

(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) DD (11) 262 998 A5

4(51) A 61 K 31/475

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

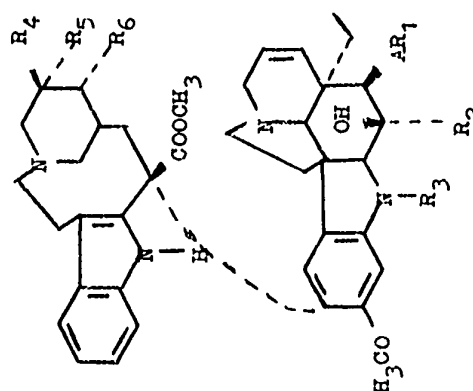
(21)	AP A 61 K / 297 644 7	(22)	15.12.86	(44)	21.12.88
(31)	86212	(32)	16.12.85	(33)	LU
	86515		16.07.86		

- (71) siehe (73)
 (72) Hannart, Jean A. A., BE; Trouet, André B. L., BE; Rao, Kandukuri S. B., IT
 (73) Omnichem S. A., Bruxelles, BE
 (74) Internationales Patentbüro Berlin, Wallstraße 23/24, Berlin, 1020, DD

(54) Verfahren zur Herstellung eines Konjugates von einem Vinca-Alkaloid mit einem Protein

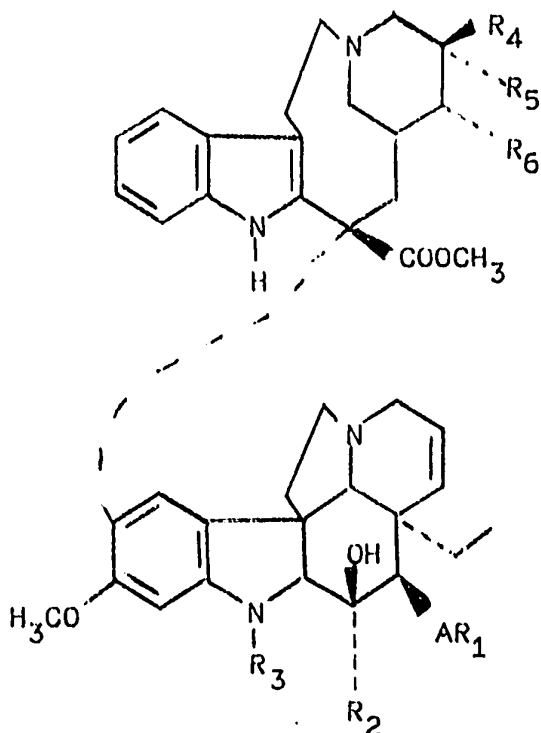
(55) starke Antitumorwirkung, keine unerwünschten Nebenwirkungen, Anwendung als Arzneimittel zur Behandlung von Krebs

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Konjugates von einem Vinca-Alkaloid mit einem Protein. Erfindungsgemäß werden Konjugate von einem Vinca-Alkaloid des Typs Indol-Dihydroindol mit einem Protein oder einem Protein-Fragment, der allgemeinen Formel I hergestellt, in der beispielsweise bedeuten: R_1 ein Protein oder ein Protein-Fragment, R_2 COOC_{1-3} -Alkyl oder $\text{CO}-R_7$, worin R_7 NH_2 ist, ein Ester einer Amino-Säure oder eines Peptids, R_3 , H, CH_3 , CHO; wenn R_5 und R_6 einzeln betrachtet werden, ist R_6 H und eines von R_4 und R_5 ist Ethyl und das andere H oder OH; wenn R_5 und R_6 zusammen mit den Kohlenstoffatomen betrachtet werden, an die sie gebunden sind, so bilden sie gemeinsam einen Oxiran-Kern und R_4 ist Ethyl, und A bedeutet ein bifunktionelles organisches Derivat vom Typ Maleoylamino-säure, Maleoylpeptid oder Maleoylphenoxy. Formel I



Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung eines Konjugates von einem Vinca-Alkaloid mit einem Protein oder einem Protein-Fragment, der allgemeinen Formel I



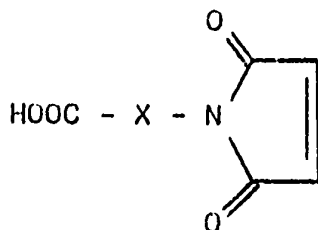
sowie gegebenenfalls einer pharmazeutischen Zusammensetzung ,
in der

R₁ ein Protein oder ein Protein-Fragment darstellt;

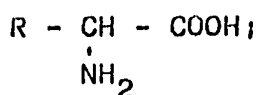
R₂ ist COOC₁₋₃-Alkyl oder CO-R₇ worin R₇ NH₂ ist, ein Ester einer Amino-Säure oder eines Peptids,

R₃ bedeutet H, CH₃, CHO;

wenn R₅ und R₆ einzeln betrachtet werden, ist R₆ H und eines von R₄ und R₅ ist Ethyl und das andere H oder OH; wenn R₅ und R₆ zusammen mit den Kohlenstoffatomen betrachtet werden, an die sie gebunden sind, so bilden sie gemeinsam einen Oxiran-Kern und R₄ ist Ethyl, und A bedeutet ein bifunktionelles organisches Derivat vom Typ Maleoylaminosäure, Maleoylpeptid oder Maleoylphenoxy, **dadurch gekennzeichnet**, daß man eine Maleoylaminosäure, ein Maleoylpeptid oder Maleoylphenoxy der Formel,

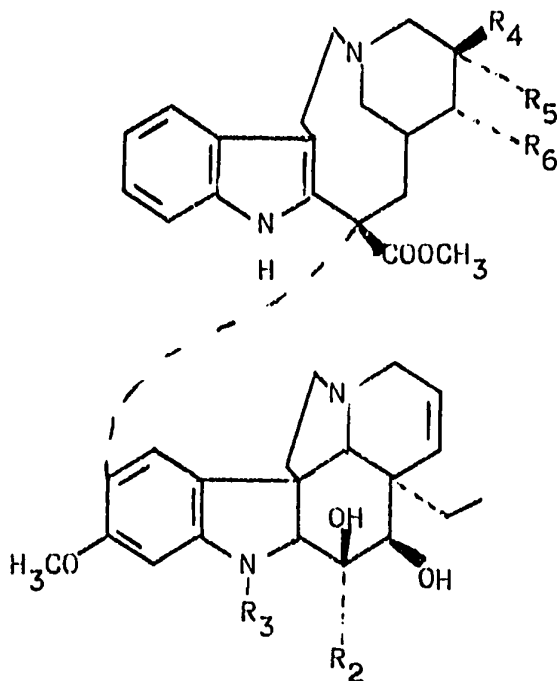


in der X eine lineare Alkylkette mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen bedeutet, oder eine verzweigte Alkylkette mit 2 bis 5 Kohlenstoffatomen, eine Cycloalkylkette mit 3 bis 6 Kohlenstoffatomen, eine Phenylkette mit 3 bis 6 Kohlenstoffatomen, oder die Gruppe R-CH der natürlichen Aminosäuren



oder das Fragment einer Peptidkette vom Typ - (X₁-NH-CO)_n-X₁- bedeutet, in der n = 1, 2, 3 oder 4

ist und X_1 eine lineare Alkylkette mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen, eine verzweigte Alkylkette mit 2 bis 5 Kohlenstoffatomen, eine Cycloalkylkette mit 3 bis 6 Kohlenstoffatomen, eine Phenylkette mit 3 bis 6 Kohlenstoffatomen, oder die Gruppe $R-CH$ der natürlichen Aminosäuren darstellt, oder auch ein Phenyl-Radikal ist; in seiner racemischen Form oder in einer seiner optisch aktiven Formen, mit dem Hydroxyl in 4-Stellung einer Verbindung der allgemeinen Formel



kondensiert, in der

R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 und X die vorgenannten Bedeutungen besitzen, und dadurch, daß man das erhaltene Zwischenprodukt mit einem Protein oder einem Protein-Fragment kondensiert, sowie gegebenenfalls die Verbindung der allgemeinen Formel I mit pharmazeutisch akzeptablen Träger- und Füllstoffen, gemäß einer Einheitsdosis von 50 mg bis zu mehreren Gramm, gegebenenfalls in Verbindung mit anderen aktiven Substanzen, mischt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die erste Stufe der Kondensation mit Hilfe eines Chlorameisensäure-alkylesters durchführt, vorzugsweise mit Chlorameisensäure-ethylester oder Chlorameisensäure-isobutylester, in Anwesenheit einer Amin-Base, wie Triethylamin, N-Methyl-piperidin oder N-Methyl-morpholin, in einem organischen Lösungsmittel, wie Ethylacetat, Tetrahydrofuran oder Methylenchlorid, dadurch, daß man das erhaltene Zwischenprodukt aus dem Reaktionsmedium isoliert, daß man es reinigt, und daß man die zweite Stufe der Kondensation in üblicher Art und Weise durchführt, und zwar im wäßrigen Medium bei einer Temperatur zwischen 4°C und 25°C und einem pH-Wert von 7,5 bis 9,5.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die eine oder die mehreren RCH -Funktionsgruppen der natürlichen Aminosäuren, dargestellt durch X oder X_1 , mittels an sich bekannter Schutzgruppen geschützt sind.
4. Verfahren nach irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Protein R_1 Albumin von Rinderserum oder menschlichem Serum, Fetuin oder Immunoglobuline ist.
5. Verfahren nach irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Protein R_1 selektiv behandelt wird.
6. Verfahren nach irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß R_1 ein Immunoglobulin ist, ausgewählt aus der folgenden Gruppe, gebildet durch:
 - Ig von Ziege oder Schaf, immunisiert mit carcinoembryonalem Antigen;
 - Ig vom Kaninchen anti-LLA;
 - Ig von Ziege oder Schaf, immunisiert mit carcinoembryonalem Antigen;
 - verschiedene Ig vom Affen, anti-LLA, anti-LMA, anti-LLC, anti-LMC;
 - Ig von Ziege oder Schaf, immunisiert mit Membranen vom Lungencarcinom;
 - monoklonale Ig, ausgehend von Mäuse-Hybriden, die
 - Antikörper gegen das menschliche Colo-rectal-Carcinom absondern;

- monoklonale Ig, ausgehend von Mäuse-Hybriden, die Antikörper gegen das menschliche Melanom absondern;
- monoklonale Ig, ausgehend von Mäuse-Hybriden, die Antikörper absondern, die mit leukämischen Human-Zellen reagieren;
- monoklonale Ig, ausgehend von Mäuse-Hybriden, die Antikörper absondern, die mit menschlichen Neuroblastom-Zellen reagieren;
- monoklonale Ig, ausgehend von Mäuse-Hybriden, die Antikörper absondern, die mit Antigenen vom Human-Mammacarcinom reagieren;
- monoklonale Ig, ausgehend von Mäuse-Hybriden, die Antikörper absondern, die mit den Zellen des Human-Ovarial-Carcinoms reagieren;
- monoklonale Ig, ausgehend von Mäuse-Hybriden, die Antikörper absondern, die mit Human-Osteosarcom-Zellen reagieren;
- monoklonale Ig, ausgehend von Mäuse-Hybriden, die Lungencarcinom-Antikörper absondern; oder einem Immunoglobulin-Fragment, nämlich Fab, Fab' oder (Fab')₂ oder monomerem IgM, erhalten aus einem Antikörper durch Verdauung mit Hilfe eines proteolytischen Enzyms.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung neuer Konjugate von Vinca-Alkaloiden des Typs Indol-Dihydroindol mit Proteinen oder Protein-Fragmenten, die pharmazeutische Eigenschaften aufweisen, insbesondere eine cytostatische Aktivität. Die Vinca-Alkaloide des Typs Indol-Dihydroindol, insbesondere Vinblastin, Vincristin und Vindesin, werden bei der Behandlung von Krebs eingesetzt. Die chemotherapeutische Verwendung dieser Derivate ist jedoch in der Wirksamkeit durch ihre Sekundäreffekte begrenzt. Daher wurden bereits zahlreiche Derivate synthetisiert, um diese Sekundäreffekte zu verringern.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Das Vinblastin und einige seiner Derivate, insbesondere das Vincristin oder das Vindesin, wurden schon mit Proteinen, beispielsweise mit Albumin oder mit verschiedenen Immunoglobulinen, gekuppelt. Daraus resultierten Kupplungsprodukte oder Verbindungen, sogenannte „Konjugate“.

Wir weisen insbesondere auf die folgenden Belegstellen der Literatur hin:

- J. D. Teale, Jacqueline M. Cleugh et V. Marks, Br. J. Clin. Pharm. 4, 169-172, 1977
- C. H. J. Ford, C. E. Newmann, J. R. Johnsen, C. S. Woodhouse, T. A. Reeder, G. F. Rowland, F. G. Simmonds, Br. J. Cancer, 47, 35-42, 1983
- M. J. Embleton, G. F. Rowland, R. G. Simmonds, E. Jacobs, C. H. Marsden, R. W. Baldwin, Br. J. Cancer, 47, 43-49, 1983
- J. R. Johnson, C. H. J. Ford, C. E. Newman, C. S. Woodhouse, G. F. Rowland, R. G. Simmonds, Br. J. Cancer, 44, 472-475, 1981
- Eli Lilly Eur. Pat. Applic., Publ. n° 56.322, 21. 7. 82
- R. A. Conrad, G. J. Cullinan, K. Gerzan, G. A. Poore, J. Med. Chem. 22, 391, 1979
- Eli Lilly U. K. Pat. Applic., Publ. n° 2.137.210, 3. 11. 84
- Onco Chem., Eur. Pat. Applic., Publ. n° 124.502, 7. 11. 84.

Die Kupplung dieser Indol-Dihydroindol-Derivate wurde nicht nur mit dem Ziel durchgeführt, neue immunologische Reagenzien zur Verfügung zu stellen, sondern vor allem in Hinblick auf die Herstellung von wirksameren, selektiveren und weniger toxischen Anti-Tumor-Substanzen.

Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt wurden zwei Typen der Kupplung in Erwägung gezogen:

- a) die Kupplung an C₃ über das Zwischenprodukt eines Azid-Derivats (EP-PS 56322).
- b) Die Kupplung an C₄ über das Zwischenprodukt einer Estergruppe, abgeleitet von der Hydroxyl-Gruppe des Kohlenstoffs in 4-Stellung des Vinca-Alkaloid-Gerüsts (GB-PS 2137210; EP-PS 124502).

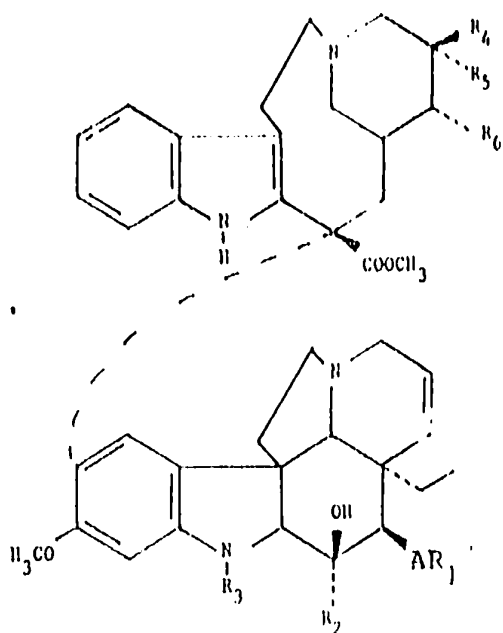
Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung von neuen Vinblastin-Derivaten mit starker Antitumorwirkung, die keine unerwünschten Nebenwirkungen verursachen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Konjugate von einem Vinca-Alkaloid mit einem Protein mit den gewünschten Eigenschaften und Verfahren zu ihrer Herstellung aufzufinden.

Erfindungsgemäß werden neue Produkte hergestellt, die Konjugate von Vinca-Alkaloiden des Typs Indol-Dihydroindol mit Proteinen oder Protein-Fragmenten darstellen. Erfindungsgemäß erfolgt die Kupplung ebenfalls über das Zwischenprodukt einer Estergruppe, die von der Hydroxyl-Gruppe des Kohlenstoffs in 4-Stellung des Vinca-Alkaloid-Gerüsts abgeleitet ist. Der Gegenstand der vorliegenden Erfindung besteht insbesondere in Konjugaten von Vinca-Alkaloiden des Typs Indol-Dihydroindol mit einem Protein oder einem Protein-Fragment, entsprechend der allgemeinen Formel I



in der

R_1 ein Protein oder ein Protein-Fragment darstellt;

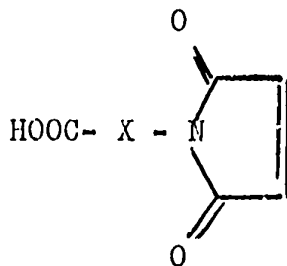
R_2 ist COOC_{1-3} -Alkyl oder Co-R_7 , worin R_7 NH_2 ist, ein Ester einer Aminosäure oder eines Peptids;

R_3 bedeutet H, CH_3 , CHO;

wenn R_5 und R_6 einzeln betrachtet werden, ist R_6 H und eines von R_4 und R_5 ist Ethyl und das andere H oder OH;

wenn R_5 und R_6 zusammen mit den Kohlenstoffatomen betrachtet werden, an die sie gebunden sind, so bilden sie gemeinsam einen Oxivan-Kern und A bedeutet ein bifunktionelles organisches Derivat vom Typ Maleoylaminosäure, Maleoylpeptid oder Maleoylphenoxy.

Diese erfindungsgemäßen Konjugate sind dadurch gekennzeichnet, daß das Protein oder das Protein-Fragment mit der Vinca-Verbindung über das Zwischenprodukt einer Arm-Verbindung gekuppelt wird, durch vorherige Kondensation des 4-Desacetylundol-dihydroindol-Vinca-Alkaloids mit einem bifunktionellen organischen Derivat vom Typ Maleoylaminosäure oder Maleoylpeptid der allgemeinen Formel



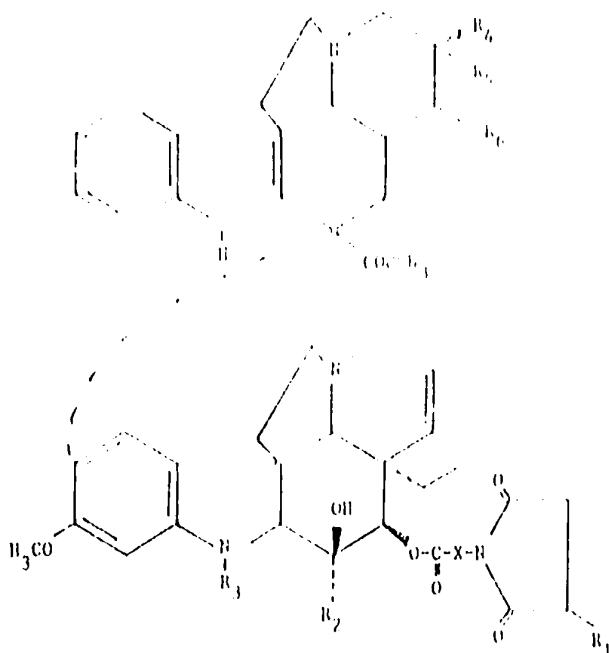
- wobei im Fall der Maleoylaminosäuren X bedeutet:
- eine lineare Alkylkette mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen;
- eine verzweigte Alkylkette mit 2 bis 5 Kohlenstoffatomen;
- eine Cycloalkylkette mit 3 bis 6 Kohlenstoffatomen;
- eine Phenylkette mit 3 bis 6 Kohlenstoffatomen.

Wenn das bifunktionelle Derivat vom Typ Maleoylaminosäure ist, bedeutet X zusätzlich zu den obengenannten Werten die Gruppe R-CH der natürlichen Aminosäuren $\text{R-CH(NH}_2\text{)-COOH}$. In diesem letzten Fall versteht es sich von selbst, daß die Funktionen

durch die in der Peptid-Synthese übliche Schutzgruppen geschützt werden können, wenn die R-CH Gruppe reaktionsfähig ist.

- wobei im Fall der Maleoylpeptide X bedeutet:
- ein Fragment der Peptid-Kette $(\text{X}_1\text{-NH-CO})_n\text{-X}_1$, worin $n = 1, 2, 3$ oder 4 ist und X_1 die gleiche Bedeutung wie X in der oben beschriebenen Form besitzt.
- wobei X ebenfalls ein Phenyl-Radikal darstellen kann: wenn das oben definierte bifunktionelle Derivat Asymmetrie-Zentren aufweist, so kann es in der racemischen Form oder in einer seiner optisch aktiven Formen verwendet werden.

Insbesondere können die erfindungsgemäßen Konjugate durch die folgende Formel dargestellt werden:



in der

R_1 ein Protein oder ein Protein-Fragment darstellt;

X ist so beschaffen, wie oben definiert;

R_2 ist COOC_{1-3} -Alkyl oder $\text{CO}-R_7$, worin R_7 NH_2 ist oder der Ester einer Aminosäure oder eines Peptids;

R_3 ist H, CH_3 , CHO;

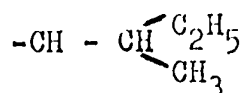
wenn R_5 und R_6 einzeln betrachtet werden, ist R_6 H und eines von R_4 und R_5 ist Ethyl und das andere H oder OH;

wenn R_5 und R_6 zusammen mit den Kohlenstoffatomen betrachtet werden, an die sie gebunden sind, so bilden sie gemeinsam einen Oxivan-Kern und R_4 ist Ethyl.

Die Verbindungen mit der vorstehenden Formel können gattungsmäßig beschrieben werden als

- Vinblastin-Derivate, in denen R_2 COOCH_3 ist, R_3 Methyl ist, R_4 Hydroxyl darstellt, R_5 Ethyl bedeutet und R_6 Wasserstoff ist;
- Vindesin-Derivate, in denen R_2 $\text{CO}-\text{NH}_2$ ist und R_3 , R_4 , R_5 und R_6 die obengenannten Bedeutungen für die Vinblastin-Derivate besitzen;
- 23-Vinblastinoyl-aminosäuren-Derivate, in denen R_2 $\text{CO}-R_7$ ist, worin R_7 den Ester einer Aminosäure oder eines Peptids darstellt und R_3 , R_4 , R_5 und R_6 die obengenannten Bedeutungen für die Vinblastin-Derivate besitzen;
- Vincristin-Derivate, in denen R_2 COOCH_3 ist;
 R_3 Formyl ist, R_4 Hydroxyl darstellt, R_5 Ethyl bedeutet und R_6 Wasserstoff ist;
- Leurosidin-Derivate, worin R_2 COOCH_3 ist,
 R_3 Methyl ist, R_4 Ethyl darstellt, R_5 Hydroxyl bedeutet und R_6 Wasserstoff ist;
- 4-Deoxy-VLB-„A“-Derivate, in denen R_2 COOCH_3 ist, R_3 Methyl darstellt, R_4 und R_6 Wasserstoff bedeuten und R_5 Ethyl ist,
- 4-Deoxy-VLB-„B“-Derivate, in denen R_2 COOCH_3 ist, R_3 Methyl darstellt, R_4 Ethyl ist und R_5 und R_6 Wasserstoff bedeuten;
- Leurosine-Derivate, in denen R_2 COOCH_3 ist,
 R_3 Methyl darstellt, R_4 Ethyl ist und R_5 und R_6 zusammen eine Epoxid-Bindung bilden.

Das bifunktionelle Derivat vom Typ Maleoylaminosäure kann aus der Kondensation eines N-Alkoxymaleimids mit einer natürlichen oder nicht natürlichen Aminosäure stammen. Im Fall der Kondensation mit Glycin ist $X = \text{CH}_3$; mit Alanin $X = \text{CH}-\text{CH}_3$; mit β -Alanin $X = (\text{CH}_2)_2$; mit Phenylalanin $X = \text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$; mit α -Amino-Buttersäure $X = \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$; mit Valin $X = \text{CH}-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$; mit Norvalin $X = \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$; mit Leucin $X = -\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$; mit Isoleucin $X =$



mit Norleucin $X = \text{CH}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_3$; mit 6 Aminocaprinsäure $X = (\text{CH}_2)_5$; mit 11-Amino-undecansäure $X = (\text{CH}_2)_{10}$; mit 12-Amidodecansäure $X = (\text{CH}_2)_{11}$.

Das bifunktionelle Derivat vom Typ Maleoylpeptid kann ebenfalls aus der Kondensation eines N-Alkoxymaleimids mit einem Dipeptid oder einem Tripeptid stammen, um ein Derivat $-(X_1-\text{NH}-\text{CO})_nX_1$ zu ergeben, worin X_1 die gleiche Bedeutung besitzen kann wie oben für X beschrieben.

Die Proteine, die vorteilhafterweise verwendet werden können, sind insbesondere Albumin von Rinderserum oder menschlichem Serum, Fetuin oder Immunoglobuline.

Die verwendeten Proteine kann man ebenfalls behandeln, um sie selektiv zu modifizieren. Diese Modifizierungen ermöglichen es, Protein-Konjugate zu erhalten, die bei ihrer therapeutischen Anwendung vorzugsweise im Bereich gewisser Gewebe konzentriert werden, beispielsweise in der Leber. Es ist daher möglich, vor der Kondensation des Vinca-Alkaloid-Derivates mit dem Protein dieses letztere zu galactosylieren.

Die zu den Antigenen der Oberfläche von malignen Zellen spezifischen Immunoglobuline und die Techniken zu ihrer Herstellung aus immunisiertem Tierserum oder durch Kultur von Hybriden, die monoklonale Antikörper absondern, sind bekannt.

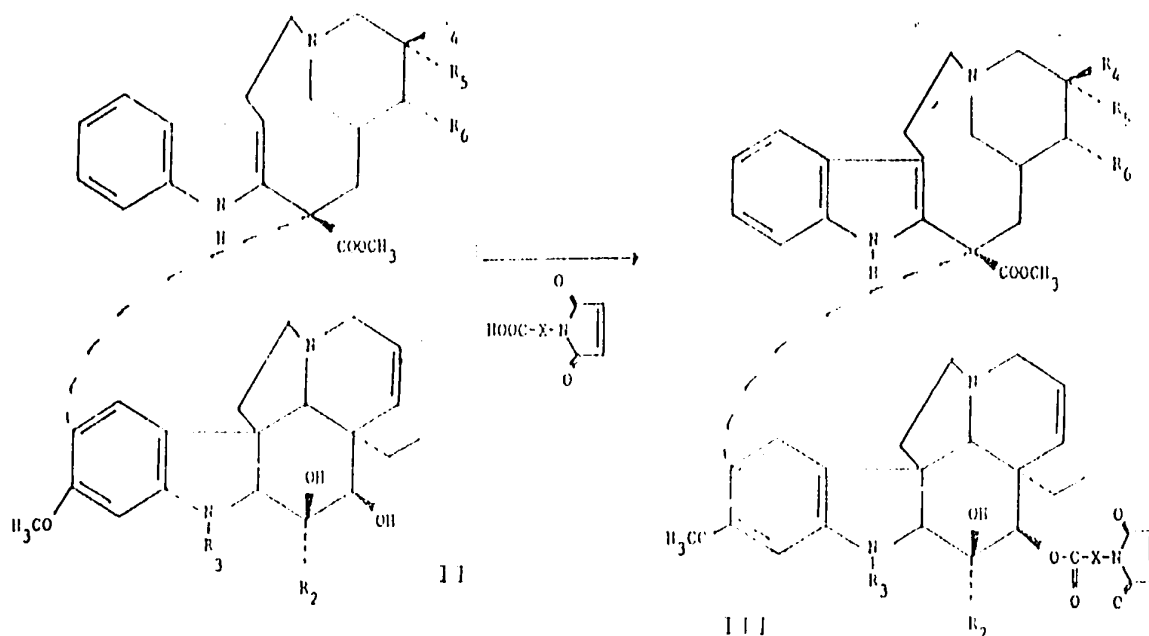
Der bevorzugte Typ von Antikörper für die erfindungsgemäße Verwendung ist ein Immunoglobulin der Klasse IgG menschlichen Ursprungs.

Jedoch sind die Immunglobuline anderer Arten auch in die vorliegende Erfindung eingeschlossen. Einige repräsentative Immunglobuline sind die folgenden:

- Ig von Ziege oder Schaf, immunisiert mit carcinomembryonalem Antigen,
- Ig vom Kaninchen anti-LLA,
- verschiedene Ig vom Affen, anti-LLa, anti-LMA, anti-LIC, anti-LMC,
- Ig von Ziege oder Schaf, immunisiert mit Membranen vom Lungen-carcinom,
- monoklonale Ig, ausgehend von Mäuse-Hybriden, die Antikörper gegen das menschliche Colo-rectal-Carcinom absondern,
- monoklonale Ig, ausgehend von Mäuse-Hybriden, die Antikörper gegen das menschliche Melanom absondern,
- monoklonale Ig, ausgehend von Mäuse-Hybriden, die Antikörper absondern, die mit leukämischen Human-Zellen reagieren,
- monoklonale Ig, ausgehend von Mäuse-Hybriden, die Antikörper absondern, die mit menschlichen Neuroblastom-Zellen reagieren
- monoklonale Ig, ausgehend von Mäuse-Hybriden, die Antikörper absondern, die mit Antigenen vom Human-Mammacarcinom reagieren.
- monoklonale Ig, ausgehend von Mäuse-Hybriden, die Antikörper absondern, die mit den Zellen des Human-Ovarial-Carcinoms reagieren,
- monoklonale Ig, ausgehend von Mäuse-Hybriden, die Antikörper absondern, die mit Human-Osteosarcom-Zellen reagieren,
- monoklonale Ig, ausgehend von Mäuse-Hybriden, die Lungencarcinom-Antikörper absondern.

Die Konjugate können ebenfalls hergestellt werden mit Immunglobulin-Fragmenten, nämlich den Fragmenten Fab, Fab' oder F(ab')₂ oder monomeren IgM, erhalten aus einem Antikörper durch Verdauung mit Hilfe eines proteolytischen Enzyms.

Die Konjugate der vorliegenden Erfindung werden in einer ersten Stufe durch Kondensation einer Maleoylaminosäure oder eines Maleoylpeptids mit dem Hydroxyl in 4-Stellung eines 4-Desacetyl-indoldihydroindol-Vinca-Alkaloids der Formel II erhalten, um ein Derivat der Formel III zu ergeben,



in der X, R₂, R₃, R₄, R₅ und R₆ die oben erwähnte Bedeutung besitzen.

In einer zweiten Stufe werden die Vinca-4-carboxy-maleoyl-Derivate der Formel III dann mit einem Protein oder einem Protein-Fragment kondensiert, und zwar durch Addition von entweder freier Thiol-Gruppen oder von freien Amino-Gruppen des Proteins, beispielsweise den vom Lysin-Rest des Proteins stammenden Amino-Gruppen, mit der olefinischen Doppelbindung des Maleimids, gemäß einem Additions-Mechanismus vom Typ Michael (Means, G. E. et Feeney, R. E.; Chemical modification of proteins, 1971, S. 110-133, Holden, Day Inc., San Francisco), um die Konjugate der Formel I zu ergeben.

Vom chemischen Gesichtspunkt aus wird die Herstellung der Maleoylaminosäuren oder der Maleoylpeptide gemäß den von O. Keller und J. Rudinger, Helv. 58, 531 (1975), von D. H. Rich, P. D. Gesselchen, A. Tong, A. Cheung und C. K. Buckner; J. med. Chem., 18, 1004 (1975) und von A. Sato und M. Nakao; J. Biochem., 90, 1117 (1981) beschriebenen Methoden realisiert.

Die Kondensation der Maleoyl-Derivate mit dem Vinca-Alkaloid kann in klassischer Art und Weise mit Hilfe eines Chlorameisensäure-Alkylesters durchgeführt werden, vorzugsweise mit Chlorameisensäure-Ethylester oder -Isobutylester, in Anwesenheit einer Amine-Base wie Triethylamin, N-Methylpiperidin, N-Methyl-morpholin, und in einem organischen Lösungsmittel wie Ethylacetat, Tetrahydrofuran oder Methylchlorid.

Das erhaltene Derivat wird aus dem Reaktionsmedium isoliert und mit Hilfe von in der Chemie angewendeten, klassischen Methoden gereinigt.

Es kann auch jede andere Methode zur Aktivierung der Carbonsäure-Gruppe der Maleoylaminosäure oder des Maleoylpeptids, insbesondere die in der Peptid-Chemie üblichen Methoden, bei diesem Kondensationstyp angewendet werden, um die Kondensation mit dem Vinca-Alkaloid durchzuführen.

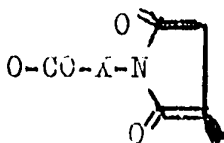
Insbesondere in dem Fall, wo X Phenyl bedeutet, wird die Kondensation mit 3-N-Succinimidyl-maleimidobenzoat durchgeführt, erhalten gemäß der von T. Akawa, J. Biochem., 79, 233 (1976) und von M. J. O'Sullivan et al., Anal. Biochem., 100, 100 (1979) beschriebenen Methode.

Die Herstellung der Konjugate kann durch Reaktion des Proteins, des monoklonalen oder des polyklonalen Antikörpers mit der Vinca-Verbindung der Formel III unter klassischen Bedingungen erfolgen, beispielsweise im wässrigen Medium bei einer Temperatur zwischen 4°C und 40°C und einem pH-Wert von 7,5 bis 9,5.

Die Anzahl der verknüpften Reste kann von der Konzentration der Reaktionspartner und der Dauer der Reaktion abhängen, im allgemeinen liegt die Zahl jedoch zwischen 5 und 20.

Beispielsweise wird eine Lösung der Verbindung der Formel III, in einem organischen Lösungsmittel wie Dioxan, tropfenweise zu einer gepufferten Lösung des Proteins gegeben, z. B. unter Verwendung eines 0,1 M-Phosphatpuffers vom pH-Wert 8,2. Nach einer Nacht bei gewöhnlicher Temperatur wird das Konjugat mittels Gelfiltration isoliert, durch Ultrafiltration konzentriert und sterilisiert. Der Gehalt an Proteinen wird nach der Methode von Lowry gemessen und der Gehalt an Alkaloiden durch Messung der Radioaktivität eingeschätzt.

Die mit den erfindungsgemäßen Verbindungen durchgeführten Versuche „in vitro“ und „in vivo“, um ihre Anti-Tumor-Aktivität zu demonstrieren, zeigen, daß die Bildung des Konjugates über das Zwischenprodukt einer Maleoyl-Bindung



vorteilhafter sein kann als über eine Bindung O-CO-X-Co. Die Maleoyl-Bindung ermöglicht nämlich gleichzeitig die Konjugation der freien Thiol-Gruppen und der Amino-Gruppen des Proteins oder des Protein-Fragments. Außerdem zeigt die Umsetzung durch lysosomiale Enzyme eine viel umfangreichere Freisetzung des Vinca-Alkaloids im Fall der Maleoyl-Bindung. Die Konjugate sind ebenfalls im Serum und im sauren pH-Bereich stabiler.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen wurden an Mäusen BDF₁ getestet, bei denen eine Leukämie P388 auf intra-peritonealem Weg implantiert wurde. Die ersten Resultate zeigen, daß die Verbindungen an diesem Experimental-Modell eine signifikante Aktivität aufweisen, da sie eine Erhöhung der Überlebenszeit induzieren.

Die neuen erfindungsgemäßen Konjugate weisen insbesondere interessante Anti-Tumor-Eigenschaften auf und sind daher geeignet, in der Human-Therapeutik verwendet zu werden.

Bei ihrer therapeutischen Anwendung werden die erfindungsgemäßen Verbindungen vorzugsweise auf parenteralem Wege verabreicht, gelöst in einem pharmazeutisch akzeptablen Lösungsmittel. Physiologisches Wasser oder andere Pufferlösungen, beispielsweise mit einem Phosphat, sind geeignete Lösungsmittel. Der Wirkstoff wird im allgemeinen in einer Dosierung verabfolgt, die von 50 mg bis zu einigen Gramm schwanken kann.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können außerdem in Kombination mit anderen Anti-Tumor-Mitteln eingesetzt werden.

Ausführungsbeispiel

Die folgenden Beispiele illustrieren in nicht einschränkender Weise das Verfahren, das zu den erfindungsgemäßen Verbindungen führt.

Beispiel 1: N-Carbomethoxy-maleimid

Eine Lösung von 3,8 g (0,04 Mol) Maleimid und 4 g (0,04 M) Triethylamin in 150 ml Ethylacetat wird bei einer Temperatur von 0°C mit 3 ml (0,04 Mol) Chlorameisensäure-methylester, gelöst in 20 ml Ethylacetat, behandelt. Nach 1 Stunde Rühren wird der Niederschlag abfiltriert und mit Ethylacetat gewaschen. Die organischen Phasen werden vereinigt, mit Wasser gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und unter Vakuum bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand, kristallisiert in einer Ethylacetat-Isopropylether-Mischung, ergibt 4,19 g N-Carbomethoxy-maleimid. NMR-Spektrum: (CDCl₃, δ): 6,75 (2H, s), 3,9 (3H, s).

Beispiel 2: N-Maleoyl-L-alanin

Eine Lösung von 2,3 g (0,025 M) L-Alanin in 100 ml gesättigter Natriumbicarbonat-Lösung wird bei einer Temperatur von 0°C unter kräftigem Rühren mit 3,87 g (0,026 M) N-Carbomethoxymaleimid behandelt. Nach einer Stunde wird die Lösung mit 200 ml Wasser verdünnt und bei einer Temperatur von 40°C eine Stunde lang gerührt. Der pH-Wert der Lösung (8,2) wird dann durch Zugabe von konzentrierter Schwefelsäure auf 6,4 gebracht. Anschließend wird die Lösung auf 100 ml konzentriert, durch Zugabe von 1 M-Schwefelsäure auf pH 2 angesäuert und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und unter Vakuum bis zur Trockne eingedampft.

Der erhaltene Rückstand wird mittels Chromatographie über eine Kieselerde-Kolonne (Elution Chloroform/Essigsäure 95/5) gereinigt. Man erhält auf diese Weise 1,2 g N-Maleoyl-L-alanin.

Ausbeute 48%

IR-Spektrum (KBr) cm⁻¹: 3400, 3100, 2930, 1780, 1740, 1700, 1460, 1420, 1390, 1370, 1345, 1220, 1175, 1118, 1080, 1068, 1015, 970, 835, 700.

NMR-Spektrum (CDCl₃) δ: 6,7 (2H, s); 4,8; (1H, g); 1,65 (3H, d).

Beispiel 3: N-Maleoyl-6-aminocapronsäure

Eine Lösung von 4,2 g (32,2 mM) 6-Amino-capronsäure in 163 ml einer gesättigten Natriumbicarbonat-Lösung wird bei einer Temperatur von 0°C unter kräftigem Rühren mit 5 g (32,3 mM) N-Carbomethoxymaleimid behandelt. Nach einer Stunde wird die Lösung mit 256 ml Wasser verdünnt und bei Umgebungstemperatur eine Stunde lang gerührt. Der pH-Wert der Lösung (8,2) wird dann durch Zugabe von konzentrierter Schwefelsäure auf 6,4 gebracht. Anschließend wird die Lösung auf 100 ml konzentriert, durch Zugabe von 1 M-Schwefelsäure auf pH 2 angesäuert und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und unter Vakuum bis zur Trockne eingedampft. Der erhaltene Rückstand wird mittels Chromatographie über eine Kieselerde-Kolonne (Elution Chloroform/Essigsäure 95/5) gereinigt. Man erhält auf diese Weise 4,7 g N-Maleoyl-6-amino-capronsäure.

Ausbeute: 51 %

IR-Spektrum (KBr, cm^{-1}): 3090, 2940, 2880, 1770, 1710, 1470, 1450, 1380, 1370, 1340, 1315, 1260, 1210, 1135, 1110, 1140, 1100, 1015, 1000, 815, 840, 735, 700.

Beispiel 4: γ -(N-Maleoyl)-L-glutaminsäure-methylester

Eine Lösung von 1 g (6,2 mM) γ -L-Glutaminsäure-methylester in 31,2 ml einer gesättigten Natriumbicarbonat-Lösung wird bei einer Temperatur von 0°C unter kräftigem Rühren mit 961 mg (6,2 mM) N-Carbomethoxy-maleimid behandelt. Nach einer Stunde wird die Lösung mit 126 ml Wasser verdünnt und eine Stunde lang bei einer Temperatur von 40°C gerührt. Der pH-Wert der Lösung (8,2) wird dann durch Zugabe von konzentrierter Schwefelsäure auf 6,4 gebracht. Anschließend wird die Lösung auf 50 ml konzentriert, durch Zugabe von 1 M-Schwefelsäure auf pH 2 angesäuert und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und unter Vakuum bis zur Trockne eingedampft. Der erhaltene Rückstand wird mittels Chromatographie über eine Kieselerde-Kolonne (Elution Chloroform/Essigsäure 95/5) gereinigt. Man erhält auf diese Weise 956 mg reines Produkt.

Ausbeute: 49%

NMR-Spektrum: 60: 7,9 (S, H Säure); 6,5 (S, Maleimid);
4,6 (m, CH⁺); 3,5 (S, OCH₃);
2,3 (m, CH₂ Glu)

IR-Spektrum (KBr) cm^{-1} : 3470, 3110, 2960, 1775, 1750–1690, 1440, 1410, 1265–1150, 1090, 1015, 830, 700.

Beispiel 5: N-Maleoyl-L-isoleucin

Gemäß der Arbeitsweise von Beispiel 2 erhält man N-Maleoyl-L-isoleucin, indem man 424 mg (3,22 mM) L-Isoleucin mit 500 ml (3,2 mM) N-Carbomethoxy-maleimid behandelt.

Ausbeute: 20%

Massenspektrum (CDI, Isobutan): 432 (2M + 1), 352, 270, 212 (M⁺ + 1), 188, 105, 132, 123.

NMR-Spektrum (CDCl₃) δ : 8,55 (Ep., OH); 6,85 (2, S, Maleimid-Doppelbindung); 4,65 (1, d, CH); 2,6 (m, 1, CH); 1,28 (d, CH₃); 1,1 (m, CH₃).

Beispiel 6: α -(N-Maleoyl)-L-aspartansäure-benzylester

Eine Lösung von 1 g (4,48 mM) α -L-Aspartansäure-benzylester in 27,5 ml einer gesättigten Natriumbicarbonat-Lösung wird bei einer Temperatur von 0°C unter kräftigem Rühren mit 694 mg (4,48 mM) N-Carbomethoxymaleimid behandelt.

Nach einer Stunde wird die Lösung mit 91 ml Wasser verdünnt und bei einer Temperatur von 40°C 1 Stunde lang geführt. Der pH-Wert der Lösung (8,2) wird dann durch Zugabe von konzentrierter Schwefelsäure auf 6,4 gebracht. Anschließend wird die Lösung auf 50 ml konzentriert, durch Zugabe von 1 M-Schwefelsäure auf pH 2 angesäuert und dreimal mit Ethylacetat extrahiert.

Die organischen Phasen werden vereinigt, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und unter Vakuum bis zur Trockne eingedampft.

Der erhaltene Rückstand wird mittels Chromatographie über eine Kieselerde-Kolonne (Elution Chloroform/Essigsäure 95/5) gereinigt. Man erhält auf diese Weise 267 mg reines Produkt.

Ausbeute: 20%

NMR-Spektrum (CD₃OD, 60 MHz, ppm):

7,1 (5H, m, H Benzyl); 6,6 (2H, S, D₁, Maleimid); 5 (2H, S, CH₂ Benzyl); 3,1 (2H, m CH₂).

IR-Spektrum (KBr, cm^{-1}):

3060, 1765, 1745, 1720, 1410, 1270, 830, 740, 700.

Beispiel 7: N-Maleoyl-11-amino-undecansäure

Eine Lösung von Maleinsäureanhydrid (2,4 g, 24,8 mM) in 10,1 ml Essigsäure wird zu einer Lösung von 11-Aminoundecansäure (5 g, 24,8 mM) in 30 ml Essigsäure gegeben und die Mischung 3 Stunden lang bei Umgebungstemperatur kräftig gerührt.

Der weiße Niederschlag wird abfiltriert, mit kalter Essigsäure gewaschen und getrocknet (6,3 g, 21,1 mM, 85%). 3 g des Niederschlages (10,00 mM) werden in trockenem Toluol (300 ml) gelöst und mit Triethylamin (2 g, 22,2 mM) behandelt. Die Lösung wird in einem Dean-Stark-Apparat mittels kräftigem Rühren unter Rückfluß gehalten, bis zum Verdampfen des Toluols. Das Produkt wird über eine Kieselerde-Kolonne (Elution Chloroform/Essigsäure 95/5) gereinigt. Man erhält auf diese Weise 1,06 g N-Maleoyl-11-amino-undecansäure.

Ausbeute: 37%

NMR-Spektrum (60 MHz, CDCl₃, ppm):

8,8 (bp, COOH); 6,5 (2H, S, d₁, Maleimid); 3,4 (2H, m, CH₂); 2,3 (2H, m, CH₂); 1,2 (16H, bp, 8 CH₂).

IR-Spektrum (KBr, cm^{-1}): 3450, 3100, 2910, 2850, 1770, 1700, 1610, 1590, 1470, 1450, 1420, 1375, 1340, 1310, 1280, 1240, 1180, 1125, 840, 700.

Beispiel 8: N-Maleoyl-12-amino-dodecansäure

Eine Lösung von Maleinsäureanhydrid (2,28 g, 23,22 mM) in 9,6 ml Essigsäure wird zu einer Lösung von 12-Amino-dodecansäure (5 g, 23,22 mM) in 28 ml Essigsäure gegeben und die Mischung 3 Stunden lang bei Umgebungstemperatur kräftig gerührt. Der weiße Niederschlag wird abfiltriert, mit kalter Essigsäure gewaschen und getrocknet (6,2 g, 20,9 mM, 86%). 4,9 g (15,9 mM) des Niederschlages werden in trockenem Toluol (500 ml) gelöst und mit Triethylamin (4,9 ml, 35 mM) behandelt. Die Lösung wird in einem Dean-Stark-Apparat mittels kräftigem Rühren unter Rückfluß gehalten, bis zum Verdampfen des Toluols. Das Produkt wird über eine Kieselerde-Kolonne (Elution Chloroform/Essigsäure 95/5) gereinigt. Man erhält auf diese Weise 1,38 g N-Maleoyl-12-amino-dodecansäure.

Ausbeute: 29%

NMR-Spektrum (60 MHz, CDCl₃, ppm): 6,52 (2H, s, d₁, Maleimid); 3,42 (2H, m, CH₂); 2,3 (2H, m, CH₂); 1,25 (18H, broad peak, 9⁺CH₂-).

IR-Spektrum (KBr, cm^{-1}):

3450, 3080, 2920, 2825, 1770, 1470, 1450, 1440, 1415, 1380, 1340, 1300, 1260, 1250, 1205, 1120, 920, 840, 700.

Beispiel 9: 4-(N-Maleoyl)-L-alanyl-Vinblastin

Zu einer Lösung von 1,52 g (0,009 M) N-Maleoylalanin und 1,26 ml (0,009 M) Triethylamin in 10 ml Ethylacetat, gekühlt auf eine Temperatur von 0°C, gibt man tropfenweise eine Lösung von 1,17 ml (0,009 M) Chlorameisensäure-isobutylester in 5 ml Ethylacetat.

Man rührt 1½ Stunden lang bei einer Temperatur von 0°C und fügt dann 2,3 g (0,003 M) O-4-Deacetyl-Vinblastin in Lösung von 20 ml Ethylacetat hinzu, wobei man die Temperatur bei 0°C hält. Anschließend läßt man auf Umgebungstemperatur ansteigen und rührt die Mischung 10 Stunden lang. Dann gibt man 50 ml Ethylacetat und 50 ml einer wäßrigen 10%igen Natriumcarbonatlösung hinzu. Man rührt, dekantiert und trennt die organische Phase ab. Die wäßrige Phase wird dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit einer wäßrigen Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und unter Vakuum bis zur Trockne eingedampft. Der erhaltene Rückstand wird mittels Chromatographie über eine Kieselerde-Kolonne (Elution Dichlormethan/Methanol 92/8) gereinigt. Man erhält auf diese Weise 1,86 g des reinen Produktes.

Ausbeute: 67,6%

Massenspektrum (DCI, Isobutan): 935 (M + 14), 922 (M + 1), 921 (M), 751, 693, 519, 445, 371, 133.

NMR-Spektrum (CDCl₃, 360 MHz, ppm):

8 (NH, 1H); 7,5-7 (4H, H-p', H-10'H-11', H-12'); 6,7 (2H, Anhydrid); 6,55 (1H, H-14); 6,05 (1H, H-17); 5,85 (1H, H-7); 5,45 (1H, H-4); 5,15 (1H, H-6); 4,8 (1H, CH); 3,95 (1H, H-17'); 3,85 (3H, -OMe); 3,78 (3H, -OMe); 3,7 (1H, H-2); 3,6 (3H, -OMe); 2,7 (3H, NMe); 1,72 (3H, CH₃ Alanin); 0,9-0,8 (6H, CH₃-21, CH₃-21').

Beispiel 10: 4-(N-Maleoyl)-6-amino-caproyl-Vinblastin

Zu einer Lösung von 604 mg (2,861 mM) N-Maleoyl-6-amino-capronsäure und 514 µl (4,65 mM) N-Methylmorpholin in 4 ml Ethylacetat, gekühlt auf eine Temperatur von 0°C, gibt man tropfenweise eine Lösung von 371 µl (2,861 mM) Chlorameisensäure-isobutylester in 1 ml Ethylacetat. Man rührt 3 Minuten lang bei einer Temperatur von 0°C und gibt dann 550 mg (0,715 mM) O-4-Deacetyl-vinblastin in Lösung von 1 ml Ethylacetat hinzu, wobei man die Temperatur bei 0°C hält. Anschließend läßt man auf Umgebungstemperatur ansteigen und rührt die Mischung 10 Stunden lang. Man filtriert die Lösung und die Ethylacetat-Phase wird unter Vakuum bis zur Trockne eingedampft. Der erhaltene Rückstand wird mittels Chromatographie über eine Kieselerde-Kolonne (Elution Dichlormethan/Methanol 94/4) gereinigt. Man erhält auf diese Weise 263 mg des reinen Produkts.

Ausbeute: 23%

Massenspektrum (DCI, Isobutan): 993, 979; 965 (M + 4); 963 (M + 2); 961 (M); 946; 933; 920; 906; 812; 754; 693.

IR-Spektrum (KBr, cm⁻¹): 3400; 350; 2940; 1740; 1700; 1615; 1500; 1460; 1440; 1410; 1370; 1220; 1170; 1040.

NMR-Spektrum (CDCl₃, 360 MHz, ppm):

7,47-7,12 (4H, m, H¹¹, H¹², H¹³, H¹⁴); 6,65 (2H, s, d 1 Maleimid); 6,55 (14, s, H¹⁴); 6,05 (1H, s, H¹⁷); 5,82 (1H, m, H⁷); 5,42 (1H, s, H⁴); 5,25 (1H, m, H⁶); 3,92 (1H, m, H¹⁷); 3,77 (6H, s, OCH₃ C²³OOCH₃); 3,70 (1H, s, H₂); 3,6 (3H, s, C¹⁸OOCH₃); 2,7 (3H, s, NCH₃); 2,32 (m, CH₂ Aminocapron); 1,62 (m, CH₂ Aminocapron); 0,9-0,8 (6H, t, CH₃21 + CH₃21').

Beispiel 11: 4-(N-Maleoyl)-L-glutamyl-γ-metgylester-Vinblastin

Zu einer Lösung von 282 mg (1,170 mM) N-Maleoyl-L-glutaminsäure-γ-methylester und 163 µl (1,170 mM) Triethylamin in 1,4 ml Ethylacetat, gekühlt auf eine Temperatur von 0°C, gibt man tropfenweise eine Lösung von 152 µl (1,170 mM) Chlorameisensäure-isobutylester in 1 ml Ethylacetat. Man rührt 4 Minuten lang bei einer Temperatur von 0°C und gibt anschließend 300 mg (0,330 mM) O-4-Deacetyl-Vinblastin in Lösung von 1 ml Ethylacetat hinzu, wobei man die Temperatur bei 0°C hält. Dann läßt man auf Umgebungstemperatur ansteigen und rührt die Mischung 10 Stunden lang. Man filtriert die Lösung und die organische Phase wird unter Vakuum konzentriert. Der erhaltene Rückstand wird mittels Chromatographie über eine Kieselerde-Kolonne (Elution Ethanol/Ethylacetat 30/90) gereinigt. Man erhält auf diese Weise 22 mg des reinen Produkts.

Ausbeute: 38%

Massenspektrum (DCI, Isobutan): 1036, 1022, 1009, 995 (M + 4), 992 (M + 1), 937, 885, 811, 751, 694, 635, 541.

NMR-Spektrum (CDCl₃, 360 MHz, ppm): 9,4 (1H, m, OH); 8 (1H, s, NH, Ind.); 7,5-7,10 (4H, m, H¹¹, H¹², H¹³, H¹⁴); 6,7 (2H, s, d 1 Maleimid); 6,58 (1H, s, H¹⁴); 6,05 (1H, s, H¹⁷); 5,80 (1H, m, H⁷); 5,48 (1H, s, H⁴); 5,25 (1H, m, H⁶); 4,73 (1H, m, CH^xGlu); 3,95 (1H, m, H¹⁷); 3,85 (3H, s, OCH₃Ar); 3,75 (3H, s, C²³OOCH₃); 3,63 (3H, s, C¹⁸OOCH₃); 3,58 (3H, s, OCH₃Glu); 2,80 (3H, s, NCH₃); 2,238 (m, CH₂, Glu); 0,9-0,8 (6H, t, CH₃21 + CH₃21').

IR-Spektrum: (KBr, cm⁻¹): 3430, 1740, 1715, 1615, 1500, 1460, 1430, 1405, 1385, 1250, 1225, 1030, 1005, 825.

Beispiel 12: 4-(N-Maleoyl)-L-isoleucyl-Vinblastin

Zu einer Lösung von 150 mg (0,7109 mM) N-Maleoyl-L-isoleucin und 99 µl (0,7109 mM) Triethylamin in 1 ml Ethylacetat, gekühlt auf eine Temperatur von 0°C, gibt man tropfenweise eine Lösung von 92 µl (0,7109 mM) Chlorameisensäure-isobutylester in 1 ml Ethylacetat. Man rührt 3 Minuten lang bei einer Temperatur von 0°C und gibt dann 182 mg (0,237 mM) O-4-Deacetyl-Vinblastin in Lösung von 1 ml Ethylacetat hinzu, wobei man die Temperatur bei 0°C hält. Anschließend läßt man auf Umgebungstemperatur ansteigen und rührt die Mischung 10 Stunden lang. Man filtriert die Lösung und die Ethylacetat-Phase wird unter Vakuum bis zur Trockne eingedampft. Der erhaltene Rückstand wird mittels Chromatographie über eine Kieselerde-Kolonne (Elution Ethanol/Ethylacetat 30/90) gereinigt. Man erhält auf diese Weise 133 mg des reinen Produkts.

Ausbeute: 40%

Massenspektrum (DCI, Aceton): 1039, 963 (M + 2); 904; 812; 769; 728; 637; 593; 549.

IR-Spektrum (KBr, cm⁻¹): 3480-3400; 2960; 2920; 2880; 1775; 1740; 1710; 1610; 1500; 1460; 1430; 1380; 1250; 1220; 1040; 1000; 830; 740.

NMR-Spektrum (CDCl₃, 360 MHz, ppm): 9,4 (m, OH); 7,5-7,1 (4H, m, CH arom. 11'-12'-13'-14'); 6,65 (2H, s, d, Maleimid-Bindung); 6,6 (1H, s, C¹⁴-H); 6,05 (1H, s, C¹⁷-H); 5,8 (1H, s, C⁴-H); 5,45 (1H, s, C⁶-H); 4,5 (1H, d, C-H); 3,95 (1H, m, H¹⁷); 3,8 (3H, s, OCH₃Ar); 3,75 (3H, s, C²³OOCH₃); 3,7 (1H, s, H₂); 3,6 (3H, s, C¹⁸OOCH₃); 2,65 (3H, s, NCH₃); 1,1 (d, 3H, CH₃ Isoleucin); 0,9-0,8 (9H, m, CH₃ Isoleucin + CH₃21' + CH₃21').

Beispiel 13: 4-(N-Maleoyl)-L-aspartyl-α-benzyl-ester-Vinblastin

Zu einer Lösung von 267 mg (0,88 mM) N-Maleoyl-L-aspartansäure-α-benzylester und 118 µl (0,88 mM) Triethylamin in 1 ml Ethylacetat, gekühlt auf eine Temperatur von 0°C, gibt man tropfenweise eine Lösung von 114 µl (0,88 mM) Chlorameisensäure-isobutylester in 1 ml Ethylacetat.

Man rührt 4 Minuten lang bei einer Temperatur von 0°C und gibt dann 227 mg (0,29 mM) 0-4-Deacetyl-Vinblastin in Lösung von 1 ml Ethylacetat hinzu, wobei man die Temperatur bei 0°C hält. Anschließend läßt man auf Umgebungstemperatur ansteigen und rührt die Mischung über Nacht.

Man filtriert die Lösung und die organische Phase wird unter Vakuum konzentriert. Der erhaltene Rückstand wird mittels Chromatographie über eine Kieselerde-Kolonne (Elution Ethanol/Ethylacetat 30/90) gereinigt. Man erhält auf diese Weise 105 mg des reinen Produkts.

Ausbeute: 34%

NMR-Spektrum (CDCl₃, 360 MHz, ppm):

9,05 (1H, s, NH Ind¹⁶); 7,5–7,17 (4H, m, H¹¹, H¹², H¹³, H¹⁴); 7,37–7,3 (5H, m, H Benzyl); 6,75 (2H, s, d 1 Maleimid); 6,60 (1H, s, H¹⁴); 6,19 (1H, s, H¹⁷); 5,87 (1H, m, H⁴); 5,45 (1H, s, H⁴); 5,30 (1H, m, H⁶); 5,20 (2H, m, CH₂ Benzyl); 3,95 (1H, m, H¹⁷); 3,82–3,75 (6H, s, OCH₃ + COOCH₃²³); 3,70 (1H, s, H₂); 3,62 (3H, s, C¹⁸OOCH₃); 2,60 (3H, s, NCH₃); 0,9–0,8 (6H, CH₃2¹).

IR-Spektrum (KBr, cm⁻¹):

3460, 3030, 2960, 2880, 1770, 1740, 1715, 1610, 1600, 1460, 1430, 1410, 1380, 1260, 1220, 1175, 1110, 1025, 910, 800, 730, 700.

Massenspektrum (DCI, Isobutan):

1085, 1071, 1057, 1054, 1039, 1023, 1013, 768, 708, 542, 158.

Beispiel 14: 4-(N-Maleoyl)-11-amino-undecanoyl-Vinblastin

Zu einer Lösung von 476 mg (1,69 mM) N-Maleoyl-11-aminoundecansäure und 326 µl (2,8 mM) N-Methylmorpholin in 3 ml Ethylacetat, gekühlt auf eine Temperatur von 0°C, gibt man tropfenweise eine Lösung von 218 µl (1,69 mM) Chlorameisensäure-isobutylester in 1 ml Ethylacetat. Man rührt 3 Minuten lang bei einer Temperatur von 0°C und gibt dann

433 mg (0,56 mM) 0-4-Deacetyl-Vinblastin in 1 ml Ethylacetat hinzu, wobei man die Temperatur bei 0°C hält. Anschließend läßt man auf Umgebungstemperatur ansteigen und rührt die Mischung über Nacht.

Man filtriert die Lösung und die Ethylacetat-Phase wird unter Vakuum bis zur Trockne eingedampft. Der erhaltene Rückstand wird mittels Chromatographie über eine Kieselerde-Kolonne (Elution Ethanol/Ethylacetat 30/90) gereinigt. Man erhält auf diese Weise 240 mg des reinen Produktes.

Ausbeute: 41%

NMR-Spektrum (CDCl₃, 360 MHz, ppm):

8 (1H, s, NH Ind¹⁶); 7,5–7,13 (4H, m, H¹¹, H¹², H¹³, H¹⁴); 6,68 (2H, s, d 1 Maleimid); 6,63 (1H, s, H¹⁴); 6,10 (1H, s, H¹⁷); 5,83 (1H, m, H⁷); 5,48 (1H, s, H⁴); 5,25 (1H, m, H⁶); 3,95 (1H, m, H¹⁷); 3,80 (6H, s, OCH₃ + C²³OOCH₃); 3,73 (1H, s, H²); 3,6 (3H, s, C¹⁸OOCH₃); 2,7 (3H, s, NCH₃); 1,28 (16H, broad peak, CH₂-); 0,88–0,8 (6H, 1CH₃2¹ + 1CH₃2¹).

IR-Spektrum (KBr, cm⁻¹):

3430, 3040, 2930, 2860, 1770, 1735, 1710, 1615, 1505, 1460, 1410, 1370, 1230–1250, 1000–1100.

Massenspektrum (DCI, Isobutan):

1089, 1064, 1048, 1034, 1000, 990, 976, 960.

Beispiel 15: 4-(N-Maleoyl)-12-amino-dodecanoyl-Vinblastin

Zu einer Lösung von 699 mg (2,37 mM) N-Maleoyl-12-aminododecansäure und 433 µl (3,95 mM) N-Methylmorpholin in 4,2 ml Ethylacetat, gekühlt auf eine Temperatur von 0°C, gibt man tropfenweise eine Lösung von 307 µl (2,37 mM) Chlorameisensäure-isobutylester in 1 ml Ethylacetat.

Man rührt 3 Minuten lang bei einer Temperatur von 0°C und gibt dann 607 mg (0,79 mM) 0-4-Deacetyl-Vinblastin in Lösung von 1 ml Ethylacetat hinzu, wobei man die Temperatur bei 0°C hält. Anschließend läßt man auf Umgebungstemperatur ansteigen und rührt die Mischung über Nacht. Man filtriert die Lösung und die Ethylacetat-Phase wird unter Vakuum bis zur Trockne eingedampft. Der erhaltene Rückstand wird mittels Chromatographie über eine Kieselerde-Kolonne (Elution Ethanol/Ethylacetat 30/90) gereinigt. Man erhält auf diese Weise 271 mg des reinen Produktes.

Ausbeute: 33%

NMR-Spektrum (CDCl₃, 360 MHz, ppm):

8 (1H, s, NH Ind¹⁶); 7,5–7,10 (4H, m, H¹¹, H¹², H¹³, H¹⁴); 6,65 (2H, s, d 1 Maleimid); 6,60 (1H, s, H¹⁴); 6,08 (1H, s, H¹⁷); 5,83 (1H, m, H⁷); 5,48 (1H, s, H⁴); 5,25 (1H, d, H⁶); 3,95 (1H, m, H¹⁷); 3,78 (6H, s, -OCH₃ + C²³OOCH₃); 3,73 (1H, s, H₂); 3,6 (3H, s, C¹⁸OOCH₃); 2,7 (3H, s, NCH₃); 1,25 (20H, m, -CH₂-); 0,9–0,8 (6H, 6, CH₃2¹ + CH₃2¹).

IR-Spektrum (KBr, cm⁻¹):

3460, 3040, 2930, 2860, 1735, 1700, 1610, 1500, 1460, 1430, 1410, 1365, 1245, 1220.

Massenspektrum (DCI, Isobutan):

1063, 1046 (M⁺ + 1), 1037, 1028, 1016, 312, 117.

Beispiel 16: 4-(N-Maleoyl)-L-alanyl-Lysyl-ethylester-Vinblastin

Zu einer Lösung von 40,26 mg (0,163 mM) Lysin-ethylester-Hydrochlorid und 150 µl (0,978 mM) Triethylamin in 7,5 ml absolutem Ethanol, gibt man tropfenweise eine Lösung von 150 mg (0,163 mM) 4-(N-Maleoyl)-L-alanyl-Vinblastin in 1 ml Ethanol. Man rührt über Nacht bei Umgebungstemperatur und dampft die Lösung dann ein. Der erhaltene Rückstand wird mittels Chromatographie über eine Kieselerde-Kolonne (Elution 14% MeOH/NH₃ in Ether) gereinigt. Man erhält auf diese Weise 101,2 mg des reinen Produkts.

Ausbeute: 67%

Massenspektrum (DCI, Isobutan):

1095 (M⁺ + 2); 1094 (M⁺ + 1); 1037; 921; 839; 769; 693; 615; 574; 532.

IR-Spektrum (KBr, cm⁻¹):

3460; 2940; 1740; 1710; 1615; 1500; 1460; 1430; 1590; 1250; 1225; 1120; 1010; 735.

NMR-Spektrum (CDCl₃, 360 MHz, ppm):

8 (1H, NH, 16¹); 7,5–7,1 (4H, H¹¹, H¹², H¹³, H¹⁴); 6,6 (1H, s, H⁴); 6,08 (1H, s, H¹⁷); 5,8 (1H, m, H⁷); 5,45 (1H, s, H⁴); 5,3 (1H, m, H⁶); 4,8 (1H, m, CH⁴); 4,18 (2H, q, -OCH₂); 3,83 (3H, s, OCH₃); 3,78 (3H, s, OCH₃); 3,6 (3H, s, OMe); 2,68 (3H, s, NCH₃); 1,65 (3H, d, CH₃ Ala); 1,43 (2H, s); 1,28 (CH₃, OCH₂CH₃); 0,9–0,8 (6H, CH₃⁻²¹ + CH₃⁻²¹).

Beispiel 17: Kupplung von 4-(N-Maleoyl)-L-alanyl-vinblastin mit galactosyliertem Human-Albumin (AHGal) · (V₄-Ala-Mal-AHg)

44 mg 4-(N-Maleoyl)-L-alanyl-Vinblastin werden in 1 ml Dioxan gelöst. Andererseits stellt man eine Lösung von 50 mg AHGal in 5 ml Phosphat-Puffer (0,2 M) vom pH-Wert 8,5 her. Dann wird die 4-(N-Maleoyl)-L-alanyl-Vinblastin-Lösung zu der AHGal-Lösung gegeben. Die Mischung wird bei gewöhnlicher Temperatur über Nacht gerührt und mittels Filtration über Sephadex-Gel G-25 (2,6 × 96 cm), im Gleichgewicht mit einer NaCl-Lösung (9%, pH 7,5) gereinigt. Der ausgesonderte Pic wird gesammelt (96 ml), durch Ultrafiltration konzentriert und sterilisiert.

Der Gehalt an Proteinen wird durch die Methode von Lowry gemessen und der Gehalt an Alkaloiden durch Messung der Radioaktivität eingeschätzt. Das erhaltene Konjugat enthält 13,5 Mole Alkaloid pro Mol galactosyliertes Human-Albumin.

Beispiel 18: Kupplung von 4-(N-Maleoyl)-6-amino-caproyl-Vinblastin mit galactosyliertem Human-Albumin (AHG) · (V₄-C₆-Mal-AHg)

234 mg 4-(N-Maleoyl)-6-aminocaproyl-Vinblastin werden in 1 ml Dioxan gelöst. Andererseits stellt man eine Lösung von 50 mg AHGal in 5 ml Phosphatpuffer (0,2 M) vom pH-Wert 8,5 her. Dann wird die 4-(N-Maleoyl)-6-amino-caproyl-Vinblastin-Lösung zu der AHGal-Lösung gegeben. Die Mischung wird bei gewöhnlicher Temperatur über Nacht gerührt und mittels Filtration über Sephadex-Gel G-25 (2,6 × 96 cm), im Gleichgewicht mit einer NaCl-Lösung (9%, pH 7,5), gereinigt. Der ausgesonderte Pic wird gesammelt (100 ml), durch Ultrafiltration konzentriert und sterilisiert.

Der Gehalt an Proteinen wird durch die Methode von Lowry gemessen und der Gehalt an Alkaloid durch Messung der Radioaktivität eingeschätzt. Das erhaltene Konjugat enthält 12,7 Mole Alkaloid pro Mol galactosyliertes Human-Albumin.

Beispiel 19: Kupplung von 4-(N-Maleoyl)-L-glutamyl-γ-methylester-Vinblastin mit galactosyliertem Human-Albumin (AHG) · (V₄-Glu-γ-methylester-Mal-AHg)

24 mg 4-(N-Maleoyl)-L-glutamyl-γ-methylester-Vinblastin werden in 1 ml Dioxan gelöst. Andererseits stellt man eine Lösung von 50 mg AHGal in 5 ml Phosphatpuffer (0,2 M) vom pH-Wert 8,5 her. Dann wird die 4-(N-Maleoyl)-L-glutamyl-γ-methylester-Vinblastin-Lösung zu der AHGal-Lösung gegeben. Die Mischung wird bei gewöhnlicher Temperatur über Nacht gerührt und mittels Filtration über Sephadex-Gel G-25 (2,6 × 96 cm), im Gleichgewicht mit einer NaCl-Lösung (9%, pH 7,5), gereinigt. Der ausgesonderte Pic wird gesammelt (100 ml), durch Ultrafiltration konzentriert und sterilisiert.

Der Gehalt an Proteinen wird durch die Methode von Lowry gemessen und der Gehalt an Alkaloid durch Messung der Radioaktivität eingeschätzt. Das erhaltene Konjugat enthält 11,8 Mole Alkaloid pro Mol galactosyliertes Human-Albumin.

Beispiel 20: Kupplung von 4-(N-Maleoyl)-L-isoleucyl-Vinblastin mit galactosyliertem Human-Albumin (AHGal) · (V₄-Ile-Mal-AHG)

250 mg 4-(N-Maleoyl)-L-isoleucyl-Vinblastin werden in 20 ml Dioxan gelöst. Andererseits stellt man eine Lösung von 591 mg AHGal in 16,5 ml Phosphatpuffer (0,4 M) vom pH-Wert 8,5 her. Dann wird die 4-(N-Maleoyl)-L-isoleucyl-Vinblastin-Lösung zu der AHGal-Lösung gegeben. Die Mischung wird bei gewöhnlicher Temperatur über Nacht gerührt und mittels Filtration über Sephadex-Gel G-25 (2,6 × 96 cm), im Gleichgewicht mit einer NaCl-Lösung (9%, pH 7,5), gereinigt. Der ausgesonderte Pic wird gesammelt (180 ml), durch Ultrafiltration konzentriert und sterilisiert.

Der Gehalt an Proteinen wird durch die Methode von Lowry gemessen und der Gehalt an Alkaloid durch Messung der Radioaktivität eingeschätzt. Das erhaltene Konjugat enthält 8,8 Mole Alkaloid pro Mol galactosyliertes Human-Albumin.

Beispiel 21: Kupplung von 4-(N-Maleoyl)-L-aspartyl-α-benzylester-Vinblastin mit galactosyliertem Human-Albumin (AHGal) · (V₄-Asp-α-B.E.-Mal-AHg)

105 mg 4-(N-Maleoyl)-L-aspartyl-α-benzylester-vinblastin werden in 7,9 ml Dioxan gelöst. Andererseits stellt man eine Lösung von 226 mg AHGal in 6,3 ml Phosphatpuffer (0,4 M) vom pH-Wert 8,5 her. Dann wird die 4-(N-Maleoyl)-L-aspartyl-α-benzylester-vinblastin-Lösung zu der AHGal-Lösung gegeben. Die Mischung wird bei gewöhnlicher Temperatur über Nacht gerührt und mittels Filtration über Sephadex-Gel G-25 (2,6 × 96 cm), im Gleichgewicht mit einer NaCl-Lösung (9%, pH 7,5), gereinigt. Der ausgesonderte Pic wird gesammelt (60 ml), durch Ultrafiltration konzentriert und sterilisiert.

Der Gehalt an Proteinen wird durch die Methode von Lowry gemessen und der Gehalt an Alkaloid durch Messung der Radioaktivität eingeschätzt. Das erhaltene Konjugat enthält 5,7 Mole Alkaloid pro Mol galactosyliertes Human-Albumin.

Beispiel 22: Kupplung von 4-(N-Maleoyl)-11-amino-undecanoyl-Vinblastin mit galactosyliertem Human-Albumin (AHGal) · (V₄-C₁₁-Mal-AHg)

440 mg 4-(N-Maleoyl)-11-amino-undecanoyl-Vinblastin werden in 46 ml Dioxan gelöst. Andererseits stellt man eine Lösung von 339 mg AHGal in 27 ml Phosphatpuffer (0,4 M) vom pH-Wert 8,5 her. Dann wird die 4-(N-Maleoyl)-11-amino-undecanoyl-Vinblastin-Lösung zu der AHGal-Lösung gegeben. Die Mischung wird bei einer Temperatur von 40°C 5 Stunden lang gerührt und mittels Filtration über Triacryl-Gel (5,6 × 50 cm), im Gleichgewicht mit einer NaCl-Lösung (9%, pH 7,5), gereinigt. Der ausgesonderte Pic wird gesammelt (250 ml), durch Ultrafiltration konzentriert und sterilisiert.

Der Gehalt an Proteinen wird durch die Methode von Lowry gemessen und der Gehalt an Alkaloid durch Messung der Radioaktivität eingeschätzt. Das erhaltene Konjugat enthält 10,2 Mole Alkaloid pro Mol galactosyliertes Human-Albumin.

Beispiel 23: Kupplung von 4-(N-Maleoyl)-12-amino-dodecanoyl-Vinblastin mit galactosyliertem Human-Albumin (AHGal) · (V₄-C₁₂-Mal-AHg)

120 mg 4-(N-Maleoyl)-12-amino-dodecanoyl-Vinblastin werden in 16 ml Dioxan gelöst. Andererseits stellt man eine Lösung von 339 mg AHGal in 9,4 ml Phosphatpuffer (0,4 M) vom pH-Wert 8,5 her. Dann wird die 4-(N-Maleoyl)-12-amino-dodecanoyl-Vinblastin-Lösung zu der AHGal-Lösung gegeben. Die Mischung wird bei einer Temperatur von 40°C 6 Stunden lang gerührt und mittels Filtration über Triacryl-Gel (5,6 × 50 cm), im Gleichgewicht mit einer NaCl-Lösung (9%, pH 7,5), gereinigt. Der ausgesonderte Pic wird gesammelt (240 ml), durch Ultrafiltration konzentriert und sterilisiert.

Der Gehalt an Proteinen wird durch die Methode von Lowry gemessen und der Gehalt an Alkaloid durch Messung der Radioaktivität eingeschätzt. Das erhaltene Konjugat enthält 9 Mole Alkaloid pro Mol galactosyliertem Human-Albumin.

Beispiel 24: Kupplung von 4-(N-Maleoyl)-L-alanyl-Vinblastin mit unspezifischem Immunglobulin (IgG) · (V₄-Ala-Mal-IgG).

4 mg 4-(N-Maleoyl)-L-alanyl-Vinblastin werden in 193 µl Ethanol gelöst. Andererseits stellt man eine Lösung von 10 mg IgG (626 µl) in 357 µl Phosphatpuffer (0,4 M) vom pH-Wert 8,5 und 447 µl Wasser (7 mg Prot/ml) her. Dann wird die 4-(N-Maleoyl)-L-alanyl-Vinblastin-Lösung zu der IgG-Lösung gegeben. Die Mischung wird über Nacht bei einer Temperatur von 35°C gerührt und mittels HPLC über eine Kolonne (Gel-Filtration) Dupont de Nemours GF450 × 250, eingestellt in einem Phosphat-Puffer 0,2 M vom pH-Wert 7,5, gereinigt.

Der ausgesonderte Pic wird gesammelt und dosiert. Der Gehalt an Proteinen wird durch die Methode von Lowry gemessen und der Gehalt an Alkaloid durch Messung der Radioaktivität eingeschätzt. Das Konjugat enthält 6,6 Mole Alkaloid pro Mol Immunglobulin.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen wurden einer pharmakologischen Untersuchung unterzogen.

1. Sensibilität zu lysosomalen Enzymen

Die Sensibilität der Konjugate zu lysosomalen Enzymen wurde durch Inkubation dieser Konjugate in Anwesenheit von 5 mM Cystein, 40 mM Acetatpuffer und lysosomalen Enzymen, über eine Dauer von 48 Stunden und bei einer Temperatur von 37°C untersucht. Nach 48 Stunden Inkubation werden die nicht beschädigten Proteine nach Zugabe von 5 mg Albumin-Serum durch 2 Volumen Acetonitril gefällt.

Nach Inkubation der Proben bei einer Temperatur von 4°C während 40' und Zentrifugieren bei 3000 Umdrehungen pro Minute während 40' wird die Radioaktivität des aufschwimmenden Anteiles durch Zählen eines aliquoten Teiles in flüssiger Szintillation ermittelt. Die lösliche Radioaktivität ist ein Maß für die Umsetzung des Konjugates.

Die Prozentsätze für die erhaltenen Umsetzungen sind die folgenden:

V ₄ -Ala-Mal AHg:	92 %
V ₄ -C ₆ -Mal AHg:	100 %
V ₄ -Ile-Mal AHg:	75 %
V ₄ -C ₁₁ -Mal AHg:	79 %
V ₄ -C ₁₂ -Mal AHg:	92 %

2. Stabilität im Serum

Die Stabilität der Konjugate in Anwesenheit von Serum wurde durch deren Inkubation in Anwesenheit von 62 % Kalb-Fötus-Serum über eine Dauer von 48 Stunden und bei einer Temperatur von 37°C untersucht.

Nach 48 Stunden Inkubation werden die nicht beschädigten Proteine durch Zugabe eines Volumens Trichloressigsäure (TCA 40%) gefällt.

Nach Inkubation der Proben bei einer Temperatur von 4°C während einer Stunde werden diese zentrifugiert und die Radioaktivität des aufschwimmenden Anteiles wird durch Zählen eines aliquoten Teiles in flüssiger Szintillation ermittelt. Die lösliche Radioaktivität ist ein Maß für die Umsetzung der Konjugate.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Konjugate im Verlauf von 49 Stunden stabil sind.

3. Stabilität bei saurem pH-Wert

Die Stabilität der Konjugate im sauren pH-Bereich wurde durch Inkubation der Konjugate in Anwesenheit von 40 mM Acetat-Puffer vom pH-Wert 4,5 während 48 Stunden und bei einer Temperatur von 37°C untersucht. Die Umsetzung wird durch die Technik der Fällung mittels TCA ermittelt.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Konjugate unter diesen Bedingungen stabil sind.

4. Chemotherapeutische Aktivität bei Leukämie P388

Die chemotherapeutische Aktivität der Zwischenprodukt-Derivate und der Konjugate wurde an Leukämie P388 ermittelt, verabfolgt auf intraperitonealem Weg bei der weiblichen Maus BDF₁: 10⁶ Tumorzellen werden auf intraperitonealem Weg am Tag Null inokuliert. Die Konjugate werden dann auf intraperitonealem Weg am Tag 1 verabreicht. Der ILS-Wert stellt den Prozentsatz der Überlebenszeit der behandelten Mäuse im Vergleich zu den nicht behandelten Mäusen dar.

Das molare Verhältnis kennzeichnet die Anzahl an Alkaloid-Molen pro Mol galactosyliertem Human-Albumin.

Die Zahl der am Tag 60 überlebenden Mäuse ist ebenso angegeben, wie die Dosis in mg/kg des Alkaloids und des Proteins.

3.1. Zwischenprodukt-Derivate

Produkt	Dosis mg/kg/Tag	ILS %	Überlebende am Tag 60
VBL (Vinblastin)	3	77	0/10
VCR (Vincristin)	2,7	64	0/11
V ₄ -Ala-Mal 5 (Beispiel 9)	25	100	0/7
	50	127	0/7
	75	–70	0/6
V ₄ -Glu-γ-methylester-Mal	50	88	0/10
	100	111	0/10
V ₄ -Ile-Mal (Beispiel 12)	50	148	0/7
	100	–79	0/7
V ₄ -C ₆ -Mal (Beispiel 10)	25	102	0/8
	50	218	1/7
	100	–83	0/7

Produkt	Dosis mg/kg/Tag	ILS %	Überlebende am Tag 60
V ₄ -C ₁₁ -Mal (Beispiel 14)	50	37	1/7
	100	19	1/5
V ₄ -C ₁₂ -Mal (Beispiel 15)	25	185	1/5
	50	> 633	6/8
	100	7	1/7

3.2. Konjugate

Produkt	Dosis mg/kg/Tag Vinca	Protein	molares Verhältnis	ILS %	Überlebende am Tag 60
VBL	3			77	0/10
VCR	2,7			64	0/11
V ₄ -Ala-Mal AHg	60	374-466	13,5-10,7	69	0/5
	80	450	15	133	1/5
	100	562	15	201	0/5
	130	2766	6,6	175	1/3
	150	3035	4,1	138	0/7
	150	1276	9,8	> 552	3/5
	150	913	13,7	> 574	3/5
V ₄ -Asp-a-benzyl ester Mal-AHg	60	768	5,7	47	0/5
V ₄ -Glu-γ-methyl ester-Mal AHg	60	987	4,7	67	0/5
	100	1645	4,7	75	0/5
	150	2468	4,7	88	0/5
V ₄ -Ile-Mal AHg	60	545	8,8	51	0/5
	100	908	3,8	48	0/5
	150	1362	8,8	79	0/5
V ₄ -C ₆ -Mal AHg	60	400	12	95	0/5
	150	995	12	137	1/5
V ₄ -C ₁₁ -Mal AHg	60	378	11,3	147	1/5
	80	504	11,8	153	1/5
		753	7,9		
	90	658	10,2	227	
	100	630	11,8	> 606	3/5
	100	646	7,9	186	3/10
	150	945	11,8	45	0/5
V ₄ -C ₁₂ -Mal AHg	90	741	9	> 769	5/5