



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 31 793 T2** 2007.08.23

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 242 438 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 31 793.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/33276**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 993 714.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/049698**

(86) PCT-Anmeldetag: **19.12.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **12.07.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **25.09.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **08.11.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.08.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C07H 15/252** (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

173497 P 29.12.1999 US

(73) Patentinhaber:

Immunogen Inc., Cambridge, Mass., US

(74) Vertreter:

**PAe Reinhard, Skuhra, Weise & Partner GbR,
80801 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**CHARI, V., Ravi, Newton, MA 02461, US;
BLATTLER, A., Walter, Brookline, MA 02446, US**

(54) Bezeichnung: **DOXORUBICIN- UND DAUNORUBICIN-ENTHALTENDE, ZYTOTOXISCHE MITTEL UND DEREN THERAPEUTISCHE ANWENDUNG**

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**FACHGEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft neue zytotoxische Mittel und ihre therapeutische Anwendung. Genauer gesagt betrifft die Erfindung neue zytotoxische Mittel, die modifizierte Doxorubicine/Daunorubicine umfassen, und ihre therapeutische Anwendung. Diese neuen zytotoxischen Mittel besitzen als Ergebnis der gezielten Abgabe der modifizierten Doxorubicine/Daunorubicine an eine spezifische Zellpopulation durch chemische Bindung des Doxorubicin/Daunorubicin an ein zellbindendes Mittel therapeutische Anwendung.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Es sind viele Berichte über das versuchte spezifische Targeting von Tumorzellen mit monoklonalen Antikörper-Arzneimittel-Konjugaten erschienen (Sela et al., in *Immunoconjugates* 189–216 (C. Vogel, Ausgabe 1987); Ghose et al., in *Targeted Drugs* 1–22 (E. Goldberg, Ausgabe 1983); Diener et al., in *Antibody mediated delivery systems* 1–23 (J. Rodwell, Ausgabe 1988); Pietersz et al., in *Antibody mediated delivery systems* 25–53 (J. Rodwell, Ausgabe 1988); Bumol et al., in *Antibody mediated delivery systems* 55–79 (J. Rodwell, Ausgabe 1988). Zytotoxische Arzneimittel, wie beispielsweise Methotrexat, Daunorubicin, Doxorubicin, Vincristin, Vinblastin, Melphalan, Mitomycin C und Chlorambucil, wurden mit einer Vielzahl muriner monoklonaler Antikörper konjugiert. In einigen Fällen wurden die Arzneimittelmoleküle über ein intermediäres Trägermolekül, wie beispielsweise Serumalbumin (Garnett et al., 46 *Cancer Res.* 2407–2412 (1986); Ohkawa et al., 23 *Cancer Immunol. Immunother.* 81–86 (1986); Endo et al., 47 *Cancer Res.* 1076–1080 (1980)), Dextran (Hurwitz et al., 2 *Appl. Biochem.* 25–35 (1980); Manabi et al., 34 *Biochem. Pharmacol.* 289–291 (1985); Dillmann et al., 46 *Cancer Res.* 4886–4891 (1986); Shoval et al., 85 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 8276–8280 (1988)); oder Polyglutaminsäure (Tsukada et al., 73 *J. Natl. Canc. Inst.* 721–729 (1984); Kato et al., 27 *J. Med. Chem.* 1602–1607 (1984); Tsukada et al., 52 *Br. J. Cancer* 111–116 (1985)), mit den Antikörpermolekülen verknüpft.

[0003] Eine Reihe von Verknüpfungstechniken wurde zur Herstellung solcher Immunkonjugate verwendet, und es wurden sowohl spaltbare als auch nicht spaltbare Linker untersucht. In den meisten Fällen konnte das volle zytotoxische Potential der Arzneimittel jedoch nur festgestellt werden, wenn die Arzneimittelmoleküle von den Konjugaten in unmodifizierter Form an der Zielstelle freigesetzt werden konnten.

[0004] Einer der abspaltbaren Linker, der zur Herstellung von Antikörper-Arzneimittel-Konjugaten verwendet wurde, ist ein säurelabiler Linker auf der Basis von cis-Aconitinsäure, der die saure Umgebung verschiedener intrazellulärer Kompartimente, wie beispielsweise die Endosomen, die während der Rezeptor-vermittelten Endozytose angetroffen wird, und die Lysosomen, ausnutzt. Shen und Ryser führten dieses Verfahren zur Herstellung von Konjugaten von Daunorubicin mit makromolekularen Trägern ein (102 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1048–1054 (1981)). Yang und Reisfeld wendeten das gleiche Verfahren an, um Daunorubicin mit einem Antimelanom-Antikörper zu konjugieren (80 *J. Natl. Canc. Inst.* 1154–1159 (1988)). Dillmann et al. setzten ebenfalls einen säurelabilen Linker in gleicher Weise ein, um Konjugate von Daunorubicin mit einem Anti-T-Zellen-Antikörper herzustellen (48 *Cancer Res.* 6097–6102 (1988)).

[0005] Ein von Trouet et al. untersuchter alternativer Ansatz, umfasst die Bindung von Daunorubicin an einen Antikörper über einen Peptid-Spacerarm (79 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 626–629 (1982)). Dies wurde mit der Maßgabe durchgeführt, dass freies Arzneimittel aus einem solchen Konjugat durch die Wirkung lysosomaler Peptidasen freigesetzt werden könnte.

[0006] In vitro Zytotoxizitätstests haben jedoch gezeigt, dass Antikörper-Arzneimittel-Konjugate selten das gleiche zytotoxische Potential erreichten wie die freien unkonjugierten Arzneimittel. Dies legte nahe, dass die Mechanismen, durch die Arzneimittelmoleküle aus den Antikörpern freigesetzt werden, sehr ineffizient sind. Auf dem Gebiet der Immunotoxine waren über Disulfid-Brücken zwischen monoklonalen Antikörpern und katalytisch aktiven Proteintoxinen gebildete Konjugate nachweislich stärker zytotoxisch als Konjugate, die andere Linker enthalten. (Siehe Lambert et al., 260 *J. Biol. Chem.* 12035–12041 (1985); Lambert et al., in *Immunotoxins* 175–209 (A. Frankel, Ausgabe 1988); Ghetie et al., 48 *Cancer Res.* 2610–2617 (1988)). Dies wurde der hohen intrazellulären Konzentration an Glutathion zugeschrieben, die zu der wirksamen Spaltung der Disulfid-Bindung zwischen einem Antikörpermolekül und einem Toxin beiträgt. Trotzdem existieren für die Anwendung von Disulfid-Brücken zur Herstellung von Konjugaten zwischen Arzneimitteln und Makromolekülen nur einige bekannte Beispiele. Shen et al. (260 *J. Biol. Chem.* 10905–10908 (1985)) beschrieben die Umwandlung von Methotrexat in ein Mercaptoethylamid-Derivat und die anschließende Konjugation mit Poly-D-Lysin über eine Disulfid-Bindung. Ein anderer Bericht beschrieb die Herstellung eines Konjugats des Trisulfid-enthalten-

den toxischen Arzneimittels Calicheamicin mit einem Antikörper (Hinman et al., 53 Cancer Res. 3336–3342 (1993)).

[0007] Ein Grund für den Mangel an Disulfid-gebundenen Antikörper-Arzneimittel-Konjugaten ist die Nichtverfügbarkeit zytotoxischer Arzneimittel, die einen Schwefelatom-enthaltenden Rest aufweisen, der leicht eingesetzt werden kann, um das Arzneimittel über eine Disulfid-Brücke an einen Antikörper zu binden. Ferner ist eine chemische Modifizierung bereits existierender Arzneimittel schwierig, ohne ihr zytotoxisches Potential zu mindern.

[0008] Ein weiterer großer Nachteil der existierenden Antikörper-Arzneimittel-Konjugate ist ihr Unvermögen, aufgrund der begrenzten Anzahl zielgerichteter Antigene und der relativ gemäßigten Zytotoxizität kanzerostatischer Arzneimittel, wie Methotrexat, Daunorubicin, Doxorubicin und Vincristin eine ausreichende Arzneimittel-Konzentration an die Zielstelle abzugeben. Um eine wesentliche Zytotoxizität zu erzielen, wird eine Bindung einer großen Anzahl von Arzneimittelmolekülen entweder direkt an den Antikörper oder durch ein polymeres Trägermolekül notwendig. Solche stark modifizierten Antikörper zeigen jedoch häufig eine beeinträchtigte Bindung an das Ziel-Antigen und eine schnelle Clearance in vivo aus dem Blutstrom.

[0009] Trotz der vorstehend beschriebenen Schwierigkeiten, wurden geeignete zytotoxische Mittel, die zellbindende Reste umfassen, und die Gruppe zytotoxischer Arzneimittel, die als Maytansinoide bekannt ist, beschrieben (USP 5,208,020; USP 5,416,064; und R. V. J. Chari, 31 Advanced Drug Delivery Reviews 89–104 (1998)). Ebenso wurden geeignete zytotoxische Mittel, die zellbindende Reste umfassen, und Analoga und Derivate des äußerst wirksamen Antitumor-Antibiotikums CC-1065 beschrieben (USP 5,475,092 und USP 5,585,499).

[0010] Doxorubicin (Adriamycin) und Daunorubicin (Daunomycin) sind zytotoxische Naturstoffe, die bei der Behandlung von Krebs breit eingesetzt werden. Diese Verbindungen gehören der Familie von Verbindungen an, die Anthracycline genannt werden. Anthracycline sind mit DNS wechselwirkende Mittel, die sich in die DNS einlagern und in ihre Templاتفunktion eingreifen, was Zelltod verursacht.

[0011] US-A-4672 057 offenbart Anthracyclinglykoside, die Doxorubicin- und Daunorubicin-Analoga einschließen, die sich durch die Gegenwart einer ketonischen Methan- oder Methanolgruppe unterscheiden, welche durch eine Morpholinogruppe gekennzeichnet sind, die durch die Substituenten Wasserstoff oder Methyl auf der einen Seite und Methoxy auf der anderen Seite alpha zu dem Morpholino-O substituiert ist. Diese Verbindungen sind als zytotoxische Mittel offenbart, geeignet zum Abtöten ausgewählter Zellpopulationen und vielleicht dargereicht in Form eines Arzneimittels.

[0012] EP-A-0434960 offenbart ebenfalls Anthracyclinglykoside in Form von Doxorubicinen, die eine ketonische Methanolgruppe umfassen. In diesem Fall schließen die Verbindungen die Morpholinogruppierung ein, und diese ist mit einer Ethoxygruppe, OC₁-C₆-Alkyl, alpha zum Morpholino-O monosubstituiert. Die Verbindungen sind als geeignete Antitumor-Mittel offenbart, nützlich bei der Abtötung ausgewählter Zellpopulationen und vielleicht dargereicht in Form eines Arzneimittels.

[0013] Obwohl Doxorubicin und Daunorubicin bei der Behandlung von Krebs geeignete Mittel sind, ist ihre Antitumoraktivität aufgrund ihrer unspezifischen Toxizität gegenüber normalen Zellen begrenzt.

[0014] Ferner sind Verbindungen, wie Doxorubicin und Daunorubicin, selbst nicht wirksam genug, um in Konjugaten zellbindender Mittel eingesetzt zu werden. Verschiedene Versuche, diese Verbindungen an Antikörper zu binden, ergibt Konjugate mit geringem Potential und geringer Ziel-Selektivität (R. S. Greenfield et al., 50 Cancer Res. 6600–6607 (1990); R. S. Greenfield et al., 50 Cancer Res. 6608–6614 (1990); R. V. J. Chari, 31 Advanced Drug Delivery Revs. 89–104 (1998)). Somit erwiesen sich diese Konjugate in klinischen Versuchen am Menschen als unwirksam (A. W. Tolcher et al., 17 J. Clin. Oncol. 478–484 (1999)). Einige Morpholinoanaloga mit größerem Potential als entweder Daunorubicin oder Doxorubicin wurden beschrieben (E. M. Acton et al., 27 J. Med. Chem. 638–645 (1984); E. M. Acton et al., 29 J. Med. Chem., 1225–1230 (1985); E. M. Acton et al., 29 J. Med. Chem. 2074–2079 (1986); U.S.-Patentschriften: 4,464,529, 4,672,075, 5,304,687 ([Fig. 1](#)); und kürzlich wurde ein Pyrrolinodoxorubicin ((5) in [Fig. 1](#)) beschrieben (A. Nagy et al., 93 Proc. Natl. Acad. Sci., 2464–2469 (1996); U.S.-Patentschrift 5,843,903). Diesen Verbindungen fehlt jedoch eine Funktionalität, die über eine spaltbare Bindung eine Verknüpfung mit einem zellbindenden Mittel erlaubt. Auch ein Versuch, Morpholinodoxorubicin über einen säurelabilen Linker an einen Antikörper zu binden, führte zu einem instabilen Konjugat, das inaktiv war (B. M. Mueller et al., 1 BioConjugate Chem. 325–330 (1990)).

[0015] Demnach wird dringend ein Verfahren zur Behandlung von Krankheiten mit Doxorubicinen/Daunorubicinen benötigt, wobei ihre Nebenwirkungen ohne Beeinträchtigung ihrer Zytotoxizität verringert sind.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0016] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, modifizierte Doxorubicine/Daunorubicine bereitzustellen, die hoch toxisch sind und die bei der Behandlung vieler Krankheiten immer noch wirksam verwendet werden können.

[0017] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, neue modifizierte Doxorubicine/Daunorubicine bereitzustellen.

[0018] Diese und weitere Aufgaben wurden durch die Bereitstellung eines zytotoxischen Mittels, das ein oder mehrere an ein zellbindendes Mittel gebundene modifizierte Doxorubicine oder Daunorubicine umfasst, erfüllt.

[0019] Bei einer zweiten Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung eine therapeutische Zusammensetzung bereit, umfassend:

- (A) eine therapeutisch wirksame Menge eines oder mehrerer modifizierter Doxorubicine oder Daunorubicine, gebunden an ein zellbindendes Mittel, und
- (B) einen pharmazeutisch verträglichen Träger.

[0020] Bei einer dritten Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Abtöten ausgewählter Zellpopulationen bereit, umfassend das in Kontakt bringen von Targetzellen oder Targetzellen enthaltendem Gewebe mit einer wirksamen Menge eines zytotoxischen Mittels, umfassend ein oder mehrere modifizierte Doxorubicine oder Daunorubicine, die an ein zellbindendes Mittel gebunden sind.

[0021] Bei einer vierten Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung modifizierte Doxorubicine oder Daunorubicine bereit, umfassend eine Linkergruppe, die die modifizierten Doxorubicine oder Daunorubicine an einen chemischen Rest binden kann.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0022] [Fig. 1](#) zeigt die Struktur verschiedener wirksamer Doxorubicin- und Daunorubicin-Analoga (E. M. Acton et al. (1984, 1985 und 1986), supra).

[0023] [Fig. 2](#) ist eine chemische Formel, die die Strukturen einiger der Disulfid-enthaltenden erfindungsgemäßigen Doxorubicine/Daunorubicine darstellt. Die Substituenten R_1 , R_2 und Z besitzen die hier angegebene Bedeutung.

[0024] [Fig. 3](#) zeigt die Synthese von Methyldithiomorpholinodoxorubicin aus Ribitol und Doxorubicin.

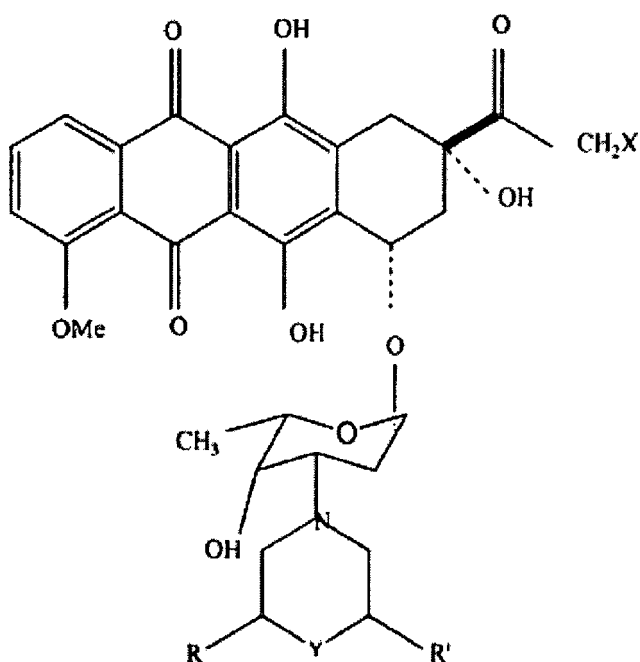
AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0025] Die Erfindung beruht auf der Synthese neuer modifizierter Doxorubicine/Daunorubicine, die verstärkte Zytotoxizität zeigen und die wirksam an zellbindende Mittel gebunden werden können. Die Technik offenbart, dass es äußerst schwierig ist, existierende Arzneimittel zu modifizieren, ohne ihr zytotoxisches Potential zu verringern. Es ist jedoch bereits gezeigt worden, dass hoch zytotoxische Arzneimittel auf eine Weise modifiziert werden können, die zu neuen Arzneimitteln führt, die ein gleichwertiges oder größeres Potential als das Ausgangsarzneimittel aufweisen. Zusätzlich können diese stark zytotoxischen Arzneimittel unter Verwendung einer spaltbaren Bindung, wie beispielsweise einer Disulfid-Bindung, die die Freisetzung von voll aktivem Arzneimittel in der Zelle sicherstellen, an zellbindende Mittel gebunden werden. Solche Konjugate sind auf Antigen-spezifische Weise zytotoxisch (R. V. J. Chari et al., 52 Cancer Res. 127–131 (1992); USP 5,475,092; und USP 5,416,064). Die offenbarte Erfindung wendet diese Technologie auf Doxorubicine und Daunorubicine an, die mit chemischen Resten modifiziert sind, und insbesondere auf solche, die Thiol- oder Disulfid-Gruppen enthalten, an die geeignete zellbindende Mittel gebunden werden können. Als Ergebnis bewahren die offenbarten neuen modifizierten Doxorubicine/Daunorubicine das zytotoxische Potential bekannter Doxorubicine und Daunorubicine und könnten es in einigen Fällen sogar verstärken. Durch die Komplexe aus zellbindendem Mittel-Doxorubicin/Daunorubicin lässt sich das volle Ausmaß der zytotoxischen Wirkung der Doxorubicine/Daunorubicine gezielt nur gegen ungewünschte Zellen anwenden, weshalb Nebenwirkungen aufgrund von Schäden an gesunden Nicht-Target-Zellen vermieden werden. Die Erfindung ermöglicht es, dass die Doxorubici-

ne/Daunorubicine gezielt und dennoch wirksam sind. Somit stellt die Erfindung geeignete Mittel zur Beseitigung kranker oder abnormer Zellen bereit, die abgetötet oder lysiert werden sollen, wie beispielsweise Tumorzellen (insbesondere solide Tumorzellen), Virus-infizierte Zellen, Mikroorganismus-infizierte Zellen, Parasiten-infizierte Zellen, Autoimmunzellen (Zellen, die Autoantikörper herstellen), aktivierte Zellen (diejenigen, die in Transplantatabstoßung oder Transplantat-gegen-Empfänger-Reaktion beteiligt sind), oder jede andere Art von kranken oder abnormen Zellen, während sie ein Minimum an Nebenwirkungen aufweisen.

[0026] Das erfindungsgemäße zytotoxische Mittel umfasst eine oder mehrere modifizierte Doxorubicine/Daunorubicine, die über eine Linkergruppe an ein zellbindendes Mittel gebunden sind. Die Linkergruppe ist Teil eines chemischen Rests, der durch herkömmliche Verfahren kovalent mit einem modifizierten Doxorubicin/Daunorubicin verknüpft ist. Während das Arzneimittel über spaltbare Bindungen, wie beispielsweise säurelabile, esterase-labile und peptidase-labile Bindungen, an zellbindende Mittel gebunden sein kann, besteht die bevorzugte Art der Verknüpfung in Disulfid-Bindungen.

[0027] Die erfindungsgemäß geeigneten modifizierten Doxorubicine/Daunorubicine weisen die nachstehend gezeigte Formel (I) auf:



(I)

wobei

X H oder OH ist;

Y O oder NR_2 ist, wobei R_2 ein lineares oder verzweigtes Alkyl mit 1–5 Kohlenstoffatomen ist;

R eine Linkergruppe, H, oder ein lineares oder verzweigtes Alkyl mit 1–5 Kohlenstoffatomen ist; und

R' eine Linkergruppe, H, oder $-\text{OR}_1$ ist, wobei R_1 ein lineares oder verzweigtes Alkyl mit 1–5 Kohlenstoffatomen ist;

unter der Voraussetzung, dass R und R' nicht gleichzeitig Linkergruppen sind.

[0028] Beispiele für das lineare oder verzweigte Alkyl mit 1–5 Kohlenstoffatomen, die durch R, R_1 und R_2 dargestellt sind, umfassen Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, Isobutyl, sek.-Butyl, tert.-Butyl und Pentyl in jeder seiner acht isomeren Anordnungen.

[0029] R_1 und R_2 sind bevorzugt Methyl.

[0030] Geeignete Linkergruppen sind aus der Technik gut bekannt und umfassen Disulfid-Gruppen, Thioether-Gruppen, säurelabile Gruppen, fotolabile Gruppen, peptidase-labile Gruppen und esterase-labile Gruppen. Bevorzugt sind Thioether-Gruppen und Disulfid-Gruppen. Die bevorzugten Positionen zur Einführung einer Thiol- oder Disulfid-Gruppe sind an R und R' .

[0031] Wenn die Linkergruppe eine Thiol- oder Disulfid-enthaltende Gruppe ist, kann die die Thiol- oder Disulfid-Gruppe tragende Seitenkette linear oder verzweigt, aromatisch oder heterozyklisch sein. Ein Fachmann kann geeignete Seitenketten leicht benennen. Spezielle Beispiele der Thiol- oder Disulfid-enthaltenden Substituenten umfassen $-(CH_2)_nSZ$, $-O(CH_2)_nSZ$, $-(CH_2)_nCH(CH_3)SZ$, $-O(CH_2)_nCH(CH_3)SZ$, $-(CH_2)_nC(CH_3)_2SZ$, oder $-O(CH_2)_nC(CH_3)_2SZ$, wobei

Z ist H oder SR_3 , wobei R_3 ein lineares, verzweigtes oder zyklisches Alkyl mit 1–10 Kohlenstoffatomen ist, oder ein einfaches oder substituiertes Aryl mit 1–10 Kohlenstoffatomen oder ein Heterozyklus mit 1–10 Kohlenstoffatomen, und

n ist eine ganze Zahl von 1–10.

[0032] Beispiele für lineare Alkyle umfassen Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl, Pentyl und Hexyl.

[0033] Beispiele für verzweigte Alkyle umfassen Isopropyl, Isobutyl, sek.-Butyl, tert.-Butyl, Isopentyl und 1-Ethyl-Propyl.

[0034] Beispiele für zyklische Alkyle umfassen Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclopentyl und Cyclohexyl.

[0035] Beispiele für einfache Aryle umfassen Phenyl und Naphthyl.

[0036] Beispiele für substituierte Aryle umfassen Aryle, wie beispielsweise die vorstehend beschriebenen, substituiert mit Alkylgruppen, mit Halogenen, wie beispielsweise Cl, Br, F, Nitrogruppen, Aminogruppen, Sulfonsäuregruppen, Carbonsäuregruppen, Hydroxygruppen und Alkoxygruppen.

[0037] Beispiele für Heterozyklen sind Verbindungen, wobei die Heteroatome aus O, N und S ausgewählt sind und Pyrrolyl, Pyridyl, Furyl und Thiophen umfassen.

[0038] Die erfindungsgemäßen modifizierten Doxorubicine/Daunorubicine, die einen Thiol- oder Disulfid-enthaltenden Substituenten aufweisen, sind an sich neu. Beispiele für einige bevorzugte Thiol- oder Disulfid-enthaltende erfindungsgemäße Doxorubicine und Daunorubicine sind in [Fig. 2](#) gezeigt.

[0039] Die modifizierten Doxorubicine/Daunorubicine können gemäß bekannten Verfahren synthetisiert werden. Das Ausgangsmaterial für die Synthese ist das im Handel erhältliche Doxorubicin oder Daunorubicin. Zuerst wird eine geeignete Disulfid-enthaltende Anhydroribitolverbindung synthetisiert. Ein Beispiel wird in [Fig. 3](#) bereitgestellt. Anschließend wird das Ribitol mit Natriumperiodat oxidiert, wie vorstehend von E. M. Acton et al., supra, beschrieben. Die Umsetzung des so erhaltenen Dialdehyds mit Doxorubicin und die anschließende Reduktion mit Natriumcyanoborohydrid liefern das Disulfid-enthaltende Morpholinodoxorubicin ([Fig. 3](#)). Der Disulfid- oder Thiol-enthaltende Substituent kann als Ethersubstituent an R' durch Umwandlung des Alkohols an R' in einen Ether durch standardmäßige chemische Verfahren eingeführt werden. Die primäre Hydroxylgruppe eines entsprechend geschützten Anhydroribitols (wie beispielsweise Schutz des Diols durch eine Isopropylidengruppe) wird beispielsweise mit einem Überschuss einer Dihalogenverbindung, wie beispielsweise 1,3-Dibrombutan, umgesetzt, um einen Halogenether zu erhalten. Die Verdrängung des Halogens mit einem Thiol durch Umsetzung mit Kaliumthioacetat und anschließende Behandlung mit einer milden Base oder Hydroxylamin liefern das Thiol-enthaltende Ribitol. Die Thiolgruppe kann durch Umsetzung mit Methylmethanthiolsulfonat bzw. Dithiodipyridin in ein Methyl- oder Pyridyldisulfid umgewandelt werden. Dieses Verfahren ist in USP 5,416,064 beschrieben, das hier ausdrücklich mit eingeschlossen ist: „Die Synthese von Maytansinoid-Derivaten kann durch Bezugnahme auf die [Fig. 1](#), [Fig. 2](#), [Fig. 3](#), 4(A) und 4(B) beschrieben werden, wobei Disulfid-enthaltende Maytansinoidester hergestellt werden, indem Maytansinol 1b mit frisch hergestellten N-Methyl-L-Alanin- oder N-Methyl-L-Cystein-Derivaten, die eine Disulfid-Gruppe enthalten, kondensiert wird.“

[0040] .omega.-Mercaptocarbonsäuren unterschiedlicher Kettenlängen werden in ihre entsprechenden Methylthio-, beispielsweise 3a bis 3d (wobei n = 1–10 ist, umfassend verzweigte und zyklische Aliphate) oder Aryldithio- (beispielsweise 4a bis 4b)-Derivate umgewandelt, indem sie mit Methylmethanthiolsulfonaten oder Aryldisulfiden, wie beispielsweise Diphenyldisulfid, und Ring-substituierten Diphenyldisulfiden und heterozyklischen Disulfiden, wie beispielsweise 2,2'-Dithiopyridin, umgesetzt werden. Die Carbonsäuren werden aktiviert und sodann mit N-Methyl-L-Alanin umgesetzt, um die gewünschten Carbonsäureverbindungen, beispielsweise 5a bis 5f für die Kondensation mit Maytansinol 1b zu bilden.

[0041] Die Veresterung von Maytansinol 1b oder eines Analogons mit den Carbonsäuren 5a bis 5f liefert die Disulfid-enthaltenden Maytansinoide 6a bis 6f. Spaltung der Disulfid-Gruppe in 6a bis 6f mit Dithiothreitol liefert die Thiol-enthaltenden Maytansinoide 7a bis 7c, die leicht über Disulfid- oder Thioether-Bindungen an zellbin-

dende Mittel gebunden werden."

[0042] Entfernung der Isopropyliden-Schutzgruppe mit Säure und anschließende Periodatoxidation und Umsetzung des so erhaltenen Dialdehyds mit Doxorubicin oder Daunorubicin liefern das gewünschte Disulfid-enthaltende Morpholinodoxorubicin oder -daunorubicin. Wenn entweder R oder R' keine Linkergruppe ist, kann der Substituent in dieser Position verändert werden, bis eine Verbindung der gewünschten Toxizität erhalten wird. Hohe Toxizität ist dadurch definiert, dass sie eine IC_{50} gegen gezüchtete Krebszellen zwischen 1×10^{-12} und 1×10^{-9} M bei einer Expositionsdauer von 72 Stunden aufweist. Repräsentative Beispiele für Substituenten sind H, Alkyl und O-Alkyl, wie vorstehend beschrieben. Ein Fachmann kann den geeigneten chemischen Rest für R und R' unter Verwendung ausschließlich von routinemäßigen Experimenten bestimmen.

[0043] Beispielsweise wird erwartet, dass Methyl- und Methoxysubstituenten das zytotoxische Potential erhöhen, während von einem Wasserstoffatom nicht erwartet wird, dass es das Potential im Vergleich zu dem Ausgangsdoxorubicin oder -daunorubicin erhöht. Typischerweise werden zunächst einige repräsentative modifizierte Doxorubicine oder Daunorubicine mit Substituenten an den verschiedenen Positionen hergestellt und bezüglich der Zytotoxizität in vitro evaluiert.

[0044] Erfindungsgemäße Disulfid-enthaltende und Thiol-enthaltende Doxorubicin/Daunorubicin-Arzneimittel können bezüglich ihrer Fähigkeit, die Vermehrung verschiedener unerwünschter Zelllinien in vitro zu unterdrücken, evaluiert werden. Zum Beispiel können Zelllinien, wie beispielsweise die menschliche Plattenepithelkarzinom-Zelllinie KB, die menschliche Mammakarzinom-Zelllinie SKBR3 und die Burkitt-Lymphom-Zelllinie Namalwa, leicht zur Evaluierung der Zytotoxizität dieser Verbindungen angewandt werden. Die zu evaluierenden Zellen können den Verbindungen 72 Stunden ausgesetzt und die überlebenden Fraktionen der Zellen in direkten Assays durch bekannte Verfahren gemessen werden. Die IC_{50} -Werte können dann aus den Ergebnissen der Assays berechnet werden.

[0045] Die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Verbindungen als therapeutische Mittel hängt von der sorgfältigen Auswahl eines geeigneten zellbindenden Mittels ab. Zellbindende Mittel umfassen Peptide und Nicht-Peptide. Im Allgemeinen können diese Antikörper (insbesondere monoklonale Antikörper), Lymphokine, Hormone, Wachstumsfaktoren, Vitamine, Nährstoff-Transportmoleküle (wie beispielsweise Transferrin) oder jede(s) andere zellbindende Molekül oder Substanz sein.

[0046] Speziellere Beispiele für zellbindende Mittel, die verwendet werden können, umfassen:

- Fragmente von Antikörpern, wie beispielsweise sFv, Fab, Fab' und F(ab'), (Parham, 131 J. Immunol. 2895–2902 (1983); Spring et al., 113 J. Immunol. 470–478 (1974); Nisonoff et al., 89 Arch. Biochem. Biophys. 230–244 (1960));
- Interferone (beispielsweise α , β , γ);
- Lymphokine, wie beispielsweise IL-2, IL-3, IL-4, IL-6;
- Hormone, wie beispielsweise Insulin, TRH (Thyreotropin-Releasing-Hormone), MSH (Melanotropin), Steroidhormone, wie beispielsweise Androgene und Östrogene;
- Vitamine, wie beispielsweise Folsäure
- Wachstumsfaktoren und koloniestimulierende Faktoren, wie beispielsweise EGF, TGF- α , G-CSF, M-CSF und GM-CSF (Burgess, 5 Immunology Today 155–158 (1984)); und
- Transferrin (O'Keefe et al., 260 J. Biol. Chem. 932–937 (1985)).

[0047] Durch monoklonale Antikörperv Verfahren lassen sich äußerst spezifische zellbindende Mittel in Form spezifischer monoklonaler Antikörper herstellen. Besonders gut aus der Technik bekannt sind Verfahren zur Erzeugung monoklonaler Antikörper, produziert durch Immunisierung von Mäusen, Ratten, Hamstern oder jedem anderen Säugetier mit dem Antigen von Interesse, wie beispielsweise die intakte Targetzelle, aus der Targetzelle isolierte Antigene, das ganze Virus, abgeschwächtes ganzes Virus und virale Proteine, wie beispielsweise virale Mantelproteine. Sensibilisierte menschliche Zellen können ebenfalls verwendet werden. Ein anderes Verfahren zur Erzeugung monoklonaler Antikörper ist die Verwendung von Phagenbibliotheken von sFv (single chain variable Region), speziell menschliches sFv. (Siehe beispielsweise Griffiths et al., USP 5,885,793; McCafferty et al., WO 92/01047; Liming et al., WO 99/06587).

[0048] Die Selektion des geeigneten zellbindenden Mittels ist eine Frage der Wahl, die von der bestimmten Zellpopulation abhängt, auf die gezielt werden soll, jedoch sind im Allgemeinen monoklonale Antikörper bevorzugt, wenn ein geeigneter Antikörper verfügbar ist.

[0049] Der monoklonale Antikörper J5 ist beispielsweise ein muriner IgG_{2a}-Antikörper, der für das Gewöhnli-

che Akute Lymphoblastische Leukämie Antigen (Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen, CALLA) spezifisch ist (Ritz et al., 283 Nature 583–585 (1980)) und kann eingesetzt werden, wenn die Targetzellen CALLA exprimieren, wie beispielsweise bei der Krankheit Akute Lymphoblastische Leukämie. Ebenso ist der monoklonale Antikörper anti-B4 ein muriner IgG₁, der an das CD19 Antigen auf B-Zellen bindet (Nadler et al., 131 J. Immunol. 244–250 (1983)) und kann eingesetzt werden, wenn die Targetzellen B-Zellen oder kranke Zellen sind, die dieses Antigen exprimieren, wie beispielsweise beim Non-Hodgkin-Lymphom oder bei chronischer lymphoblastischer Leukämie.

[0050] Zusätzlich kann GM-CSF, welches an myeloide Zellen bindet, als ein zellbindendes Mittel an kranken Zellen von akuter myelogener Leukämie eingesetzt werden. IL-2, welches an aktivierte T-Zellen bindet, kann zur Vorbeugung einer Transplantatabstoßung, zur Therapie und Vorbeugung der Transplantat-gegen-Empfänger-Reaktion und zur Behandlung akuter T-Zellen-Leukämie eingesetzt werden. MSH, das an Melanozyten bindet, kann zur Behandlung von Melanomen eingesetzt werden. Folsäure, die auf den an Eierstock- und anderen Krebsen exprimierten Folatrezeptor gerichtet ist, ist ebenfalls ein geeignetes zellbindendes Mittel.

[0051] Auf Krebse der Brust und Hoden kann erfolgreich mit Östrogen (oder Östrogen-Analoga) bzw. Androgen (oder Androgen-Analoga) als zellbindenden Mitteln gezielt werden.

[0052] Konjugate der erfindungsgemäßen modifizierten Doxorubicine/Daunorubicine und eines zellbindenden Mittels können unter Verwendung jeder der derzeit bekannten oder später entwickelten Verfahren hergestellt werden. Zahlreiche Verfahren zur Konjugation werden in USP 5,416,064 gelehrt. Morpholinoether können synthetisiert werden, um eine freie Aminogruppe zu erhalten, und dann an einen Antikörper oder an ein anderes zellbindendes Mittel über einen säurelabilen Linker oder einen fotolabilen Linker gebunden werden. Morpholino (Doxorubicin/Daunorubicin), das eine freie Aminogruppe enthält, kann mit einem Peptid kondensiert und anschließend an ein zellbindendes Mittel gebunden werden, um einen peptidase-labilen Linker herzustellen. Morpholino (Doxorubicin/Daunorubicin), das eine freie Hydroxylgruppe enthält, kann aus Doxorubicin/Daunorubicin und Ribitol synthetisiert und dann succinyliert und an ein zellbindendes Mittel gebunden werden, um ein Konjugat herzustellen, das durch intrazelluläre Esterasen gespalten werden kann, um freies Arzneimittel freizusetzen. Besonders bevorzugt werden die Doxorubicin/Daunorubicinether behandelt, um eine freie oder geschützte Thiolgruppe zu erzeugen, und dann werden die Disulfid- oder Thiol-enthaltenden Doxorubicine/Daunorubicine über Disulfid-Bindungen an das zellbindende Mittel gebunden.

[0053] Erfindungsgemäße repräsentative Konjugate sind Antikörper-modifiziertes Doxorubicin/Daunorubicin, Antikörperfragment-modifiziertes Doxorubicin/Daunorubicin, epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)-modifiziertes Doxorubicin/Daunorubicin, Melanozyten-stimulierendes Hormon (MSH)-modifiziertes Doxorubicin/Daunorubicin, Thyroid-stimulierendes Hormon (TSH)-modifiziertes Doxorubicin/Daunorubicin, Östrogen-modifiziertes Doxorubicin/Daunorubicin, Östrogen-Analagon-modifiziertes Doxorubicin/Daunorubicin, Androgen-modifiziertes Doxorubicin/Daunorubicin, Androgen-Analagon-modifiziertes Doxorubicin/Daunorubicin und Folat-modifiziertes Doxorubicin/Daunorubicin.

[0054] Modifizierte Doxorubicin/Daunorubicin-Konjugate von Antikörpern, Antikörperfragmenten, Protein- oder Peptidhormonen, Protein- oder Peptidwachstumsfaktoren und anderen Proteinen werden auf die gleiche Weise durch bekannte Verfahren hergestellt. Peptide und Antikörper können zum Beispiel mit Vernetzungsreagenzien, wie beispielsweise N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat, N-Succinimidyl-4-(2-pyridyldithio)pentanoat (SPP), 4-Succinimidylloxycarbonyl- α -methyl- α -(2-pyridyldithio)-toluol (SMPT), N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)butyrat (SDPB), 2-Iminoethanol oder S-Acetylsuccinimid, durch bekannte Verfahren modifiziert werden. Siehe Carlsson et al., 173, Biochem. J. 723–737 (1978); Blattler et al., 24 Biochem. 1517–1524 (1985); Lambert et al., 22 Biochem. 3913–3920 (1983); Klotz et al., 96 Arch. Biochem. Biophys. 605 (1962); und Liu et al., 18 Biochem. 690 (1979), Blakey und Thorpe, 1 Antibody, Immunoconjugates & Radiopharmaceuticals, 1–16 (1988), Worrell et al., 1 Anti-Cancer Drug Design 179–184 (1986). Das so abgeleitete freie oder geschützte Thiol-enthaltende zellbindende Mittel wird dann mit einem Disulfid- oder Thiol-enthaltenden Doxorubicin/Daunorubicin umgesetzt, um Konjugate herzustellen. Die Konjugate können durch HPLC oder durch Gelfiltration gereinigt werden.

[0055] Ebenso können beispielsweise Östrogen- und Androgen-zellbindende Mittel, wie beispielsweise Estradiol und Androstendiol, an der C-17 Hydroxygruppe mit einer geeigneten Disulfid-enthaltenden Carbonsäure unter Verwendung beispielsweise von Dicyclohexylcarbodiimid als Kondensationsmittel verestert werden. Beispiele solcher Carbonsäuren, die eingesetzt werden können, sind 3-(2-Pyridyldithio)propansäure, 3-Methyldithiopropansäure, 4-(2-Pyridyldithio)pentansäure und 3-Phenyldithiopropansäure. Die Veresterung der C-17-Hydroxygruppe kann auch durch Umsetzung mit einem Carbonsäurechlorid, das eine entsprechend ge-

geschützte Thiol-Gruppe enthält, wie beispielsweise 3-S-Acetylpropanoylchlorid, erreicht werden. Auch andere Verfahren, wie in der Literatur beschrieben (Haslam, 36 Tetrahedron 2409–2433 (1980)), können zur Veresterung angewandt werden. Das geschützte oder freie Thiol-enthaltende Androgen oder Östrogen kann dann mit einem Disulfid- oder Thiol-enthaltenden Doxorubicin/Daunorubicin umgesetzt werden, um Konjugate herzustellen. Die Konjugate können durch Säulenchromatographie auf Kieselgel oder durch HPLC gereinigt werden. Folsäure kann mit einem geeigneten Hydrazid, wie beispielsweise 4-(2-Pyridyldithio)pentansäurehydrazid, in Gegenwart eines Kondensationsmittels, wie beispielsweise Dicyclohexylcarbodiimid, kondensiert werden, um ein Hydrazon zu erhalten, das ein aktives Disulfid enthält. Das Disulfid-enthaltende Folat kann dann mit einem Thiol-enthaltenden Doxorubicin/Daunorubicin umgesetzt werden, um ein Konjugat herzustellen, das durch Säulenchromatographie auf Kieselgel oder durch HPLC gereinigt werden kann.

[0056] Vorzugsweise sind die monoklonalen Antikörper- oder zellbindenden Mittel-Doxorubicin/Daunorubicin-Konjugate diejenigen, die über eine Disulfid-Bindung, wie vorstehend diskutiert, gebunden sind, und in der Lage sind, Doxorubicin/Daunorubicinmoleküle abzugeben. Solche zellbindenden Konjugate werden durch bekannte Verfahren hergestellt, wie beispielsweise mittels Modifizierung monoklonaler Antikörper mit Succinimidylpyridyldithiopropionat (SPDP) (Carlsson et al., 173 Biochem. J. 723–737 (1978)). Die resultierende Thiopyridyl-Gruppe wird dann durch Behandlung mit Thiol-enthaltenden Doxorubicinen/Daunorubicinen verdrängt, um Disulfid-gebundene Konjugate herzustellen. Alternativ wird im Falle der Aryldithiodoxorubine/-daunorubine die Bildung des zellbindenden Konjugats durch direkte Verdrängung des Arylthiols des Doxorubicins/Daunorubins mit zuvor in Antikörpermoleküle eingeführten Sulfhydrylgruppen durchgeführt. Konjugate, die 1 bis 10 Doxorubicin/Daunorubicin-Arzneimittel, gebunden über eine Disulfid-Brücke, enthalten, werden leicht durch beide Verfahren hergestellt.

[0057] Genauer gesagt, wird eine Lösung des Dithiopyridyl-modifizierten Antikörpers mit einer Konzentration von 1 mg/ml in einem 0,1 M Kaliumphosphatpuffer bei pH 6,5, enthaltend 1 mM EDTA, mit dem Thiol-enthaltenden Doxorubicin/Daunorubicin (1,25 Moläquivalent/Dithiopyridylgruppe) behandelt. Die Freisetzung von Thiopyridin aus dem modifizierten Antikörper wird spektralphotometrisch bei 343 nm überwacht und ist nach ca. 20 Stunden abgeschlossen. Das Antikörper-modifizierte Doxorubicin/Daunorubicin-Konjugat wird gereinigt und von nicht umgesetztem Arzneimittel und anderem niedermolekularem Material durch Gelfiltration über eine Sephadex G-25- oder eine Sephacryl S300-Säule befreit. Die Anzahl modifizierter Doxorubicin/Daunorubicin-Reste, die pro Antikörpermolekül gebunden sind, kann durch Messung des Verhältnisses der Absorption bei 280 nm und 490 nm bestimmt werden. Durch dieses Verfahren können durchschnittlich 1–10 modifizierte Doxorubicin/Daunorubicinmoleküle/Antikörpermolekül über Disulfid-Bindungen gebunden werden.

[0058] Antikörper-modifizierte Doxorubicin/Daunorubicin-Konjugate mit nicht spaltbaren Bindungen können ebenfalls hergestellt werden. Der Antikörper kann mit Vernetzungsreagenzien, wie beispielsweise Succinimidyl-4-(maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (SMCC), Sulfo-SMCC, m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester (MBS), Sulfo-MBS oder Succinimidylodoacetat, wie in der Literatur beschrieben, modifiziert werden, um 1–10 reaktive Gruppen einzuführen. Siehe Yoshitake et al., 101 Eur. J. Biochem. 395–399 (1979); Hashida et al., J. Applied Biochem. 56–63 (1984); und Liu et al., 18 Biochem. 690–697 (1979). Sodann wird der modifizierte Antikörper mit dem Thiol-enthaltenden Doxorubicin/Daunorubicin-Derivat umgesetzt, um ein Konjugat herzustellen. Das Konjugat kann durch Gelfiltration über eine Sephadex G-25-Säule gereinigt werden.

[0059] Die modifizierten Antikörper werden mit den Thiol-enthaltenden Doxorubicinen/Daunorubicinen (1,25 Moläquivalent/Maleimidogruppe) behandelt. Die Gemische werden über Nacht bei ca. 4°C inkubiert. Die Antikörper-modifizierten Doxorubicin/Daunorubicin-Konjugate werden durch Gelfiltration über eine Sephadex G-25-Säule gereinigt. Im Allgemeinen werden durchschnittlich 1 bis 10 modifizierte Doxorubicin/Daunorubicinmoleküle pro Antikörper gebunden.

[0060] Ein bevorzugtes Verfahren besteht darin, Antikörper mit Succinimidyl-4-(maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat (SMCC) zu modifizieren, um Maleimidogruppen einzuführen, und in der anschließenden Umsetzung des modifizierten Antikörpers mit den Thiol-enthaltenden Doxorubicinen/Daunorubicinen, um ein Thioether-gebundenes Konjugat zu erhalten.

[0061] Wiederum ergeben sich Konjugate mit 1 bis 10 Arzneimittelmolekülen pro Antikörpermolekül.

[0062] Die Zytotoxizität der modifizierten Doxorubicine/Daunorubine und ihrer Antikörperkonjugate gegenüber nicht-adhärenenten Zelllinien, wie beispielsweise Namalwa und HL-60, kann durch Rück-Extrapolation aus Zellproliferationskurven, wie beschrieben bei Goldmacher et al., 135 J. Immunol. 3648–3651 (1985), gemes-

sen werden. Die Zytotoxizität dieser Verbindungen gegenüber adhären Zellen, wie beispielsweise SKBR3 und KB, kann durch klonogene Assays, wie beschrieben bei Goldmacher et al., 102 J. Cell Biol. 1312–1319 (1986), bestimmt werden.

[0063] Die vorliegende Erfindung stellt auch eine therapeutische Zusammensetzung bereit, umfassend:
(A) eine wirksame Menge eines oder mehrerer modifizierter Doxorubicine/Daunorubicine, wie vorstehend definiert, die an ein zellbindendes Mittel gebunden sind, und
(B) einen pharmazeutisch verträglichen Träger.

[0064] Das zytotoxische Mittel wird hergestellt wie vorstehend beschrieben.

[0065] Die Konjugate können bezüglich des Potentials in vitro und der Spezifität durch zuvor beschriebene Verfahren evaluiert werden – siehe R. V. J. Chari et al., 55 Cancer Res. 4079–4084 (1995). Die Antitumoraktivität kann in menschlichen Tumor-Xenograft-Modellen in Mäusen durch zuvor beschriebenen Verfahren evaluiert werden (siehe C. Liu et al., 93 Proc. Natl. Acad. Sci. 8618–8623 (1996)).

[0066] Geeignete pharmazeutisch verträgliche Träger sind wohl bekannt und können von den Fachleuten je nach klinischer Situation bestimmt werden. Wie hier verwendet, umfassen Träger Verdünnungsmittel und Exzipienten.

[0067] Beispiele für geeignete Träger, Verdünnungsmittel und/oder Exzipienten umfassen: (1) Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH-Wert ca. 7,4, enthaltend ca. 1 mg/ml bis 25 mg/ml humanes Serumalbumin oder nicht, (2) 0,9% Kochsalzlösung (0,9% Gew./Vol. NaCl), und (3) 5% (Gew./Vol.) Dextrose; und kann auch ein Antioxidanz, wie beispielsweise Tryptamin, und ein Stabilisierungsmittel, wie beispielsweise Tween 20, enthalten.

[0068] Beispiele für medizinische Zustände, die unter Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindung oder Zusammensetzung behandelt werden können, umfassen maligne Tumore jeder Art, umfassend zum Beispiel Krebs der Lunge, der Brust, des Darms, der Prostata, der Niere, des Pankreas, der Eierstöcke, und lymphatischer Organe; Autoimmunkrankheiten, wie beispielsweise systemischer Lupus, rheumatoide Arthritis und Multiple Sklerose; Transplantatabstoßungen, wie beispielsweise Nierentransplantatabstoßung, Lebertransplantatabstoßung, Lungentransplantatabstoßung, Herztransplantatabstoßung, und Knochenmarkstransplantatabstoßung; Transplantat-gegen-Empfänger-Reaktion; Virusinfektionen, wie beispielsweise mV-Infektion, HIV-Infektion, AIDS, etc.; und Parasiteninfektionen, wie beispielsweise Giardiasis, Amöbiasis, Schistosomiasis, und andere wie von einem Fachmann bestimmt.

BEISPIELE

[0069] Die Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf nicht einschränkende Beispiele veranschaulicht. Wenn nicht anders angegeben, sind alle Prozentangaben, Verhältnisse, Teile, etc. Masseanteile.

BEISPIEL 1

SYNTHESE VON DISULFID-ENTHALTENDEM MORPHOLINODOXORUBICIN

[0070] Die Synthese eines repräsentativen Disulfid-enthaltenden Morpholinodoxorubicins ist schematisch in [Fig. 3](#) gezeigt. Ribitol (7), das im Handel erhältlich ist, wird durch säurekatalysierte Dehydratisierung in das Anhydroribitol 8 umgewandelt. Schutz des Diols in 8 durch Umwandlung in das Isopropyliden 9 und anschließende Umsetzung der freien Hydroxylgruppe mit Methansulfonylchlorid lieferten das Mesylat 10. Umsetzung von 10 mit Kaliumthioacetat lieferte 11. Hydrolyse des Thioesters mit einer Base und anschließender Disulfid-Austausch des Thiols in 12 mit Methyldisulfid lieferten die Methyldithioverbindung 13. Die Isopropyliden-Schutzgruppe wurde dann durch saure Hydrolyse entfernt, um 5-Methyldithio-(1,4-anhydro)ribitol (14) zu erhalten. Periodat-Oxidation des Diols lieferte das Dialdehyd 15, welches in situ mit Doxorubicin in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid behandelt wurde, um Methyldithiomorpholinodoxorubicin 16 zu erhalten.

BEISPIEL 2

IN VITRO ZYTOTOXIZITÄTS-ASSAYS

[0071] Die erfindungsgemäßen Sulfid-, Disulfid-, und Sulfhydryl-enthaltenden Doxorubicin/Daunorubicin-Arz-

neimittel können bezüglich ihrer Fähigkeit, die Vermehrung verschiedener menschlicher Tumor-Zelllinien in vitro zu unterdrücken, evaluiert werden. Zwei adhärenzte Zelllinien, KB (menschliches Plattenepithelkarzinom) und SKBR3 (menschliches Mammakarzinom), und die nicht-adhärenzte Zelllinie Namalwa (Burkitt-Lymphom) werden zur Evaluierung der Zytotoxizität dieser Verbindungen verwendet. Die Zellen werden den Verbindungen 72 Stunden lang ausgesetzt, und die überlebenden Fraktionen der Zellen werden in direkten Assays gemessen. (KB und SKBR3 werden auf Plattenkultur-Wirksamkeit getestet (Goldmacher et al., 102 J. Cell. Biol. 1312–1319 (1986), und Namalwa wird durch Wachstums-Rück-Extrapolation getestet (Goldmacher et al., 135 J. Immunol. 3648–3651 (1985)). Dann werden aus diesen Messwerten die IC_{50} -Werte berechnet.

BEISPIEL 3

KONJUGATION AN ANTIKÖRPER

[0072] Konjugation Thiol-enthaltender Doxorubicine/Daunorubicine an Antikörper über Disulfid-Bindungen: Die Konjugation Thiol-enthaltender Doxorubicine/Daunorubicine an Antikörper über Disulfid-Bindungen wird in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt werden Dithiopyridylgruppen unter Verwendung von Succinimidylpyridyldithioproponat (SPDP) in Antikörper eingeführt, wie von Carlsson et al. beschrieben. Die Thiopyridylgruppen werden dann durch Umsetzung mit dem Thiol-enthaltenden Doxorubicin/Daunorubicin verdrängt, um ein Konjugat herzustellen.

[0073] Herstellung von Antikörper-SS-Doxorubicin/Daunorubicin-Konjugaten. Die Antikörper anti-B4, anti-T9 und N901 werden mit SPDP oder SPP modifiziert, wie in der Literatur beschrieben. Zwischen 1 und 10 Dithiopyridylgruppen werden durchschnittlich pro Antikörpermolekül eingeführt.

[0074] Eine Lösung des Dithiopyridyl-modifizierten Antikörpers mit einer Konzentration von 1 mg/ml in einem 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH-Wert 6,5, der 1 mM EDTA enthält, wird bei 25°C mit einem Thiol-enthaltenden Doxorubicin/Daunorubicin (1,25 Moläquivalent/Dithiopyridylgruppe) behandelt. Die Freisetzung von Thiopyridin aus dem modifizierten Antikörper wird spektralphotometrisch bei 343 nm überwacht und wird nach ca. 20 Stunden als abgeschlossen festgestellt. Das Antikörper-modifizierte Doxorubicin/Daunorubicin-Konjugat wird gereinigt und durch Gelfiltration über eine Sephadex G-25-Säule von nicht umgesetztem Arzneimittel und anderem niedermolekularem Material befreit. Die Anzahl an modifizierten, pro Antikörpermolekül gebundenen Doxorubicin/Daunorubicinmolekülen wird durch Messung des Verhältnisses der Absorptionen bei 280 nm und 490 nm bestimmt. Durchschnittlich können durch dieses Verfahren 1–10 modifizierte Doxorubicin/Daunorubicinmoleküle pro Antikörpermolekül über Disulfid-Bindungen gebunden werden.

[0075] Konjugation von Thiol-enthaltendem modifiziertem Doxorubicin/Daunorubicin an Antikörper über eine nicht spaltbare Thioether-Bindung: Die Konjugation eines Thiol-enthaltenden Doxorubicins/Daunorubicins wird in zwei Schritten durchgeführt. Der Antikörper wird zuerst mit Succinimidylmaleimidomethylcyclohexancarboxylat (SMCC) umgesetzt, um Maleimidogruppen einzuführen. Der modifizierte Antikörper wird dann mit dem Thiol-enthaltenden Doxorubicin/Daunorubicin umgesetzt, wobei Thioether-Bindungen gebildet werden.

[0076] Herstellung von Antikörper-modifizierten Doxorubicin/Daunorubicin-Konjugaten (nicht spaltbar). Die Antikörper anti-B4, anti-T9, und N901 werden mit SMCC modifiziert, wie in der Literatur beschrieben.

[0077] Die modifizierten Antikörper werden mit Thiol-enthaltendem Doxorubicin/Daunorubicin behandelt (1,25 Moläquivalent/Maleimidogruppe). Die Gemische werden über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Antikörper-modifizierten Doxorubicin/Daunorubicin-Konjugate werden gereinigt, wie vorstehend beschrieben. Durchschnittlich werden typischerweise 1–10 modifizierte Doxorubicin/Daunorubicinmoleküle pro Antikörpermolekül gebunden.

BEISPIEL 4

ANDERE VERFAHREN ZUR BINDUNG VON DOXORUBICINEN/DAUNORUBICINEN

Säurelabile Linker

[0078] Morpholinodoxorubicine/-daunorubicine, die einen Aminosubstituenten enthalten, können durch in der chemischen Literatur beschriebene Standardverfahren synthetisiert werden. Diese Aminogruppe-enthaltenden Doxorubicine/Daunorubicine können über einen säurelabilen Linker an Antikörper und andere zellbindende Mittel gebunden werden, wie zuvor beschrieben (Blättler et al., 24 Biochemistry, 1517–1524 (1985),

U.S.-Patentschriften Nrn. 4,542,225, 4,569,789 und 4,764,368).

Fotolabiler Linker

[0079] Das vorstehend beschriebene Aminogruppe-enhaltende Doxorubicin/Daunorubicin-Derivat kann, wie zuvor beschrieben, über einen fotolabilen Linker an zellbindende Mittel gebunden werden. (Senter et al., 42 Photochemistry and Photobiology, 231–237 (1985), U.S.-Patentschrift 4,625,014).

Peptidase-labiler Linker

[0080] Das vorstehend beschriebene Aminogruppe-enhaltende Doxorubicin/Daunorubicin kann auch über Peptid-Spacerarm-Linker an zellbindende Mittel gebunden werden. Es wurde bereits gezeigt, dass kurze Peptid-Spacerarme zwischen Arzneimitteln und makromolekularen Protein-Trägern in Serum stabil sind, jedoch durch intrazelluläre lysosomale Peptidasen schnell hydrolysiert werden (Trouet et al., 79 Proc. Nat'l. Acad. Sci., 626–629 (1982)). Das Aminogruppe-enhaltende Doxorubicin/Daunorubicin kann unter Verwendung von Kondensationsmitteln, wie beispielsweise 1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimid-HCl, mit Peptiden, wie beispielsweise Ala-Leu, Leu-Ala-Leu und Ala-Leu-Ala-Leu, kondensiert werden, um ein Peptid-Derivat von Doxorubicin/Daunorubicin zu erhalten, das dann an zellbindende Mittel gebunden werden kann.

Esterase-labiler Linker

[0081] Morpholinodoxorubicine/-daunorubicine können durch Umsetzung der Hydroxylgruppe mit Succinanhidrid verestert und dann an ein zellbindendes Mittel gebunden werden, um ein Konjugat herzustellen, welches durch intrazelluläre Esterasen gespalten werden kann, um freies Arzneimittel freizusetzen. (Beispiele siehe: Aboud-Pirak et al., 38 Biochem. Pharmacol. 641–648 (1989), Laguzza et al., 32 J. Med. Chem. 549–555 (1989)).

BEISPIEL 5

ZELLKULTUREN UND IN VITRO ZYTOTOXIZITÄTS-ASSAYS

[0082] Zellen der menschlichen promyelozytischen Leukämie-Zelllinie HL-60 (ATCC CCL 240) und der Burkitt-Lymphom Zelllinie Namalwa (ATCC CRL 1432) werden als Suspensionskulturen in einem RPMI-1640-Medium, angereichert mit 10% fetalem Kälberserum und 2 mM L-Glutamin, gezüchtet. Alle anderen nachstehend beschriebenen Zelllinien werden als adhärenzte Kulturen gezüchtet. Die menschliche Plattenepithelkarzinom-Zelllinie KB (ATCC CCL 17), die menschliche Nierenkarzinom-Zelllinie A498 (ATCC HTB 44), die menschlichen Darmadenokarzinom-Zelllinien SW620 (ATCC CCL 227) und HT-29 (ATCC HTB 38) werden in einem RPMI-1640-Medium, angereichert mit 10% fetalem Kälberserum und 2 mM L-Glutamin, gezüchtet. Menschliche Mammakarzinom-SKBR3-Zellen (ATCC HTB 30) werden in DMEM, angereichert mit 15% fetalem Kälberserum, enthaltend 2 mM Glutamin, gezüchtet, und die menschliche Eierstockadenokarzinom-Zelllinie OVCAR3 (ATCC HTB 161) wird in RPMI-1640 Medium, angereichert mit 10% fetalem Kälberserum, enthaltend 10 µg/ml Insulin und 2 mM L-Glutamin, gezüchtet.

[0083] Zur Konjugation an Thiol-enhaltende Doxorubicine/Daunorubicine über Disulfid-Bindungen werden drei verschiedene Antikörper verwendet. Die Konjugate werden mit den Antikörpern anti-B4, welcher gegen das B-Zellen-Antigen CD19 gerichtet ist; anti-T9 (5E9), welcher ein Anti-Human-Transferrin-Rezeptor-Antikörper ist, und N901, welcher ein kleinzelliger Anti-Human-Lungenkrebs-Antikörper ist, hergestellt.

[0084] Die Zytotoxizitäts-Assays werden in den entsprechenden vorstehend beschriebenen Medien durchgeführt. Die Zytotoxizität der modifizierten Doxorubicine/Daunorubicine und ihrer Antikörperkonjugate mit HL-60- und Namalwa-Zellen werden durch Rück-Extrapolation von Zellproliferationskurven gemessen. Die Zytotoxizität dieser Verbindungen zum Rest der Zelllinien wird mittels eines klonogenen Assays bestimmt, wie zuvor beschrieben.

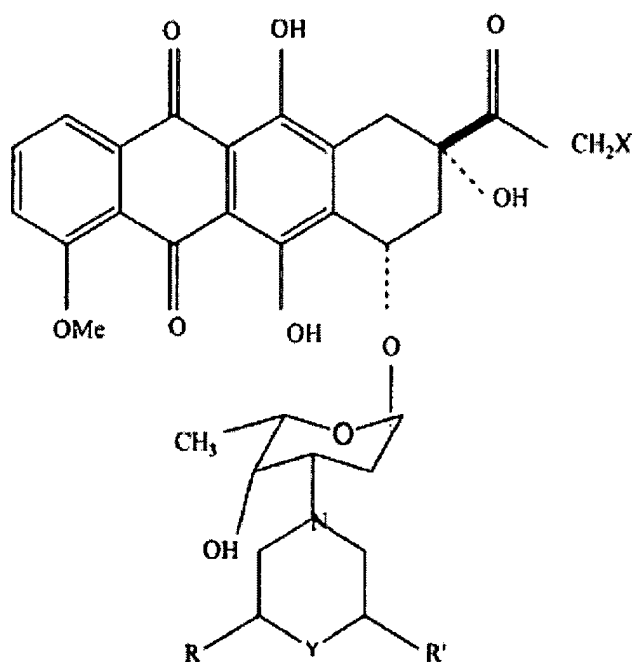
[0085] Die Konjugate werden bezüglich in vitro Zytotoxizität getestet, und die IC₅₀-Werte für die Zelllinien werden bestimmt.

BESTIMMUNG DER SPEZIFISCHEN AFFINITÄT VON ANTIKÖRPER-MODIFIZIERTEN DOXORUBICIN/DAUNORUBICIN KONJUGATEN

[0086] Die spezifischen Affinitäten von Disulfid-gebundenen N901-modifizierten Doxorubicin/Daunorubicin-Konjugaten werden durch kompetitive Bindungs-Assays analysiert. Die Konkurrenz des Bindens von FITC-markiertem Antikörper an NCI N417 und NCI H69-Zellen mit unmarkierten Antikörper- und Antikörper-modifizierten Doxorubicin/Daunorubicin-Konjugaten wird durch direkte Immunfluoreszenz auf einem Becton-Dickinson FACS bestimmt. Die beiden Zelllinien werden als adhärenente Zellen in Gewebekulturflaschen gezüchtet, die Dulbecco's modifiziertes minimal essentielles Medium mit 15% fetalem Rinderkalbserum enthalten. Die Zellen werden dann trypsinisiert und 30 min in Suspension bei 37°C im gleichen Medium Nichtgewebekulturflaschen inkubiert, um ein Anhaften der Zellen am Kunststoff zu vermeiden. Die Zellen werden dann in die Vertiefungen von 96-Well-Platten übergeführt und in minimal essentiellen Medium, enthaltend 25% gemischtes menschliches Serum, resuspendiert. Die Zellsuspensionen (0,2 ml Suspension, enthaltend 100,000 Zellen/Vertiefung) werden mit 6 nM FITC-markiertem Antikörper N901, mit verschiedenen Konzentrationen unmarkierter Antikörper oder modifizierter Doxorubicin/Daunorubicin-Konjugate 1 Stunde bei 0°C inkubiert. Die Zellen werden dann einmal mit Puffer gewaschen und mit 1% Formaldehyd in einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung fixiert. Die durchschnittliche Zellfluoreszenz wird auf einem FACS gemessen.

Patentansprüche

1. Verbindung mit einer Linkergruppe R oder R' der Formel (I):



(I)

wobei X H oder OH ist;

Y O oder NR^2 ist, wobei R^2 ein lineares oder verzweigtes Alkyl mit 1–5 Kohlenstoffatomen ist;

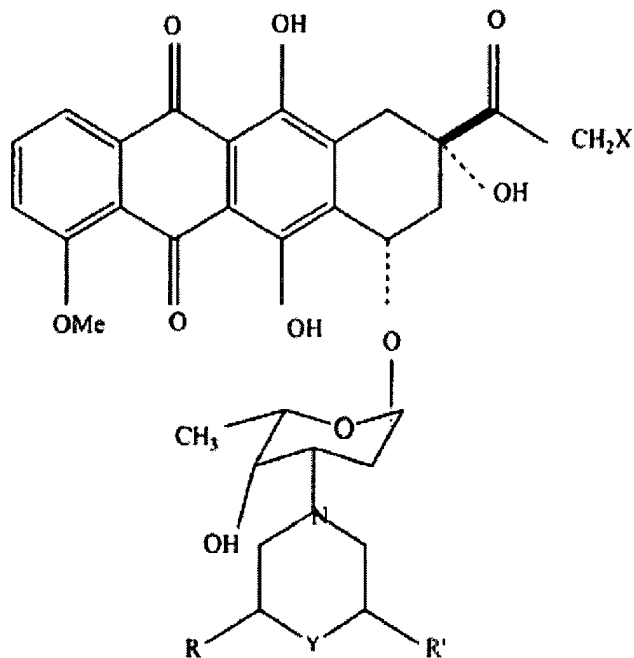
R eine Linkergruppe, H, oder ein lineares oder verzweigtes Alkyl mit 1–5 Kohlenstoffatomen ist; und

R' eine Linkergruppe, H, oder $-\text{OR}^1$ ist, wobei R^1 ein lineares oder verzweigtes Alkyl mit 1–5 Kohlenstoffatomen ist;

wobei die Linkergruppe ein Thiol- oder Disulfid-enthaltender Rest ist, oder, in einem Morpholinether, eine freie Aminogruppe zum Binden an ein zellbindendes Mittel über eine säurelabile oder fotolabile Bindung oder zum Kondensieren mit einem Peptid und zum Binden mit einem zellbindenden Mittel über eine peptidase-labile Bindung ist, oder eine succinylierte Hydroxylgruppe zum Binden an ein zellbindendes Mittel über eine intrazelluläre esterase-labile Bindung ist;

unter der Voraussetzung, dass R und R' nicht gleichzeitig Linkergruppen sind.

2. Verbindung nach Anspruch 1, wobei X H ist.
3. Verbindung nach Anspruch 1, wobei X OH ist.
4. Verbindung nach Anspruch 1, wobei die Linkergruppe ein Thiol- oder ein Disulfid-enthaltender Rest ist.
5. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 und 4, wobei die die Thiol- oder Disulfid-Gruppe tragende Seitenkette linear oder verzweigt, aromatisch oder heterozyklisch ist.
6. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 und 4 oder 5, wobei die Linkergruppe wie folgt ist:
 $-(CH_2)_nSZ$, $-O(CH_2)_nSZ$, $-(CH_2)_nCH(CH_3)SZ$, $-O(CH_2)_nCH(CH_3)SZ$, $-(CH_2)_nC(CH_3)_2SZ$, oder $-O(CH_2)_nC(CH_3)_2SZ$, wobei
 Z H oder SR^3 ist, wobei R^3 ein lineares, verzweigtes oder zyklisches Alkyl mit 1–10 Kohlenstoffatomen ist, oder ein einfaches oder substituiertes Aryl mit 1–10 Kohlenstoffatomen oder ein Heterozyklus, und
 n ein Ganzzahliges von 1–10 ist.
7. Verbindung nach Anspruch 1, wobei $NR^2 NCH_3$ ist.
8. Verbindung nach Anspruch 1, wobei $R^1 -OCH_3$ ist.
9. Verbindung nach Anspruch 1, wobei, wenn R H oder Alkyl ist, $R^1 -OCH_2CH_2CH(Me)SH$ oder $-OCH_2CH_2CH(Me)SZ$ ist, oder wobei, wenn R CH_2SH oder $CH_2CH(Me)SH$ oder CH_2SZ oder $CH_2CH(Me)SZ$ ist, R^1 H oder OR^1 ist.
10. Verbindung nach Anspruch 1, wobei R, R^1 oder R^2 ausgewählt sind aus Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-, iso-, sek.- oder tert.-Butyl oder -Pentyl.
11. Ein oder mehrere Verbindungen, die kovalent über eine Linkergruppe an ein zellbindendes Mittel gebunden sind, zur Verwendung als zytotoxisches Mittel, wobei wenigstens eine der Verbindungen eine Verbindung mit einer Linkergruppe R oder R^1 ist und durch die Formel (I) dargestellt ist:



(I)

wobei X H oder OH ist;

Y O oder NR^2 ist, wobei R^2 ein lineares oder verzweigtes Alkyl mit 1–5 Kohlenstoffatomen ist;

R eine Linkergruppe, H, oder ein lineares oder verzweigtes Alkyl mit 1–5 Kohlenstoffatomen ist; und

 R^1 eine Linkergruppe, H, oder $-OR^1$ ist, wobei R^1 ein lineares oder verzweigtes Alkyl mit 1–5 Kohlenstoffatomen

ist;

wobei die Linkergruppe ein Thiol- oder Disulfid-enthaltender Rest ist, oder in einem Morpholinoether eine freie Aminogruppe zum Verbinden an ein zellbindendes Mittel über eine säurelabile oder fotolabile Bindung oder zum Kondensieren mit einem Peptid und zum Verbinden mit einem zellbindenden Mittel über eine peptidase-labile Bindung ist, oder eine succinylierte Hydroxylgruppe zum Binden an ein zellbindendes Mittel über eine intrazelluläre esterase-labile Bindung ist;

unter der Voraussetzung, dass R und R' nicht gleichzeitig Linkergruppen sind.

12. Ein oder mehrere Verbindungen, die kovalent an ein zellbindendes Mittel über eine Linkergruppe nach Anspruch 11 gebunden sind, wobei die eine oder die mehreren Verbindungen der Formel (I) nach einem der Ansprüche 2–10 definiert ist.

13. Ein oder mehrere Verbindungen, die kovalent an ein zellbindendes Mittel über eine Linkergruppe nach Anspruch 10 gebunden sind, wobei das zellbindende Mittel ausgewählt ist aus Peptiden oder Nicht-Peptiden, bevorzugt Antikörpern, Lymphokinen, Hormonen, Wachstumsfaktoren, Vitaminen und Nährstoff-Transportmolekülen.

14. Zusammensetzung zur Verwendung als therapeutisches Mittel, umfassend:

(A) eine therapeutisch wirksame Menge der ein oder mehreren Verbindungen, die kovalent an ein zellbindendes Mittel über eine Linkergruppe gebunden sind, zur Verwendung als zytotoxisches Mittel nach einem der Ansprüche 11–13; und

(B) einen pharmazeutisch verträglichen Träger.

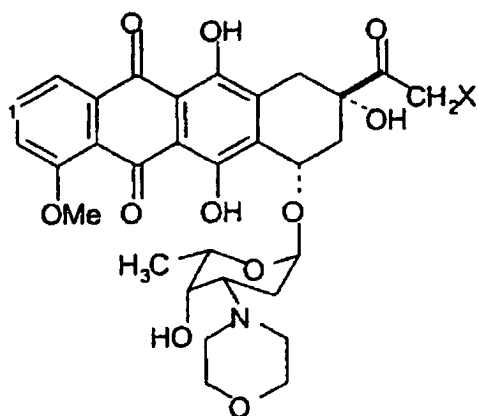
15. Verfahren zum Abtöten ausgewählter Zellpopulationen in vitro oder ex vivo in Modellen zum Evaluieren ihres Potentials und ihrer Spezifität, umfassend das in Kontakt bringen von Targetzellen oder Targetzellen enthaltendem Gewebe mit einer wirksamen Menge ein oder mehrerer der Verbindungen, die kovalent an ein zellbindendes Mittel über eine Linkergruppe gebunden sind, zur Verwendung als zytotoxisches Mittel nach einem der Ansprüche 11–13.

16. Verwendung einer wirksamen Menge der einen oder mehreren Verbindungen, die kovalent an ein zellbindendes Mittel über eine Linkergruppe gebunden sind, zur Verwendung als zytotoxisches Mittel nach Anspruch 11, als aktiven Wirkstoff zur Herstellung einer Zusammensetzung zum Abtöten ausgewählter Zellpopulationen in Targetzellen oder in Targetzellen enthaltenden Geweben.

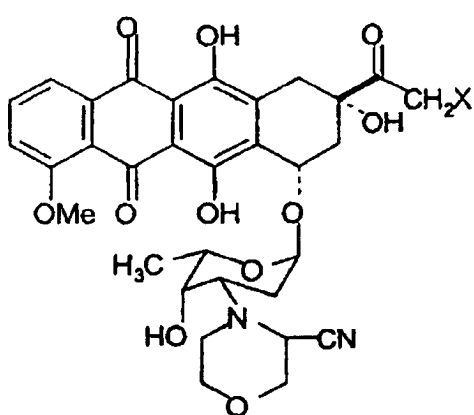
Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

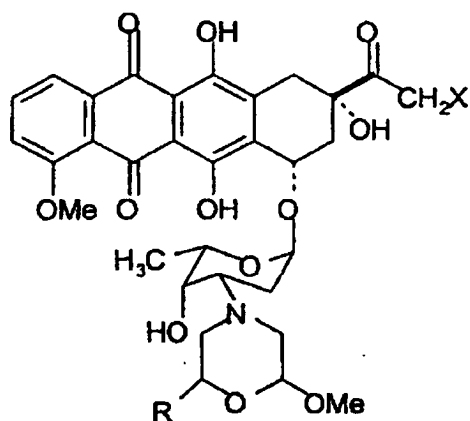
Figur 1



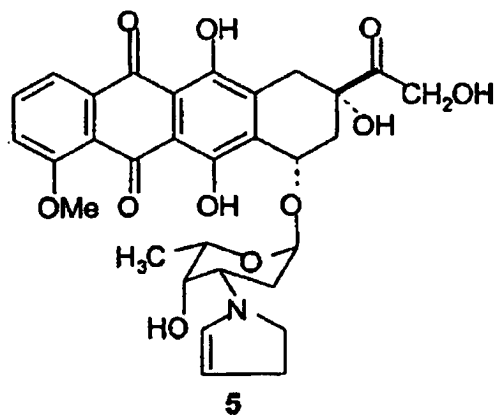
1. X = H: Morpholinodaunorubicin
 2. X = OH: Morpholinodoxorubicin



- 3a: X = H
 3b: X = OH

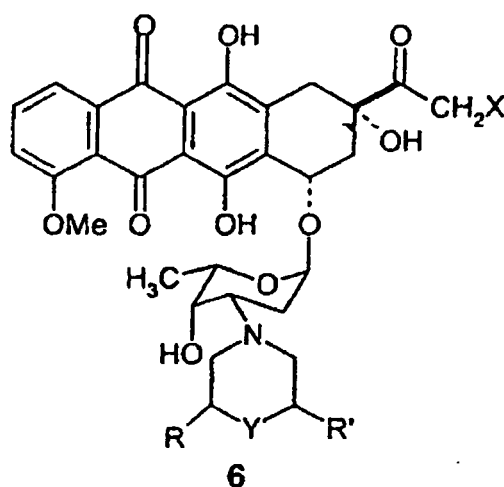


- 4a: X = H, R = Me
 4b: X = OH, R = Me



5

Figur 2



X = H: Daunorubicinverbindungen

X = OH: Doxorubicinverbindungen

Y	R	R'
O oder NR ₂	H oder Alkyl	-OCH ₂ CH ₂ CH(Me)SH
O oder NR ₂	H oder Alkyl	-OCH ₂ CH ₂ CH(Me)SSZ
O oder NR ₂	-CH ₂ SH oder -CH ₂ CH(Me)SH	-H oder -OR ₁
O oder NR ₂	-CH ₂ SSZ oder -CH ₂ CH(Me)SZ	-H oder -OR ₁

R, R₁ und R₂ kann jedes lineare oder verzweigte Alkyl mit bis zu 5 Kohlenstoffatomen sein: Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-, iso-, sek- oder tert-Butyl, Pentyl.

Figur 3. Synthese von Methylthiomorpholinodoxorubicin

