besonders geeignet, weil sie Absorption und Phototoxizität im therapeutischen Fenster (etwa 560 nm bis etwa 700 nm) aufweisen; eine ausgezeichnete sonodynamische Aktivität im Frequenzbereich von etwa 1 MHz bis etwa 3 MHz besitzen; eine niedrige Molekulargewicht haben (typischerweise von etwa 550 Dalton bis etwa 880 Dalton); in monomerer Form rein zugänglich sind; eine schnelle Serum- und Hautklärung aufweisen; eine vernachlässigbare Zytotoxizität in vitro und in vivo besitzen; eine ausgezeichnete Photopotentierung (z. B. um zwei Größenordnungen) besitzen, so dass der Sicherheitsspielraum bei der Verwendung ausgezeichnet ist; die Phototoxizität mittels herkömmlicher Typ II-Reaktionen und Typ I-Reaktionen vermittelt wird (was die Verwendbarkeit für hypoxische Tumorzellen anzeigt); starke Inhibitoren für Proteinkinasen sind; den apoptotischen Zelltod in vitro und in vivo übertragen; keine Genotoxizität aufweisen; eine ausgezeichnete Tumorkontrolle bieten; molekular im Hinblick auf eine gezielte Freisetzung konfiguriert werden können; gezielt mit radioaktiven Bereichen versehen werden können, um die Sono/Photo-Toxizität weiter zu erhöhen; und die Stammhypocrelline der seitenspezifischen Modifikation zugänglich sind, so dass viele Derivate gebildet werden können, Derivate mit wechselndem Grad der Photosensibilisierungs- und/oder Sonosensibilisierungseigenschaften.

**[0044]** Die Zusammensetzungen, welche ein PQP-aktives Mittel enthalten, können eine breite Vielfalt an zusätzlichen Komponenten einschließen, einschließlich zum Beispiel ein oder mehrere Gase, gasförmige Vorfächer, Flüssigkeiten, Öle, Stabilisatoren, Diagnosemittel, lichtempfindliche Mittel, bioaktive Mittel und/oder Targeting-Liganden.

**[0045]** „Krankheit“ bezieht sich, wie hierin verwendet, auf die Behandlung, Diagnose und/oder Linderung irgendeiner Krankheit, einer Störung, eines Leidens oder eines Zustandes beim Säugers (einschließlich des Menschen), welcher mit einer photodynamischen und/oder sonodynamischen Therapie behandelt werden kann. „Krankheit“ schließt, ohne Beschränkung darauf ein: Krebs und seine Metastasen wie Hautkrebs; Tumorgewachstum und seine Metastasen; Tumore und Tumorzellen wie Sarkome und Karzinome, einschließlich fester Tumore, Blut-Knochen Tumore und Tumore, die sich in den Nasendurchgängen, in der Blase, der Speiseröhre oder der Lunge, einschließlich der Bronchien, finden; Viren, einschließlich Retroviren; bakterielle Krankheiten; Pilzkrankheiten und dermatologische Zustände oder Störungen wie Schäden an der Vulva, Keloid, Vitiligo, Schuppenflechte, gutartige Tumore, Gebärmutterhautentzündung, Barettscher Esophagus, tinea capitis und Amyloidose.

**[0046]** „Verabreichung“ bezieht sich, wie hierin verwendet, auf jeden Vorgang, welcher darin besteht, eines oder mehrere PQP-Derivate einer vorbestimmten Zelle, Zellen oder Gewebe, typischerweise eines Säugetiers, auszusetzen. Die Verabreichung kann, wie hierin verwendet, in vivo, in vitro oder ex vivo erfolgen. Eine Zusammensetzung kann zum Beispiel durch Injektion oder durch ein Endoskop erfolgen. Die Verabreichung

schließt auch die direkte Anwendung auf Zellen einer Zusammensetzung ein. Während einer Operation können zum Beispiel Tumorzellen offen gelegt werden. Diese ausgesetzten Zellen (oder Tumore) können an eine erfindungsgemäße Zusammensetzung direkt ausgesetzt werden, z. B. durch Waschen oder Spülen der Operationsstelle und/oder der Zellen.

**[0047]** Aktivierung, Aktivieren oder ähnliche Ausdrücke beziehen sich, wie hierin verwendet, auf die Verwendung von Lichtwellen und/oder Schallfrequenzen, um bei einer Verbindung oder einem Teil einer Verbindung die chemische Reaktionsfähigkeit zu erhöhen. Es kann jede beliebige Methode verwendet werden, um eine Lichtquelle und/oder eine Schallquelle auf ein Perylenchinonderivat anzuwenden, z. B. eine direkte Anwendung, eine Ultraschallmaschine; gebündelter Ultraschall, gebündelter hochintensiver Ultraschall und Leuchtendoskop, um nur einige zu nennen.

**[0048]** Bei Bestrahlung mit geeignetem Licht oder Schall kann der Sensibilisator (z. B. durch Oxidation, Reduktion und dergleichen) sich in eine toxische Form verwandeln und/oder eine Immunansprechung modulieren. Im Nachgang zur Anregung eines Photosensibilisators oder eines Sonosensibilisators in einen langlebigen Triplet-Zustand, wird zum Beispiel ein Zieltumor entweder durch Energiequantensprung erzeugte hochreaktive Sauerstoff-Singulett Spezies (ein Typ II Mechanismus) und/oder durch radikalische Produkte (ein Typ I Mechanismus) zerstört. Größere biologische Zielmoleküle vom Typ der Sauerstoff-Singulett Spezies und/oder radikalischen Produkte schließen Nukleinsäuren, Enzyme und Membranen ein. Eine therapeutische Nebenwirkung solcher Methoden beinhaltet die Freisetzung pathophysiologischer Produkte wie Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene, wenn Gewebe den Wirkungen aktivierter Photosensibilisatoren ausgesetzt werden.

**[0049]** Das Aktivieren eines Sensibilisators mithilfe von Licht und das Aktivieren eines Sensibilisators mithilfe von Schall können gemeinsam erfolgen, weil sich beide Verfahren ergänzen. Das bedeutet, dass rotes sichtbares Licht, welches geeignet ist ein Perylenchinonderivat zu aktivieren etwa 5 mm bis etwa 7 mm in ein Gewebe eindringen kann und Schall, welcher geeignet ist ein Perylenchinonderivat zu aktivieren, das Gewebe oder einen Körper vollständig durchdringen kann.

**[0050]** „Photopotenzierungsfaktor“ bezieht sich, wie hierin verwendet, auf die Eigenschaft der Verbindung(en) zusätzlich zu ihrer/ihren inherenten nicht-aktivierten Toxizität eine durch Licht oder Schall vermittelte Toxizität auszuüben. Der Aktivierungsfaktor berechnet sich als Verhältnis von LD<sub>50</sub> der behandelten Zellen ohne Aktivierung zu LD<sub>50</sub> der mit einer aktivierten Verbindung behandelten Zellen (LD<sub>50</sub> Wirkstoff, dividierte durch LD<sub>50</sub> aktiver Wirkstoff). Sofern der Ausdruck „LD<sub>50</sub>“ vorstehend verwendet worden ist, kann der Ausdruck durch „IC<sub>50</sub>“ ersetzt werden, um die biologische Analyse anzusprechen, welche eher die Stoffwechselaktivität betrifft als den finalen Endpunkt, den Verlust der Reproduktionsfähigkeit oder den klonogenen Tod. Die relative Phototoaktivitätseffizienz einer Verbindung kann auch unter Verwendung eines klonogenen Versuchs bestimmt werden, eines klonogenen Versuchs, wie er dem Fachmann wohlbekannt ist.

**[0051]** Ein wünschenswertes PQP-Derivat ist ein solches, das bei hohen Wirkstoffkonzentrationen ohne Aktivierung, d. h. ohne Licht (auch als „dunkel“ bezeichnet) und/oder ohne Schall, nicht-toxisch (oder gering toxisch) ist und bei Anwendung von Licht geeigneter Wellenlänge oder Schall geeigneter Frequenz bei geringen Konzentrationen toxisch ist. Wie der Fachmann weiß, sind die am wünschenswertesten Verbindungen jene, welche eine breite Vielfalt nicht-toxischer Dosen im nicht-aktivierten Zustand bereitstellen, nachdem diese charakteristische Eigenschaft für den Kranken eine größere Sicherheit bietet.

**[0052]** Physiologisch annehmbare Flüssigkeit bezieht sich, wie hierin verwendet, auf jede(s) Fluid oder Additiv, welche(s) zur Kombination mit einer Zusammensetzung geeignet ist, welche ein PQP-Derivat enthält. Diese Fluids werden typischerweise als Verdünner oder Träger verwendet. Physiologisch annehmbare Fluids schließen beispielsweise Konservierungslösungen, physiologische Kochsalzlösung, isotone (etwa 0,9%) Kochsalzlösung oder eine etwa 5% Albuminlösung oder Suspension ein. Die vorliegende Erfindung soll nicht durch den verwendeten Typ von physiologisch annehmbarer Fluid eingeschränkt werden. Die Zusammensetzung kann auch pharmazeutisch annehmbare Träger einschließen. Pharmazeutisch annehmbare Träger schließen, ohne Beschränkung darauf, physiologische Kochsalzlösung, steriles Wasser, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung und dergleichen ein. In die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können andere Puffersubstanzen, Dispergierungsmittel und inerte, ungiftige Substanzen, die zur Verabreichung an einen Kranken geeignet sind, eingeschlossen werden. Die Zusammensetzungen können Lösungen, Suspensionen oder irgendwelche zur Verabreichung geeignete Formulierungen sein und sind typischerweise steril und frei von unerwünschtem teilchenförmigem Material. Die Zusammensetzungen können mit herkömmlichen Sterilisationsverfahren sterilisiert werden.

**[0053]** Das Sensibilisierungsmittel kann dem Kranken auf einem beliebigen, biologisch geeignetem Weg, verabreicht werden. Das Sensibilisierungsmittel kann in einen Kranken zum Beispiel intravenös, subkutan, intraperitoneal, intrahecal, intravesicular, intradermal, intramuskulär oder auf intralymphatischem Weg eingeführt werden. Die Zusammensetzung kann als Lösung, Tablette, Aerosol oder mehrphasige Formulierung vorliegen. Liposome, lang-zirkulierende Liposome, Immunoliposome, bioabbaubare Microspheres, Mizellen oder dergleichen können ebenfalls als Träger, Vehikel oder Verabreichungssystem verwendet werden. Verwendet man des Weiteren die auf dem Fachgebiet wohlbekannten ex vivo Verfahren, wird Blut oder Serum des Kranken aus dem Kranken abgenommen; Gelegentlich kann es wünschenswert sein das Antigen aus dem Blut des Patienten zu entfernen; Das Blut oder Serum kann dann mit einer Zusammensetzung gemischt werden, die das erfundungsgemäße Sensibilisierungsmittel enthält; und das behandelte Blut oder Serum in den Kranken zurückgeführt werden. Der Arzt kann die anti-idiotypische und anti-isotypische Reizbeantwortung bei diesen unterschiedlichen Wegen vergleichen, um den wirksamsten Weg der Verabreichung zu bestimmen. Die Erfindung soll nicht durch irgendein spezielles Verfahren der Einführung des Sensibilisierungsmittels in den Kranken eingeschränkt werden.

**[0054]** Die intrazelluläre Aufnahme kann rasch (z. B. innerhalb von etwa 2 Stunden) erfolgen oder die Aufnahme kann mehr Zeit beanspruchen (z. B. etwa 20 Stunden oder mehr). Ein gewisser Grad an selektiver Aufnahme durch den Tumor könnte durch Modifikation des pKa des Sensibilisierungsmittels erreicht werden, weil das Zwischengewebemillieu mancher Tumore stärker sauer ist als das normaler Gewebe. Diese Erfindung schließt über vergleichende Klonierungsversuche ein Verfahren zur Erkennung von Verbindungen ein, bei denen die Toxizität der Verbindungen für Krebszellen höher ist als die für normale Zellen.

**[0055]** Adjuvantien oder Immunadjuvantien sind als eine Gruppe strukturell heterogener Verbindungen definiert, die dazu verwendet werden, die Immunansprechung gegenüber einem Antigen zu initiieren oder zu verstärken. Theoretisch kann jedes Molekül, das eine spezielle Situation in der Abfolge der immunologischen Ereignisse begünstigen oder erweitern kann, was letztendlich zu einer besseren immunologischen Ansprechung führt, als ein Adjuvans definiert werden [schij 2000]. Anerkannte klassische Beispiele schließen Ölemulsionen, Saponine, Aluminium- oder Calciumsalze, nicht-ionische Blockpolymer-Tenside, Derivate von Lipopolysacchariden (LPS), Mycobakterien und viele andere ein. Adjuvantien können die Immunansprechung durch Erhöhung der Antigenlokalisierung (Aluminiumverbindungen, Liposome, Wasser-und-Öl-Emulsionen [Freund's unvollständiges Adjuvans]) potenzieren; die Antigenpräsentation verstärken (Interferon Gamma Interferon Induktoren, Beryllium, Muramyldipeptide, Freund's vollständiges Adjuvans); und Lymphozyten aktivieren (Interleukine-1 und -2). [Lise LD, Audibert F, Immunadjuvants and analogs of immunomodulatory bacterial structures. Curr. Opin. Immunol. 1989; 2: 269–274].

**[0056]** Die PQP-Derivate können auch in Verbindung mit und konjugiert an eine Reihe anderer Verbindungen verwendet werden wie Signalmittel, Verstärker und/oder Targetingmittel.

**[0057]** Ein Hypocrellinderivat, das zum Beispiel bei der vorliegenden Erfindung verwendet wird, kann an einen Antikörper, vorzugsweise an einen monoklonalen Antikörper oder an eine Verbindung wie Transferrin konjugiert sein. Das Kopplungsmittel schließt irgendein flaches DNA-Targetingmittel ein, wie Lexotropsin oder Neotropsin, vorzugsweise um die Toxizität über den Zellkern zu verstärken. Geeignete Verstärker schließen, ohne Beschränkung darauf, pKa-Modifizierungsmittel, hypoxische Zellradiosensibilisierungsmittel und bioreduktive aktivierte anti-neoplastische Mittel, wie Mitomycin C, ein (vorzugsweise um die toxische Wirkung der Verbindung in hypoxischen Zellen oder Mikroorganismen zu bewirken oder zu potenzieren). Geeignete Signalmittel schließen, ohne Beschränkung darauf, Markierungsmittel für den apoptotischen Zelltod oder necrotischen Zelltod oder endogene Regulationsmoleküle zur Kontrolle oder Verzögerung des Zellzyklus ein, vorzugsweise um die Phototoxizität oder Sonotoxizität des/der Verbindung(en) durch Induktion des apoptotischen oder necrotischen Zelltods zu potenzieren, oder durch Inhibieren irgendeines Paares aus tödlichem oder möglicherweise tödlichem Schaden (PLD).

**[0058]** Wie vorstehend angegeben, schließt eine der Ausführungsformen der Erfindung Bindemittel-PQP-Konjugate (oder Immunkonjugate) und die therapeutische Verwendung dieser Konjugate ein. In Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung kann jedes Verfahren zum Verknüpfen oder Koppeln eines Mittels an PQP verwendet werden. Es ist zum Beispiel wohlbekannt, einen Antikörper oder ein Antikörperbruchstück an einen Photosensibilisator zu koppeln. Goff et al., British Journal of Cancer, 74: 1194–1198 (1996) legen zum Beispiel die Herstellung eines Immunkonjugats durch Inkubieren eines Photosensibilisierungsmittels mit dem monoklonalen Antikörper OC125 offen, einem Antikörper, der sich speziell an das CA125-Antigen bindet, das meistens zusammen mit Eierstockkrebs vorkommt. Bei diesem beispielhaften Immunkonjugat kann Polyglutaminsäure an ein Monoethylendiaminmonoamid-Derivat gebunden sein, das dann kovalent mit der Kohlenhy-

drateinheit der Gelenk-Region des monoklonalen Antikörpers abseits der Antigenkopplungsstelle verknüpft ist. Andere beispielhafte Verknüpfungen sind in US-A 4,722,906 und 3,959,078 offen gelegt. Kurz gesagt, legen dieses Patente die Bereitstellung eines Photosensibilisators mit einer Selectorgruppe oder eine latent reaktive Gruppe offen, welche ein anderes Teil eines spezifischen Kopplungspaares ist, z. B. eine reaktive Gruppe, welche sich kovalent an einen Antikörper bindet.

**[0059]** Wie der Fachmann weiß, hängt eine wirksame Dosis des Derivats oder eines Konjugats, welches das Derivat einschließt, zum Teil von der Schwere der Krankheit und vom Zustand des Immunsystems des Kranken ab. Der Fachmann wird erkennen, dass eine Vielfalt von Dosen verwendet werden kann und dass diese von einer Vielfalt wohlbekannter Faktoren abhängen. Im Allgemeinen wird die Zusammensetzung etwa 0,1 µg bis etwa 2 mg oder mehr Kopplungsmittel pro Kilogramm Körpergewicht einschließen, noch üblicher etwa 200 µg pro Kilogramm Körpergewicht. Die Konzentration beträgt mindestens etwa 0,5%. Die Menge wird in erster Linie auf der Grundlage des Fluidvolumens, der Viskosität, der Antigenizität etc. in Übereinstimmung mit der gewählten Verabreichungsmethode gewählt.

**[0060]** Die Verabreichung des Konjugats oder des Derivats kann mehr als einmal erfolgen, vorzugsweise dreimal während eines längeren Zeitraums. Nachdem die Zusammensetzungen dieser Erfindung bei Kranken in einem ernsten, d. h. einem lebensbedrohenden oder möglicherweise lebensbedrohenden Krankheitszustand verwendet werden können, kann ein Überschuss des Kopplungsmittels verabreicht werden, wenn dies wünschenswert ist. Die tatsächlichen Verfahren und Vorschriften für die Verabreichung pharmazeutischer Zusammensetzungen, einschließlich der Verdünnungsverfahren für die Injektionen mit den vorliegenden Zusammensetzungen, sind wohlbekannt oder werden für den Fachmann ersichtlich. Einige dieser Verfahren und Vorschriften sind in Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Co. (1982) beschrieben.

**[0061]** Eine erfindungsgemäße Zusammensetzung kann allein verabreicht werden oder in Kombination (aufeinanderfolgend oder gleichzeitig) mit anderen immuntherapeutischen Zusammensetzungen. Dieser Gesichtspunkt erfordert möglicherweise die Erhöhung des photodynamischen und/oder sonodynamischen therapeutischen Verhältnisses durch schrittweise Sensibilisierungsmittelverabreichung (gefolgt von Lichtbehandlung). Unter diesen Bedingungen kann eine entfernte Metastase gezielt erreicht werden.

**[0062]** Dies kann die Verabreichung eines ersten Wirkstoffs umfassen, vorzugsweise eines mit einer langsamen Aufnahme, und die Verabreichung eines zweiten Wirkstoffs, vorzugsweise mit einer schnelleren Aufnahme als die des ersten Mittels. Sowohl der erste als auch der zweite Wirkstoff können dann durch Aussetzen des Kranken und/oder des Mittels an Licht geeigneter Wellenlänge und/oder Schall geeigneter Frequenz aktiviert werden, wie vorstehend beschrieben.

**[0063]** Puffer werden in erster Linie verwendet, um die Formulierung gegen den chemischen Abbau zu stabilisieren, der eintreten könnte, wenn sich der pH nennenswert ändert. Die üblicherweise eingesetzten Puffer weisen eine so niedrige Pufferkapazität wie möglich auf, um bei der Injektion das körpereigene Puffersystem nicht wesentlich zu stören. Der Pufferbereich und die Auswirkung des Puffers auf die Aktivität muss untersucht werden. Eine geeignete Einstellung ist nützlich, um optimale Bedingungen für den pH-abhängigen Übergang in das vorgesehene kranke Gewebe oder den geschädigten Bereich vorzusehen. Beispiele solcher Puffersysteme schließen die folgenden Säuren ein: Essig-, Adipin-, Ascorbin-, Benzoe-, Zitronensäure, Glycerin, Milch-, Wein-, Salz-, Phosphor-, Schwefel-, Kohlen- und Hydrokohlensäure; und ihre jeweiligen Salze, wie: Kalium-, Natrium-, Magnesium-, Calcium- und Diethanolaminsalze.

### Beispiele

#### Beispiel 1: Direktaminierung von Hypocrellin B

**[0064]** HB (50 mg) wurde in aminhaltigem (1 ml) Ethanol (5 ml) gelöst und die resultierende Lösung je nach verwendetem Amin 6–18 h am Rückfluss gekocht. Die Mischung wurde in Eiswasser gegossen, mit 10% Salzsäure neutralisiert und mit Chloroform extrahiert. Die Chloroformschicht wurde mit Wasser gewaschen, mit wasserfreiem  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und zu einem blauen Feststoff eingedampft. Der Feststoff wurde zunächst an einer 1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Silicagelsäule mit Dichlormethan-Methanol (Gradientenverhältnis) als Elutionsmittel chromatographiert, um mehrere Bestandteile zu erhalten. Jeder Bestandteil wurde noch zweimal an einer 1% Zitronensäure-Silicagel-Platte unter Verwendung von 6:1:1 Petrolether-Ethylacetat-Ethanol als Entwickler chromatographiert, um die einzelnen Derivate zu liefern.

## Beispiel 2: Aminierung von Hypocrellin B mit Ethanolamin

**[0065]** Die Umsetzung von HB mit Ethanolamin gemäß vorstehendem Verfahren liefert fünf Produkte. HBEA-R2 und HBEA-R1 (Diwu et al. 1993) wurden identifiziert und wie folgt charakterisiert:

HBEA-R2 (20%): IR: 3270, 1717 und 1612  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (in  $\text{DMSO-d}_6$ ): 11,46 (s, < 1H, austauschbar gegen  $\text{D}_2\text{O}$ , phenolisches OH), 1,38 (s, < 1H, austauschbar gegen  $\text{D}_2\text{O}$ , phenolisches OH), 6,83 (s, 1H, ArH), 6,78 (s, 1H, ArH), 4,09 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,94 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,92 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,85–3,50 (m, 4H,  $2\text{NHCH}_3$ ), 3,40–2,92 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 2,11 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ) und 1,72 ppm (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ). MS (FAB): 615 ( $\text{M} + \text{H}$ ). Berechnet für  $\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_9$ : 614,2264; gefunden: 614,2270.

HBEA-R1 [Isomer B] (12%): IR: 3260, 1720 und 1613  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (in  $\text{DMSO-d}_6$ ): 12,11 (s, < 1H, austauschbar gegen  $\text{D}_2\text{O}$ , phenolisches OH), 11,99 (s, < 1H, austauschbar gegen  $\text{D}_2\text{O}$ , phenolisches OH), 6,47 (s, 1H, ArH), 6,35 (s, 1H, ArH), 4,03 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,95 (s, 6H, 2  $\times$   $\text{OCH}_3$ ), 3,93 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,88–3,62 (m, 4H,  $2\text{NHCH}_3$ ), 3,20–2,95 (m, 2 $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 2,15 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ) und 1,90 ppm (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ). MS (FAB): 615 ( $\text{M} + \text{H}$ ). Berechnet für  $\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_9$ : 614,2264; gefunden: 614,2268.

## Beispiel 3: Aminierung von Hypocrellin B mit Butylamin

**[0066]** Synthese von HBBA-R2 (Isomer A) und 3-Acetyl-4,6,8,9,11,13-hexamethoxy-2-methyl-1H-cyclohepta[ghi]perylene-5,12-dion (Diwu et al. 1993). Die Umsetzung von HB mit Butylamin gemäß vorstehendem Verfahren lieferte fünf Produkte. Zwei dieser Verbindungen wurden wie folgt identifiziert:

HBBA-R2 (21%): IR: 3280, 1702 und 1616  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$ : 15,66 (s, < 1H, austauschbar gegen  $\text{D}_2\text{O}$ , phenolisches OH), 14,94 (s, < 1H, austauschbar gegen  $\text{D}_2\text{O}$ , phenolisches OH), 6,41 (s, 1H, ArH), 6,40 (s, 1H, ArH), 4,07 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4,00 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,96 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,93 (d, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,24 (m, 4H,  $2\text{NHCH}_3$ ), 1,98 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 1,26 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) und 1,70–0,85 ppm (m, 14H,  $2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ). MS (FAB): 639 ( $\text{M} + \text{H}$ ). Berechnet für  $\text{C}_{38}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_7$ : 638,2992; gefunden: 638,2998.

HBBA-R1 (11%): IR: 3300, 1702 und 1616  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$ : 15,40 (s, < 1H, austauschbar gegen  $\text{D}_2\text{O}$ , phenolisches OH), 15,18 (s, < 1H, austauschbar gegen  $\text{D}_2\text{O}$ , phenolisches OH), 6,48 (s, 1H, ArH), 6,33 (s, 1H, ArH), 4,01 (s, 6H, 2  $\times$   $\text{OCH}_3$ ), 3,97 (d, 1H, CH), 3,96 (s, 6H, 2  $\times$   $\text{OCH}_3$ ), 3,54 (m, 4H,  $2\text{NHCH}_3$ ), 3,14 (d, 1H, CH), 2,16 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 1,69 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) und 1,60–0,85 ppm (m, 14H,  $2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ). MS (FAB): 639 ( $\text{M} + \text{H}$ ). Berechnet für  $\text{C}_{38}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_7$ : 639,2998; gefunden: 639,2992.

## Beispiel 4

**[0067]** Tumormodell: Sarcoma EMT6-Brusstumorzellen wurden in syngeneische BALG/c-Mäuse implantiert und die aus dem Tumor heraus geschnittenen Tumorzellen in flüssigem Stickstoff gefroren aufbewahrt. Für den Versuch wurden die Zellen aufgetaut und in Waymouth's Medium kultiviert bis sie noch nicht zusammen flossen. Die Flanke der Maus wurde mit einer Suspension mit  $10^5$  Tumorzellen in PBS s. c. geimpft. Die Tumore wurden 8 Tage nach der Impfung behandelt, nachdem das Tumorvolumen eine Größe von  $\sim 70 \text{ mm}^3$  erreicht hatte. Die Mäuse wurden in 2 Gruppen von jeweils 5 Mäusen aufgeteilt.

**[0068]** PDT-Behandlung: Bei diesem Versuch erhielten alle Mäuse (10) eine PDT-Behandlung. Die Oberhaut des Tumors wurde rasiert und eine feste Dosis frisch in Mineralöl resuspendiertes DNHB i. p. verabreicht (50  $\mu\text{M}$  Gesamtkörper, 200  $\mu\text{l}/\text{Maus}$ ). Nach 24 h wurden die Mäuse mit Methophan betäubt und der Tumor mit Licht von 635 nm aus einer optischen Faser eines Biolitec Lasers bestrahlt. Die Stärke der belichteten Stelle (2 cm) betrug 150 mW. Jeder Tumor erhielt eine Dosis von 100 Joules.

**[0069]** BCG-Behandlung: Die BCG-Behandlung erhielt nur eine Gruppe von Mäusen (PDT-BCG-Gruppe). Bacillus Calmette-Guérin (BCG)-Impfstoff (OncoTICE, Organon, Canada Ltd.) wurde als alleinige subtumorale Verabreichung verwendet, indem der subcutane Tumor angehoben wurde und unter die Wunde langsam  $10^7$  cfu in steriler, injizierbarer physiologischer Kochsalzlösung (Volumen 50  $\mu\text{l}$ ) injiziert wurde. Die BCG-Injektion erfolgte unmittelbar nach der PDT-Behandlung.

**[0070]** Auswertung der Tumoransprechung: Das Ansprechen des Tumors auf die Therapie wurde jeden zweiten Tag durch Überwachung der Mäuse in Bezug auf Anzeichen von Tumorwachstum untersucht. Änderungen des Tumorvolumens wurden durch Messung der Beschädigung mit einem Zirkel in allen drei Raumrichtungen bestimmt. Das Tumorvolumen wurde anhand des Ausdrucks

$$V = \pi/6 \times d_1 \times d_2 \times d_3$$

berechnet, worin  $V$  = Volumen ( $\text{mm}^3$ ) und  $d_1$ – $d_3$  die drei orthogonalen Durchmesser (mm) sind.

## Ergebnisse

**[0071]** Im vorliegenden Beispiel wurde bestimmt, ob die Kombination aus Hypocrellin DMHB und BCG die therapeutische Wirkung von DMHB verbessern konnte. Die Dosis des Photosensibilisators wurde mit  $50 \mu\text{M}$  und die Lichtbehandlung auf der Basis früherer *in vivo* Studien mit dem DMHB-Derivat HBEA-R1 [23] gewählt. Die Potenzierung der PDT-Aktivität durch BCG ist kürzlich für andere Photosensibilisatoren [19] beschrieben worden; die gleiche BCG-Behandlung wurde auf unsere Versuchsweise angewendet.

**[0072]** EMT6-Tumor tragende Mäuse wurden wahllos in zwei Gruppen von jeweils 5 Mäusen aufgeteilt. Die erste Gruppe von Mäusen (PDT-Gruppe) erhielt nur DMBH, wohingegen die zweite Gruppe (PDT-BCG) DMHB in Kombination mit BCG erhielt. Die Aktivierung von DMHB durch Lichtbehandlung war in beiden Gruppen identisch. Am Tag bevor die Mäuse dem Licht ausgesetzt wurden (Tag 0; Es konnte keine therapeutische Wirkung beobachtet werden, da weder DMHB aktiviert noch BCG injiziert worden war), wurde beobachtet, dass das mittlere Tumorvolumen der PDT-BCG-Gruppe größer war ( $52,73 \pm 8 \text{ mm}^3$ ) als das der PDT-Gruppe ( $30,37 \pm 4 \text{ mm}^3$ ). Um die Ergebnisse in möglichst genauer Weise auszudrücken, wurden die Ergebnisse lieber als % des Tumorwachstums ausgedrückt, als direkt als Tumorvolumen. Große Tumore wachsen in der Tat viel schneller als kleine, so dass eine günstige therapeutische Wirkung in der PDT-BCG-Gruppe, wenn sie nicht außerordentlich dramatisch ist, leicht durch diesen Effekt überdeckt werden kann. Das prozentuale Tumorwachstum ist andererseits im Hinblick auf die Geschwindigkeit des Tumorwachstums viel repräsentativer, weshalb wir glauben, dass dies ein genauerer Weg ist, um den Unterschied zwischen den zwei Gruppen darzustellen. Das Tumorvolumen wurde berechnet anhand des Ausdrucks:

$$\% \text{ Zunahme} = 100 \times [\text{Tumorvolumen am Tag der Messung} + \text{Tumorvolumen am Tag 0}]$$

**[0073]** Die Wirksamkeit von DMHB allein und in Kombination mit BCG bei der Kontrolle des EMT6-Tumor ist für jede einzelne Maus in **Fig. 3** wiedergegeben. Es wurde eine beträchtliche Verlangsamung des Tumorwachstums beobachtet, wenn PDT in Kombination mit BCG verwendet wurde, verglichen mit PDT allein.

**[0074]** Die nach **Fig. 3** erhaltenen Werte geben die günstige Wirkung der kombinierten PDT-BCG-Behandlung wieder, verglichen mit PDT allein bei Tieren, welche nur teilweise auf die PDT-Behandlung ansprechen. Die in **Fig. 3A** und B angegebenen Ergebnisse zeigen, dass bei Tieren, welche nur teilweise auf die PDT-Behandlung ansprechen, eine Abnahme des Tumorwachstums um ungefähr 50% erhalten wird, wenn PDT in Kombination mit BCG verwendet wird, verglichen mit PDT allein.

**[0075]** Dieses Beispiel zeigt, dass bei dieser ersten Studie einer mit einer BCG kombinierten PDT-Therapie sehr ermutigende Ergebnisse erhalten wurden, welche eine günstige Antitumorwirkung zeigt, verglichen mit der PDT-Therapie.

## Beispiel 5

**[0076]** Hypocrellin B (HB) wurde durch quantitative Dehydrierung von Hypocrellin A (HA) mit Kaliumhydroxid hergestellt, gefolgt von Neutralisation mit HA, Chloroformextraktion und Rekristallisation aus Benzol-Petrolether. 2-Butylamino-2-demethoxy-hypocrellin B (2-BA-2-DMHB) wurde durch Kochen mit n-Butylamin in Pyridin am Rückfluss, Neutralisation und Chloroformextraktion von HB hergestellt. Das Produkt wurde der 1% Zitronensäure-Silicagel Dünnschichtchromatographie (TLC) unterworfen, wozu eine 6:1:1 Mischung von Petrolether/Ethylacetat/Ethanol (95%) als Eluierungsmittel verwendet wurde, wobei drei Verbindungen erhalten wurden. Es waren die gesuchte Verbindung (Durchflussrate ( $R_r$ ) = 0,64) und zwei Nebenprodukte ( $R_r$  = 0,74 bzw. 0,40), welche mit NMR, Massenspektren und Elementaranalyse zufrieden stellend identifiziert wurden. Die gesuchte Verbindung wurde mit TLC weiter gereinigt und das gewünschte Produkt, 2-BA-2-DMHB, in einer Ausbeute von 54% erhalten. Die Reinheit von HB und 2-BA-2-DMHB wurde mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie zu größer als 95% geschätzt.

## Beispiel 6

Perylenchinoidpigmente (Hypocrelline) und ihre photosensibilisierenden und sonosensibilisierenden Eigenschaften

Verbindung	Photosensibilisierendes Potenzial*	Sonosensibilisierendes Potenzial*
DMHBa Demethyliertes HB	3,0 $\mu$ M	1,0 mM
DMHBb 2-Butylamino-2-demethoxy-Hypocrellin B	0,1 $\mu$ M	0,1 mM
HA Hypocrellin A	4,0 $\mu$ M	ohne
HBAC-R1 Cystamin-HB Isomer 1	1,0 $\mu$ M	ohne
HBAC-R2 Cystamin-HB Isomer 1	5,0 $\mu$ M	ohne
HBAM-R1 2-Morpholino-ethylaminiertes HB	4,0 $\mu$ M	ohne
HBDD-R1 2-(N,N-Dimethylamino)-propylamin-Hypocrellin B		1,0 mM
HBEA-R1 Ethanolamin-Hypocrellin B Isomer 1	0,15 $\mu$ M	1,0 mM
HBEA-R2 Ethanolamin-Hypocrellin B Isomer 2	7.50 $\mu$ M	ohne
HBED-R2 Ethylendiamin-Hypocrellin B	4,0 $\mu$ M	ohne
HBMA-IV Methylamin-Hypocrellin B	1,0 $\mu$ M	ohne

\*Molare Konzentration, welche LD<sub>50</sub> in EMT6 murine mastocytoma in vitro bei einer gegebenen #Dosis Licht oder Ultraschall bewirkt.

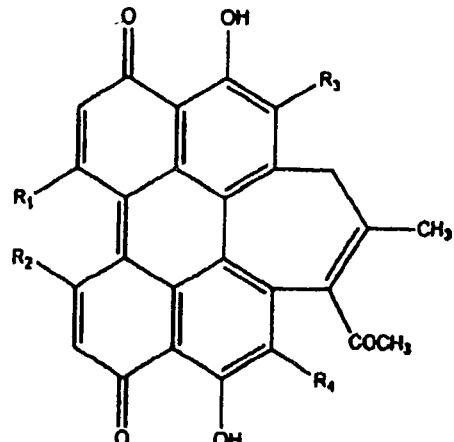
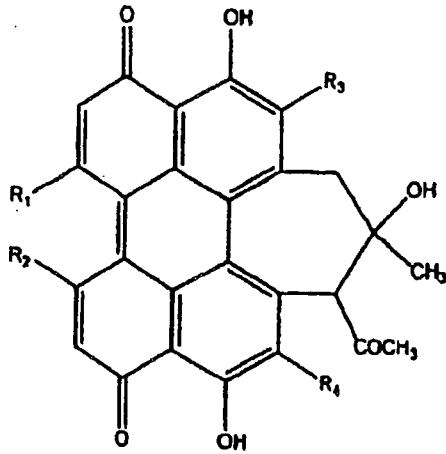
1. Hunt DW, Chan AH (2000) Expert Opinion on Investigational Drugs 9: 807
2. Korbelik M (1996) Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery 14: 329
3. Korbelik M, Dougherty GJ (1999) Cancer Research 59: 1941
4. Abdel-Hady ES, Martin-Hirsch P, Duggan-Keen M, Stern PL, Moore JV, Corbitt G, Kitchener HC, Hampson IN (2001) Cancer Research 61: 192
5. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Peng Q (1998) Journal of the National Cancer Institute 90: 889
6. Korbelik M, Krosl G, Krosl J, Dougherty GJ (1996) Cancer Research 56: 5647
7. Ochsner M (1997) Journal of Photochemistry & Photobiology. B – Biology 39: 1
8. de Vree WJ, Essers MC, Koster JF, Sluiter W (1997) Cancer Research 57: 2555
9. Gollnick SO, Liu X, Owczarczak B, Musser DA, Henderson BW (1997) Cancer Research 57: 3904
10. Krosl G, Korbelik M, Dougherty GJ (1995) British Journal of Cancer 71: 549
11. Korbelik M, Krosl G (1994) Photochemistry & Photobiology 60: 497
12. Hendrzak-Henion JA, Knisely TL, Cincotta L, Cincotta E, Cincotta AH (1999) Photochemistry & Photobiology 69: 575
13. de Vree WJ, Essers MC, de Brujin HS, Star WM, Koster JF, Sluiter W (1996) Cancer Research 56: 2908
14. Korbelik M, Cecic I (1999) Cancer Letters 137: 91
15. Korbelik M, Sun J (2001) International Journal of Cancer 93: 269
16. Bellnier DA (1991) Journal of Photochemistry & Photobiology. B – Biology 8: 203
17. Krosl G, Korbelik M, Krosl J, Dougherty GJ (1996) Cancer Research 56: 3281
18. Cho YH, Straight RC, Smith JA (1992) Journal of Urology 147: 743
19. Korbelik M, Sun J, Posakony JJ (2001) Photochemistry & Photobiology 73: 403
20. Korbelik M, Cecic I (1998) Journal of Photochemistry & Photobiology. B – Biology 44: 151
21. Myers RC, Lau BH, Kunihira DY, Torrey RR, Woolley JL, Tosk J (1989) Urology 33: 230
22. Estey EP, Brown K, Diwu Z, Liu J, Lown JW, Miller GG, Moore RB, Tulip J, McPhee MS (1996) Cancer Chemotherapy & Pharmacology 37: 343
23. Miller GG, Brown K, Ballangrud AM, Barajas O, Xiao Z, Tulip J, Lown JW, Leithoff JM, Allalunis-Turner MJ, Mehta RD, Moore RB (1997) Photochemistry & Photobiology 65: 714

**[0077]** Obwohl die Erfindung anhand von Illustrationen und Beispielen in einem Detail beschrieben worden ist, ist die Erfindung selbstverständlich verschiedenen Änderungen und alternativen Formen zugänglich und ist nicht auf die angegebenen spezifischen Ausführungsformen beschränkt. Es versteht sich, dass diese spezifischen Ausführungsformen die Erfindung nicht einschränken sollen, sondern im Gegenteil alle Modifikatio-

nen, Analoga und Alternativen, welche unter den Geist und Rahmen der Erfindung fallen, abdecken sollen.

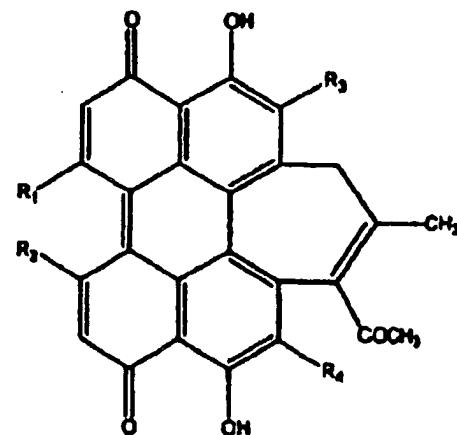
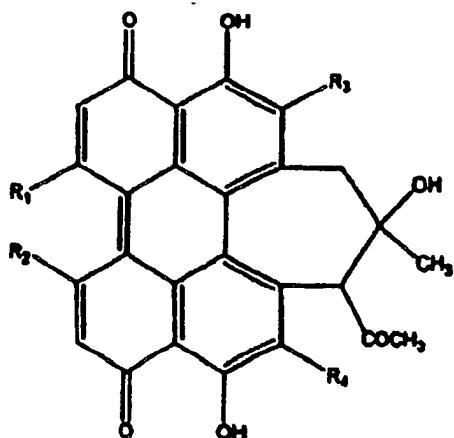
### Patentansprüche

1. Verwendung eines aminosubstituierten Hypocrellins für die Herstellung eines Medikaments zur Modulation der Aktivität eines immuntherapeutischen Mittels, wobei das aminosubstituierte Hypocrellin ein Sonosen-sibilisator und/oder ein Photosensibilisator ist und wobei das aminosubstituierte Hypocrellin, wenn es aktiviert wird, das Potential eines immuntherapeutischen Mittels modulieren kann.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das aminosubstituierte Hypocrellin unter Verwendung von Schall mit einer vorbestimmten Frequenz aktiviert werden kann.
3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das am aminosubstituierte Hypocrellin unter Verwendung von Licht mit einer vorbestimmten Wellenlänge aktiviert werden kann.
4. Verwendung nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei ein immuntherapeutisches Mittel aus der Gruppe ausge-wählt ist, bestehend aus einem Antikörper, einem Antigen, einem Zytokin oder einem Immunadjuvans.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das amminosubstituierte Hypocrellin bei hohen Konzentrationen in seinem nicht-aktivierten Zustand nicht toxisch ist und bei niedrigen Konzentrationen in sei- nem aktivierten Zustand toxisch ist.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das aminosubstituierte Hypocrellin aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus butylaminierter Hypocrellin B, 2-(N,N-Dimethylamino)-propylamin-hypocrel-lin B, ethanolaminierter Hypocrellin B und 1,12-Bis-[2-(acethoxy)-propyl]-2,4,6,7,9,11-hexamethoxy-3,10-pe-rylendion.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das aminosubstituierte Hypocrellin aus den Ver- bindungen mit den folgenden Formeln ausgewählt ist:



wobei R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> OCH<sub>3</sub> oder NHCH<sub>2</sub>Ar (Ar ist eine Phenyl- oder Pyridylgruppe), NHCH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> (wobei -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> eine alizyklische Gruppe ist und n = 3, 4, 5, 6 ist) sind.

8. Verwendung nach Anspruch 7, wobei R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> OCH<sub>3</sub> sind und R<sub>4</sub> NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub> ist.
9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das aminosubstituierte Hypocrellin aus den Ver- bindungen der folgenden Formeln ausgewählt ist:



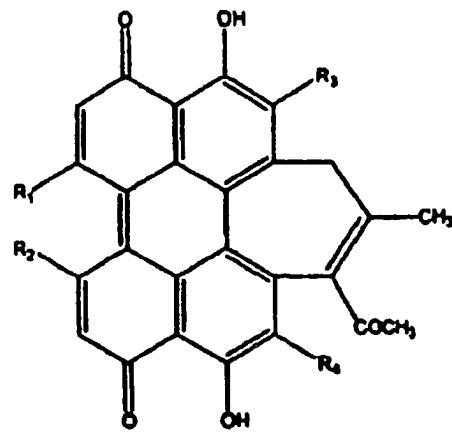
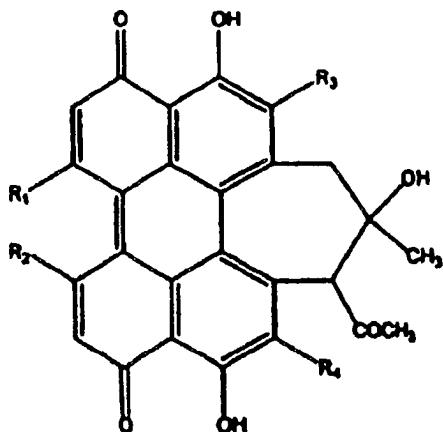
wobei  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$   $OCH_3$  oder  $NHCH_2(CH_2)_nAr$  sind, wobei Ar ein Phenyl-, ein Naphthyl-, ein polzyklischer aromatischer Rest oder eine heterozyklische Rest ist und  $n$  0–12 ist.

10. Verwendung einer Zusammensetzung, welche ein aminosubstituiertes Hypocrellin und ein immuntherapeutisches Mittel umfasst, für die Herstellung eines Medikaments zur Modulation der Aktivität eines immuntherapeutischen Mittels gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9.

11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Zustandes, ausgewählt unter Hautzuständen, Krebs, Viruserkrankungen, retroviroalen Erkrankungen, bakteriellen Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Pilzerkrankungen.

12. Produkt, welches folgendes umfasst:

(a) ein aminosubstituiertes Hypocrellin, wobei das aminosubstituierte Hypocrellin ein Sonosensibilisator und/oder ein Photosensibilisator ist und, wenn es aktiviert wird, das Potential eines immuntherapeutischen Mittels modulieren kann und das aminosubstituierte Hypocrellin aus den Verbindungen der folgenden Formeln ausgewählt ist:



wobei

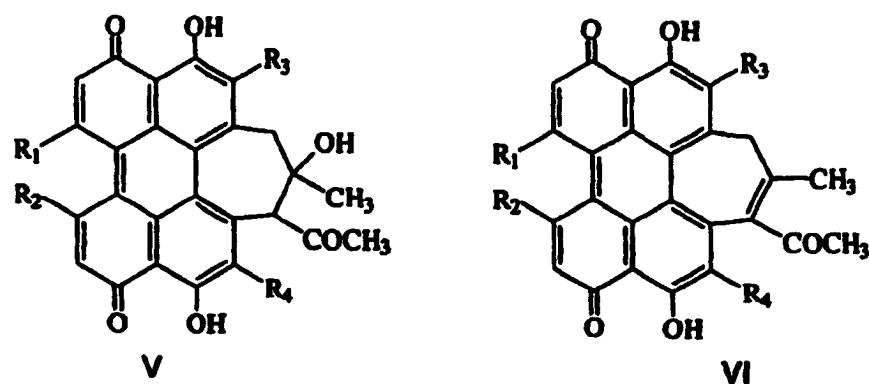
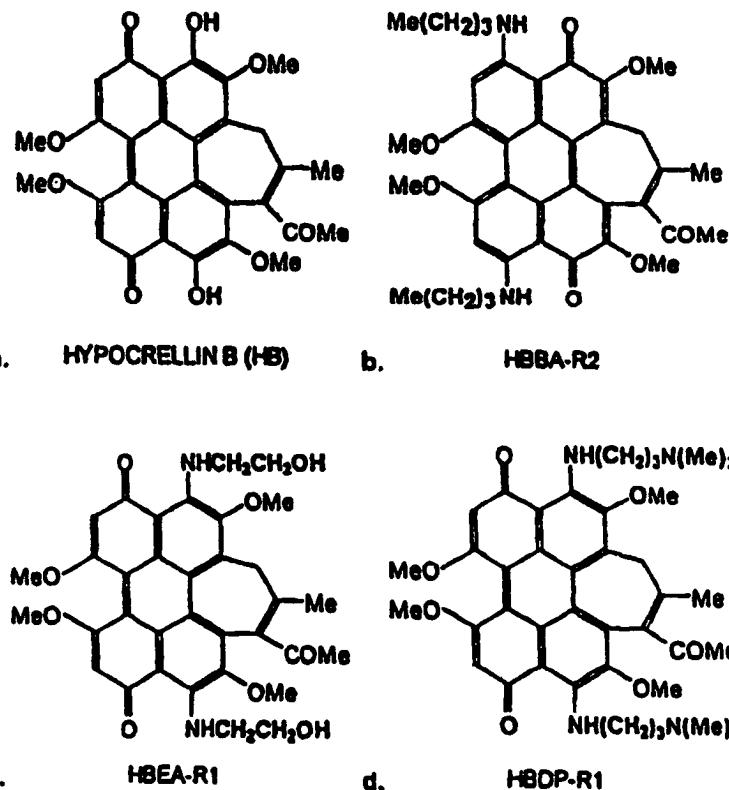
(i)  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$   $OCH_3$  oder  $NHCH_2Ar$  (Ar ist eine Phenyl- oder Pyridylgruppe),  $NHCH(CH_2)_n$  (wobei  $-CHCH_2)_n$  eine alzyklische Gruppe ist und  $n$  = 3, 4, 5, 6 ist) sind oder

(ii)  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$   $OCH_3$  oder  $NHCH_2(CH_2)_nAr$  sind, wobei Ar ein Phenyl-, ein Naphthyl-, ein polzyklischer aromatischer oder eine heterozyklischer Rest sind und  $n$  0–12 ist.

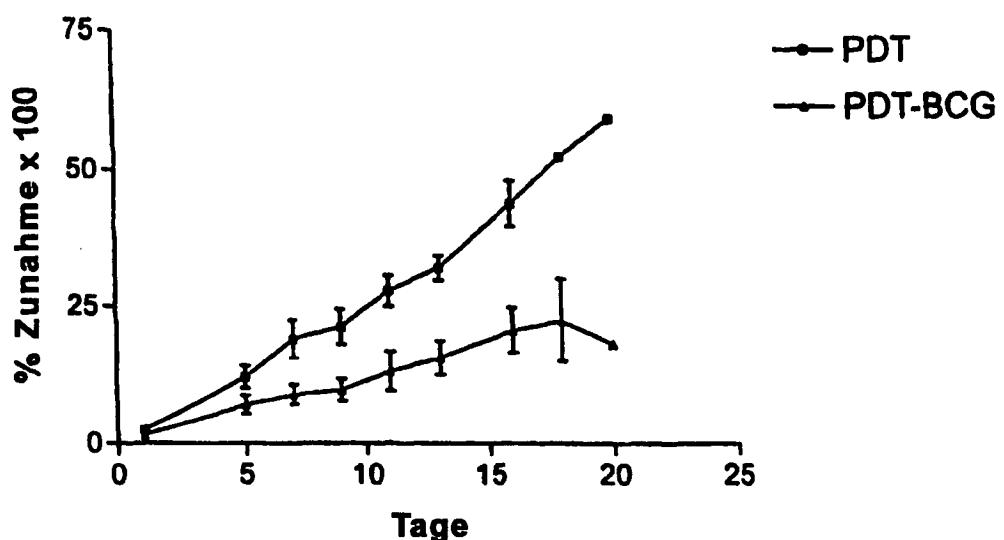
(b) ein immuntherapeutisches Mittel

für die gleichzeitige oder aufeinanderfolgende Verwendung zum Modulieren der Aktivität eines immuntherapeutischen Mittels oder zur Behandlung eines Zustandes, ausgewählt unter Hautzuständen, Krebs, Viruserkrankungen, retroviroalen Erkrankungen, bakteriellen Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Pilzerkrankungen.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

**Figur 1****Figur 2**

**Fig. 3A**



**Fig. 3B**

