



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 698 32 702 T2 2006.08.10

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 988 059 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 698 32 702.0

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/GB98/01731

(96) Europäisches Aktenzeichen: 98 929 555.5

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1998/057662

(86) PCT-Anmeldetag: 15.06.1998

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 23.12.1998

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 29.03.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 07.12.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 10.08.2006

(51) Int Cl.⁸: A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07D 401/06 (2006.01)

A61K 31/4422 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9712370 14.06.1997 GB

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Protherics Molecular Design Ltd., Runcorn,
Cheshire, GB

(72) Erfinder:

BURKE, John, Philip, London SE7 7PF, GB; KNOX,
John, Richard, Sutton, Surrey SM1 2SU, GB

(74) Vertreter:

Andrae Flach Haug, 83022 Rosenheim

(54) Bezeichnung: MENSCHLICHE CHINON REDUKTASE KONJUGATE FÜR ADEPT UND GDEPT

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

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft therapeutische Systeme, insbesondere therapeutische Systeme zur Aktivierung von Pro-Pharmaka und zum Einsatz derartiger Systeme zur Abtötung von Zielzellen, insbesondere Tumorzellen.

[0002] Die Zuführung eines zytotoxischen Mittel zum Ort von Tumorzellen ist sehr erwünscht, da eine systemische Verabreichung dieser Mittel zum Abtöten normaler Zellen neben den Tumorzellen im Körper führt. Die resultierende Toxizität für normale Zellen limitiert die Dosis des zytotoxischen Mittels und verringert somit das therapeutische Potenzial dieser Mittel. Allerdings besitzt das verabreichte Mittel in bestimmten Fällen keine inhärente Aktivität, sondern wird *in vivo* zum richtigen Zeitpunkt oder am richtigen Ort in das aktive Arzneimittel umgewandelt. Derartige Analoge werden als Pro-Pharmaka bezeichnet und in der Medizin extensiv eingesetzt [Connors und Knox, 1995]. Die Umwandlung des Pro-Pharmakons in die aktive Form kann über verschiedene Mechanismen erfolgen, in Abhängigkeit, zum Beispiel, von Veränderungen des pH, der Sauerstoffspannung, der Temperatur oder der Salzkonzentration, oder durch die spontane Zersetzung des Arzneimittels oder eine innere Ringöffnung oder Cyclisierung.

[0003] WO 88/07378 beschreibt ein System aus zwei Komponenten und seine therapeutischen Anwendungen, wobei eine erste Komponente ein Antikörperfragment, das imstande ist, an ein Tumor-assoziiertes Antigen zu binden, und ein Enzym, das imstande ist, ein Pro-Pharmakon in ein zytotoxisches Arzneimittel umzuwandeln, umfasst, und eine zweite Komponente ist ein Pro-Pharmakon, das in ein zytotoxisches Arzneimittel umgewandelt werden kann. Dieses generelle System, dass häufig als eine „Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy“ (ADEPT) bezeichnet wird, wird auch unter Bezugnahme auf spezifische Enzyme und Pro-Pharmaka in EP 0 302 473 und WO 91/11201 beschrieben.

[0004] WO 89/10140 beschreibt eine Modifikation des in WO 88/07378 beschriebenen Systems, bei der eine weitere Komponente im System eingesetzt wird. Diese weitere Komponente beschleunigt die Clearance der ersten Komponente aus dem Blut, wenn die erste und die zweite Komponente klinisch verabreicht werden. Die zweite Komponente ist gewöhnlich ein Antikörper, der an das Antikörper-Enzym-Konjugat bindet und die Clearance beschleunigt. Ein Antikörper, der gegen das aktive Zentrum des Enzyms gerichtet war, hatte den zusätzlichen Vorteil, dass er das Enzym inaktivierte. Jedoch hat ein derartiger inaktivierender Antikörper das unerwünschte Potenzial, das Enzym an den Tumorstellen zu inaktivieren, aber sein Eindringen in Tumore wurde durch das Anbringen von Galactoserenen auf dem Antikörper verhindert. Der galactosyierte Antikörper wurde schnell, zusammen mit der gebundenen Antikörper-Enzym-Komponente, über Galactoserezeptoren in der Leber aus dem Blut entfernt. Das System wurde in klinischen Studien sicher und wirkungsvoll eingesetzt. Allerdings hemmt die Galactosylierung eines derartigen inaktivierenden Antikörpers, die zu seiner schnellen Clearance aus dem Blut führt, auch sein Eindringen in normales Gewebe und die Inaktivierung von dort lokalisiertem Enzym.

[0005] WO 93/13805 beschreibt ein System, das eine Verbindung umfasst, die einen für eine Zielzelle spezifischen Teil umfasst, wie einen für Tumorzellantigene spezifischen Antikörper, und einen inaktivierenden Teil, wie ein Enzym, der imstande ist, eine Substanz, die in ihrem nativen Zustand imstande ist, die Wirkung eines zytotoxischen Mittels zu hemmen, in eine Substanz umzuwandeln, die eine geringere Wirkung gegen das genannte zytotoxische Mittel hat. Damit ist eine verlängerte Wirkung eines zytotoxischen Mittels an Tumororten möglich, während normales Gewebe vor den Wirkungen des zytotoxischen Mittels geschützt ist.

[0006] WO 93/13806 beschreibt eine weitere Modifikation der ADEPT-Systems, die einen aus drei Komponenten zusammengesetzten Kit für den Einsatz in einem Verfahren zur Zerstörung von Zielzellen in einem Wirt umfasst. Die erste Komponente umfasst einen für Zielzellen spezifischen Teil und einen enzymatisch aktiven Teil, der ein Pro-Pharmakon in ein zytotoxisches Arzneimittel umwandeln kann; die zweite Komponente ist ein Pro-Pharmakon, das vom genannten enzymatisch aktiven Teil in das zytotoxische Arzneimittel umgewandelt werden kann; und die dritte Komponente umfasst einen Teil, der imstande ist, die Komponente wenigstens teilweise daran zu hindern, das Gefäßkompartiment eines Wirts zu verlassen, wenn die genannte Komponente dem Gefäßkompartiment verabreicht wird, und einen inaktivierenden Teil, der das zytotoxische Arzneimittel in eine weniger toxische Substanz umwandeln kann.

[0007] EP 0 415 731 beschreibt ein therapeutisches System, das häufig als GDEPT (Gene Directed Enzyme Prodrug Therapy) bezeichnet wird.

[0008] Ein Hauptansatz beim Design von Pro-Pharmaka besteht aus der Synthese inerter Analoge, die durch

die Wirkung eines Enzyms in das aktive Arzneimittel umgewandelt werden. In der Krebs-Chemotherapie sind Pro-Pharmaka klinisch für verschiedene Zwecke eingesetzt worden, die von Analogen mit besseren Formulierungseigenschaften bis zu Pro-Pharmaka reichen, die so entworfen wurden, dass sie in der Tumorumgebung selektiv aktiviert werden. Ergebnisse aus Tierexperimenten und Studien zur Dosisintensivierung am Menschen haben gezeigt, dass einige Tumortypen, z.B. Ovarialkrebs, durch eine Chemotherapie vollständig eradiziert werden könnten, wenn die Dosis des gegen den Krebs gerichteten Mittels, auf das sie ansprechen, um das Hundertfache erhöht werden könnte. Versuche, die verabreichte Dosis über eine Dosisintensivierung, über eine autologe Knochenmarktransplantation nach einer myelotoxischen Hochdosis-Therapie, über Rescue-Experimente, z.B. Folsäure nach Methotrexat, oder durch die Perfusion isolierter Glieder zu erhöhen, ermöglichen es, eine höhere, aber nicht um diese Größenordnung höhere Gesamtdosis zu verabreichen. Es gibt jedoch viele Beispiele, bei denen diese Dosisintensität theoretisch durch die Verwendung von Pro-Pharmaka erreicht werden kann, die selektiv durch in Tumoren vorkommende Enzyme aktiviert werden. Experimente an tumortragenden Tieren haben gezeigt, dass, wenn ein Pro-Pharmakon ausschließlich in der Tumorumgebung aktiviert wird, eine Heilung von Mäusen mit großen Primärtumoren und extensiven Metastasen erreicht werden kann [Connors und Whisson, 1966, Whisson und Connors, 1965]. Wenn das Pro-Pharmakon ein gutes Substrat für das Enzym ist, das spezifisch im Tumor exprimiert wird, und wenn das Arzneimittel hundertfach toxischer oder noch toxischer als das Pro-Pharmakon ist, dann können, sobald ein Enzymkandidat identifiziert worden ist (besonders, wenn auch eine hohe Konzentration des Enzyms in den extrazellulären Räumen des Tumors vorliegt), viele verschiedene Klassen von Antikrebsmitteln zur Bildung geeigneter Pro-Pharmaka derivatisiert werden. Das kann in Ansätzen demonstriert werden, die zur Entwicklung von Pro-Pharmaka von zytotoxischen Alkylierungsmitteln eingesetzt wurden. Da diese Klasse von Antikrebsmitteln in erster Linie, aber wahrscheinlich nicht ausschließlich, über die kovalente Alkylierung benachbarter DNA-Stränge wirkt, ist die erste grundlegende Anforderung für eine Zytotoxizität, dass das Mittel eine optimale chemische Reaktivität haben sollte, die es ihm ermöglicht, den Ort des Tumors nach der Injektion zu erreichen, und dass es reaktiv genug für eine Alkylierung der DNA ist. Wenn das Mittel zu reaktiv ist, dann kann es sein, dass es vor dem Erreichen des Tumors hydrolysiert, und wenn es zu wenig reaktiv ist, dann kann es ausgeschieden werden, ehe eine ausreichende DNA-Alkylierung erfolgt ist. Zweitens muss es imstande sein, das Endothel und die Kernmembranen zu passieren, um sein Ziel erreichen zu können. Schließlich muss das Alkylierungsmittel, da die vorherrschende Reaktion, die zur Zytotoxizität führt, eine Vernetzungsreaktion ist, mindestens zwei alkylierende Arme besitzen.

[0009] Zur Entwicklung eines geeigneten Pro-Pharmakons, nachdem ein für einen Tumor spezifisches Enzym identifiziert wurde, wird ein Pro-Pharmakon synthetisiert, dem eines oder mehrere der beschriebenen Merkmale fehlen, das aber vom Enzym unter Bildung eines geeigneten Arzneimittels umgesetzt wird. So sind viele alkylierende Pro-Pharmaka chemisch unreaktiv und nicht toxisch, sind aber Substrate für Enzyme, die sie zu hochreaktiven und toxischen Produkten metabolisieren. Die Fähigkeit eines Alkylierungsmittels, mit biologischen Molekülen zu reagieren, hängt von einer chemischen Mindestreakтивität ab, und das Ausmaß der Aktivität kann in Abhängigkeit von der chemischen Struktur stark variieren. Kleine Veränderungen der elektronenabgebenden oder -ziehenden Eigenschaften können die chemische Reaktivität stark verändern. Sehr viele alkylierende Antitumormittel sind experimentell getestet worden, und aktive Derivate müssen, beinahe ausnahmslos, wenigstens bifunktionell sein, d.h. wenigstens zwei alkylierende Arme haben.

[0010] Monofunktionelle Mittel sind gewöhnlich, auch wenn sie Kanzerogene sein können, viel weniger toxisch, und wenn sie enzymatisch in bifunktionelle Mittel umgewandelt werden können, könnten sie wirksame Pro-Pharmaka sein. Ein Beispiel dafür ist CB 1954, ein monofunktionelles Aziridin, das äußerst wirksam gegen den Walker-Tumor der Ratte war, der normalerweise nur empfindlich gegenüber bifunktionellen Alkylierungsmitteln ist (Übersicht bei Knox et al., 1993). Dieser Tumor enthält eine relativ hohe Konzentration des Enzyms DT-Diaphorase (NQO1, EC 1.6.99.2), das die 4-Nitro-Gruppe zu einem Hydroxylamin reduziert, das dann (wahrscheinlich durch Acetyl-CoA) in ein bifunktionelles Mittel umgewandelt wird ([Fig. 1](#)), Allerdings reduziert die menschliche Form der DT-Diaphorase CB 1954 viel langsamer als die Rattenform, und menschliche Tumoren (sogar solche, die die gleichen Spiegel an DT-Diaphorase wie der Walker-Tumor der Ratte enthalten) sind resistent gegen dieses Mittel [Knox et al., 1993]. Der Unterschied der Reduktionsgeschwindigkeiten beruht zum größten Teil auf dem Austausch einer einzigen Aminosäure, eines Glutamins gegen ein Tyrosin in der Aminosäureposition 104 [Chen et al., 1997]. Vor dem Hintergrund der Entwicklung von CB 1954 gegen Ratentumoren wurden verschiedene Wege zur Aktivierung von CB 1954 in menschlichen Tumoren vorgeschlagen. Der erste ist die Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy (ADEPT, wie oben erwähnt), bei der ein Antikörper dazu eingesetzt wird, eine Nitroreduktase von *E. coli* an einem Tumor anzubringen. Diese Nitroreduktase kann CB 1954 viel schneller reduzieren als die DT-Diaphorase der Ratte. Das System wird in WO 93/08228 beschrieben. Die Gene Directed Enzyme Prodrug Therapy (GDEPT) ist ein Verfahren, bei dem das Gen, das für die Nitroreduktase von *Escherichia coli* codiert, in Tumorzellen exprimiert wird und somit eine

Empfindlichkeit gegen CB 1954 bewirkt. Das wird in WO 95/12678 beschrieben.

[0011] Es wurde auch berichtet, dass die Zytotoxizität von CB 1954 in menschlichen Zellen durch das Stimulieren deren endogener DT-Diaphorase mit NRH dramatisch erhöht werden kann [Friedlos et al., 1992a]. In diesen Experimenten wurde die Toxizität von CB 1954 (5-(Aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamid) für menschlicher Zellen sehr durch NADH (wenn fötales Kälberserum im Kulturmedium vorhanden war) und durch Nicotinamidribosid (reduziert) (NRH) verstärkt, aber nicht durch Nicotinatribosid (reduziert). Die gleichzeitige Behandlung menschlicher Zellen mit CB 1954 und NADH führte zur Bildung von Crosslinks in ihrer DNA. Die Toxizität anderer Mittel, die zu DNA-Crosslinks führen, wurde durch reduzierte Nicotinamidverbindungen nicht beeinflusst. Wenn Coffein dem Medium zugesetzt wurde, kam es zu einer Verminderung der Zytotoxizität von CB 1954. Die Toxizität für menschliche Zelllinien nach Exposition gegen CB 1954 und NADH war proportional zu ihren Spiegeln des Enzyms DT-Diaphorase. Es wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass NRH, für das gezeigt wurde, dass es ein Cofaktor für die DT-Diaphorase der Ratte ist [Friedlos et al., 1992b], aus NADH durch Enzyme im fötalen Kälberserum gebildet wird [Friedlos und Knox, 1992] und die Aktivität der menschlichen DT-Diaphorase für CB 1954 stimuliert. Allerdings wurde kürzlich gezeigt, dass es eine weitere CB-1954-reduzierende Aktivität gibt, die in menschlichen Zellen in Gegenwart von NRH nachweisbar ist, und dass diese Aktivität viel größer ist als die, die auf die DT-Diaphorase zurückgeführt werden kann [Quinn, 1996].

[0012] Die Begriffe „Nicotinamidmononucleosid, reduziert“, „Dihydronicotinamidribosid“, „Nicotinamidribosid (reduziert)“ und „NRH“ sind alle äquivalent und werden in der Patentbeschreibung gegeneinander austauschbar verwendet. Nicotinamidribosid kann enzymatisch aus seinen kommerziell erhältlichen Mononucleotiden mittels Verfahren, die in diesem Gebiet gut bekannt sind, erhalten werden, einschließlich derjenigen, die bei Friedlos & Knox (1992) Biochem. Pharmacol. 44, 631–635, beschrieben werden.

[0013] Die menschliche NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase 2 (NQO2) wurde über ihre Homologie zur DT-Diaphorase (NQO1) identifiziert [Jaiswal et al., 1990]. Das letzte Exon im NQO2-Gen ist um 1603 bp kürzer als das letzte Exon des NQO1-Gens und codiert für 58 Aminosäuren im Vergleich zu 101 Aminosäuren, die vom NQO1-Gen codiert werden. Das macht das NQO2-Protein um 43 Aminosäuren kürzer als das NQO1-Protein. Das hohe Ausmaß der Konservierung hinsichtlich der Organisation und der Sequenz des NQO2- und des NQO1-Gens bestätigte, dass das NQO2-Gen für ein zweites Mitglied der NQO-Genfamilie beim Menschen codiert, dass ihm aber die für die DT-Diaphorase charakteristische Chinonreduktaseaktivität fehlt [Jaiswal, 1994]. Das von der NQO2-cDNA abgeleitete, in COS1-Affennierenzellen exprimierte Protein katalysierte wirkungsvoll die Nitroreduktion von CB 10–200, eines Analogen von CB 1954 [Jaiswal, 1994]. Northern-Blot-Analysen zeigten, dass das NQO2-Gen im Herz, im Gehirn, in der Lunge, in der Leber und im Skelettmuskel exprimiert wurde, aber nicht in der Placenta. Im Gegensatz dazu wurde das NQO1-Gen in allen menschlichen Geweben exprimiert. Für unterschiedliche Gewebe wurden große Variationen bezüglich der Expression des NQO2- und des NQO1-Gens festgestellt [Jaiswal, 1994].

[0014] Die katalytischen Eigenschaften der NQO2 wurden von Wu et al. [1987] untersucht. In diesem Artikel wurde NRH als Elektronendonator für die NQO2 eingesetzt.

[0015] Wir haben jetzt gezeigt, dass die NQO2 CB 1954 schnell reduzieren kann und gehen davon aus, dass dieses Enzym, und nicht die DT-Diaphorase, für die potenzierenden Wirkungen von NRH auf die Zytotoxizität von CB 1954 für menschliche Zellen, die von Friedlos et al. [1992a] berichtet wurde, verantwortlich ist.

[0016] Auch wenn alle der zuvor erwähnten Verfahren zum Abtöten einer Zielzelle, wie einer Tumorzelle, im Körper eines Tieres nützlich sind, ist es immer noch wünschenswert, neue Behandlungssysteme bereitzustellen.

[0017] Die vorliegende Erfindung stellt ein therapeutisches System gemäß Anspruch 1 bereit. Weitere Ausführungsformen des Systems werden in den Ansprüchen 2 bis 7 definiert.

[0018] Außerdem stellt die Erfindung die Anwendung, wie sie in den Ansprüchen 8 und 9 definiert wird, bereit. Weitere Ausführungsformen werden in den Ansprüchen 10 und 11 definiert.

[0019] Der Begriff „Tumor“ sollte so verstanden werden, dass er sich auf alle Formen eines neoplastischen Zellwachstums bezieht, einschließlich von Tumoren von Lunge, Leber, Blutzellen, Haut, Pankreas, Magen, Dickdarm, Prostata, Uterus, Brust, Lymphdrüsen und Blase. Feste Tumoren sind besonders geeignet.

[0020] Vorzugsweise ist das Pro-Pharmakon CB 1954 oder ein Analoges von diesem. Am bevorzugtesten ist

das Pro-Pharmakon CB 1954.

[0021] Analoge von CB 1954 werden passenderweise als Moleküle definiert, die die wesentlichen Strukturmerkmale von CB 1954 beibehalten, d.h. einen Benzolring, der einen Aziridinring enthält, zwei NO₂-Gruppen und einen weiteren Substituenten R, die sich aber entweder bezüglich der relativen Orientierung der Substituenten und/oder der Art von R unterscheiden. Verschiedene Analoge wurden bei Khan A. H. und Ross W. C. J. (1969) Chem. Biol. Interact. 1, 27–47, und bei Khan A. H. und Ross W. C. J. (1971) Chem. Biol. Interact. 4, 11–22, offenbart, insbesondere die Details der Analogen von CB 1954.

[0022] Somit ist das System für die Zerstörung einer Zielzelle in einem Wirt (z.B. einem Patienten) nützlich.

[0023] Vorzugsweise hat der Patient, der behandelt werden soll, einen Tumor.

[0024] Das Pro-Pharmakon kann jedes beliebige geeignete Pro-Pharmakon, wie es oben beschrieben wurde, sein.

[0025] Vorzugsweise ist das Pro-Pharmakon CB 1954 oder ein Analoges von diesem.

[0026] Es wird angenommen, dass das zytotoxische Arzneimittel imstande sein sollte, in die Zelle einzudringen, da generell angenommen wird, dass seine zytotoxische Wirkung auf seiner Reaktivität in der Zelle beruht.

[0027] Es wird bevorzugt, dass das Cosubstrat ein Analoges von NRH ist, wie es hier definiert wird, insbesondere eines, das eine Zellmembran in nennenswertem Ausmaß durchdringen kann.

[0028] Vorzugsweise wurde oder wird dem Patienten ein Pro-Pharmakon, das durch die Wirkung der NQO2 zu einem beträchtlich zytotoxischen Arzneimittel umgewandelt wird, verabreicht oder wird ihm verabreicht werden.

[0029] In einer Ausführungsform stellt die Erfindung ein System zur Behandlung eines menschlichen Patienten mit einer Zielzelle, die zerstört werden soll, bereit, wobei die Zielzelle die NQO2 exprimiert, und das System umfasst das Verabreichen eines Pro-Pharmakons, das durch die Wirkung der NQO2 zu einem beträchtlich zytotoxischen Arzneimittel umgewandelt wird, sowie eines Analogen von NRH, wie es hier definiert wird, das Reduktionsäquivalente auf die NQO2 übertragen kann, an einen Patienten.

[0030] Vorzugsweise exprimiert die Zielzelle die NQO2 von Natur aus (zum Beispiel aufgrund des Krankheitszustands), aber sie kann eine Zielzelle sein, die zur Produktion der NQO2 gebracht wurde, oder die die NQO2 aufgrund einer Induktion oder Manipulation der Zelle exprimiert.

[0031] Die NRH-Analogen sind diejenigen, die weiter unten in bezug auf die vorherigen Aspekte der Erfindung beschrieben werden.

[0032] Die Pro-Pharmaka sind diejenigen, die weiter oben in bezug auf die vorherigen Aspekte der Erfindung beschrieben wurden. Es wird besonders bevorzugt, dass das Pro-Pharmakon CB 1954 oder ein Analoges von diesem ist.

[0033] Es wird besonders bevorzugt, dass das Analoge von NRH, wie es hier definiert wird, in nennenswertem Ausmaß fähig ist, die Membran der Zielzelle zu durchdringen.

[0034] Vorzugsweise ist die Zielzelle eine Tumorzelle. Es wird besonders bevorzugt, das System für Tumoren einzusetzen, die im Vergleich zu Nicht-Tumorgewebe einen erhöhten Spiegel der NQO2 zeigen.

[0035] Die gleichzeitige Verabreichung von CB 1954 und des Cofaktors, wie er hier definiert wird, stellt eine Basis für die Aktivierung von CB 1954 an intrazellulären Stellen bereit, an denen die NQO2 exprimiert wird. Derzeit liegen Hinweise vor, dass das Enzym in colorektalen Tumoren hoch exprimiert wird. Sie kann auch in einigen normalen Gewebe exprimiert werden, und wenn das der Fall ist, kann die Aktivierung im normalen Gewebe die Dosis limitieren.

[0036] Somit wird es besonders bevorzugt, colorektale Tumoren mit dem erfindungsgemäß System zu behandeln.

[0037] Gemäß dem erfindungsgemäßen System sollen ein Pro-Pharmakon und ein Cosubstrat an ein Wirts-säugetier, das einen Tumor trägt, verabreicht werden. Das Pro-Pharmakon, das für Tumorzellen viel weniger zytotoxisch ist als das aktive Arzneimittel, wird nur in Gegenwart des Cosubstrats durch das Enzym NAD(P)H:Chinon-Oxidoreductase 2 (NQO2) des Menschen in seine aktive Form umgewandelt. Zu Pro-Pharmaka, die für das erfindungsgemäße System nützlich sind, gehört, ohne jedoch auf dieses beschränkt zu sein, CB 1954 (5-(Aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamid). Cosubstrate, die für das erfindungsgemäße System nützlich sind, sind Analoge von NRH, wie sie hier definiert werden. Es dürfte klar sein, dass sowohl das Pro-Pharmakon als auch das Cosubstrat im wesentlichen fähig sein sollten, die Zellmembran zu durchdringen. Für NADH und NMNH sind Zellmembranen im wesentlichen impermeabel. Es sollte jedoch klar sein, dass wir unter „durch Verabreichen eines Analogen von NRH“, wie es hier in bezug auf diesen und vorherige Aspekte der Erfindung definiert wird, auch das Verabreichen einer Verbindung mit einschließen, die im Körper des Patienten in ein Analoges von NRH, wie es hier definiert wird, umgewandelt wird. Es sollte klar sein, dass eine weitere Ausführungsform die Möglichkeit einschließt, einen Vorläufer eines Analogen von NRH, wie es hier definiert wird, sowie ein Mittel zur Umwandlung des Vorläufers in ein Analoges von NRH, wie es hier definiert wird, einem Patienten zu verabreichen.

[0038] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung wird die endogene NQO2 zur Aktivierung von CB 1954 in Gegenwart eines Analogen von NRH, wie es hier definiert wird, eingesetzt ([Fig. 3](#)). Durch den Einsatz von In-vitro-Enzymtests wird demonstriert, dass CB 1954 zu seinem 4-Hydroxylamin-Derivat (5-(Aziridin-1-yl)-4-hydroxylamino-2-nitrobenzamid) reduziert wird. Diese Reduktion ist viel größer als diejenige durch die DT-Diaphorase des Menschen oder der Ratte, und sie wird nicht ohne weiteres von einem der biogenen Cosubstrate, NADH oder NADPH, katalysiert.

[0039] Das erfindungsgemäße System ist besonders für die Behandlung eines Patienten mit Zielzellen, die zerstört werden sollen, geeignet, wobei die Zielzellen die NQO2 exprimieren. Somit wird bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform vor der Verabreichung des Pro-Pharmakons oder des Analogen von NRH, wie es hier definiert wird, bestimmt, ob die Zielzellen die NQO2 exprimieren. Diese Bestimmung kann zum Beispiel über das Messen der NQO2-Spiegel in einer Probe erfolgen, die die Zielzelle enthält. Das kann enzymatisch erreicht werden oder unter Verwendung von Sonden, die für das NQO2-Polypeptid oder die -mRNA selektiv sind. Das kann zweckmäßigerweise mittels der Techniken erreicht werden, die üblicherweise als Western bzw. Northern Blotting bezeichnet werden. Im Falle des Polypeptids kann die Sonde ein mono- oder polyklonaler Antikörper gegen das NQO2-Protein oder ein Fragment von diesem sein. Derartige Antikörper könnten auch dazu eingesetzt werden, die NQO2 in Gewebeschnitten mittels immunocytochemischer und verwandter Techniken zu identifizieren. Sonden für die mRNA sind Oligonucleotide oder DNA-Fragmente, die komplementär zu Teilesequenzen der mRNA-Sequenz der NQO2 sind. Diese Verfahren werden zwar bevorzugt, aber es können andere Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung der NQO2-Polypeptid- oder der NQO2-mRNA-Spiegel in einer Zielzelle oder einem Zielgewebe eingesetzt werden.

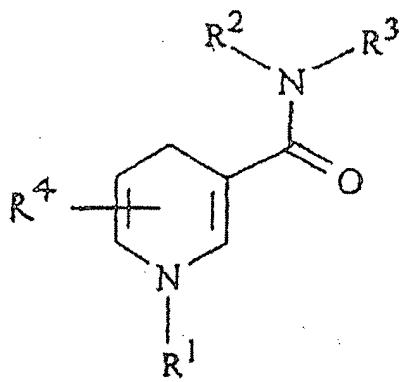
[0040] Die Erfindung schließt deshalb auch ein therapeutisches System ein, das ein Pro-Pharmakon umfasst, das durch die Wirkung der NQO2 und eines Analogen von NRH, wie es hier definiert wird, das Reduktionsäquivalente auf die NQO2 übertragen tragen, in ein beträchtlich zytotoxisches Arzneimittel umgewandelt wird. Es wird bevorzugt, dass das System weiterhin ein Mittel zur Bestimmung, ob die Zielzelle die NQO2 exprimiert, umfasst.

[0041] Die Erfindung schließt auch die Verwendung eines Analogen von NRH ein, wie es hier definiert wird, das Reduktionsäquivalente auf die NQO2 übertragen kann, bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines menschlichen Patienten mit einer Zielzelle, die zerstört werden soll, und die Verwendung eines Pro-Pharmakons, das durch die Wirkung der NQO2 in ein beträchtlich zytotoxisches Arzneimittel umgewandelt wird, bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines menschlichen Patienten mit einer Zielzelle, die zerstört werden soll, wobei dem Patienten ein Analoges von NRH, wie es hier definiert wird, das Reduktionsäquivalente auf die NQO2 übertragen kann, verabreicht wurde, verabreicht wird oder verabreicht werden wird.

[0042] Der k_{kat} -Wert für NQO2/NRH liegt mit CB 1954 als Elektronenakzeptor bei 360 min^{-1} . Ein Cosubstrat (d.h. ein Analoges von NRH, das imstande ist, Reduktionsäquivalente auf die NQO2 zu übertragen) ist eine Verbindung, die als ein Cosubstrat für die NQO2 wirken kann, so dass das Enzym CB 1954 zu seinem 4-Hydroxylamin-Derivat reduzieren kann, und zwar mit einem k_{kat} von $> 50 \text{ min}^{-1}$. Zur Vermeidung von Unklarheiten sei angemerkt, dass ein „Analoges von NRH, das imstande ist, Reduktionsäquivalente auf die NQO2 zu übertragen“ nicht notwendigerweise ein Strukturanalogen von NRH sein muss, sondern ein funktionelles Analoges von NRH in dem Sinne ist, dass es Reduktionsäquivalente auf die NQO2 übertragen kann. Zur Vermeidung

von Unklarheiten sei angemerkt, dass NADH und NADPH keine Cosubstrate für die NQO2 sind.

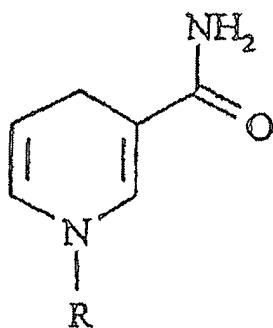
[0043] Bestimmte Cosubstrate (Analoge von NRH) haben die Struktur:



wobei R¹ ist Aryl, substituiertes Alkyl, substituiertes Aryl, CONR^aR^b (wobei R^a und R^b unabhängig voneinander H, Alkyl oder substituiertes Alkyl sind), und R² und R³ sind unabhängig voneinander H, Alkyl, oder substituiertes Alkyl. R⁴ ist ein beliebiges von H, Alkyl, substituiertem Alkyl, Halogen, CN, COOH, CONH₂ oder OH. Vorzugsweise ist R⁴ H.

[0044] Ob Verbindungen mit dieser Struktur als Cosubstrate der NQO2 wirken oder nicht, kann leicht mittels Verfahren, wie sie hier offenbart werden, bestimmt werden.

[0045] Vorzugsweise sind R² und R³ H. Vorzugsweise ist R¹ substituiertes Alkyl. Somit wird bevorzugt, dass das Cosubstrat die generelle Struktur



hat, wobei R substituiertes Alkyl ist.

[0046] Es wird bevorzugt, dass die Alkylgruppe C₁- bis C₆-Alkyl ist, und es wird weiter bevorzugt, dass die Alkylgruppe eine lineare Alkylgruppe ist.

[0047] Unter „substituiertes Alkyl“ schließen wir eine Substitution durch OH, Halogen, CN, COOH und CONH₂ ein.

[0048] Wir haben die folgenden Verbindungen synthetisiert:

- 1: R = -CH₂CH₂CH₂SO₃⁻
- 2: R = -CH₂CONH₂
- 3: R = -CH₂CH₂CH₃
- 4: R = -CH(CH₃)₂
- 5: R = -CH₂CH₂CH₂OH
- 6: R = -CH₂CH₂OH
- 7: R = -CH₂CH₂COOH
- 8: R = -CH₂C₆H₅
- 9: R = -CH₃
- 10: R = -CH₂CH₃
- 11: R = -CH₂CH₂C₆H₅

[0049] Für die MDEPT ist die Verbindung 1 vorzuziehen. Sie ist bei physiologischem pH geladen und wird

von den Zellen ausgeschlossen.

[0050] Die Verbindung 8 und die Verbindung 11 sind keine Cosubstrate für die NQO2 nach unserer Definition.

[0051] Es wird erwartet, dass geladene oder polare Verbindungen (z.B. die Verbindungen 1 und 7) nicht ohne weiteres in Zellen gelangen. Für lipophile Derivate (z.B. die Verbindungen 3 und 4) wird erwartet, dass sie leicht in Zellen gelangen.

[0052] Die Erfindung wird jetzt detaillierter unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele und Figuren beschrieben.

[0053] [Fig. 1](#) zeigt die Bioaktivierung von CB 1954. Der erste Schritt ist die Reduktion von CB 1954 durch das Enzym DT-Diaphorase unter Bildung von 5-(Aziridin-1-yl)-4-hydroxylamino-2-nitrobenzamid. Dieses Hydroxylaminderivat kann mit Thioestern unter Bildung DNA-reaktiver Spezies reagieren. Es wird postuliert, dass diese das N-Acetoxyderivat ist. Das Hauptprodukt dieser Reaktion ist jedoch 4-Amino-5-(aziridin-1-yl)-2-nitrobenzamid, das nicht leicht mit DNA reagiert. Die Bildung von 4-Amino-5-(aziridin-1-yl)-2-nitrobenzamid steht in Konkurrenz mit der Erzeugung DNA-bindender Produkte.

[0054] [Fig. 2](#) zeigt die Struktur von NRH.

[0055] [Fig. 3](#) ist eine schematische Darstellung der Bioaktivierung von CB 1954 durch die NQO2.

[0056] [Fig. 4](#) zeigt die Reduktion von CB 1954 durch die NQO2 in Gegenwart verschiedener Cosubstrate.

[0057] [Fig. 5](#) zeigt die Bildung von 5-(Aziridin-1-yl)-4-hydroxylamino-2-nitrobenzamid (4-NHOH) über die Reduktion von CB 1954 durch die NQO2.

[0058] [Fig. 6](#) zeigt die Nucleotidsequenz einer cDNA, die für die menschliche NQO2 codiert, und die abgeleitete Aminosäuresequenz.

[0059] [Fig. 7](#) zeigt die Strukturen potenzieller Cosubstrate für die NQO2.

[0060] [Fig. 8a](#) zeigt die Fähigkeit von NQO2 zur Verwendung von NRH und verschiedener Analoge als Cosubstrate für die Reduktion von CB 1954. In Abwesenheit des Enzyms kam es nicht zu einer Reduktion von CB 1954 (nicht gezeigt). Die Ausgangskonzentration des Cosubstrats war 500 µM, und die Enzymkonzentration lag bei 1 µg/ml.

[0061] [Fig. 8b](#) zeigt die Fähigkeit von NQO2 zur Verwendung von NRH und verschiedener Analoge als Cosubstrate für die Reduktion von CB 1954. In Abwesenheit des Enzyms kam es nicht zu einer Reduktion von CB 1954 (nicht gezeigt). Die Ausgangskonzentration des Cosubstrats war 500 µM, und die Enzymkonzentration lag bei 0,5 µg/ml.

[0062] [Fig. 8c](#) zeigt die Fähigkeit von NQO2 zur Verwendung von NRH und verschiedener Analoge als Cosubstrate für die Reduktion von CB 1954. In Abwesenheit des Enzyms kam es nicht zu einer Reduktion von CB 1954 (nicht gezeigt). Die Ausgangskonzentration des Cosubstrats war 500 µM, und die Enzymkonzentration lag bei 0,5 µg/ml.

[0063] [Fig. 9](#) zeigt die Aufnahme verschiedener Cosubstrate in Wildtyp-V79-Zellen. Die Verbindung 1 ist bei physiologischem pH geladen und wird von den Zellen ausgeschlossen. Somit ist dieses Cosubstrat besonders für MDEPT-Anwendungen geeignet.

[0064] [Fig. 10](#) zeigt die Plasmide pIRES-P und H6.

[0065] [Fig. 11](#) zeigt die Wirkung von NRH auf die Zytotoxizität von CB 1964 in NQO2-exprimierenden V79-Zellen. Die Zugabe von NRH erhöhte die Zytotoxizität von CB 1954 um das wenigstens 100-fache (V79TM13), und sie war um mehr als das 100-fache höher in den V79TM5- und -13-Zelllinien. Diese Wirkung wurde in nicht-transfizierten V79-Zellen (< 3-fach) nicht gesehen und kann somit auf die Expression der NQO2 in den transfizierten Zellen zurückgeführt werden.

[0066] [Fig. 12](#) zeigt die Wirkung von NRH, der Verbindung 1 und der Verbindung 2 auf die Zytotoxizität von

CB 1954 in menschlichen T98G-Glioblastomzellen. Die Zellen wurden wie die V79-Zellen behandelt, allerdings für 144 Stunden in Gegenwart von CB 1954. Die Zugabe von NRH und der Verbindung 2 erhöhte die Zytotoxizität von CB 1954 um das wenigstens 100-fache, während die impermeable Cosubstrat-Verbindung 1 zu keiner Potenzierung führte.

[0067] [Fig. 13](#) zeigt die Fähigkeit der DT-Diaphorase der Ratte, die Verbindungen 1 und 2 als Cosubstrate für die Reduktion von CB 1954 zu verwenden.

[0068] [Fig. 14](#) zeigt die Fähigkeit der Nitroreduktase von E. coli, die Verbindungen 1 und 2 als Cosubstrate für die Reduktion von CB 1954 zu verwenden.

[0069] [Fig. 15](#) und [Fig. 16](#) zeigen die Wirkung der Verbindung 1 auf das Körpergewicht normaler Mäuse.

[0070] [Fig. 17](#) und [Fig. 18](#) zeigen die Wirkung der Verbindung 2 auf das Körpergewicht normaler Mäuse. Mäusen [6 Gruppen aus 3 Tieren] wurde intravenös (Schwanzvene) entweder 1 oder 2 in den gezeigten Dosen injiziert, und das Gewicht der Mäuse wurde über einen Zeitraum von 8 Tagen registriert. Kontrollmäuse erhielten lediglich den Träger (Phosphat-gepufferte Saline).

Beispiel 1: Die Wirkung verschiedener Cosubstrate auf die Aktivität der menschlichen NQO2

Experimentelle Details

[0071] Rekombinante menschliche NQO2 wurde in E. coli hergestellt. Eine Ncol- und eine HindIII-Restriktionsstelle wurden mittels eines PCR-Verfahrens mit Primern und Nucleotidsequenzen, die von den 5'- und 3'-Enden der cDNA stammten, an das 5'- bzw. 3'-Ende der vollständigen cDNA der NQO2 angefügt. Das PCR-Produkt wurde über ein 1%iges Agarosegel abgetrennt und dann mittels des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen Inc.) extrahiert. Das gelgereinigte PCR-Produkt wurde in den PCRII-Vektor aus dem TA-Klonierungs-kit (Invitrogen Co.) kloniert, und die Korrektheit der Sequenz des PCR-Produkts wurde über eine Dideoxysequenzierung überprüft. Das resultierende Konstrukt wurde über die angefügten Ncol- und HindIII-Restriktionsstellen wieder in den E.-coli-Expressionsvektor pKK233-2 (Pharmacia) ligiert. Das Expressionsplasmid wurde pKK-hNQO2 genannt. Die pKK-hNQO2-E.-coli-Zellen wurden kultiviert, sonifiziert und zentrifugiert, wie es früher für die Reinigung der rekombinanten DT-Diaphorase beschrieben wurde [Chen et al., 1992]. Der Überstand einer 90-min-Zentrifugation bei 10500 g wurde auf 50 ml Affi-gel Blue (Bio-Rad) aufgetragen, und die Säule wurde gemäß dem veröffentlichten Verfahren gewaschen. Die Präparation der gereinigten NQO2 wurde mittels SDS-PAGE-Elektrophorese analysiert. Die Aktivität der NQO2 in Gegenwart von CB 1954 und verschiedener Cofaktoren wurde mittels HPLC bestimmt. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurde die NQO2 (1 µg/ml) mit NRH (500 µM) und CB 1954 in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 bis 2 mM) in Natriumphosphatpuffer (10 mM, pH 7) bei 37°C inkubiert Zu unterschiedlichen Zeiten wurden Aliquots (10 µl) auf eine Partisphere-SCX-HPLC-Säule (250 × 4,5 mm) (Whatman Ltd.) injiziert und isokratisch (1,5 ml/min) mit 50 mM wässrigem Natriumphosphat, das 1% Methanol enthielt, eluiert. Die Extinktion des Eluats wurde kontinuierlich bei 320 nm aufgezeichnet. Dieses Trennsystem konnte alle erwarteten Reduktionsprodukte von CB 1954 auf trennen [Boland et al., 1991, Knox et al., 1992]. Die Reduktion von CB 1954 wurde verfolgt, indem die Zunahme der Fläche des Peaks, der dem Reduktionsprodukt 5-(Aziridin-1-yl)-4-hydroxylamino-2-nitrobenzamid entsprach, quantifiziert wurde. Alle Tests wurden durch die Zugabe des Enzyms gestartet und doppelt durchgeführt. Die kinetischen Parameter wurden berechnet, indem die Anfangsgeschwindigkeit der Reduktion für jede Konzentration von CB 1954 gegen diese Konzentration aufgetragen wurde und die Daten mittels eines Computerprogramms (FigP) der Michales-Menten-Gleichung angepasst wurden. Die Werte wurden durch das Transformieren der Daten und ihre Anpassung an verschiedene Formen der linearen Gleichung über Regressionsanalysen bestätigt.

[0072] Die Wirkung verschiedener Cosubstrate auf CB 1954 wurde wie oben, aber ohne NADH, bestimmt. NRH wurde durch NADPH oder NMNH ersetzt, und CB 1954 wurde in einer festen Konzentration von 100 µM eingesetzt. Die Enzymkonzentration lag bei 5 µg/ml. Die Reduktion von CB 1954 wurde über das Messen sowohl der Abnahme seiner entsprechenden Peakfläche der HPLC-Spur als auch der Zunahme der Fläche des Peaks, der dem Reduktionsprodukt 5-(Aziridin-1-yl)-4-hydroxylamino-2-nitrobenzamid entsprach, verfolgt. Die relativen Geschwindigkeiten der Reduktion wurden für eine Abnahme des CB 1954 um 10% aus einem Graphen bestimmt, bei dem die Abnahme des CB 1954 gegen die Zeit aufgetragen wurde. Die Zeitachse wurde auf ein Äquivalent von 10 µg/ml NQO2 normalisiert.

Tabelle 1. Kinetische Parameter für die NQO2, die Nitroreduktase aus E. coli, die DT-Diaphorase des Menschen und der Ratte bezüglich CB 1954. NRH wurde als Cosubstrat für die NQO2 eingesetzt, während die Werte für die anderen Enzyme mit NADH bestimmt wurden.

ENZYM	Km (μM)	$k_{\text{kat}} (\text{s}^{-1})$
NQO2	263 ± 13	6,01
Nitroreduktase ¹	862 ± 145	6,0
DT-Diaphorase der Ratte ²	826	0,0683
DT-Diaphorase des Menschen ²	1403	0,0107

[0073] Daten aus:

¹[Anlezark et al., 1992]

²[Boland et al., 1991]

Tabelle 2. Die relative Geschwindigkeit der Reduktion von CB 1954 durch die NQO2 bei Verwendung unterschiedlicher Cosubstrate. Alle Cosubstrate wurden in einer Ausgangskonzentration von 500 μM eingesetzt, und CB 1954 in einer Ausgangskonzentration von 100 μM .

COSUBSTRAT	RELATIVE GESCHWINDIGKEIT DER REDUKTION
NADH	1,0
NADPH	1,24
NMNH	5,6
NRH	70,0

Beispiel 2: Verabreichung eines Konjugats aus einem monoklonalen Antikörper und der NQQ2

[0074] In diesem Beispiel wird das Pro-Pharmakon 6–48 Stunden nach der Verabreichung eines Konjugats aus einem monoklonalen Antikörper und der NQO2 verabreicht. Der genaue Abstand hängt von den Lokalisierungseigenschaften des Konjugats ab, aber die Verabreichung des Pro-Pharmakons beginnt idealerweise, sobald die Aktivität des Enzyms im Plasma nicht ausreicht, genügend Pro-Pharmakon zur Verursachung einer Toxizität umzusetzen. Die Dosis des Konjugats liegt im Bereich von 100–300 mg m^{-2} pro Patient. Die Verabreichung des Cosubstrats NRH beginnt ungefähr 1 Stunde vor der Verabreichung des Pro-Pharmakons und wird über den Zeitraum der Verabreichung des Pro-Pharmakons fortgesetzt. Die Dosis des Pro-Pharmakons hängt von dessen Art ab, aber eine wirksame Dosis kann im Bereich von 10–2000 mg m^{-2} liegen. Die Dosis des NRH kann das 2–3-fache der Dosis des Pro-Pharmakons sein. In diesem System kann es vorteilhaft sein, die Clearance von restlicher Enzymaktivität aus dem Plasma und normalen Geweben zu beschleunigen. Das kann durch die Verabreichung eines galactosylierten Anti-Enzym-Antikörpers nach der Verabreichung des Konjugats, aber vor der Verabreichung des NRH, erreicht werden.

Beispiel 3: Verabreichung eines rekombinanten NQO2-Polynucleotids

[0075] In diesem Beispiel wird ein rekombinantes Polynucleotid verabreicht.

[0076] Die Verabreichung kann über jeden beliebigen Weg erfolgen, der für die zu behandelnde Erkrankung geeignet ist, wobei zu geeigneten Wegen eine orale, nasale und parenterale Verabreichung gehört. Die Dosierung wird vom jeweiligen Arzt für den jeweiligen Patienten bestimmt, und das Ganze wird von der genauen Art des Pro-Pharmakons und des zytotoxischen Mittels, das aus dem Pro-Pharmakon freigesetzt werden soll, bestimmt. Ungefähr Dosen sind im Beispiel 2 oben angegeben. Wenn die Expression der NQO2 in einem geeigneten Maße erfolgt, kann die Verabreichung des NRH gefolgt vom Pro-Pharmakon beginnen, wie im Bei-

spiel 2 dargelegt wurde.

Beispiel 4: Verabreichung von NRH und des Pro-Pharmakons

[0077] In diesem Beispiel wird einem Patienten NRH verabreicht, und nach 1 Stunde wird mit der gleichzeitigen Verabreichung des Pro-Pharmakons begonnen. Wie zuvor hängt die Dosis des Pro-Pharmakons und von NRH von der Art des Pro-Pharmakons und des zytotoxischen Mittels, das aus dem Pro-Pharmakon freigesetzt wird, ab.

Beispiel 5: Potenzielle Cosubstrate für die NQO2

[0078] Die synthetisierten Verbindungen sind in der [Fig. 7](#) gezeigt.

[0079] Details der Synthesen werden im Folgenden vorgestellt.

Verbindung 1: 1-(3-Sulfonatopropyl)dihydronicotinamid

[0080] Zu einer Lösung von 1-(3-Sulfonatopropyl)-3-carboxamidopyridinium (20 mg) in Wasser (5 ml) wurden 50 mg wasserfreies Natriumcarbonat, 50 mg Natriumbicarbonat und 50 mg Natriumhydrosulphit gegeben, und die mit einem Stopfen verschlossene Lösung wurde 30 min bei 37°C stehen gelassen. Die reduzierte Verbindung wurde mittels präparativer HPLC aus der Reaktionsmischung gereinigt. 5 ml der Reaktionsmischung wurden auf eine Dynamax-Macro-C18-Reverse-Phase-Säule von 21,4 × 250 mm (Rainin) injiziert und mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser (0–100% über 30 min) mit 10,0 ml/min eluiert. Die Extinktion des Eluats bei 340 nm und die Fluoreszenz (Exzit. 340, Em. 450) wurden kontinuierlich verfolgt, und es wurde eine Fraktion, die einem Fluoreszenzpeak entsprach, gesammelt. Das Eluat wurde gesammelt und gefriergetrocknet, wodurch die Verbindung 1 erhalten wurde. NMR (D_2O 270 MHz, 20°C) δ 1,95–2,08 (m, J ~ 7,3 Hz, 2H, $NCH_2CH_2CH_2SO_3^-$), 2,94 (t, J = 7,7 Hz, 2H, $NCH_2CH_2CH_2SO_3^-$), 3,04 (br t, J = 1,8 Hz, 1H, 4- CH_2), 3,34 (t, J = 6,8 Hz, 2H, $NCH_2CH_2CH_2SO_3^-$), 4,88–4,98 (m, 1H, H-5), 5,95 (dd, J = 8,1 Hz, J = 1,5 Hz, 1H, H-6), 7,04 (s, 1H, H-2).

[0081] Das Ausgangsmaterial 1-(3-Sulfonatopropyl)-3-carboxamidopyridinium wurde wie folgt hergestellt: 1,3-Propansulton (12,21 g, 0,10 mol) wurde als eine Portion zu einer gerührten Lösung von Nicotinamid (12,21 g, 0,10 mol) in N,N-Dimethylformamid (DMF, 20 cm³) gegeben. Die klare Lösung wurde 1 h auf 100°C erhitzt, und innerhalb dieser Zeit (> 5 min) trennte sich ein schwerer farbloser Feststoff ab. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur gekühlt, filtriert, und der Feststoff wurde nacheinander mit kaltem DMF (2 × 25 cm³) und dann mit trockenem Diethylether (2 × 30 cm³) gewaschen. Die Umkristallisation aus wässrigem DMF ergab 1-(3-Sulfonatopropyl)-3-carboxamidopyridinium in Form farbloser Prismen; Schmp. 300–302°C; NMR (D_2O 270 MHz, 20°C) δ 2,52 (Quintett, J = 7,3 Hz, 2H, $N^+CH_2CH_2CH_2SO_3^-$), 3,04 (t, J = 7,3 Hz, 2H, $N^+CH_2CH_2CH_2SO_3^-$), 4,89 (t, J = 7,3 Hz, 2H, $N^+CH_2CH_2CH_2SO_3^-$), 7,95 (br s, langsamer Austausch, CONH₂), 8,24 (br t, J ~ 7,2 Hz, 1H, H-5), 8,94 (d, J = 8,1 Hz, 1H, H-4), 9,10 (d, J = 6,2 Hz, 1H, H-6), 9,40 (s, 1H, H-2). Gefunden: C, 43,38, H, 4,95, N, 10,94%. $C_9H_{12}N_2O_4S \cdot 0,25H_2O$ (wasserfreies M = 244,27) erfordert C, 43,45, H, 5,06, N, 11,26%.

Verbindung 2

[0082] Die Verbindung 2, 1-(Carboxamidomethyl)dihydronicotinamid, wurde aus 1-(Carboxamidomethyl)-3-carboxamidopyridiniumiodid nach dem für die Verbindung 1 beschriebenen Reduktionsverfahren hergestellt.

NMR (D_2O , 270 MHz, 20°C) δ 3,00 (br t, J = 1,8 Hz, 2H, 4- CH_2), 3,90 (s, 2H, CH₂CONH₂), 4,82–4,90 (m, 1H, H-5), 5,76 (dm, J = 8,1 Hz, H-6), 6,89 (s, 1H, H-2).

[0083] Das Ausgangsmaterial 1-(Carboxamidomethyl)-3-carboxamidopyridiniumiodid wurde durch das Erhitzen einer Mischung von Nicotinamid (2,0 g, 16,4 mmol) und 2-Iodacetamid (3,1 g, 16,8 mmol) in DMF (5 ml) für 3 h bei 55–60°C hergestellt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde Ethylacetat (50 ml) zugegeben, und die Mischung wurde 30 min gerührt. Das Produkt wurde durch Filtrieren entfernt, an der Pumpe getrocknet und aus wässrigem Ethanol umkristallisiert, wodurch 1-(Carboxamidomethyl)-3-carboxamidopyridiniumiodid in Form farbloser Kristalle erhalten wurde (3,3 g, 66%); Schmp. 210–211°C. Gefunden: C, 31,37, H, 3,34, N, 13,77%, $C_8H_{10}N_3O_2I$ (wasserfreies M = 307,09) erfordert C, 31,29, H, 3,28, N, 13,68%.

Verbindung 3

[0084] Die Verbindung 3, 1-Propyldihydronicotinamid, wurde aus 1-Propyl-3-carboxamidopyridiniumbromid nach dem für die Verbindung 1 beschriebenen Reduktionsverfahren hergestellt. NMR (CDCl_3 , 270 MHz, 20°C) δ 0,90 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,56 (Sextett, $J = 7,3$ Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3,05 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3,16 (dd, $J = 3,6$ Hz, $J = 1,8$ Hz, 2H, 4- CH_2), 4,72 (dt, $J = 8,1$ Hz, $J = 3,6$ Hz, 1H, H-5), 5,35 (br s, 2H, langsamer D_2O -Austausch, CONH_2), 5,72 (dq, $J = 8,1$ Hz, 1,8 Hz, 1H, H-6), 7,04 (d, $J = 1,8$ Hz, H-2).

[0085] Das Ausgangsmaterial 1-Propyl-3-carboxamidopyridiniumbromid wurde wie folgt hergestellt. Eine Lösung von Nicotinamid (12,21 g, 0,10 mol) und 1-Brompropan (12,30 g, 0,10 mol) in DMF (20 cm³) wurde gerührt und 1 h auf 70°C erhitzt. Ein schweres Präzipitat bildete sich innerhalb von 15 min. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur über Nacht wurde die Mischung filtriert, und der Feststoff wurde mit kaltem DMF (10 cm³) und dann mit trockenem Diethylether (2 × 20 cm³) gewaschen. Die Umkristallisation aus DMF ergab 1-Propyl-3-carboxamidopyridiniumbromid (19,42 g, 79%) in Form farbloser Prismen; Schmp. 171,5–172,5°C; NMR ($d_6\text{-DMSO}$, 270 MHz, 20°C) δ 0,91 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2,01 (Sextett, $J = 7,3$ Hz, 2H, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4,70 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 8,20 (br s, langsamer D_2O -Austausch, 1H, CONH_aH_b), 8,32 (dd, $J = 8,1$ Hz, $J = 6,2$ Hz, 1H, H-5), 8,68 (br s, langsamer D_2O -Austausch, 1H, CONH_aH_b), 9,02 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-4), 9,35 (d, $J = 6,2$ Hz, 1H, H-6), 9,65 (s, 1H, H-2). Gefunden: C, 44,21, H, 5,36, N, 11,32%. $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_2\text{OBr}$ (wasserfreies M = 245,12) erfordert C, 44,10, H, 5,35, N, 11,43%.

[0086] Die Verbindung 3 konnte auch über die Reduktion von 1-Propyl-3-carboxamidopyridiniumiodid hergestellt werden. Dieses Ausgangsmaterial wurde durch das Erhitzen einer Mischung von Nicotinamid (2,0 g, 16,4 mmol) und 1-Iodpropan (3,2 ml, 32,8 mmol) in DMF (5 ml) für 4 h bei 90–95°C hergestellt. Es wurde Ethylacetat (50 ml) zu der gekühlten Lösung gegeben, und die Mischung wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Der Feststoff wurde abfiltriert, an der Pumpe getrocknet und aus Methanol umkristallisiert, wodurch 1-Propyl-3-carboxamidopyridiniumiodid in Form blassgelber Kristalle erhalten wurde (2,3 g, 48%); Schmp. 183–184°C (Lit. 180–182°C [S. Liao, J. T. Dulaney & H. G. Williams-Ashman, J Biol Chem, 237, 2981–2987 (1962)]; NMR ($d_6\text{-DMSO}$, 270 MHz, 20°C) δ 0,90 (t, 3H), 1,98 (m, 2H), 4,64 (t, 2H), 8,17 (s, 1H), 8,30 (t, 1H), 8,54 (s, 1H), 8,94 (d, 1H), 9,23 (s, 1H), 9,49 (s, 1H). Gefunden: C, 37,05, H, 4,47, N, 9,49%. $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_2\text{OI}$ (wasserfreies M = 292,12) erfordert C, 37,01, H, 4,49, N, 9,59%.

Verbindung 4

[0087] Die Verbindung 4, 1-(2-Propyl)dihydronicotinamid, wurde aus 1-(2-Propyl)-3-carboxamidopyridiniumbromid nach dem für die Verbindung 1 beschriebenen Reduktionsverfahren hergestellt.

[0088] Das Ausgangsmaterial 1-(2-Propyl)-3-carboxamidopyridiniumbromid wurde wie folgt hergestellt. Eine Lösung von Nicotinamid (12,21 g, 0,10 mol) und 2-Brompropan (12,30 g, 0,10 mol) in DMF (20 cm³) wurde 10 h gerührt und auf 70°C erhitzt, und während dieser Zeit bildete sich ein farbloses Präzipitat. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur über Nacht wurde die Mischung filtriert, und der Feststoff wurde mit kaltem DMF (10 cm³) und dann mit trockenem Diethylether (2 × 20 cm³) gewaschen. Die Umkristallisation aus DMF ergab 1-(2-Propyl)-3-carboxamidopyridiniumbromid (16,81 g, 69%) in Form farbloser Prismen; Schmp. 215,5–217,0°C; NMR ($d_6\text{-DMSO}$, 270 MHz, 20°C) δ 1,68 (d, $J = 7,0$ Hz, 6H, $\text{N}^+\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 5,17 (Septett, $J = 7,0$ Hz, 2H, $\text{N}^+\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 8,20 (br s, langsamer D_2O -Austausch, 1H, CONH_aH_b), 8,31 (dd, $J = 8,1$ Hz, $J = 6,2$ Hz, 1H, H-5), 8,71 (br s, langsamer D_2O -Austausch, 1H, CONH_aH_b), 8,98 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-4), 9,43 (d, $J = 6,2$ Hz, 1H, H-6), 9,62 (s, 1H, H-2). Gefunden: C, 44,19, H, 5,34, N, 11,30%. $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_2\text{OBr}$ (wasserfreies M = 245,12) erfordert C, 44,10, H, 5,35, N, 11,43%.

[0089] Die Verbindung 4 konnte auch durch die Reduktion von 1-(2-Propyl)-3-carboxamidopyridiniumiodid hergestellt werden. Dieses wurde durch das Erhitzen einer Mischung von Nicotinamid (2,0 g, 16,4 mmol) und 2-Iodpropan (3,0 ml, 30,0 mmol) in DMF (5,0 ml) für 4 h bei 90–95°C hergestellt. Es wurde Ethylacetat (50 ml) zu der gekühlten Lösung gegeben, und die Mischung wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde filtriert, und der Feststoff wurde an der Pumpe getrocknet und aus wässrigem Ethanol umkristallisiert, wodurch 1-(2-Propyl)-3-carboxamidopyridiniumiodid in Form gelber Kristalle erhalten wurde (1,1 g, 23%); Schmp. 188–189°C. Gefunden: C, 37,16, H, 4,55, N, 9,53%. $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_2\text{OI}$ (wasserfreies M = 292,12) erfordert C, 37,01, H, 4,49, N, 9,59%.

Verbindung 5

[0090] Die Verbindung 5, 1-(3-Hydroxypropyl)dihydronicotinamid, wurde aus 1-(3-Hydroxypropyl)-3-carboxa-

midopyridiniumbromid nach dem für die Verbindung 1 beschriebenen Reduktionsverfahren hergestellt. NMR (D_2O , 270 MHz, 20°C) d 1,89 (br Quintett, $J \sim 6,6$ Hz, 2H, $NCH_2CH_2CH_2OH$), 3,17 (br t, $J = 1,8$ Hz, 2H, 4- CH_2), 3,38 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H, $NCH_2CH_2CH_2OH$), 3,74 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H, $NCH_2CH_2CH_2OH$), 4,95–5,05 (m, 1H, H-5), 6,01 (dm, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-6), 7,13 (s, 1H, H-2).

[0091] Das Ausgangsmaterial 1-(3-Hydroxypropyl)-3-carboxamidopyridiniumbromid wurde wie folgt hergestellt. Eine Lösung von Nicotinamid (12,21 g, 0,10 mol) und 3-Brom-1-propanol (13,90 g, 0,10 mol) in DMF (20 cm³) wurde 1 h gerührt und auf 90°C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur über Nacht wurde die Mischung filtriert, und der Feststoff wurde mit kaltem DMF (10 cm³) und dann trockenem Diethylether (2 × 25 cm³) gewaschen. Die Umkristallisation aus DMF ergab 1-(3-Hydroxypropyl)-3-carboxamidopyridiniumbromid (19,29 g, 74%) in Form farbloser Prismen; Schmp. 119,0–120,0°C; NMR (d_6 -DMSO, 270 MHz, 20°C) d 2,14 (br Quintett, $J \sim 6,2$ Hz, 2H, $N^+CH_2CH_2CH_2OH$), 3,48 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H, $N^+CH_2CH_2CH_2OH$), 4,77 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H, $N^+CH_2CH_2CH_2OH$), 8,18 (br s, langsamer D_2O -Austausch, 1H, $CONH_aH_b$), 8,28 (dd, $J = 8,1$ Hz, $J = 5,9$ Hz, 1H, H-5), 8,63 (br s, langsamer D_2O -Austausch, 1H, $CONH_aH_b$), 8,97 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-4), 9,26 (d, $J = 5,9$ Hz, 1H, H-6), 9,56 (s, 1H, H-2). Gefunden: C, 40,07, H, 5,17, N, 10,16%. $C_9H_{13}N_2O_2Br \cdot 0,5H_2O$ (wasserfreies M = 261,12) erfordert C, 40,02, H, 5,22, N, 10,37%.

Verbindung 6

[0092] Die Verbindung 6, 1-(2-Hydroxyethyl)dihydronicotinamid, wurde aus 1-(2-Hydroxyethyl)-3-carboxamidopyridiniumiodid nach dem für die Verbindung 1 beschriebenen Reduktionsverfahren hergestellt.

[0093] Das Ausgangsmaterial 1-(2-Hydroxyethyl)-3-carboxamidopyridiniumiodid wurde durch das Erhitzen einer Mischung von Nicotinamid (2,0 g, 16,4 mmol) und 2-Iodethanol (2,6 ml, 33,3 mmol) in DMF (5 ml) für 4 h auf 90–95°C hergestellt. Es wurde Ethylacetat (50 ml) zu der gekühlten Lösung gegeben, und die Mischung wurde bei Raumtemperatur 30 min gerührt. Die Mischung wurde filtriert, und der Feststoff wurde an der Pumpe getrocknet und aus Methanol umkristallisiert, wodurch 1-(2-Hydroxyethyl)-3-carboxamidopyridiniumiodid in Form farbloser Kristalle erhalten wurde (3,8 g, 79%); Schmp. 128–129°C; NMR (d_6 -DMSO, 270 MHz, 20°C) d 3,90 (br t, $J = 7,3$ Hz, 2H, $N^+CH_2CH_2OH$), 5,21 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H, $N^+CH_2CH_2OH$), 8,17 (br s, langsamer D_2O -Austausch, 1H, $CONH_aH_b$), 8,32 (dd, $J = 8,1$ Hz, $J = 6,2$ Hz, 1H, H-5), 8,56 (br s, langsamer D_2O -Austausch, 1H, $CONH_aH_b$), 8,98 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-4), 9,16 (d, $J = 6,2$ Hz, 1H, H-6), 9,43 (s, 1H, H-2). Gefunden: C, 33,06, H, 3,85, N, 9,57%. $C_8H_{11}N_2O_2I$ (wasserfreies M = 294,09) erfordert C, 32,67, H, 3,77, N, 9,53%.

Verbindung 7

[0094] Die Verbindung 7, 1-(2-Carboxyethyl)dihydronicotinamid, wurde aus 1-(2-Carboxyethyl)-3-carboxamidopyridiniumiodid nach dem für die Verbindung 1 beschriebenen Reduktionsverfahren hergestellt. NMR (D_2O , 270 MHz, 20°C) 2,46 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H, $NCH_2CH_2CO_2H$), 2,96 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H, $NCH_2CH_2CO_2H$), 4,85–4,95 (m, 1H, H-5), 7,33–7,31 (m), 8,19–8,24 (m), 8,29–9,05 (m), 9,36 (s).

[0095] Das Ausgangsmaterial 1-(2-Carboxyethyl)-3-carboxamidopyridiniumiodid wurde durch das Erhitzen einer Mischung von Nicotinamid (2,0 g, 16,4 mmol) und 3-Iodpropionsäure (3,3 g, 16,5 mmol) in DMF (5 ml) für 4 h bei 90–95°C hergestellt. Es wurde Ethylacetat (50 ml) zu der gekühlten Lösung gegeben, und die Mischung wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde filtriert, und der Feststoff wurde an der Pumpe getrocknet und aus wässrigem Ethanol umkristallisiert, wodurch 1-(2-Carboxyethyl)-3-carboxamidopyridiniumiodid in Form farbloser Kristalle erhalten wurde (2,4 g, 46%); Schmp. 185–186°C. Gefunden: C, 33,80, H, 3,45, N, 8,57%. $C_9H_{11}N_2O_3I$ (wasserfreies M = 322,10) erfordert C, 33,56, H, 3,44, N, 8,70%.

Verbindung 8

[0096] Die Verbindung 8, 1-Benzyl-dihydronicotinamid, wurde aus 1-Benzyl-3-carboxamidopyridiniumiodid nach dem für die Verbindung 1 beschriebenen Reduktionsverfahren hergestellt.

[0097] 1-Benzyl-3-carboxamidopyridiniumbromid wurde durch das Erhitzen einer Mischung von Nicotinamid (2,0 g, 16,4 mmol) und Benzylbromid (3,9 ml, 32,8 mmol) in DMF (5 ml) auf 55–60°C hergestellt. Nach 5 Minuten bildete sich ein schweres Präzipitat, und es wurde eine weitere Portion DMF (5 ml) zugegeben. Nach 30 min wurde die Mischung auf Raumtemperatur abgekühlt, und es wurde Ethylacetat (50 ml) zugegeben. Die Mischung wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt, dann wurde der Feststoff abfiltriert, an der Pumpe getrocknet und aus wässrigem Ethanol umkristallisiert, wodurch 1-Benzyl-3-carboxamidopyridiniumbromid in Form farbloser Prismen erhalten wurde (4,2 g, 85%); Schmp. 212–213°C; NMR (d_6 -DMSO, 270 MHz, 20°C) d

5,99 (s, 2H, N⁺CH₂Ph), 7,35–7,55 (m, 3H, H-3'/4'/5'), 7,55–7,70 (m, 2H, H-2'/6'), 8,22 (br s, langsamer D₂O-Austausch, 1H, CONH_aH_b), 8,32 (dd, J = 8,1 Hz, J = 6,2 Hz, 1H, H-5), 8,68 (br s, langsamer D₂O-Austausch, 1H, CONH_aH_b), 9,03 (d, J = 8,1 Hz, 1H, H-4), 9,39 (d, J = 6,2 Hz, 1H, H-6), 9,74 (s, 1H, H-2). Gefunden: C, 53,35, H, 4,48, N, 9,40%. C₁₃H₁₃N₂OB (wasserfreies M = 293,16) erfordert C, 53,26, H, 4,47, N, 9,56%.

Verbindung 9

[0098] Die Verbindung 9, 1-Methyldihydronicotinamid, wurde aus 1-Methyl-3-carboxamidopyridiniumiodid nach dem für die Verbindung 1 beschriebenen Reduktionsverfahren hergestellt.

[0099] Das Ausgangsmaterial 1-Methyl-3-carboxamidopyridiniumiodid wurde von Sigma-Aldrich Chemical Company, Poole Dorset, GB, bezogen. NMR (d₆-DMSO, 270 MHz, 20°C) d 4,41 (s, 3H, N⁺CH₃), 8,16 (br s, langsamer D₂O-Austausch, 1H, CONH_aH_b), 8,26 (dd, J = 8,4 Hz, J = 6,2 Hz, 1H, H-5), 8,52 (br s, langsamer D₂O-Austausch, 1H, CONH_aH_b), 8,91 (d, J = 8,4 Hz, 1H, H-4), 9,12 (d, J = 6,2 Hz, 1H, H-6), 9,41 (s, 1H, H-2).

Verbindung 10

[0100] Die Verbindung 10, 1-Ethyldihydronicotinamid, wurde aus 1-Ethyl-3-carboxamidopyridiniumiodid nach dem für die Verbindung 1 beschriebenen Reduktionsverfahren hergestellt.

[0101] Das Ausgangsmaterial 1-Ethyl-3-carboxamidopyridiniumiodid wurde durch das Erhitzen einer Mischung von Nicotinamid (2,0 g, 16,4 mmol) und 1-Iodethan (2,6 ml, 32,5 mmol) in DMF (5 ml) für 3 h bei 55–60°C hergestellt. Nach dem Abkühlen wurde Ethylacetat (50 ml) zugegeben, und die Mischung wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde filtriert, und der blassgelbe Feststoff wurde an der Pumpe getrocknet und aus einer Mischung von DMF und Ethylacetat umkristallisiert, wodurch 1-Ethyl-3-carboxamidopyridiniumiodid in Form blassgelber Prismen erhalten wurde (3,7 g, 82%); Schmp. 202–203°C; NMR (d₆-DMSO, 270 MHz, 20°C) d 1,59 (t, J = 7,3 Hz, 3H, N⁺CH₂CH₃), 4,72 (q, J = 7,3 Hz, 2H, N⁺CH₂CH₃), 8,16 (br s, langsamer D₂O-Austausch, 1H, CONH_aH_b), 8,30 (dd, J = 8,1 Hz, J = 6,2 Hz, 1H, H-5), 8,53 (br s, langsamer D₂O-Austausch, 1H, CONH_aH_b), 8,93 (d, J = 8,1 Hz, 1H, H-4), 9,27 (d, J = 6,2 Hz, 1H, H-6), 9,50 (s, 1H, H-2). Gefunden: C, 34,11, H, 3,91, N, 9,80%. C₈H₁₁N₂OI (wasserfreies M = 278,09) erfordert C, 34,55, H, 3,99, N, 10,07%.

Verbindung 11

[0102] Die Verbindung 11, 1-Phenylethyldihydronicotinamid, wurde aus 1-Phenylethyl-3-carboxamidopyridiniumiodid nach dem für die Verbindung 1 beschriebenen Reduktionsverfahren hergestellt.

[0103] Das Ausgangsmaterial 1-Phenylethyl-3-carboxamidopyridiniumiodid wurde durch das Erhitzen einer Mischung von Nicotinamid (2,0 g, 16,4 mmol) und (2-Iodethyl)benzol (4,7 ml, 32,5 mmol) in DMF (5 ml) für 4 h bei 55–60°C hergestellt. Es wurde Ethylacetat (50 ml) zu der gekühlten Lösung gegeben, und die Mischung wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Der Feststoff wurde abfiltriert, an der Pumpe getrocknet und aus wässrigem Ethanol umkristallisiert, wodurch 1-Phenylethyl-3-carboxamidopyridiniumiodid in Form gelber Prismen erhalten wurde (3,8 g, 65%); Schmp. 188–189°C; NMR (d₆-DMSO, 270 MHz, 20°C) d 3,32 (t, J = 7,3 Hz, 2H, N⁺CH₂CH₂Ph), 4,93 (t, J = 7,3 Hz, 2H, N⁺CH₂CH₂Ph), 7,15–7,40 (m, 5H, H-2'/3'/4'/5'/6'), 7,55–7,70 (m, 2H, H-2'/6') 8,17 (br s, langsamer D₂O-Austausch, 1H, CONH_aH_b), 8,26 (dd, J = 8,1 Hz, J = 6,2 Hz, 1H, H-5), 8,52 (br s, langsamer D₂O-Austausch, 1H, CONH_aH_b), 8,93 (d, J = 8,1 Hz, 1H, H-4), 9,15 (J = 6,2 Hz, 1H, H-6), 9,47 (s, 1H, H-2).

[0104] Wir haben die Verbindungen 1–11 als potenzielle Cosubstrate für die NQO2 untersucht, und wir haben die vollständigen kinetischen Eigenschaften für die Verbindungen 1 und 2 bestimmt. Die experimentellen Details und die Ergebnisse sind weiter unten angegeben.

[0105] Von den Verbindungen 3, 8, 9 und 10 wurde in der Literatur berichtet (S Liao, JT Dulaney & HG Williams-Ashman, J. Biol. Chem., 237, 2981–2987, 1962; S Liao & HG Williams-Ashman, Biochem. Biophys. Res. Comm., 4, 208–213, 1961; S Liao & HG Williams-Ashman, Biochem. Pharmacol., 6, 53–54, 1961).

[0106] Die [Fig. 8a](#) zeigt, dass die Verbindung 8 und Nicotinsäuremononucleotid (reduziert) keine Cosubstrate für die NQO2 sind und dass die Verbindung 11 ein schlechtes Cosubstrat ist. Die [Fig. 4](#) zeigt, dass NADH und NADPH schlechte Cosubstrate für die NQO2 sind.

[0107] Der k_{kat} -Wert für die NQO2 mit NRH liegt bei 360 min^{-1} bei Verwendung von CB 1954 als Elektronen-akzeptor. Der K_m für diese Reaktion liegt bei ungefähr $30 \mu\text{M}$. Die neuen Cofaktoren sind mit Sicherheit sehr gut bezüglich der Reduktion von CB 1954 in Gegenwart der NQO2.

Bestimmung der Cosubstrataktivität mit der NQO2

[0108] Die Aktivität verschiedener potenzieller Cosubstrate wurde über eine HPLC-Analyse in Gegenwart von CB 1954 und NQO2 bestimmt. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurde die NQO2 ($1 \mu\text{g/ml}$) mit NRH ($5000 \mu\text{M}$) und CB 1954 in unterschiedlichen Konzentrationen ($0,1$ bis 2 mM) in Natriumphosphatpuffer (10 mM , pH 7) bei 37°C inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeiten wurden Aliquots ($10 \mu\text{l}$) auf eine Partisphäre-SCX-HPLC-Säule ($250 \times 4,5 \text{ mm}$) (Whatman Ltd.) injiziert und isokratisch mit 50 mM wässrigem Natriumphosphat, das 1% Methanol enthielt, eluiert ($1,5 \text{ ml/min}$). Die Extinktion des Eluats wurde kontinuierlich bei 320 nm registriert. Dieses Trennsystem konnte alle erwarteten Reduktionsprodukte von CB 1954 auftrennen [Boland et al., 1991, Knox et al., 1992]. Die Reduktion von CB 1954 wurde durch das Quantifizieren der Zunahme der Fläche des Peaks, der dem Reduktionsprodukt 5-(Aziridin-1-yl)-4-hydroxylamino-2-nitrobenzamid entsprach, registriert. Alle Tests wurden durch die Zugabe des Enzyms gestartet und doppelt durchgeführt. Die kinetischen Parameter wurden berechnet, indem die Anfangsgeschwindigkeit der Reduktion für jede Konzentration von CB 1954 gegen diese Konzentration aufgetragen wurde und die Daten mittels eines Computerprogramms (FigP) der Michales-Menten-Gleichung angepasst wurden. Die Werte wurden durch das Transformieren der Daten und ihre Anpassung an verschiedene Formen der linearen Gleichung über Regressionsanalysen bestätigt.

[0109] Die Wirkung verschiedener Cosubstrate auf die Reduktion von CB 1954 wurde wie oben bestimmt, aber NRH wurde durch das Cosubstrat ersetzt, und CB 1954 wurde in einer festen Konzentration von $100 \mu\text{M}$ eingesetzt. Die Enzymkonzentration lag bei 1 oder $5 \mu\text{g/ml}$. Die Reduktion von CB 1954 wurde über das Messen sowohl der Abnahme seiner entsprechenden Peakfläche der HPLC-Spur als auch der Zunahme der Fläche des Peaks, der dem Reduktionsprodukt 5-(Aziridin-1-yl)-4-hydroxylamino-2-nitrobenzamid entsprach, verfolgt. Die relativen Geschwindigkeiten der Reduktion wurden für eine Abnahme des CB 1954 um 10% aus einem Graphen bestimmt, bei dem die Abnahme des CB 1954 gegen die Zeit aufgetragen wurde. Die Zeitachse wurde auf ein Äquivalent von $10 \mu\text{g/ml}$ NQO2 normalisiert. Die kinetischen Parameter der NQO2 für die verschiedenen Cosubstrate wurden wie für CB 1954 bestimmt, außer dass die Ausgangskonzentration des CB 1954 konstant bei $100 \mu\text{M}$ lag, während diejenige des Cosubstrats von 0 bis 2 mM variiert wurde. Die Enzymkonzentration lag bei $0,5 \mu\text{g/ml}$.

[0110] Die [Fig. 8a–c](#) zeigen die Fähigkeit aller Verbindungen, als Cosubstrat zu wirken.

[0111] Die für die Verbindungen 1 und 2 ermittelten kinetischen Daten sind in der Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3: Die kinetischen Parameter der NQO2 für verschiedene Cosubstrate

Cosubstrat	$K_m (\mu\text{M})$	$k_{\text{kat}} (\text{min}^{-1})$
NRH	28 ± 2	360
2	198 ± 19	750
1	1080 ± 135	1530

Beispiel 6: Internalisierung von NQO2-Cosubstraten durch Zellen

[0112] Die Verbindung 1 trägt eine negative Ladung, weshalb wir nicht erwarteten, dass sie in die Zellen gelangt, und genau das wurde auch beobachtet. Die Verbindung 2 wird anscheinend schlecht internalisiert (ungefähr 10% des Wertes von NRH). Die schlechte Internalisierung könnte am intrazellulären Metabolismus liegen.

[0113] Die Aufnahme verschiedener NQO2-Cosubstrate in V79-Zellen wurde durch Fluorimetrie bestimmt. Die V79-Zellen wurden in T25-Gewebekulturflaschen ausgesät, und dann ließ man sie konfluent werden ($\sim 2 \times 10^7$ Zellen). Das Wachstumsmedium wurde entfernt und durch 10 ml frisches Medium ersetzt, das 1 mM Cosubstrat enthielt, und dann wurde bei 37°C inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeiten wurde das Medium entfernt,

und der Zellmonolayer wurde $5 \times$ mit 50 ml eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden durch Trypsinieren abgelöst und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in alkalischem Lysierpuffer (0,5 M KOH, 36% Gew./Vol. CsCl, in 50%igem wässrigem Ethanol) resuspendiert und durch schnelles Mischen aufgebrochen, und die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 10 000 g entfernt. Die Konzentration des Cosubstrats wurde fluorimetrisch bestimmt (Exzitation 360 nm, Emission 450 nm, Spalt 5 nm), indem 100 μ l Überstand mit 2,9 ml 100 mM Natriumbicarbonatpuffer, pH 10, verdünnt wurden. Das Fluorimeter wurde mit Hilfe eines geeigneten Standards kalibriert. Alle Messungen wurden dreifach durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der [Fig. 9](#) gezeigt.

[0114] Die [Fig. 9](#) zeigt die Aufnahme verschiedener Cosubstrate in Wildtyp-V79-Zellen. Die Verbindung 1 ist bei physiologischem pH geladen und wird aus den Zellen ausgeschlossen. Somit ist dieses Cosubstrat für MDEPT-Anwendung geeignet.

Beispiel 7: Zytotoxizität von CB 1954 in mit NQO2 transfizierten Zellen in Gegenwart von Cosubstraten

[0115] Wir haben die NQO2 in V79-Zellen (embryonale Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters) transfiziert und uns die Zytotoxizität von CB 1954 in Gegenwart von Cosubstraten angesehen.

Konstruktion des NQO2-Vectors H6

[0116] Die NQO2-Sequenz wurde von einem bakteriellen Expressionsplasmid, pKK-hNQO2, gewonnen, das im Beispiel 1 beschrieben wurde. Die Konstruktion umfasste folgende Schritte:

- 1) Der ORF der NQO2 wurde als ein NcoI/HindIII-Fragment aus pKK-hNQO2 herausgeschnitten, wobei die NcoI-Stelle das Startcodon enthielt.
- 2) Er wurde in den mit NcoI/HindIII geschnittenen F58 kloniert, wodurch der Vektor H1 erzeugt wurde. F58 ist ein Derivat des pBluescript II SK(+) (Stratagene), der bei uns erzeugt wurde, und enthält eine zusätzliche Xhol-Stelle, eine Kozak-Sequenz für eine gute eukaryotische Expression und eine NcoI-Stelle (CCTC-GAGTCACCATGGATATCnnn...), die in der Bluescript-EcoRV-Stelle insertiert ist.
- 3) Es wurde eine partielle Füllung mit 2 Basen eingesetzt, um die 3'-HindIII-Stelle des ORF der NQO2 mit der MCS-XbaI-Stelle des bicistronischen Puromycin-resistenten eukaryotischen IRES-Expressionsvektors F250 (AIRES-P, EMBL:Z75185 ([Fig. 10a](#)) zu verknüpfen. H1 und F250 wurden zuerst mit Xhol geschnitten, und die Plasmid-DNA wurde gereinigt. H1 wurde dann mit HindIII geschnitten und mit der Klenow-DNA-Polymerase in Gegenwart von lediglich dA + dG behandelt, F250 wurde mit XbaI geschnitten und mit Klenow und lediglich dC + dT behandelt. Der durch Xhol-[XbaI/CT] linearisierte F250 und das Xhol-[HindIII/AG]-nqo2-Insert wurden dann zur Erzeugung des fertigen Expressionsvektors H6 zusammenligiert ([Fig. 10b](#)).

Transfektion von V79-Zellen

[0117] H6-DNA von Transfektionsqualität wurde mittels des endotoxinfreien Maxiprep-Kits von QIAGEN hergestellt. Embryonale Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters (V79) wurden mit dem gereinigten H6 unter Verwendung des DOTAP-Liposomenreagens gemäß den Angaben des Herstellers (Boehringer Mannheim) transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden Puromycin-resistente Klone in DMEM/10% FCS mit 10 μ g/ml Puromycin (Sigma) selektiert und weitergezüchtet, um Zelllinien zu etablieren, die V79TM1, -5, -3, -7, -9, -11 und -13 genannt und in selektivem Medium gehalten wurden.

Analyse der Zytotoxizität in vitro

[0118] Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase wurden trypsinisiert, in einer Dichte von 5×10^4 Zellen pro Well (100 μ l) in 96-Well-Platten ausgesät, und dann ließ man sie sich 24 Stunden erholen. Dann wurden 50 μ l Medium entnommen und durch 50 μ l frisches Medium ersetzt, das 200 μ M NRH enthielt, so dass eine Endkonzentration von 100 μ M erzielt wurde. Es wurde eine Verdünnungsreihe von CB 1954 (8 mal 3,66-fach), die Endkonzentrationen von 1000–0,46 μ M lieferte, in situ hergestellt. Die Zellen wurden dann mit dem Arzneimittel 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden fixiert und mit Sulforhodamin-B gefärbt. Die Extinktion bei 590 nm wurde bestimmt, und die Ergebnisse wurden als Prozent des Wachstums der Kontrolle ausgedrückt. Die IC₅₀-Werte wurden durch Interpolation ermittelt. Als Kontrolle wurden nicht-transfizierte V79-Zellen wie oben behandelt, aber in diesem Falle enthielt das Medium kein Puromycin. Die Wachstumskurven sind in der [Fig. 11](#) gezeigt.

[0119] Die [Fig. 11](#) zeigt die Wirkung von NRH auf die Zytotoxizität von CB 1964 in NQO2-exprimierenden V79-Zellen. Die Zugabe von NRH erhöhte die Zytotoxizität von CB 1954 um wenigstens das 100-fache

(V79TM13), und sie war höher als das 100-fache in der V79TM5- und -13-Zelllinie. Diese Wirkung wurde in nicht-transfizierten V79-Zellen nicht gesehen (< 3-fach) und kann somit der Expression der NQO2 in den transfizierten Zellen zugeschrieben werden.

Beispiel 8: Zytotoxizität von CB 1954 in T98G-Glioblastomzellen in Gegenwart von NQO2-Cosubstrat

[0120] Wir haben die Zytotoxizität von CB 1954 in Gegenwart von entweder NRH, der Verbindung 1 oder der Verbindung 2 in der Glioblastomzelllinie T98G untersucht. CB 1954 allein war für diese Zellen nicht toxisch. Die Zytotoxizität von CB 1954 wurde um das wenigstens 100-fache erhöht, wenn die Zellen mit CB 1954 und entweder NRH oder der Verbindung 2 inkubiert wurden. In Gegenwart der Verbindung 1, die nicht imstande ist, in die Zellen zu gelangen, wird keine Potenzierung beobachtet. Die Schlussfolgerung ist, dass die NQO2 in den Zellen vorhanden ist und ihre Aktivierung von CB 1954 die Ursache der Zytotoxizität ist.

[0121] Die Ergebnisse sind in der [Fig. 12](#) gezeigt.

[0122] Die [Fig. 12](#) zeigt die Wirkung von NRH, der Verbindung 1 und der Verbindung 2 auf die Zytotoxizität von CB 1954 in menschlichen T98G-Glioblastomzellen. Die Zellen wurden wie die V79-Zellen behandelt, jedoch für 144 Stunden in Gegenwart von CB 1954. Die Zugabe von NRH und der Verbindung 2 erhöhte die Zytotoxizität von CB 1954 um wenigstens das 100-fache, während die impermeable Cosubstrat-Verbindung 1 keine Potenzierung bewirkte.

Beispiel 9: Selektivität der NQO2-Cosubstrate und In-vivo-Toxizität

Selektivität der neuen Cosubstrate

[0123] Die [Fig. 13](#) und [Fig. 14](#) zeigen die Fähigkeit anderer CB-1954-reduzierender Enzyme (der Nitroreduktase aus *E. coli* und der DT-Diaphorase der Ratte) zur Verwendung der neuen Cosubstrate. Im Gegensatz zur NQO2 können beide Enzyme NADH als Cosubstrate für die Reduktion von CB 1954 verwenden. Die Daten zeigen, dass die DT-Diaphorase der Ratte imstande ist, sowohl die Verbindung 1 als auch die Verbindung 2 als Cosubstrat in der Reduktion einzusetzen. Allerdings ist die Nitroreduktase aus *E. coli* nicht imstande, eine von ihnen zu verwenden. Somit zeigen die neuen Cosubstrate eine gewisse Selektivität und sind keine generellen Elektronendonatoren.

[0124] Die [Fig. 15](#) und [Fig. 16](#) zeigen die Wirkung der Verbindung 1 auf das Körpergewicht normaler Mäuse.

[0125] Die [Fig. 17](#) und [Fig. 18](#) zeigen die Wirkung der Verbindung 2 auf das Körpergewicht normaler Mäuse. Mäusen (6 Gruppen aus jeweils 3) wurde intravenös (Schwanzvene) entweder die Verbindung 1 oder die Verbindung 2 in den gezeigten Dosen injiziert, und das Gewicht der Mäuse wurde über einen Zeitraum von 8 Tagen registriert. Kontrollmäuse erhielten lediglich den Träger (Phosphat-gepufferter Saline).

[0126] Die Verbindungen 1 und 2 zeigen keine Hinweise auf eine inhärente Toxizität für Mäuse, wie aus der Körpergewichtsabnahme hervorgeht.

ZITIERTE LITERATURSTELLEN

Anlezark, G. M., Melton, R. G., Sherwood, R. F., Coles, B., Friedlos, F. und Knox, R. J. (1992) „The bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB 1954) – I. Purification and properties of a nitroreductase enzyme from *Escherichia coli* – a potential enzyme for antibodydirected enzyme prodrug therapy (ADEPT)”, Biochem Pharmacol 44, 2289–95

Boland, M. P., Knox, R. J. und Roberts, J. J. (1991) „The differences in kinetics of rat und human DT diaphorase result in a differential sensitivity of derived cell lines to CB 1954 (5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide)”, Biochem Pharmacol 41, 867–75

Chen, H. H., Ma, J. X., Forrest, G. L., Deng, P. S., Martino, P. A., Lee, T. D. und Chen, S. (1992) „Expression of rat liver NAD(P)H:quinone-acceptor oxidoreductase in *Escherichia coli* and mutagenesis in vitro at Arg-177”, Biochem J 284, 855–60

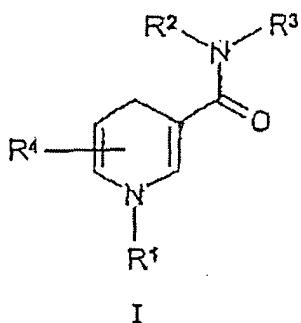
Chen, S., Knox, R. J., Wu, K., Deng, P. S. K., Zhou, D., Biancher, M. A. und Amzel, L. M. (1997) „Molecular basis of the catalytic differences among DT diaphorase of human, rat und mouse”, Journal of Biological Chemistry 272, 1437–1439

Connors, T. A. und Knox, R. J. (1995) „Prodrugs in medicine”, Expert Opinion on Therapeutic Patents 5, 873–885

- Connors, T. A. und Whisson, M. E. (1966) „Cure of mice bearing advanced plasma cell tumours with aniline mustard: the relationship between glucuronidase activity and tumour sensitivity“, Nature 210, 866–7
- Friedlos, F., Biggs, P. J., Abrahamson, J. A. und Knox, R. J. (1992a) „Potentiation of CB 1954 cytotoxicity by reduced pyridine nucleotides in human tumour cells by stimulation of DT diaphorase activity“, Biochem Pharmacol 44, 1739–43
- Friedlos, F., Jarman, M., Davies, L. C., Boland, M. P. und Knox, R. J. (1992b) „Identification of novel reduced pyridinium derivatives as synthetic co-factors for the enzyme DT diaphorase (NAD(P)H dehydrogenase (quinone), EC 1.6.99.2)“, Biochem Pharmacol 44, 25–31
- Friedlos, F. und Knox, R. J. (1992) „Metabolism of NAD(P)H by blood components. Relevance to bioreductively activated prodrugs in a targeted enzyme therapy system“, Biochem Pharmacol 44, 631–5
- Jaiswal, A. K. (1994) „Human NAD(P)H:quinone oxidoreductase 2. Gene structure, activity, and tissue-specific expression“, J Biol Chem 269, 14502–8
- Jaiswal, A. K., Burnett, P., Adesnik, M. und Wesley, M. O. (1990) „Nucleotide and deduced amino acid sequence of a human cDNA (NQO-2) corresponding to a second member of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene family. Extensive polymorphism at the NQO-2 gene locus on chromosome 6“, Biochemistry 29, 1899–1906
- Knox, R. J., Friedlos, F. und Boland, M. P. (1993) „The bioactivation of CB 1954 and its use as a prodrug in antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT)“, Cancer Metastasis Rev 12, 195–212
- Knox, R. J., Friedlos, F., Jarman, M., Davies, L. C., Goddard, P., Anlezark, G. M., Melton, R. G. und Sherwood, R. F. (1995) „Virtual cofactors for an Escherichia coli nitroreductase enzyme – relevance to reductively activated prodrugs in antibody-directed enzyme prodrug therapy (adept)“, Biochemical Pharmacology 49, 1641–1647
- Knox, R. J., Friedlos, F., Sherwood, R. F., Melton, R. G. und Anlezark, G. M. (1992) „The bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB 1954) – II. A comparison of an Escherichia coli nitroreductase and Walker DT diaphorase“, Biochem Pharmacol 44, 2297–301
- Mauger, A. B., Burke, P. J., Soman, H. H., Friedlos, F. und Knox, R. J. (1994) „Self-immolative prodrugs: candidates for antibody-directed enzyme prodrug therapy in conjunction with a nitroreductase enzyme“, J Med Chem 37, 3452–8
- Quinn, J. (1996) „Studies on CB 1954 and its analogues“, Doktorarbeit: Universität London.
- Sharma, S. K., Bagshawe, K. D., Burke, P. J., Boden, R. W und Rogers, G. T. (1990) „Inactivation and clearance of an anti-CEA carboxypeptidase G2 conjugate in blood after localisation in a xenograft model“, Br J Cancer 61, 659–662
- Whisson, M. E. und Connors, T. A. (1965) „Cure of mice bearing advanced plasma cell tumours with aniline mustard“, Nature 206, 689–91
- Wu, K., Knox, R., Sun, X. Z., Joseph, P., Jaiswal, A. K., Zhang, D., Deng, P. S.-K., Chen, S. (1997) „Catalytic properties of NAD(P)H:quinone oxidoreductase-2 (NQO2), a dihydronicotinamide riboside dependent oxidoreductase“, Arch Biochem Biophys 347, 221–228

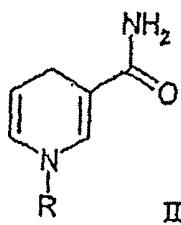
Patentansprüche

1. Therapeutisches System, das umfasst: ein Pro-Pharmakon, das durch die Wirkung der NQO2 in ein beträchtlich zytotoxisches Pharmakon umgewandelt werden kann, und ein Analoges von Nicotinamidribosid (reduziert) (NRH) mit der Formel I, das Reduktionsäquivalente auf die NQO2 übertragen kann,



wobei R¹ ausgewählt ist aus substituiertem Alkyl, einschließlich einer Substitution durch CONH₂, OH, Halogen, CN oder COOH; Aryl; substituiertem Aryl; CONR^aR^b, wobei R^a und R^b unabhängig voneinander H, Alkyl oder substituiertes Alkyl sind; und R² und R³ sind unabhängig voneinander H, Alkyl oder substituiertes Alkyl, und R⁴ ist ein beliebiges von H, Alkyl, substituiertem Alkyl, Halogen, CN, COOH, CONH₂ oder OH.

2. System gemäß Anspruch 1, wobei das Analoge von NRH die Formel II hat



wobei R substituiertes Alkyl ist, einschließlich einer Substitution durch CONH₂, OH, Halogen, CN oder COOH.

3. System gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die Alkylgruppe C₁- bis C₆-Alkyl ist.
4. System gemäß Anspruch 2 oder Anspruch 3, wobei R aus der Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus -CH₂CONH₂, -CH₂CH₂CH₂SO₃⁻, -CH₂CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂OH und -CH₂CH₂COOH.
5. System gemäß Anspruch 4, wobei das Analoge von NRH 1-(Carboxamidomethyl)dihydronicotinamid ist.
6. System gemäß einem beliebigen der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Pro-Pharmakon CB 1954 oder ein Analoges von diesem ist.
7. System gemäß Anspruch 6, wobei das Pro-Pharmakon CB 1954 ist.
8. Verwendung eines Analogen von Nicotinamidribosid (reduziert) (NRH), wie es in einem beliebigen der Ansprüche 1 bis 5 definiert ist, das Reduktionsäquivalente auf die NQO2 übertragen kann, bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines menschlichen Patienten mit einem Tumor, der behandelt werden soll, wobei dem Patienten ein Pro-Pharmakon verabreicht worden ist, wird oder werden wird, das durch die Wirkung der NQO2 in ein beträchtlich zytotoxisches Pharmakon umgewandelt wird.
9. Verwendung eines Pro-Pharmakons, das durch die Wirkung der NQO2 in ein beträchtlich zytotoxisches Pharmakon umgewandelt werden kann, bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines menschlichen Patienten mit einem Tumor, der behandelt werden soll, wobei dem Patienten ein Analoges von NRH, wie es in einem beliebigen der Ansprüche 1 bis 5 definiert ist, das Reduktionsäquivalente auf die NQO2 übertragen kann, verabreicht worden ist, wird oder werden wird.
10. Verwendung, wie sie im Anspruch 8 oder im Anspruch 9 definiert ist, wobei das Pro-Pharmakon CB 1954 oder ein Analoges von diesem ist.
11. Verwendung, wie sie im Anspruch 10 definiert ist, wobei das Pro-Pharmakon CB 1954 ist.

Es folgen 19 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

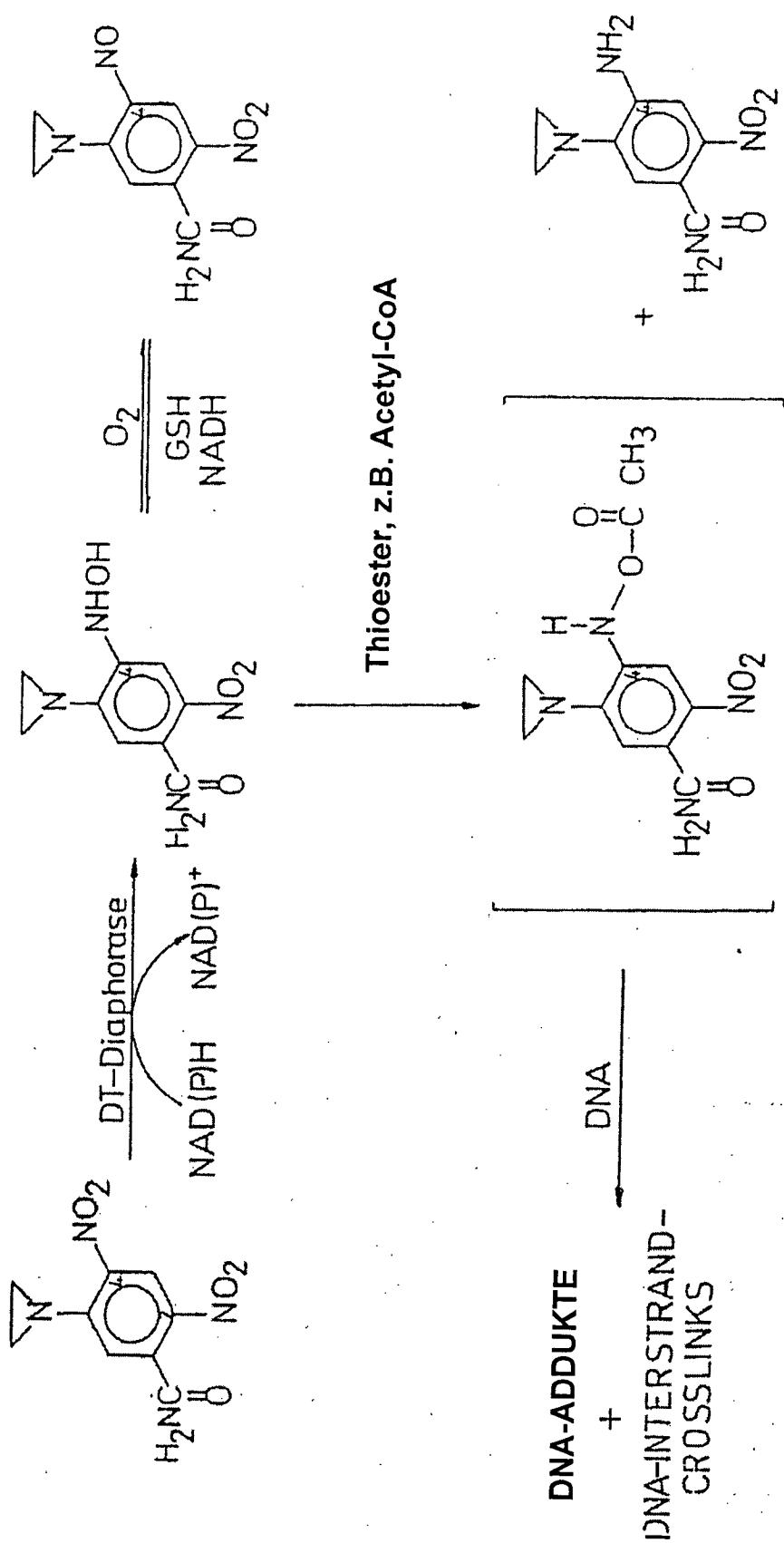
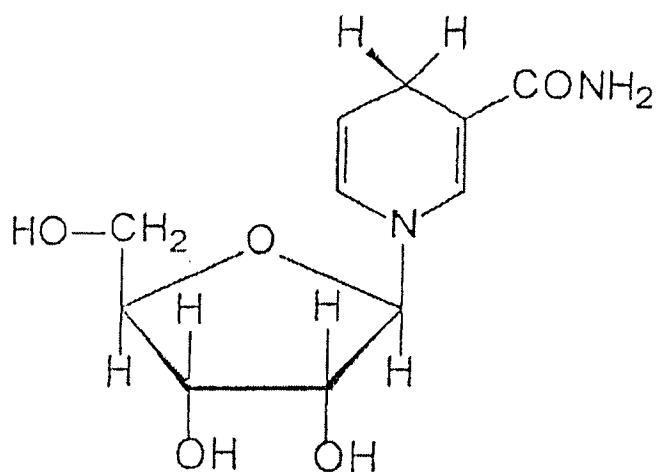


Fig. 1



$C_{11}H_{16}N_2O_5$
256.25
256.105921
C 51,6% H 6,3% N 10,9% O 31,2%

Fig. 2

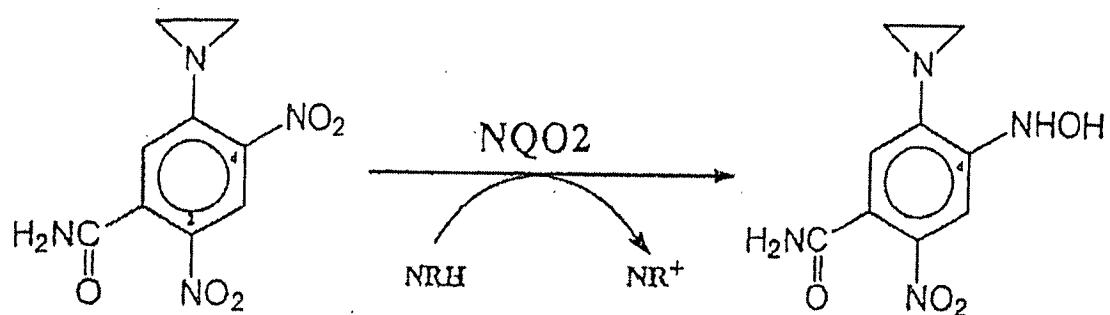


Fig. 3

REDUKTION VON CB 1954 DURCH DIE NQO2

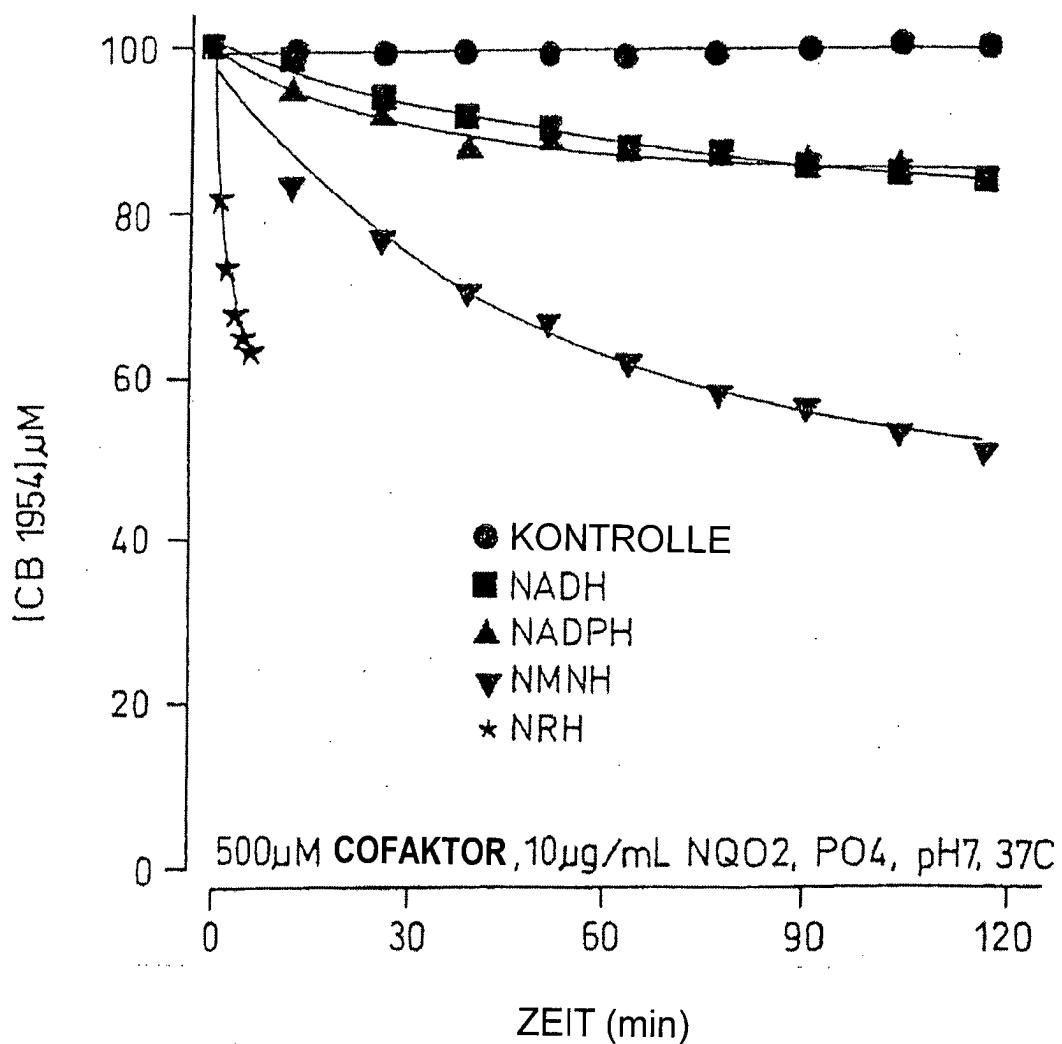


Fig. 4

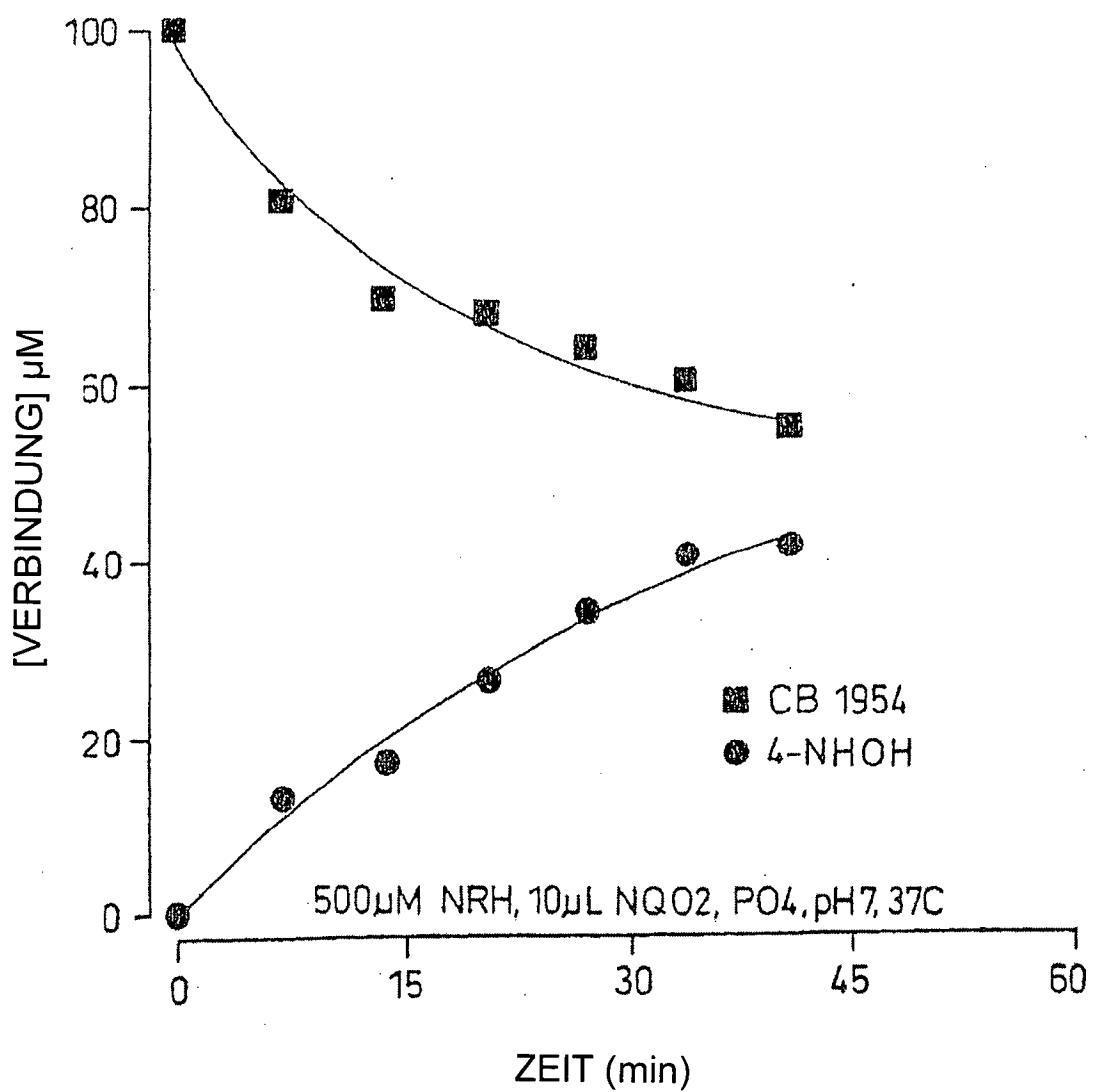
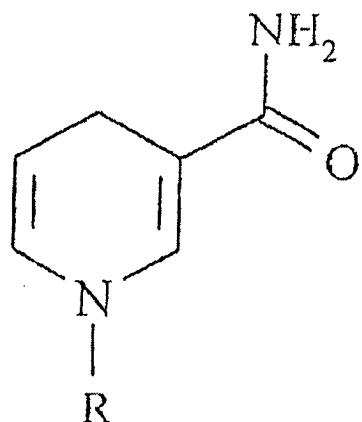


Fig. 5

B

ATGGCAGGTAAAGAAGTACTCATTTGCTTACACCGGAACCCAAAGTCCTTCACGGATCTTGAAAGA M A G K K V L I V Y A H Q E P K S F N G S L K N	245
ATGGGGCTGTAGATGAACTGAGGCCAGGGCTGCACGGGTCAAGTGTCTGATTGTGATGCCATGAACTT V A V D E L S R Q G C T V T V S D L Y A M N F	315
4	
TGAGCCCAGGGCACAGACAAAGATACTGTTCTAATCTGAGGTTTCAATTATGGAGTC E P R A T D K D I T G T L S N P E V F N Y G V	385
	70
GAAACCACGAAGCTACAAGCAAAGGTCTCTGGCTAGGGACATCACTGATGAGCAGAAAAGGTCTGGG E T H E A Y K Q R S L A S D I T D E Q K K V R E	455
AGGCTGACCTAGTGATATTTCAGTTCCGGCTGTACTGGGTCAAGCCTGGCCATCCTGAAAGGGCTGGAT A D L V I F Q F P L Y W F S V P A I L K G W M	525
	11
GGATAGGGCTGTGCCAGGGCTTGGCTTGGACATCCCAAGGATTCTACGATTCCGGTTGCTCCAGGGT D R V L C Q G F A F D I P G F Y D S G L L Q G	595
	140
AAACTAGGGCTCCCTTCCGTAACCAACGGGAGGCCACGGCCAGATGTACACGAAGACAGGACTAAATGGAG K L A L S V T T G G T A E M Y T K T G V N G D	665
	1
ATTCTCGATACTTCCCTGTGCCACTCCAGGACATTAACACTCTGTGGATTAAAGTCCTTGGCCCC S R Y F L W P L Q H G T L H F C G F K V L A P	735
	18
TCAGATCAGCTTGTCTGAAATTGCATCCGACATTAACACTCTGTGGATTAAAGTCCTTGGCCCC Q I S F A P E I A S E E E R K G M V L A P	805
	210
AGGCTGAGACCATTGGAAAGGAAAGGCCATCCCTGACAGCCACTTGGCAATAACTTCGGGAAATAACT R L Q T I W K E E P I P C T A H W F G Q <	873
	231

Fig. 6



Nummer der Verbindung	R
1	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻
2	-CH ₂ CONH ₂
3	-CH ₂ CH ₂ CH ₃
4	-CH(CH ₃) ₂
5	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH
6	-CH ₂ CH ₂ OH
7	-CH ₂ CH ₂ COOH
8	-CH ₂ C ₆ H ₅
9	-CH ₃
10	-CH ₂ CH ₃
11	-CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₅

Fig. 7

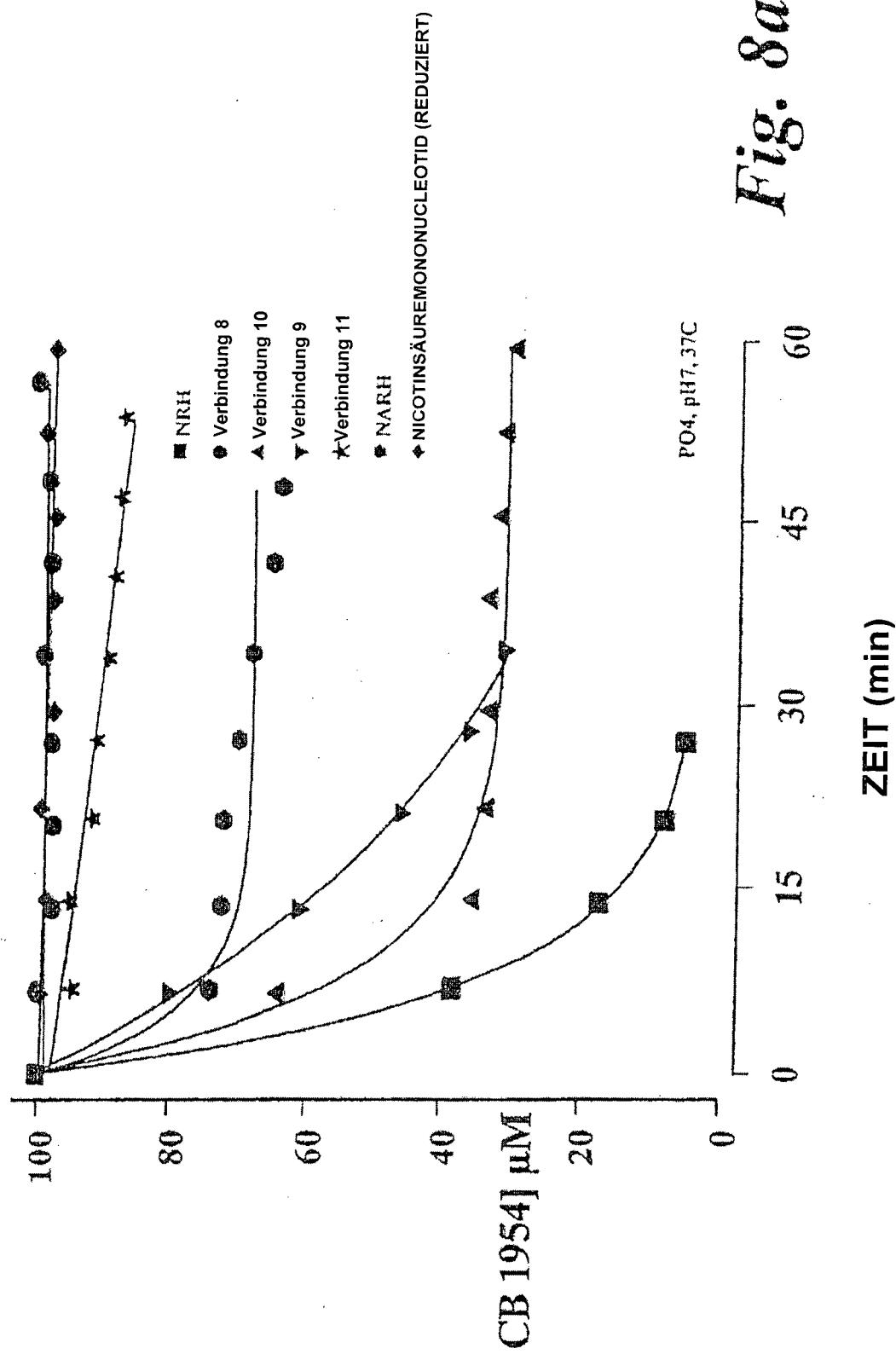


Fig. 8a

ZEIT (min)

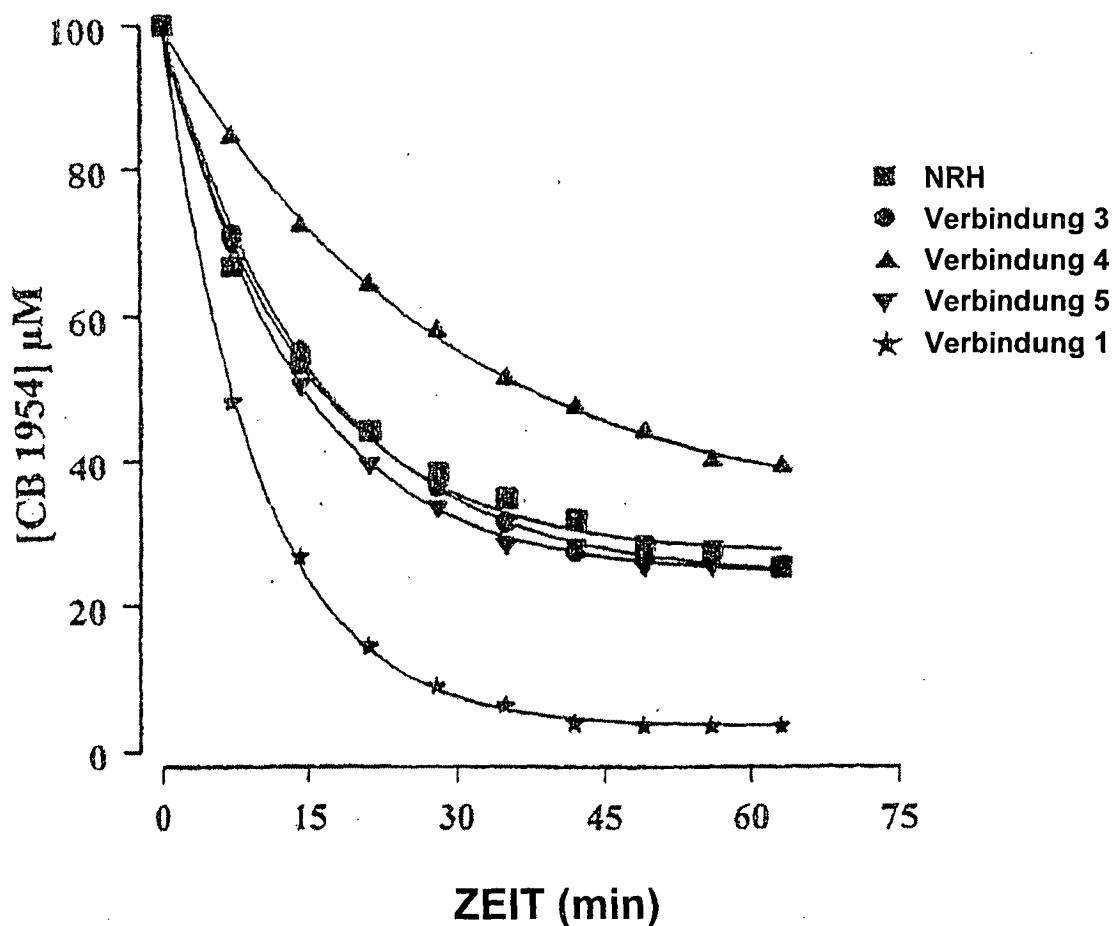


Fig. 8b

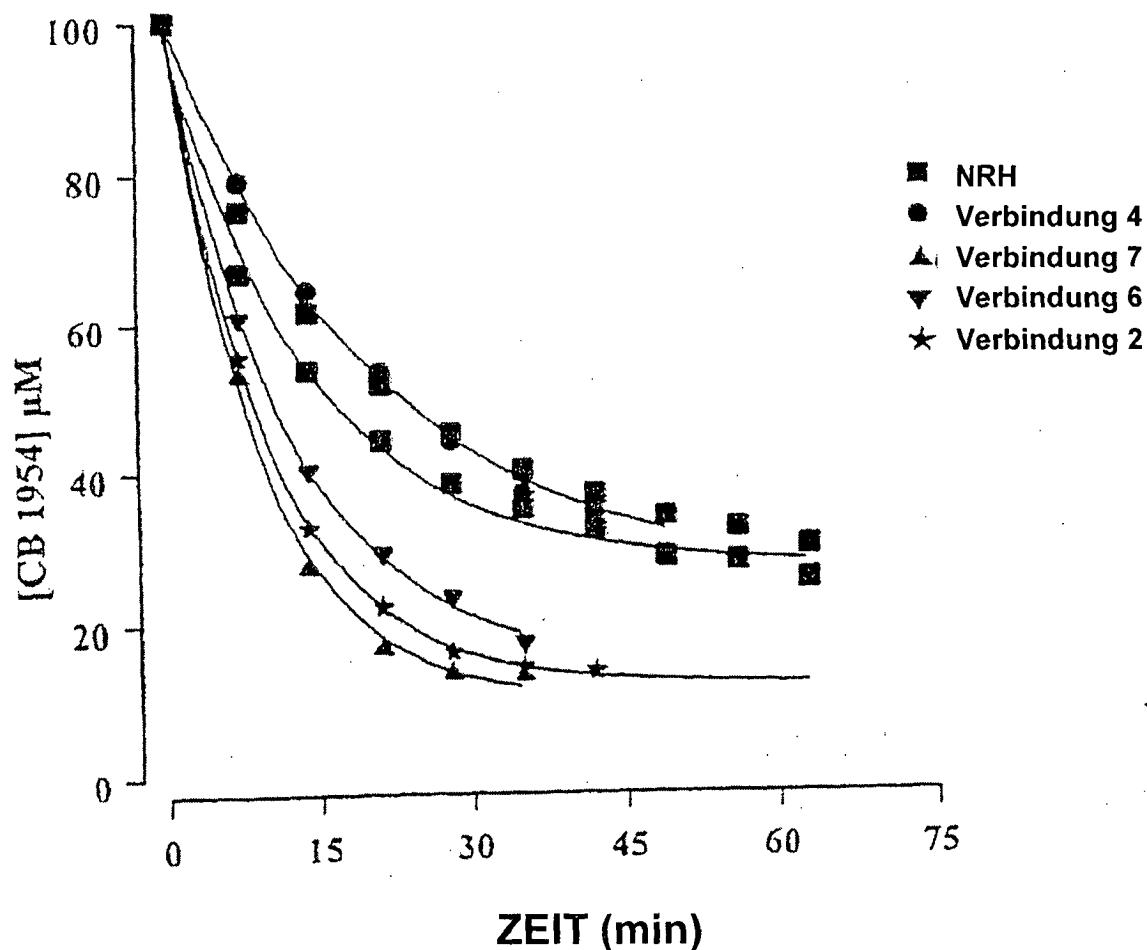


Fig. 8c

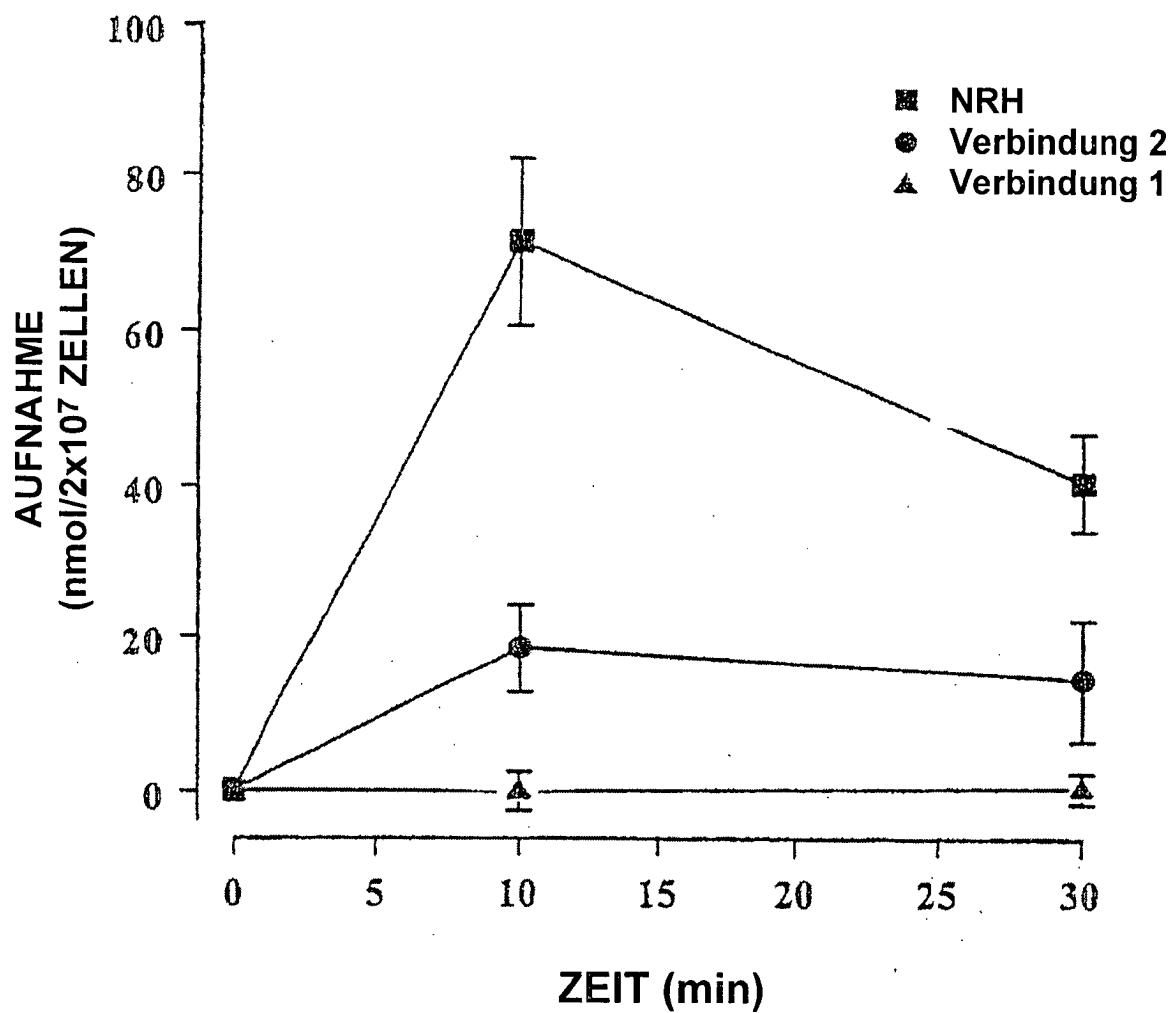


Fig. 9

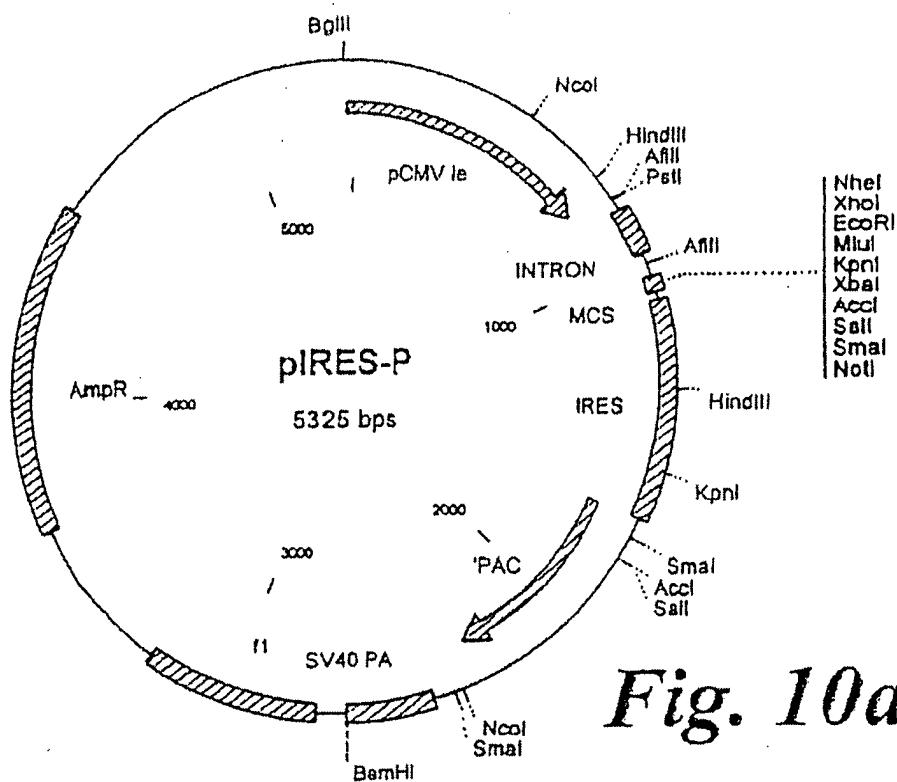


Fig. 10a

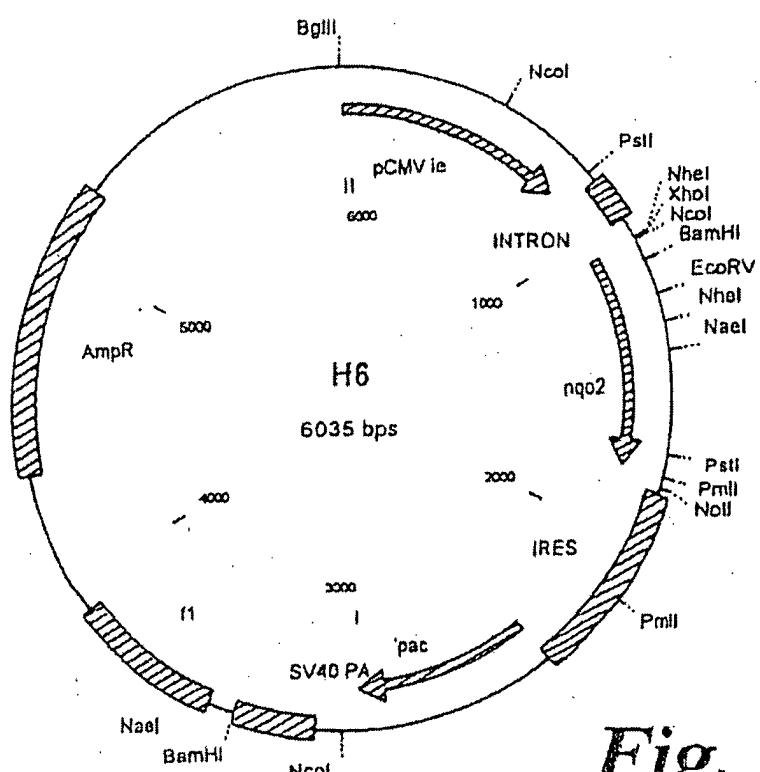


Fig. 10b

EMPFINDLICHKEIT MIT NQO2-TRANSFIZIERTER V79-ZELLEN GEGEN CB 1954 ± NRH

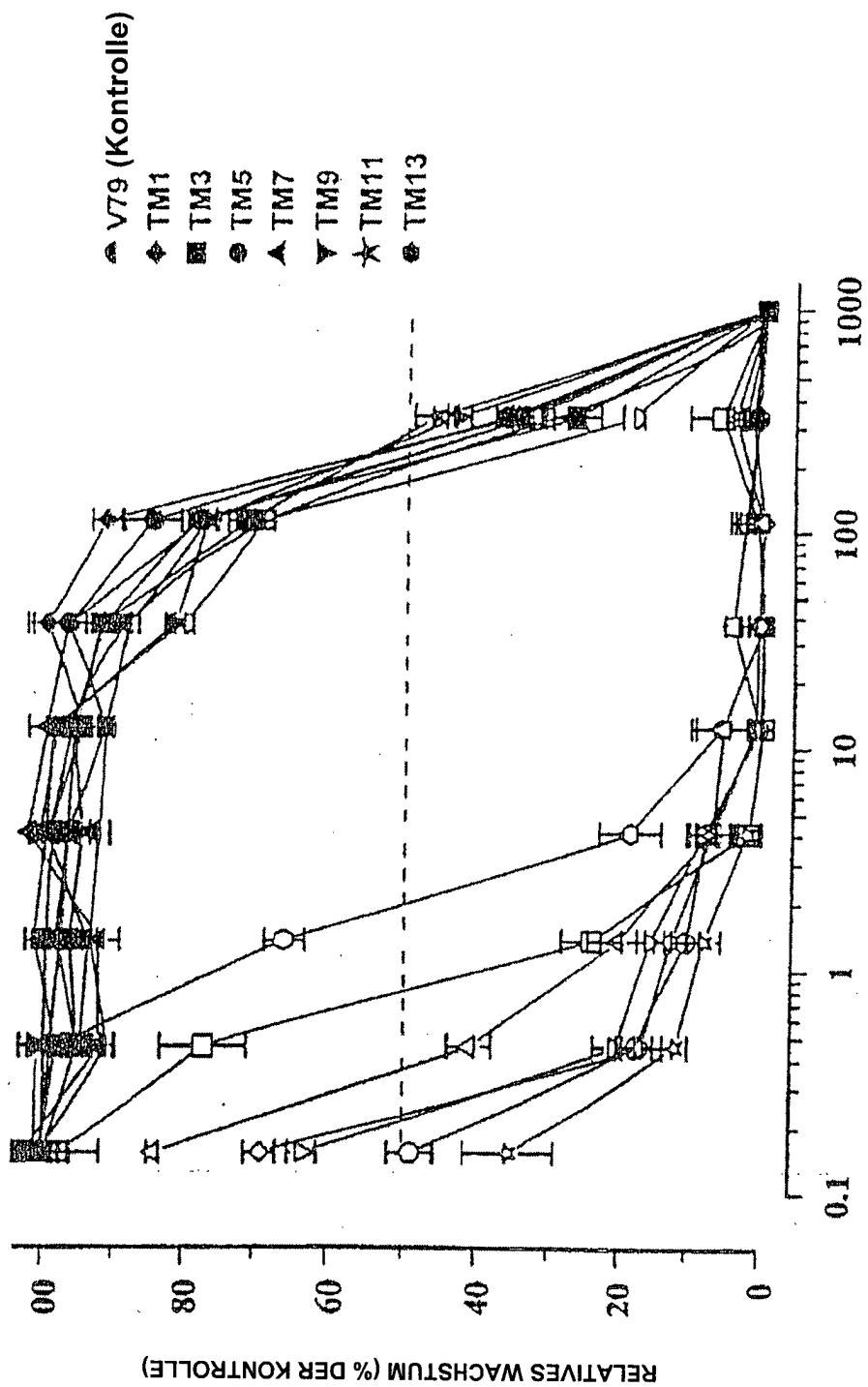


Fig. 11

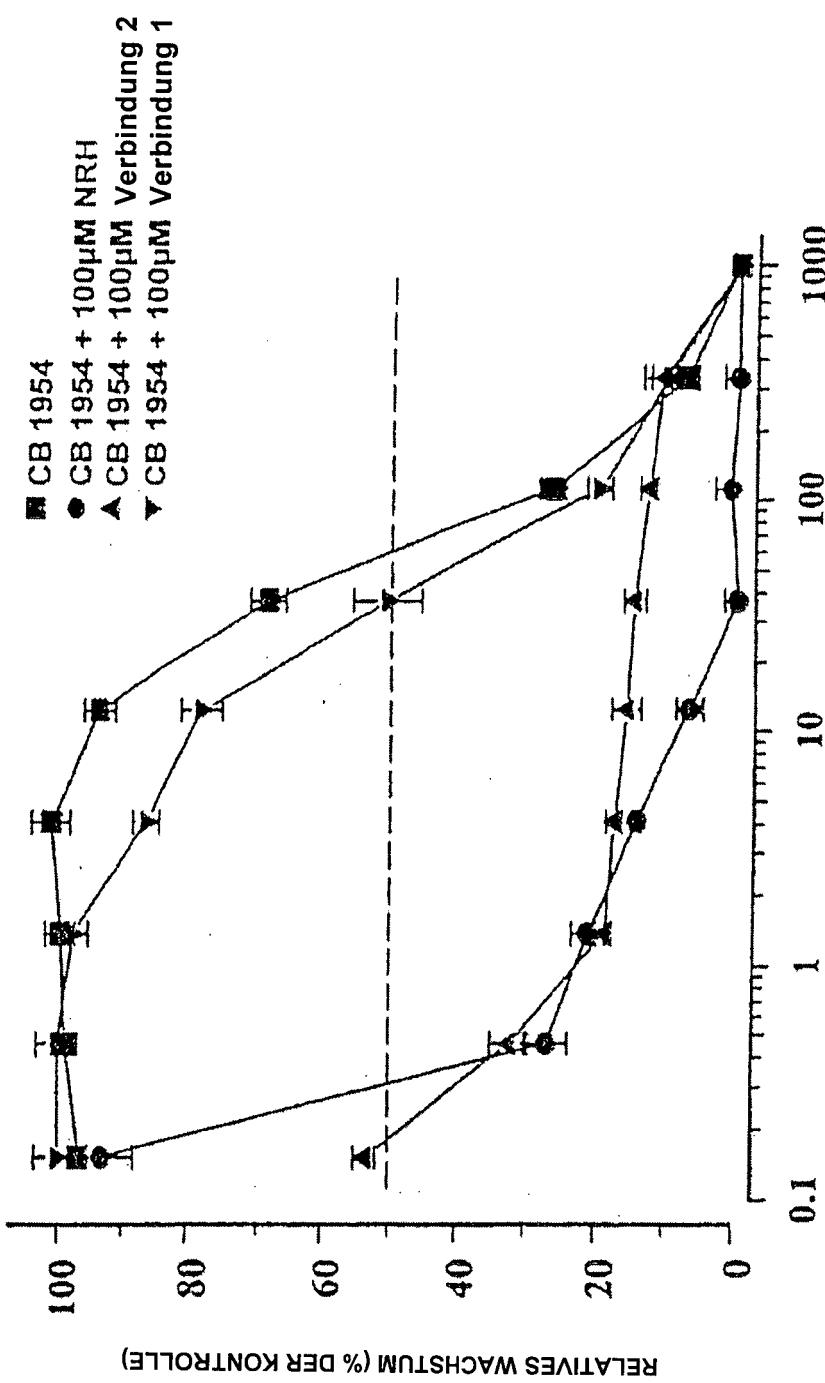
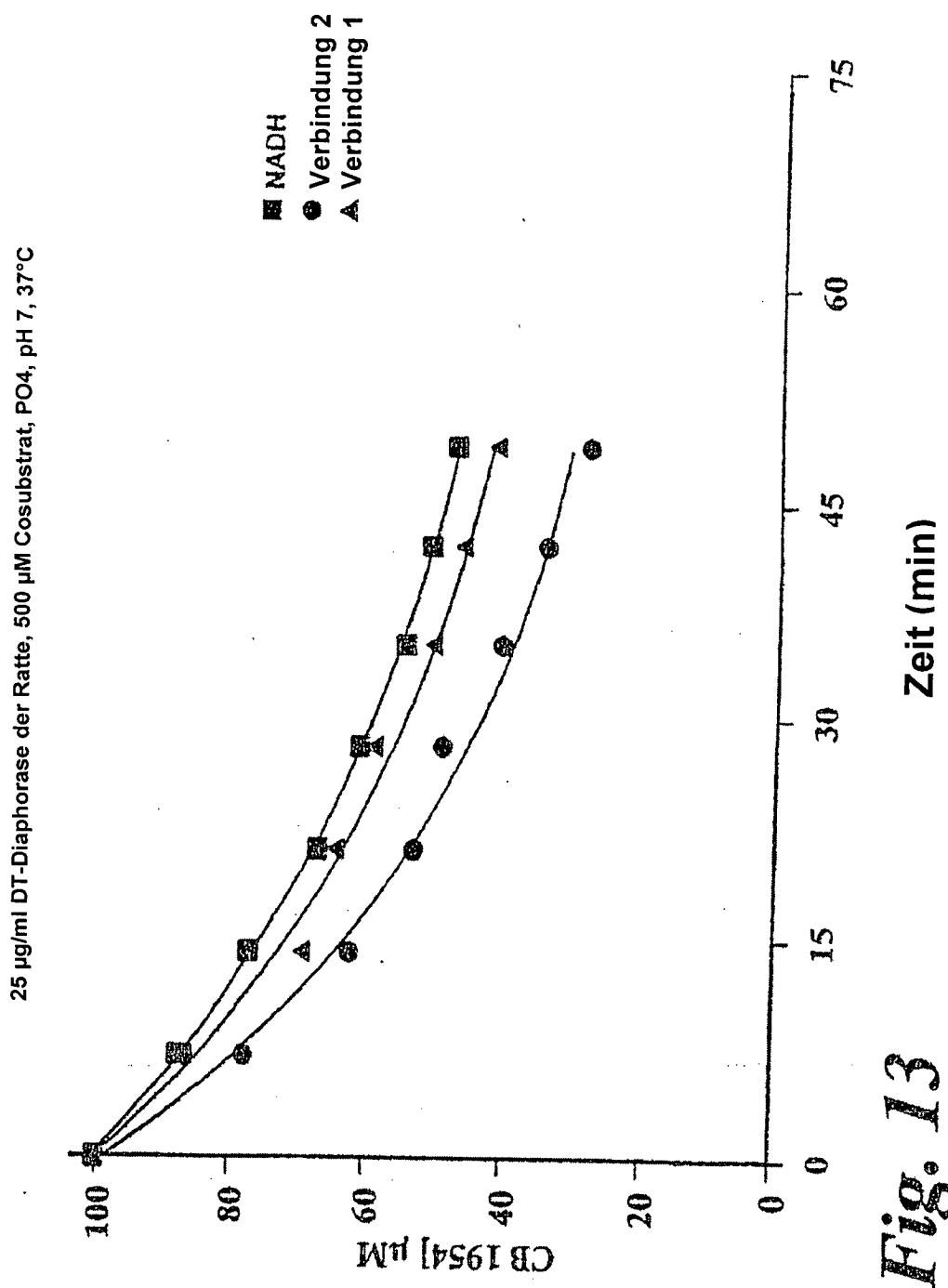


Fig. 12



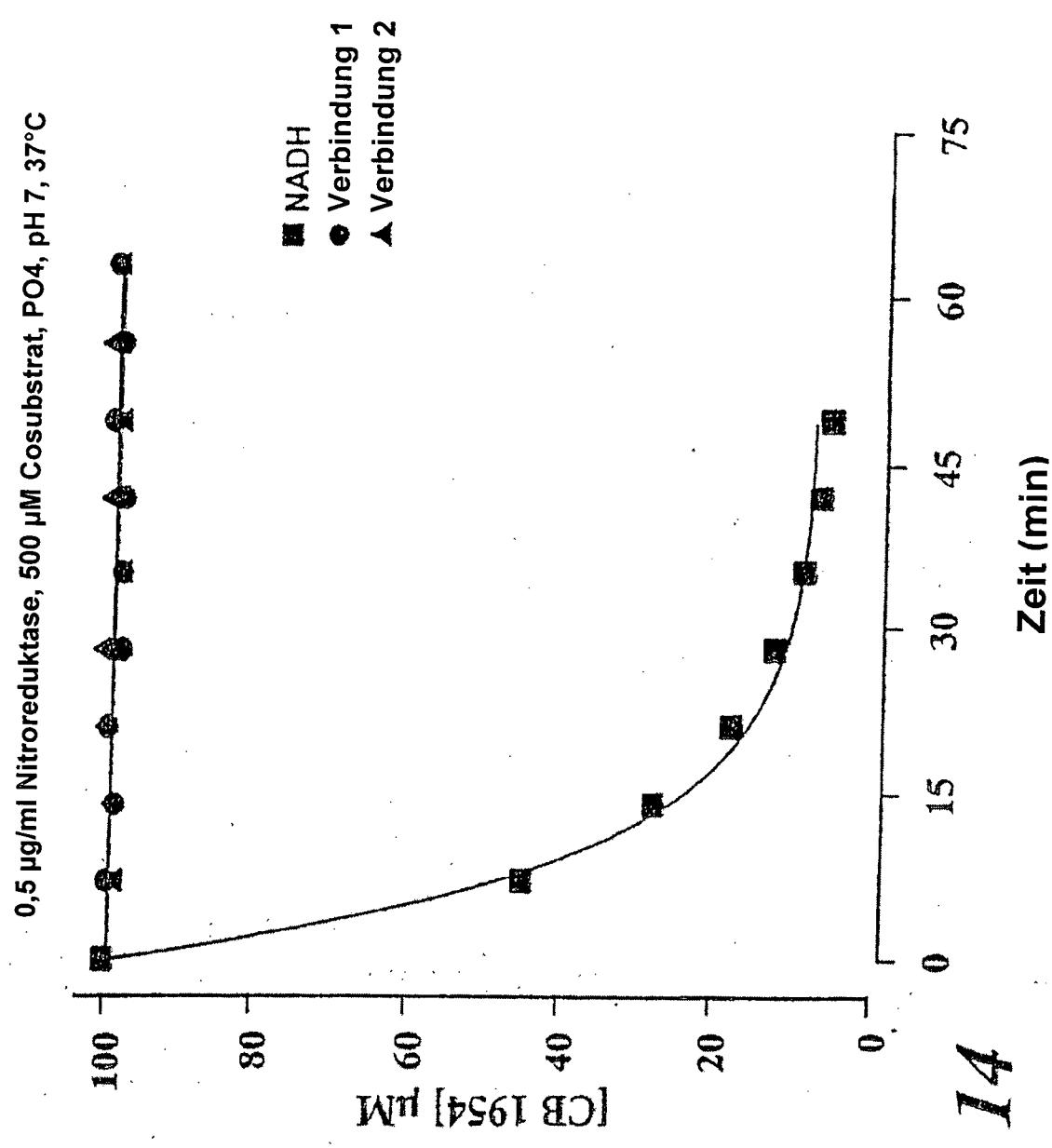


Fig. 14

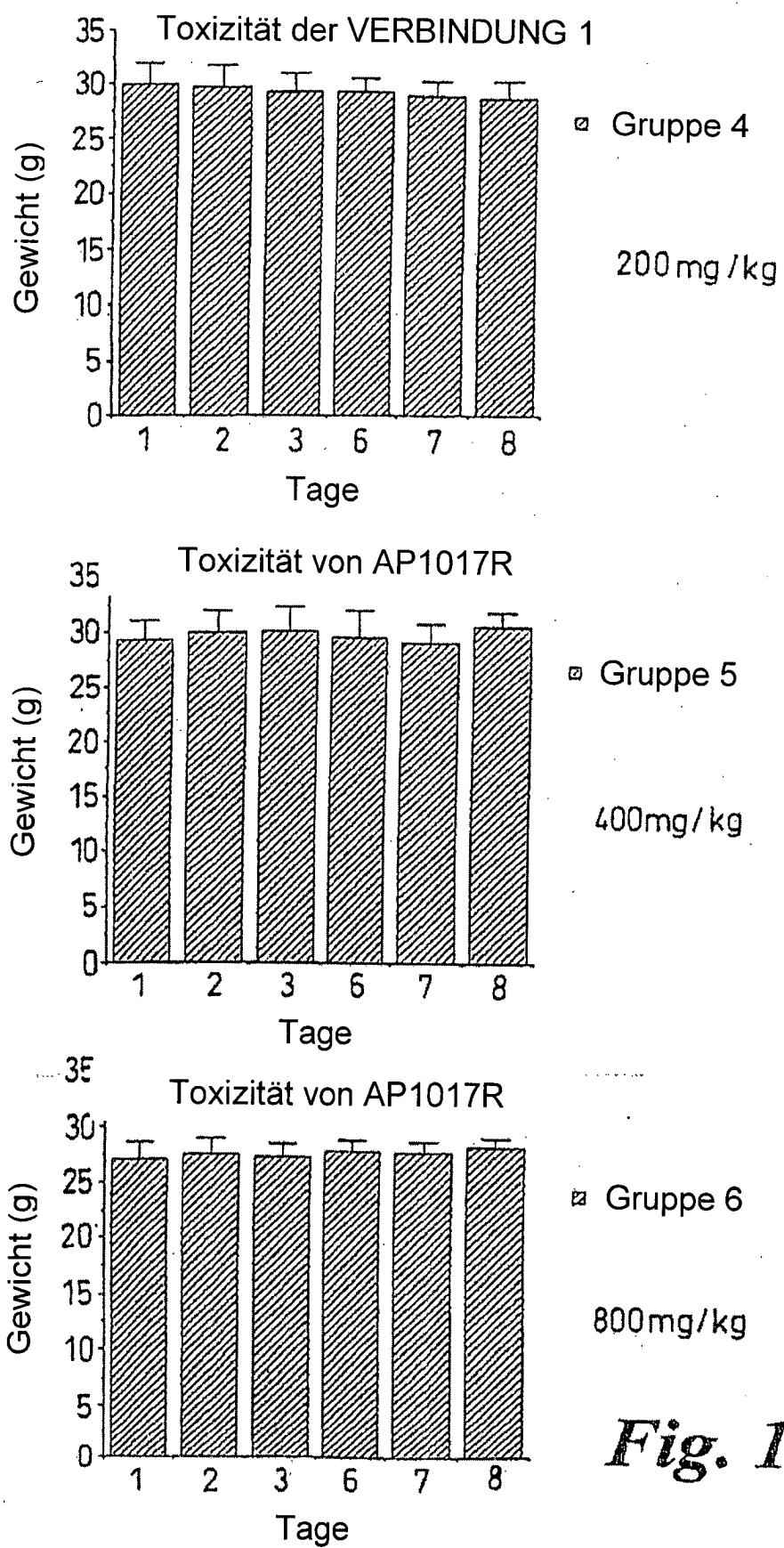


Fig. 15

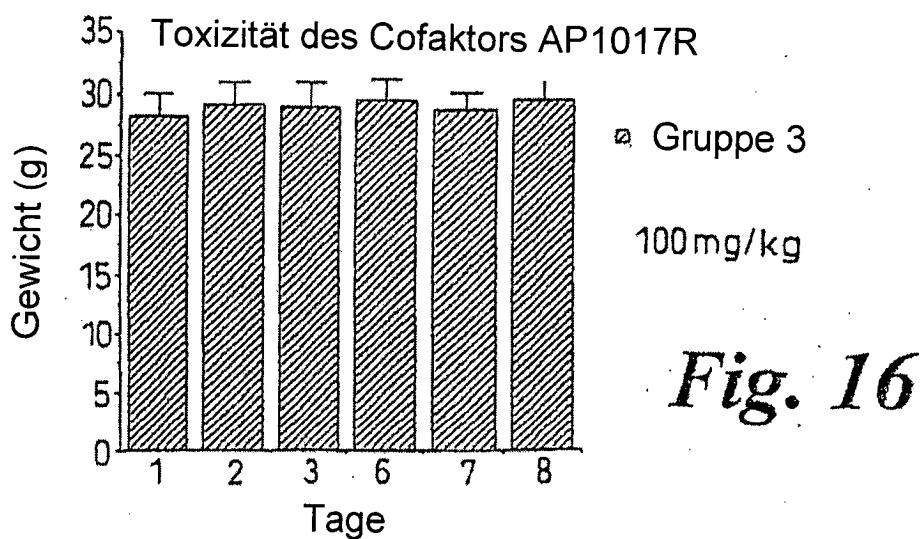
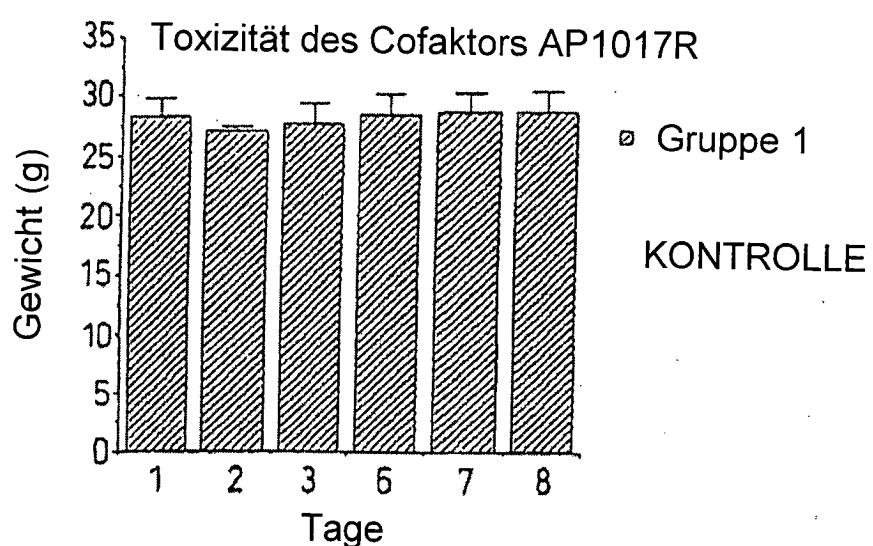
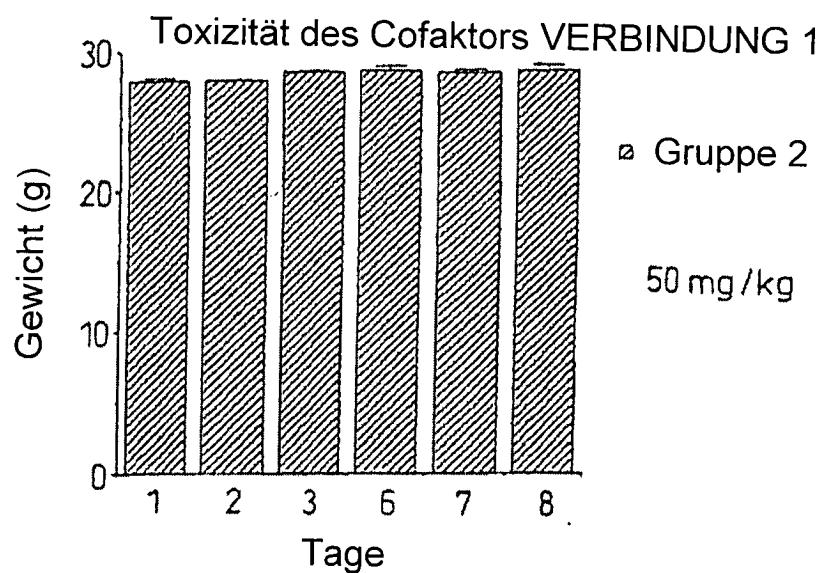


Fig. 16

