



Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer: **AT 393 125 B**

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 2604/87

(51) Int.Cl.⁵ : **C07H 15/252**
C07K 15/00, A61K 31/71, 39/395

(22) Anmeldetag: 8.10.1987

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 1.1991

(45) Ausgabetag: 26. 8.1991

(30) Priorität:

30. 3.1987 JP 74259/87 beansprucht.

(73) Patentinhaber:

HOECHST JAPAN LIMITED
TOKIO (JP).

(54) CYTORHODIN S-DERIVATE, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND SIE ENTHALTENDE ARZNEIMITTEL

(57) Es werden Cytorhodin S-Derivate, insbesondere Cytorhodin S-Immunglobulin-Komplexe, beschrieben.

Cytorhodin S selbst besitzt eine sehr hohe Antikrebswirksamkeit, doch wirken die Komplexe auf Krebszellen selektiver und sind als Antikrebsmittel nützlicher.

Zur Herstellung von Cytorhodin S-Immunglobulin-Komplexen wird die Oxogruppe an der Saccharidkette von Cytorhodin S mit einem Alkalimetalcyanoborhydrid in Gegenwart eines Ammoniumsalzes oder einer Verbindung mit Aminogruppe zu einer Aminogruppe oder substituierten Aminogruppe reduziert. Dann werden die so hergestellten Cytorhodin S-Derivate mittels eines bifunktionellen Vernetzungsmittels, eines Kondensationsmittels oder eines Spacers an Immunglobulin gebunden.

Neue Zwischenproduktderivate sind auch als Antikrebsmittel nützlich.

AT 393 125 B

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Cytorhodin S-Derivate, insbesondere auf Cytorhodin S-Immunglobulin-Komplexe.

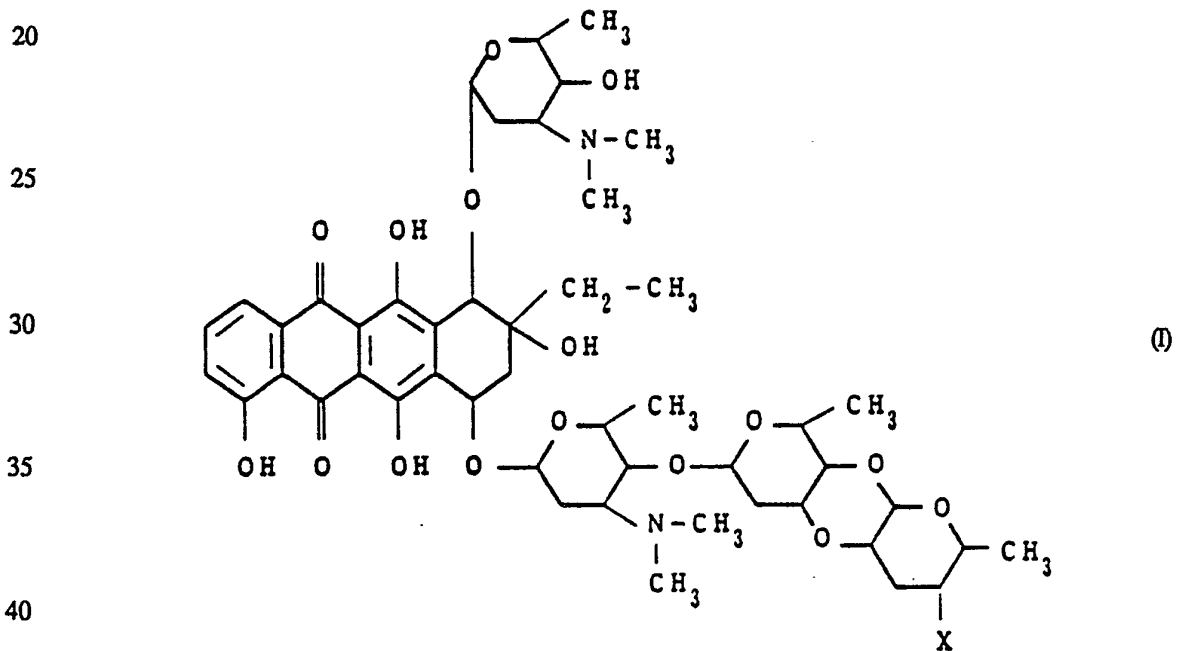
Die Cytorhodin S-Derivate der Erfindung wirken auf Krebszellen selektiv und sind als ein Antikrebsmittel nützlich.

5 Es ist berichtet worden, daß Cytorhodin S durch Säurebehandlung eines rohen Cytorhodin-Gemisches hergestellt wird, das durch Züchtung von Streptomyces Y-11472 (Hinterlegungs-Nr. DSM-2658) produziert wird und Antikrebswirksamkeiten aufweist (Japanische Patentauslegung Sho 60-48994). Obgleich Cytorhodin S selbst sehr hohe Antikrebswirksamkeiten besitzt, ist es dennoch wünschenswert, Mittel zu entwickeln, welche selektiv auf Krebszellen wirken und hohe Bioverfügbarkeit haben.

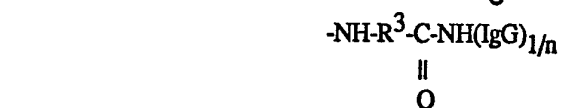
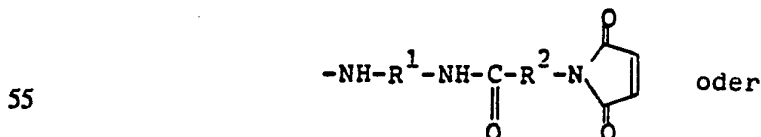
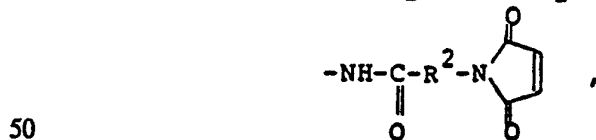
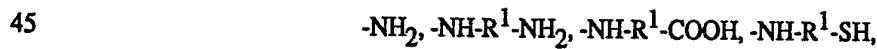
10 Als ein Ergebnis umfassender Studien zur Entwicklung von Cytorhodin S-Derivaten, die überlegene selektive Spezifität gegen Krebszellen haben, ist es uns gelungen, Cytorhodin S-Immunglobulin-Komplexe zu erhalten, welche die Antikrebswirksamkeiten von Cytorhodin S selbst beibehalten. Die vorliegende Erfindung ist auf der Grundlage der obigen Entdeckung vollendet worden.

15 Gemäß der Erfindung werden Cytorhodin S-Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ein diese enthaltendes Antikrebsmittel wie folgt zur Verfügung gestellt:

1) Ein Cytorhodin S-Derivat, das durch die allgemeine Formel (I)



repräsentiert wird, worin X eine Gruppe der Formel

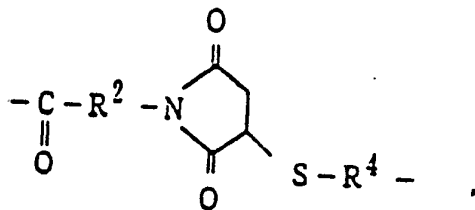


darstellt, wobei R^1 eine zweiwertige Kohlenwasserstoffgruppe, die durch beliebige Substituenten substituiert sein kann, bedeutet, R^2 eine zweiwertige Kohlenwasserstoffgruppe ist, R^3 eine zweiwertige organische Gruppe bedeutet, IgG einen Immunglobulinrest bedeutet, und n eine ganze Zahl von 1 bis 15 bedeutet, und Salze davon.

2) Ein Cytorhodin S-Derivat gemäß obigem Punkt 1), worin R^3 für R^1 oder eine Gruppe der Formel

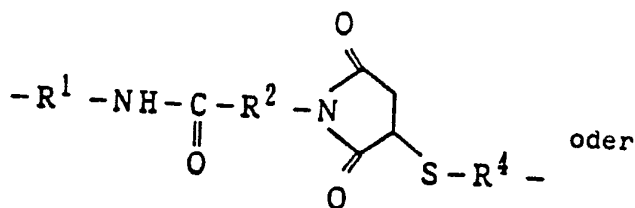
5

10



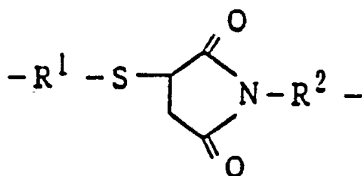
15

20



25

30



steht, wobei R^4 eine zweiwertige Kohlenwasserstoffgruppe bedeutet.

3) Ein Cytorhodin S-Derivat nach obigem Punkt 2), wobei R^2 eine Propylengruppe ist, und R^4 eine Methylengruppe ist.

35

4) Ein Cytorhodin S-Derivat nach irgendeinem der obigen Punkte 1) bis 3), wobei n 5 bis 12 ist.

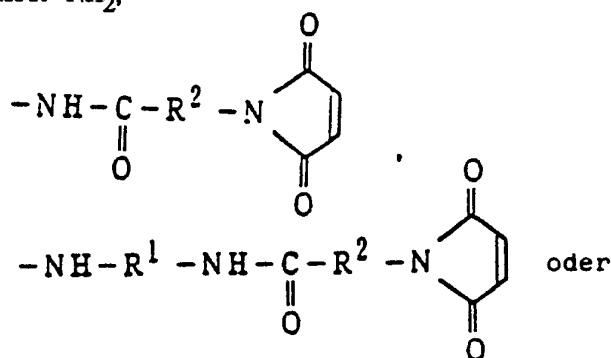
5) Ein Cytorhodin S-Derivat nach irgendeinem der obigen Punkte 1) bis 4), wobei das IgG ein Rest des Antikörpers gegen carcinoembryonisches Antigen (CEA) ist.

6) Ein Verfahren zur Herstellung eines Cytorhodin S-Derivats der allgemeinen Formel (I), worin X eine Gruppe der Formel $-NH_2$, $-NH-R^1-NH_2$,

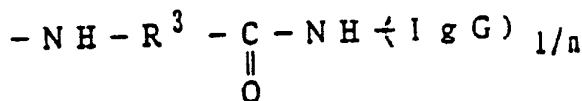
40

45

50

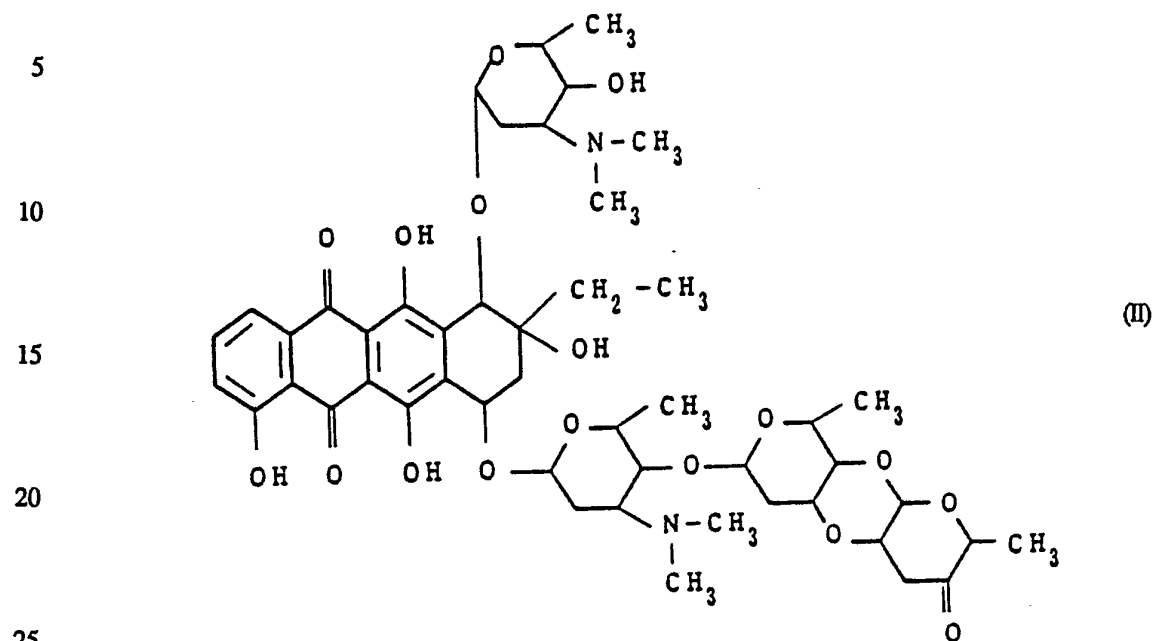


55



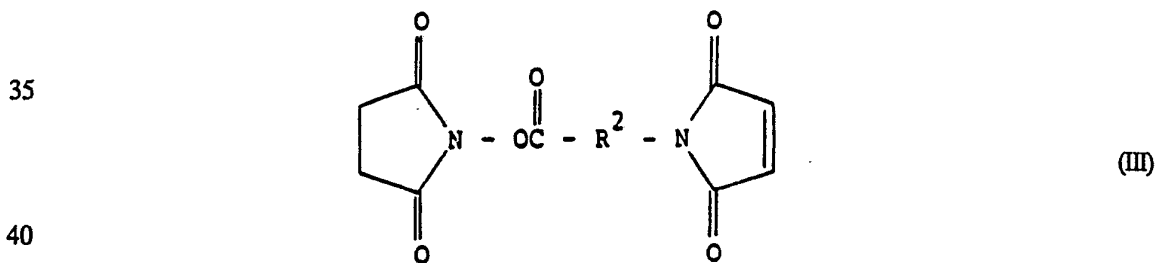
bedeutet, wobei R^1 eine zweiwertige Kohlenwasserstoffgruppe bedeutet, welche durch beliebige Substituenten substituiert sein kann, R^2 eine zweiwertige Kohlenwasserstoffgruppe bedeutet, R^3 einen zweiwertigen, organischen Rest bedeutet, IgG einen Immunglobulinrest bedeutet, und n eine ganze Zahl von 1 bis 15 bedeutet,

welches umfaßt: das Reduzieren eines Cytorhodin S der Formel (II)



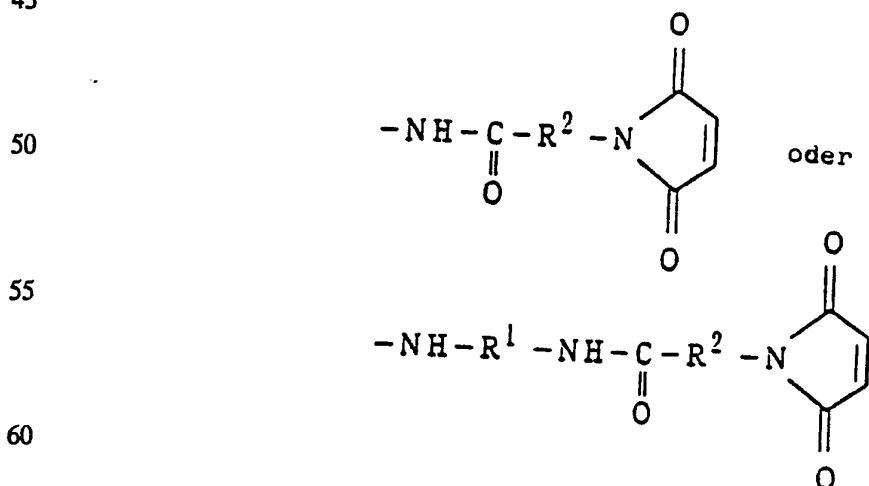
30

mit einem Alkalimetallcyanoborhydrid in Gegenwart eines Ammoniumsalzes oder einer durch $\text{NH}_2\text{-R}^1\text{-NH}_2$ repräsentierten Verbindung, wobei R^1 die gleiche Bedeutung wie oben definiert hat, zur Gewinnung eines Cytorhodin S-Derivats, worin X in der oben angegebenen Formel (I) $-\text{NH}_2$ oder $-\text{NH-R}^1\text{-NH}_2$ ist, erforderlichenfalls das Umsetzen des Produktes mit einer Maleimidverbindung der Formel (III)

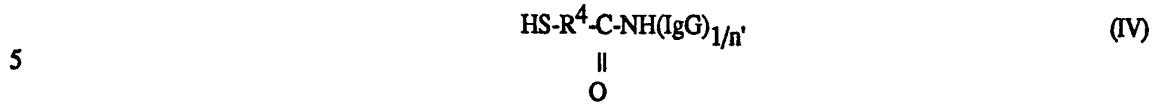


45

worin R^2 die gleiche Bedeutung wie oben definiert hat, zur Gewinnung eines Cytorhodin S-Derivats (I), worin X



ist, und weiterhin, falls erforderlich, das Umsetzen des Produktes mit einem Thiolderivat von Immunglobulin der Formel (IV)

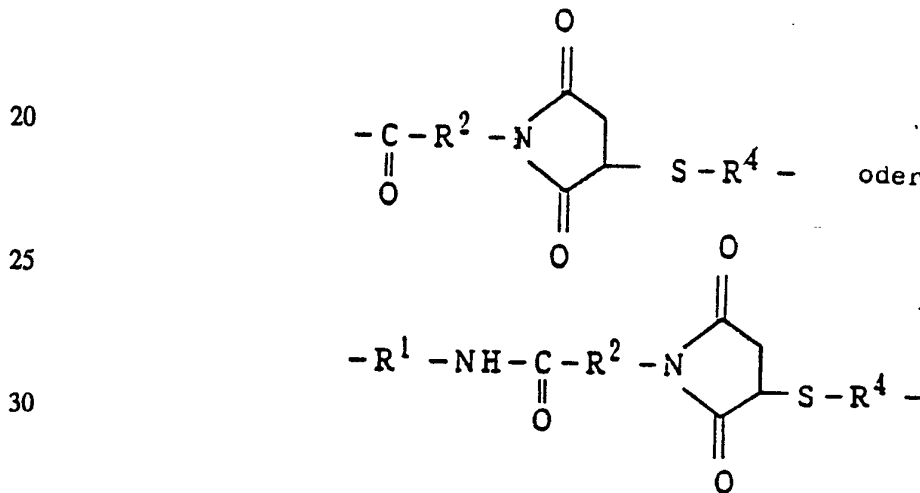


worin R⁴ eine zweiwertige Kohlenwasserstoffgruppe bedeutet, IgG die gleiche Bedeutung wie oben definiert hat, und n' eine ganze Zahl von 1 bis 20 bedeutet, zur Gewinnung eines Cytorhodin S-Derivats (I), worin X



ist.

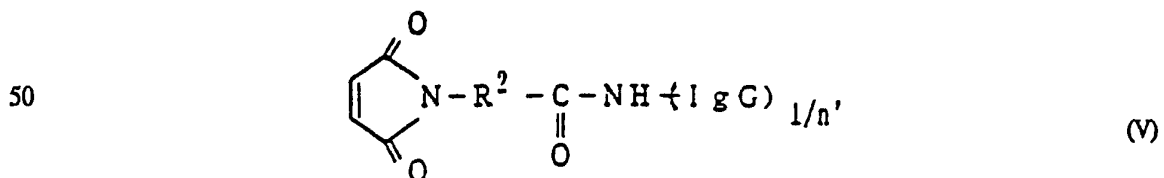
15 7) Ein Verfahren zur Herstellung eines Cytorhodin S-Derivats gemäß obigem Punkt 6), wobei R³



ist.

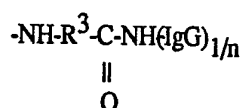
35 8) Ein Verfahren zur Herstellung eines Cytorhodin S-Derivats der allgemeinen Formel (I), worin X eine Gruppe -NH-R¹-SH oder -NH-R³-C-NH(IgG)_{1/n} bedeutet, in der R¹ eine zweiwertige Kohlenwasserstoffgruppe,

die durch beliebige Substituenten substituiert sein kann, bedeutet, R³ eine zweiwertige, organische Gruppe bedeutet, IgG einen Immunglobulinrest bedeutet, und n eine ganze Zahl von 1-15 bedeutet, welches umfaßt: das Reduzieren eines Cytorhodin S der oben erwähnten Formel (II) mit einem Alkalimetallcyanoborhydrid in Gegenwart einer durch NH₂-R¹-SH repräsentierten Verbindung, wobei R¹ die gleiche Bedeutung wie oben definiert hat, zur Gewinnung eines Cytorhodin S-Derivats (I), worin X in der oben erwähnten Formel (I) -NH-R¹-SH ist, und erforderlichenfalls das Umsetzen des Produktes mit einem Maleimiderivat von Immunglobulin der Formel (V)



55

worin R² und IgG die gleichen Bedeutungen wie oben definiert haben, und n' eine ganze Zahl von 1-20 bedeutet, zur Gewinnung eines Cytorhodin S-Derivats (I), worin X

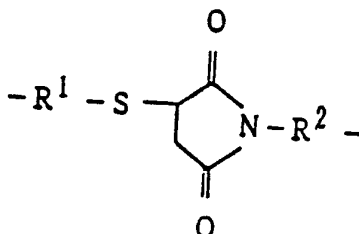


5

ist.

9) Ein Verfahren zur Herstellung eines Cytorhodin 5-Derivats nach obigem Punkt 8), wobei R^3

10



15

ist.

10) Ein Verfahren zur Herstellung eines Cytorhodin S-Derivats der allgemeinen Formel (I), worin X eine -NH-R¹-COOH- oder -NH-R³-C-NH(IgG)_{1/n}-Gruppe bedeutet, in welcher R¹ eine zweiwertige

20



25

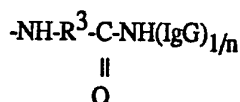
Kohlenwasserstoffgruppe bedeutet, die durch beliebige Substituenten substituiert sein kann, R³ eine zweiwertige, organische Gruppe bedeutet, IgG einen Immunglobulinrest bedeutet, und n eine ganze Zahl von 1-15 bedeutet, welches umfaßt: das Reduzieren von Cytorhodin S der oben angegebenen Formel (II) mit einem Alkalimetallcyanoborhydrid in Gegenwart einer durch NH₂-R¹-COOH repräsentierten Verbindung, worin R¹ die gleiche Bedeutung wie oben definiert hat, und erforderlichenfalls das Umsetzen des Produktes mit einem Immunglobulin der Formel (VI)

30



worin IgG die gleiche Bedeutung wie oben definiert hat, und n eine ganze Zahl von 1-15 bedeutet, zur Gewinnung eines Cytorhodin S-Derivats (I), worin X in der Formel (I)

35



ist.

11) Ein Verfahren zur Herstellung eines Cytorhodin S-Derivats nach obigem Punkt 10), wobei $R^3 R^1$ ist.

12) Ein Antikrebsmittel, enthaltend ein Cytorhodin S-Derivat, das durch die oben angegebene Formel (I) repräsentiert wird.

Kurze Beschreibung der Zeichnung

Fig. 1 zeigt das Massenspektrum von Cytorhodin S-Aminoderivat.

Fig. 2 zeigt Eluierungsmuster des Cytorhodin S-Immunglobulin-Komplexes und von Cytorhodin S bei der Säulenchromatographie.

Fig. 3 zeigt das UV-Spektrum des Cytorhodin S-Immunglobulin-Komplexes.

Fig. 4 zeigt graphisch die zellenwachstumshemmenden Wirksamkeiten von Cytorhodin S und des Cytorhodin S-Kaninchen-Immunglobulin-Komplexes gegen L1210-Zellen.

Fig. 5 zeigt graphisch die Zellenwachstumshemmungswirksamkeiten von Cytorhodin S, von Cytorhodin S-MA 204-Immunkomplex, von Cytorhodin S-Kaninchen-Immunglobulin-Komplex und von der Kontrolle gegen Colo 205-Zellen.

Fig. 6 zeigt graphisch die Zellenwachstumshemmungswirksamkeiten des Cytorhodin S-Immunglobulin-Komplexes und des Aclacinomycin-Immunglobulin-Komplexes gegen L1210-Zellen.

55

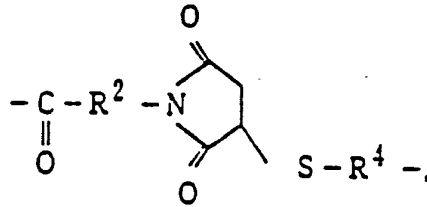
Ausführliche Beschreibung der Erfindung

Als bevorzugte Beispiele für R¹ in der oben angegebenen Formel (I) werden Gruppen erwähnt, die aus bekannten α -Aminosäuren, β -, γ - und ϵ -Aminosäuren und β -, γ - und ϵ -Thiolaminen stammen.

Als bevorzugte Beispiele für R^2 in der obigen Formel (I) werden niedrige Alkylengruppen, wie Methylen, Ethylen und Propylen, Phenylengruppen, wie p-Phenylen und m-Phenylen, C_4 - C_7 -Cycloalkylengruppen, wie Cyclohexylen, Phenylenylniedrigalkylgruppen, wie Phenylenylmethyl, und C_4 - C_7 -Cycloalkenyl-niedrigalkylgruppen, wie Cyclohexylenylmethyl, erwähnt. Als bevorzugte Beispiele für R^3 werden Gruppen erwähnt, die durch die Formeln

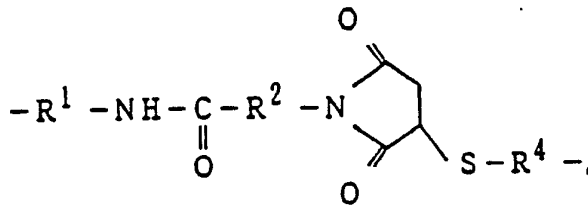
5

10

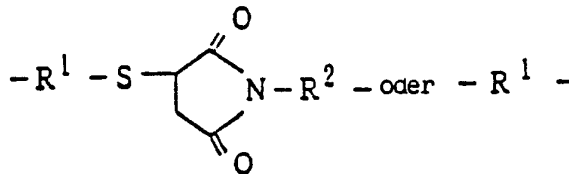


15

20



25



repräsentiert werden.

30

Als bevorzugte Beispiele für R^4 werden niedrige Alkylengruppen, wie Methylen, Ethylen und Propylene, Phenylengruppen, wie p-Phenylen- und m-Phenylengruppen, C_4 - C_7 -Cycloalkylengruppen, wie Cyclohexylen, Phenylenyl-niedrigalkylgruppen, wie Phenylenylmethyl, und C_4 - C_7 -Cycloalkylenylniedrig-alkylgruppen, wie Cyclohexylenylmethyl, erwähnt. Der durch IgG repräsentierte Immunglobulinrest bedeutet einen Immunglobulinrest, worin n Aminogruppen aus einem Immunglobulin entfernt sind. IgG in der Formel (I) umfaßt einen solchen, in welchem einige der in das Immunglobulin eingeführten Thiolgruppen (-NH-C-R²-SH) verbleiben.

35

Dies ist deswegen so, weil nicht alle der Thiolgruppen in dem Thiolderivat von Immunglobulin (IV) mit dem Cytorhodin S-Derivat umgesetzt sind, und einige der Thiolgruppen unumgesetzt bleiben.

Als Immunglobulinrest wird ein Antikörper bevorzugt, der sich spezifisch mit Krebszellen verbindet.

40

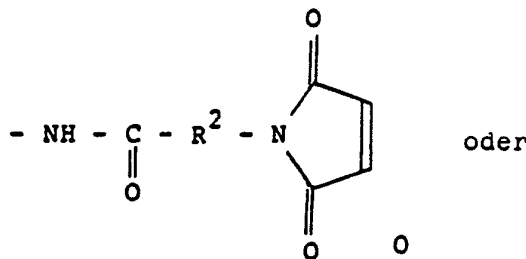
1/n gibt die Anzahl der Immunglobulinmoleküle je Molekül Cytorhodin S an, welche 1/1 bis 1/15 beträgt. Dies bedeutet, daß 1 bis 15 Moleküle des Cytorhodin S an ein Molekül des Immunglobulins gebunden sind.

Eine durch die Formel (I) repräsentierte Verbindung, worin X

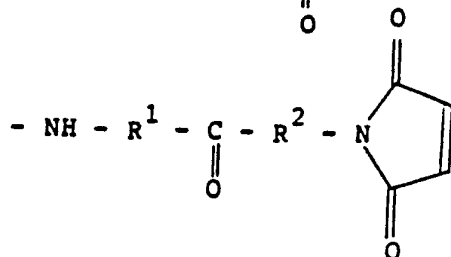
45



50



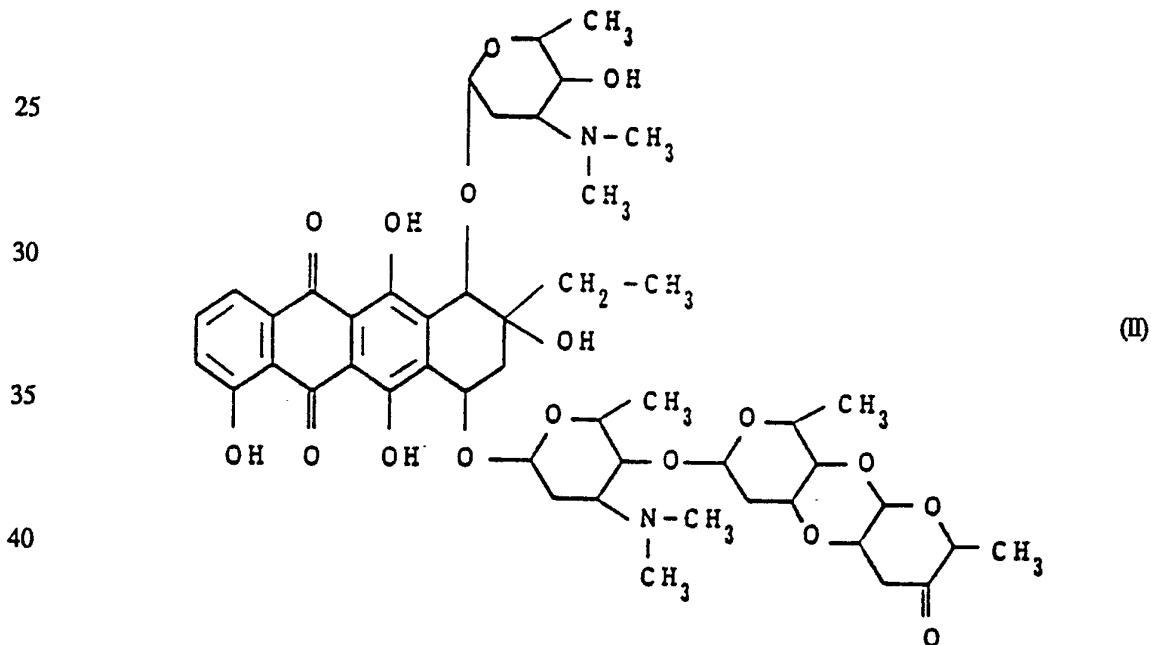
55



ist, ist eine Zwischenproduktverbindung für die Herstellung der Immunglobulin-Komplexe, welche selbstverständlich Antikrebswirksamkeiten von Cytorhodin S beibehält, und auch, so wie sie ist, ein Antikrebsmittel sein kann.

Bei der Bildung eines Komplexes zwischen einem Antikrebsmittel und Immunglobulin wird im allgemeinen das Antikrebsmittel an das Immunglobulin mittels eines bifunktionellen Vernetzungsmittels, eines Kondensationsmittels oder eines Spacers gebunden. Das obige Ziel wird durch Verbindung eines Antikrebsmittels mit einem bifunktionellen Vernetzungsmittel, einem Kondensationsmittel oder einem Spacer über eine funktionelle Gruppe (wie eine Amino-, Carboxyl- oder Thiolgruppe) des ersteren erreicht. Cytorhodin S hat jedoch keine solchen funktionellen Gruppen und sollte notwendigerweise chemisch modifiziert werden, um ein Derivat herzustellen, das Amino-, Carboxyl- oder Thiolgruppen enthält. Um solche Derivate von Cytorhodin S zu erhalten, ohne dessen Antikrebswirksamkeiten zu verlieren, kann die Oxogruppe an der Saccharidkette in eine Aminogruppe umgewandelt werden.

Allgemeine Verfahren zur Reduktion der Oxogruppe umfassen die Verwendung von Lithiumaluminiumhydrid (LiAlH_4), Natriumborhydrid (NaBH_4) od. dgl. Das Reagens, das zur selektiven Reduktion der Oxogruppe an der Saccharidkette ohne Reduktion der Oxogruppe am Anthracyclinring verwendet werden kann, ist Natriumcyanoborhydrid (NaBCNH_3) oder Lithiumcyanoborhydrid (LiBCNH_3). Wird ein solches Reduktionsmittel in Gegenwart eines Ammoniumsalzes oder einer organischen, Aminogruppe(n)-haltigen Verbindung angewendet, so wird die Oxogruppe an der Saccharidkette selektiv zur Aminogruppe reduziert, wobei das Derivat von Cytorhodin S gebildet wird. Tatsächlich wird Cytorhodin S der Formel (II)



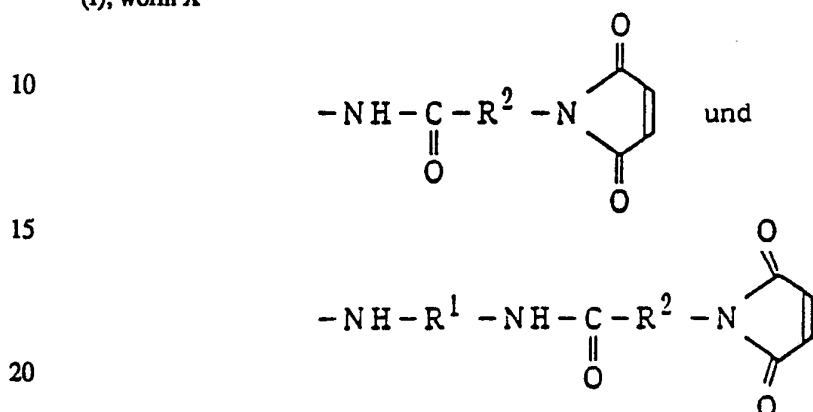
in ein Cytorhodin S-Derivat (I), in welchem $\text{X}-\text{NH}_2$ oder $-\text{NH}-\text{R}^1-\text{NH}_2$, $-\text{NH}-\text{R}^1-\text{COOH}$ oder $-\text{NHR}^1-\text{SH}$ ist, durch die Reduktion mit einem Alkalimetallcyanoborhydrid in Gegenwart eines Ammoniumsalzes oder einer organischen Verbindung, die eine durch $\text{NH}_2-\text{R}^1-\text{NH}_2$, $\text{NH}_2-\text{R}^1-\text{COOH}$ oder $\text{NH}_2-\text{R}^1-\text{SH}$ repräsentierte Aminogruppe enthält, umgewandelt.

Beispiele für das Ammoniumsalz umfassen Ammoniumacetat, Ammoniumpropionat und Ammoniumchlorid. Als Beispiele für die Aminogruppe(n)-haltige organische Verbindung werden bekannte α -Aminosäuren, wie Lysin und Cystein, β -, γ - und ϵ -Aminosäuren, wie γ -Aminobuttersäure, Aminosäureester, wie der Ethylester von Glycin, und Thiolamine, wie Aminoethanthiol und Aminothiophenol, erwähnt. Zu Beispielen für das Alkalimetallcyanoborhydrid gehören Lithium-(oder Natrium-)cyanoborhydrid.

Die obige Umsetzung wird bequem durch Auflösen von Cytorhodin S und eines Ammoniumsalzes oder einer Aminogruppe(n) enthaltenden organischen Verbindung in einem mit Wasser mischbaren, organischen Lösungsmittel (wie z. B. Methanol oder Ethanol) oder in einer keinerlei primäre und sekundäre Amine enthaltenden, auf pH 8 eingestellten Pufferlösung (wie z. B. einem Phosphat- oder Boratpuffer oder 2,4,6-Trimethylpyridin-chlorwasserstoffsäurepuffer) und Zugabe eines Alkalimetallcyanoborhydrids zu der Lösung bei Zimmertemperatur oder unter Eiskühlung ausgeführt.


Das in dem Reaktionsgemisch enthaltene Produkt kann durch übliche Mittel gewonnen werden. Beispielsweise wird es durch Einstellung des Reaktionsgemisches auf pH 8, Extraktion mit einem geeigneten organischen Lösungsmittel, wie Dichlormethan, und Abdestillieren des Lösungsmittels aus dem Extrakt, oder mittels einer präparativen HPLC, gewonnen.


5 Das so erhaltene Aminoderivat von Cytorhodin S, in welchem X-NH₂ oder -NH-R¹-NH₂ ist, wird dann mit einer Maleimidverbindung der obigen Formel (III) unter Bildung eines Cytorhodin S-Derivats der obigen Formel (I), worin X




ist, umgesetzt. Als Nebenprodukt wird N-Hydroxysuccinimid gebildet.

25 Als Beispiele der Maleimidverbindung (III) werden erwähnt: N-g-Maleimidobutyryloxy-succinimid [GMBS,

R²: (CH₂)₃], Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexancarboxylat (R²: -CH₂), m-

30 Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester (R²: ) und Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)-

butyrat (R²: (CH₂)₃-).

35 Die obige Umsetzung kann bequem durch Behandlung eines Cytorhodin S-Aminoderivats mit einer Maleimidverbindung in einem geeigneten Lösungsmittel (z. B. Dichlormethan, Dichlorethan, Chloroform, Pyridin, Triethylamin usw.) bei Zimmertemperatur oder unter Eiskühlung ausgeführt werden.

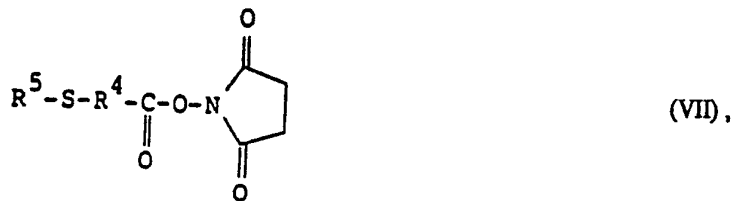
40 Die so erhaltenen Cytorhodin S-Derivate, in welche eine Maleimidgruppe eingeführt worden ist, sind geeignet, mit irgendeinem der Thiogruppen-hältigen Proteine oder irgendeiner der Thiogruppen-hältigen Verbindungen eine Additionsreaktion einzugehen. Die Doppelbindung der Maleimidgruppe nimmt an der elektrophilen Additionsreaktion mit der Thiolgruppe teil. Wie unten beschrieben, ermöglicht daher die Additionsreaktion zwischen der Maleimidgruppe und der in das Immunglobulin eingeführten Thiolgruppe die Bildung eines Komplexes.

45 Im allgemeinen ist das für die Herstellung des Komplexes verwendete Immunglobulin vorzugsweise ein monoclonaler oder polyclonaler Antikörper gegen das spezifisch in Krebszellen gebildete Membranprotein. Es ist auch bei klinischer Anwendung wünschenswert, den Antikörper zu verwenden, aus dem der Fc-Abschnitt entfernt worden ist, falls ein Antikörper von nicht-humanem Ursprung verwendet wird. Unter Berücksichtigung der Wirksamkeit bei der Addition des Cytorhodin S wird jedoch vorzugsweise der gesamte Antikörper angewendet.

50 Als besonders bevorzugtes Immunglobulin wird ein monoclonaler Antikörper gegen Krebs-spezifisches Protein, wie carcinoembryonisches Antigen (CEA) oder α-Fetoprotein (AFP), erwähnt. Der monoclonale Antikörper gegen carcinoembryonisches Antigen wird nach einem üblichen Verfahren hergestellt, bei welchem Mäuse mit dem Antigen behandelt werden, die Milz aus den Mäusen isoliert wird, die Milzzellen mit HAT-empfindlichen Myelomzellen nach der Polyethylenglykollmethode verschmolzen werden, und das Hybridom unter Verwendung von HAT-Medium als Selektiermedium selektiert und in Mäuse transplantiert wird.

55 Vor der Umsetzung von Immunglobulin mit Cytorhodin S, das zur Herstellung eines Komplexes eine Maleimidgruppe aufweist, wird eine Thiolgruppe in das Immunglobulin eingeführt. Um die Thiolgruppe einzuführen, wird das Immunglobulin mit einer N-Succinimidverbindung der allgemeinen Formel (VII)

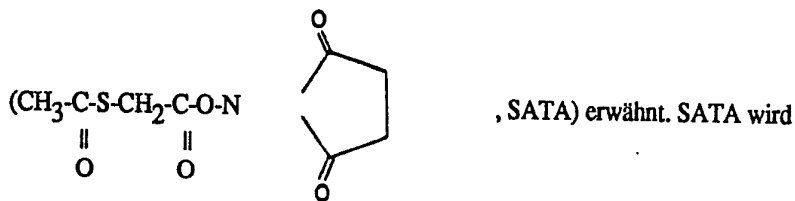
5



10 worin R^4 die gleiche Bedeutung wie oben definiert hat, und R^5 eine Thiol Schutzgruppe, z. B. eine Acylgruppe, wie Acetyl, oder eine 2-Pyridylthiogruppe bedeutet, zur Gewinnung eines Thiolderivats von Immunglobulin mit der oben erwähnten Formel (IV) umgesetzt.

Als ein bevorzugtes Beispiel der N-Succinimidverbindung (VII) wird N-Succinimidyl-S-acetylthioacetat

15



20

mit der Aminogruppe in dem Immunglobulin unter Bildung einer Amidbindung $-\text{NH}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{C}-\text{CH}_3$

25

umgesetzt, in welcher die Thiolgruppe durch eine Acetylgruppe gesch\u00fctzt ist, und N-Hydroxysuccinimid wird als Nebenprodukt gebildet. Die Schutzgruppenabspaltung an der Thiolgruppe wird z. B. mit Hydroxylamin bei pH 7,5 bewirkt, um die erstere in die reaktive Gruppe $-\text{NH}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{SH}$ umzuwandeln.

30

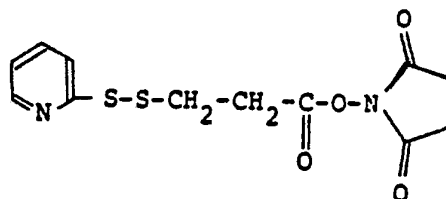
Die Thiolgruppe ist geeignet, unter bestimmten Bedingungen mit dem Ergebnis oxidiert zu werden, da\u00df Immunglobulinpolymere gebildet werden. Es ist daher w\u00fcnschenswert, die Abspaltung der Acetyl Schutzgruppe bei 25 °C w\u00e4hrend etwa 1 Stunde und unmittelbar vor der Umsetzung mit einem die Maleimidgruppe aufweisenden Cytothodin S-Derivat auszuf\u00fchren.

35

Die Thiolgruppe wird in Abh\u00e4ngigkeit von der verwendeten Menge an SATA in einem Anteil von 1-20, vorzugsweise 5-20, pro Molek\u00fcl Immunglobulin eingef\u00fchrt. Die Einf\u00fchrung f\u00fchrt zu keinem Verlust an Antik\u00f6rperwirksamkeit des Immunglobulins.

Die Verwendung von N-Succinimidyl-3-(2-pyridylthio)propionat

40



45

als ein Thiol-einf\u00fchrendes Reagens anstelle von SATA und die Verwendung von Dithiothreitol als Schutzgruppen-abspaltendes Mittel f\u00fchrt, zusammen mit der Aminogruppe im Immunglobulin, zur Bildung der Gruppe $-\text{NH}-\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{SH}$.

50



Das so gebildete, eine Thiolgruppe aufweisende Immunglobulin (IV) wird mit dem Maleimid aufweisenden Cytothodin S zur Herstellung des Immunglobulin-Komplexes gem\u00e4\u00df der Erfindung umgesetzt.

55

Die obige Reaktion kann bequem durch Vermischen einer L\u00f6sung des Maleimidgruppen aufweisenden Cytothodin S-Derivats in einem wassermischbaren, organischen L\u00f6sungsmittel (z. B. Methanol, Ethanol, Dimethylformamid) mit einer w\u00e4sserigen L\u00f6sung des Thiolgruppen aufweisenden Immunglobulins bei pH 7,5 ausgef\u00fchrt werden.

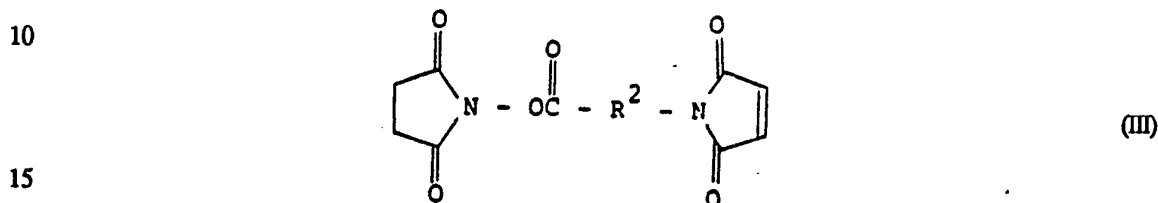
60

Cytothodin S-Derivate mit einer eingef\u00fchrten Thiolgruppe, in welchen $X-\text{NH}-R^1-\text{SH}$ ist, sind bef\u00e4higt, mit einem beliebigen Protein oder einer beliebigen Verbindung mit eingef\u00fchrter Maleimidgruppe eine

Additionsreaktion einzugehen. Die Doppelbindung der Maleimidgruppe wird mit der Thiolgruppe durch elektrophile Additionsreaktion umgesetzt. Wie unten beschrieben, kann daher durch Addition der Thiolgruppe an die Maleimidgruppe in dem Immunglobulin mit eingeführter Maleimidgruppe ein Komplex gebildet werden.

Das zur Herstellung des Komplexes zu verwendende Immunglobulin ist ein solches wie oben beschrieben.

5 Vor der Umsetzung von Immunglobulin mit eine eingeführte Thiolgruppe aufweisendem Cytorhodin S werden Maleimidgruppen in das Immunglobulin eingeführt. Um die Maleimidgruppen einzuführen, wird Immunglobulin mit einer Maleimidverbindung der Formel (III)

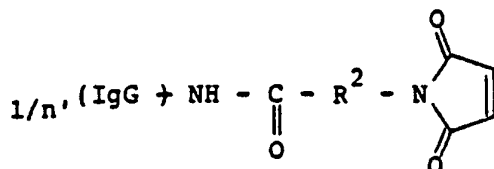


20 worin R² die gleiche Bedeutung wie oben definiert hat, unter Bildung eines Maleimidderivates von Immunglobulin mit der oben angegebenen Formel (V) umgesetzt. Bevorzugte Beispiele für die Maleimidverbindung (III) sind N-γ-Maleimidobutyryloxysuccinimid und andere, wie sie oben erwähnt sind.

Die Maleimidverbindung (III) bildet durch nukleophile Substitutionsreaktion mit Aminogruppen in dem Immunglobulin eine Amidbindung, wobei ein Maleimidderivat von Immunglobulin der Formel (V)

25

30



und, als ein Nebenprodukt, N-Hydroxysuccinimid entstehen.

35 In Abhängigkeit von der Menge der Maleimidverbindung (III) wird die Maleimidgruppe in einem Anteil von 1-20, und vorzugsweise 5-20, je Molekül des Immunglobulins eingeführt. Die Einführung führt jedoch nicht zu einem Wirksamkeitsverlust des Immunglobulins als Antikörper.

Die Immunglobulin-Komplexe der Erfindung werden durch Umsetzung des eingeführte Maleimidgruppen aufweisenden Immunglobulins (V) mit dem eine eingeführte Thiolgruppe aufweisenden Cytorhodin S hergestellt.

40 Die Umsetzung wird bequem durch Vermischen einer pH 7,5 aufweisenden Lösung des eine eingeführte Thiolgruppe aufweisenden Cytorhodin S in einem mit Wasser mischbaren Lösungsmittel (z. B. Methanol, Ethanol, Dimethylformamid od. dgl.) oder einer Pufferlösung vom pH 7,5 (der gleichen, wie sie zur Auflösung von Immunglobulin verwendet wurde) mit einer wässrigen Lösung des Immunglobulins mit eingeführter Maleimidgruppe ausgeführt.

45 Die Cytorhodin S-Derivate, in welchen X -NH-R¹-COOH ist, sind geeignet, unter Mitwirkung eines entsprechenden Kondensationsmittels mit Aminogruppen eines Proteins oder einer Verbindung unter Peptidbindung eine Bindung einzugehen. Die Peptidbindung wird durch nukleophile Reaktion eines Aktivesters der Carboxylgruppe gebildet, der durch das Kondensationsmittel mit der Aminogruppe in dem Protein oder der Verbindung gebildet worden ist.

50 Daher kann ein Komplex durch Einführung eines Cytorhodin S-Derivats über eine Peptidbindung mit der in die Aminogruppe (Seitenkette, wie Lysin-Rest), die ursprünglich im Immunglobulin enthalten war, neu eingeführten Carboxylgruppe gebildet werden.

55 Die Cytorhodin S-Derivate, in welchen X -NH-R¹-COOH ist, werden durch ein Kondensationsmittel unter Bildung eines Komplexes in einen Aktivester umgewandelt. Um den Aktivester herzustellen, wird das Cytorhodin S-Derivat, in welchem X in der oben angegebenen Formel (I) -NH-R¹-COOH ist, mit einem Carbodiimid umgesetzt.

60 Als bevorzugte Beispiele des Carbodiimids werden Dicyclohexylcarbodiimid, 1,3-Dimethylaminopropyl-3-ethylcarbodiimid-hydrochlorid, Diethylcarbodiimid, Diphenylcarbodiimid, Dibenzylcarbodiimid, Cyanamid u. dgl., erwähnt. Die Umsetzung wird ausgeführt, indem eine Lösung des Cytorhodin S-Derivats mit dem Carbodiimid in einem mit Wasser mischbaren, organischen Lösungsmittel (z. B. Methanol, Ethanol,

Dimethylformamid od. dgl.) oder in einer Pufferlösung bei pH 7,5 (der gleichen, wie sie zur Auflösung von Immunglobulin verwendet worden ist) bei Zimmertemperatur 1 Stunde lang umgesetzt wird, worauf das Reaktionsgemisch zu einer wässrigen Lösung des Immunglobulins bei pH 7,5 zugesetzt wird.

In Abhängigkeit von der Menge des für die Umsetzung verwendeten Cytorhodin S-Derivats wird das Cytorhodin-S-Derivat in einem Anteil von 1-20, und vorzugsweise 5-20, je Molekül des Immunglobulins gebunden. Die Bindung führt jedoch nicht zu einem Verlust der Wirksamkeit von Immunglobulin als Antikörper.

Das Bindungsverhältnis von Cytorhodin S zu Immunglobulin in dem erfindungsgemäßen Komplex beträgt 1-15:1, d. h. es werden 1-15 Moleküle Cytorhodin S je Molekül Immunglobulin gebunden.

Ein so hoher Anteil der Antikrebskomponente ist bei der Bildung hoher Antikrebsaktivitäten wirksam.

Die klinische Dosis für das Cytorhodin S-Derivat der Erfindung kann in Abhängigkeit von dem Verabreichungsweg variiert werden und liegt im Bereich von 1 bis 20 mg je Tag bei Erwachsenen, ausgedrückt als Cytorhodin S.

Die Dosis kann auf intravenösem, intraperitonealem oder rektalem Verabreichungsweg gegeben werden. Im Falle der intravenösen Verabreichung ist außer der üblichen intravenösen Injektion auch ein intravenöser Tropf anwendbar.

Pharmazeutische Zubereitungen, die das Cytorhodin S-Derivat (I) enthalten, werden nach üblichen Verfahren unter Verwendung üblicher Träger und Zusätze hergestellt.

Die injizierbare Zubereitung kann z. B. eine pulverförmige Zubereitung für Injektionszwecke sein. Sie wird durch Zugabe eines oder mehrerer entsprechender Exzipienzien, wie z. B. Mannit, Saccharose, Lactose, Maltose, Glucose und Fructose, zu dem Cytorhodin S-Derivat (I), Auflösen des Gemisches in Wasser und Aufteilen der Lösung in Fläschchen oder Ampullen sowie anschließendes Lyophilisieren und Versiegeln hergestellt.

Die rektale Zubereitung kann aus einer lipophilen Basis, wie der halbsynthetischen Basis, die durch Vermischen von Kakaoöl oder einem Fettsäuretriglycerid mit einem Fettsäuremonoglycerid oder einem Fettsäurediglycerid in verschiedenen Anteilen hergestellt wird, oder einer hydrophilen Basis, wie einem Polyethylenglykol oder einer Glycerogelatine, unter Erwärmen des Gemisches zu einer Lösung und Zugabe der Lösung zu einem homogenen Gemisch sowie Bildung der Zubereitung in einer Form hergestellt werden.

Beispiele der Erfindung werden nachstehend gegeben.

Beispiel 1

In 2 ml Methanol wurden 10 mg Cytorhodin S aufgelöst. Zu der Lösung wurden eine Methanollösung (Konzentration 10 mg/ml) von 5,8 mg Ammoniumacetat, welche 10 Mol-Äquivalenten des Cytorhodin S entspricht, und eine Methanollösung (Konzentration 10 mg/ml) von 1,4 mg Natriumcyanoborhydrid, welche 3 Mol-Äquivalenten entspricht, zugesetzt. Das Gemisch wurde 4 Stunden lang bei 25 °C umgesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde in 20 ml gekühlte, 0,5 %ige wässrige Essigsäure gegossen, und das Gemisch wurde mit 2 Anteilen von 5 ml Dichlormethan extrahiert, um nicht-umgesetztes Cytorhodin S zu entfernen. Die entstandene, wässrige Essigsäurelösung wurde mit gesättigter, wässriger Natriumbicarbonatlösung auf pH 8 eingestellt. Die wässrige Lösung wurde mit 3 Anteilen zu 20 ml Dichlormethan extrahiert, wobei ein Aminoderivat erhalten wurde. Die Dichlormethanlösung wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, und das Dichlormethan wurde durch Vakuumdestillation entfernt. Dabei wurden 4,8 mg eines Aminoderivats von Cytorhodin S (nachstehend mit Aminocytorhodin S bezeichnet) erhalten. Das Produkt wurde durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie auf Reinheit analysiert. Die Bedingungen waren wie folgt: Säule SSC-Aquasil PE-2, 4,6 mm x 250 mm (Senshu Kagaku); Lösungsmittel 2,0 %iges Triethylammoniumphosphat (pH 3), 75 %, und Acetonitril, 25 %; Retentionszeit, Cytorhodin S (25,0 min), Aminocytorhodin S (12,9 min). Außerdem wurde die Massenzahl für das genannte, durch HPLC erhaltene Cytorhodin S-Derivat mittels eines FAB/MS-Spektrometers (Nihon Denshi JMS-DX300) gemessen, wobei ein Massenspektrum von 942 (M+H⁺) erhalten wurde, welches mit der berechneten Massenzahl identisch war.

Im Absorptionsspektrum des Derivats wurde eine spezifische Absorption bei 495 nm beobachtet, die vom Anthracyclinring des Cytorhodin S stammt. Dieses Derivat zeigt das gleiche Spektrum wie das Ausgangs-Cytorhodin S, woraus hervorgeht, daß die Antikrebswirksamkeiten im Derivat nicht verlorengegangen sind.

Beispiel 2

In 2 ml Dichlormethan wurden 4,8 mg des im Beispiel 1 hergestellten Aminocytorhodin S aufgelöst. Zu der Lösung wurde eine Dichlormethanlösung (Konzentration 10 mg/ml) von 3,8 mg N-γ-Maleimidobutyryloxysuccinimid (hergestellt von der Firma Behring Diagnostics, nachstehend mit GMBS bezeichnet) zugesetzt, welche 5 Mol-Äquivalenten des Aminocytorhodin S entspricht. Das Gemisch wurde 2 Stunden lang bei 25 °C umgesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde durch präparative Dünnschichtchromatographie gereinigt, wobei ein GMBS-Derivat von Cytorhodin S erhalten wurde. Die Bedingungen für die Dünnschichtchromatographie sind wie folgt: Dünnschichtplatte, 2 mm Kieselsäuregel 60F-254 (hergestellt von der Firma Merck); Entwicklungslösungsmittel, Methanol:Dichlormethan = 1:4; Rf-Wert des GMBS-Derivats (0,82), des Aminocytorhodin S (0,29): Das so erzeugte GMBS-Derivat wurde aus der Dünnschichtplatte extrahiert, der Extrakt wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wurde durch

Vakuumdestillation entfernt. Es wurden 2,7 mg des GMBS-Derivats von Cytorhodin S erhalten.

Überdies wurde die Reinheit des GMBS-Derivats durch HPLC analysiert, und die Reinigung wurde durchgeführt. Die Säule und die Bedingungen, die bei der Analyse angewendet wurden, waren wie folgt: Säule, SSC-Aquasil PE-2, 4,6 mm x 250 mm (Senshu Kagaku); Lösungsmittel, Acetonitril wurde in 2,0 %igem Triethylammoniumphosphat (TEAP, pH 3,0) während eines Zeitraumes von 30 min unter Anwendung eines linearen Gradienten von 0 % - 30 % zugesetzt, und der Zustand von 30 % Acetonitril wurde weitere 30 min beibehalten; Fließgeschwindigkeit 1 ml/min; Retentionszeit 36 min für Cytorhodin S und 38 min und 38,6 min für das GMBS-Derivat. Die Säule und die Bedingungen, die bei der Reinigung angewendet wurden, waren wie folgt: Säule, Senshu Pak NP-318-4252, 10 mm x 250 mm (Senshu Kagaku); Lösungsmittel, Acetonitril in 2,0 %igem TEAP (pH 3,0) wurde während eines Zeitraumes von 20 min in einem linearen Gradienten von 10 % - 30 % zugegeben, und der Zustand von 30 % Acetonitril wurde weitere 15 min beibehalten. In der gleichen Weise wurde eine Änderung während eines Zeitraumes von 5 min bei einem Gradienten von 30 % - 100 % vorgenommen; Fließgeschwindigkeit 4 ml/min; Retentionszeit 28 min und 28,5 min für das GMBS-Derivat. Das Eluat von der HPLC wurde auf eine SEP-PAK (C₁₈)-Patrone (hergestellt von der Firma Nihon Waters) aufgebracht, um das Cytorhodin S-Derivat zu adsorbieren, worauf mit 0,5 %iger wässriger Essigsäure gewaschen und mit 0,5 %iger Essigsäure-Methanol-Lösung eluiert wurde. Das Eluat wurde gewonnen und unter vermindertem Druck getrocknet, wobei etwa 3,2 mg des GMBS-Derivats erhalten wurden. Die Reinheit des Produktes wurde erneut unter den gleichen Bedingungen wie oben beschrieben durch HPLC geprüft.

Überdies wurde die Massenzahl des genannten Cytorhodin S-Derivats, das bei der HPLC erhalten worden ist, mittels eines FAB/MS-Spektrometers (hergestellt von der Firma Nihon Denshi, JMS-DX300) gemessen, wobei ein Massenspektrum von 1215 (M+H⁺) erhalten wurde, welches durch die errechnete Massenzahl bestätigt wurde und die Massenzahl eines Komplexes mit Thioglycerin war, das bei der Messung des Massenspektrums verwendet worden war. Auch wurde im Absorptionsspektrum des Derivats die spezifische Absorption des Anthracyclinrings um 495 nm gut beibehalten.

Außerdem wurde die Einführung der Maleimidgruppe auch durch die Umsetzung mit Aminoethanthiol bestätigt, bei der die Positionen der Flecken und Peaks bei der Dünnschichtchromatographie und bei der HPLC verändert wurden. Die Säule und die Bedingungen der HPLC, welche bei der Analyse angewendet wurden, sind die gleichen wie oben beschrieben. Retentionszeit: 19,5 min und 20,5 min für das Aminocytorhodin S, und 23 min und 23,5 min für das GMBS-Derivat-Aminoethanthiol-Addukt. (Bei einem Vergleichsversuch wurde ein Gemisch des Ausgangs-Aminocytorhodin S mit Aminoethanthiol, hergestellt unter den gleichen Bedingungen wie mit dem GMBS-Derivat, umgesetzt. Es wurde gefunden, daß das Aminocytorhodin S durch die Einverleibung des Thiols, was die Peaks der HPLC betrifft, überhaupt nicht beeinflusst wurde.)

Beispiel 3

In 1 ml 50 mM Phosphatpufferlösung (pH 7,5), enthaltend 1 mM EDTA, wurden 18 mg Kaninchen-Immunglobulin (hergestellt von der Firma Sigma) aufgelöst. Zu der Lösung wurden 10 µl 100 mM Dimethylformamidlösung von N-Succinimidyl-S-acetylthioacetat (hergestellt von der Firma Behring Diagnostics, nachfolgend SATA genannt) zugesetzt, und das Gemisch wurde 20 min lang bei 25 °C umgesetzt. Zu dem Reaktionsgemisch wurden 50 µl 1M Tris-hydrochloridlösung (pH 7,8) zugegeben, und das Gemisch wurde 5 min lang bei 25 °C stengelassen. Das Reaktionsgemisch wurde dann an einer PD-10-Säule (hergestellt von der Firma Pharmacia), die vorher mit 50 mM Phosphatpufferlösung (pH 7,5), enthaltend EDTA, ins Gleichgewicht gebracht worden war, fraktioniert. Dabei wurde ein SATA-Derivat des Immunglobulins erhalten. Zu dem SATA-Derivat wurde 0,5 mM wässrige Hydroxylaminlösung (pH 7,5), enthaltend 0,25 mM EDTA, was 50 Äquivalenten SATA entspricht, zugesetzt. Das Gemisch wurde 1 Stunde lang bei 25 °C zur Entacylierung umgesetzt. Zu der obigen wässrigen, Immunglobulin mit eingeführter SH-Gruppe enthaltenden Lösung wurde eine Lösung des GMBS-Derivats, die der SH-Gruppe 10-fach äquivalent war, in 20 µl Dimethylformamid gegeben, und das Gemisch wurde 12 Stunden lang bei 5 °C umgesetzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch an einer 20 mm x 400 mm-Sephadex G-25-Säule (hergestellt von der Firma Pharmacia) fraktioniert, die mit 50 mM Phosphatpufferlösung (pH 7,5), enthaltend 1 mM EDTA, ins Gleichgewicht gebracht worden war. Es wurde eine Fraktion entsprechend Protein 160.000 isoliert. Das Eluat wurde bei 280 nm und 495 nm überwacht, um Protein- und Cytorhodin S-Fractionen zu identifizieren.

Der so erhaltene Cytorhodin S-Immunglobulin-Komplex wurde durch Dialyse entsalzt und lyophilisiert, wobei 20 mg eines Produktes erhalten wurden. Die Menge an gebundenem Cytorhodin S je Molekül des Immunglobulins wurde aus der für Cytorhodin S spezifischen Absorption bei 495 nm und aus dem Trockengewicht des Komplexes errechnet, wobei gefunden wurde, daß 5 Moleküle Cytorhodin S je Molekül des Immunglobulins gebunden waren. Überdies konnten 12 Moleküle Cytorhodin S durch Erhöhung der Menge von SATA gebunden werden.

Fig. 3 zeigt das UV-Spektrum des Komplexes, in welchem annähernd 12 Moleküle Cytorhodin S je Molekül des Immunglobulins gebunden sind. Die UV-Spektren des Komplexes zeigen, daß in dem Maße, wie der Anteil an gebundenem Cytorhodin S erhöht wird, das Absorptionsmaximum für Cytorhodin S ansteigt.

Beispiel 4

Zu einer Lösung von 5 mg Cytorhodin S in 1 ml Methanol wurde eine Methanollösung von 2,6 mg γ -Aminobuttersäure (Konzentration 1 mg/ml), welche 6 Mol pro Mol des Cytorhodin S entspricht, zugesetzt. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 8 mit Triethylamin wurden 1,4 mg Natriumcyanoborhydrid, entsprechend 3 Mol-Äquivalenten, zugesetzt, und das Gemisch wurde 24 Stunden lang bei 25 °C umgesetzt. Das so gebildete Reaktionsgemisch wurde durch Dünnschichtchromatographie auf das Vorliegen oder Fehlen des Produktes überprüft, worauf eine Analyse auf Reinheit mittels HPLC sowie eine Reinigung vorgenommen wurden. Die Rf-Werte bei der Dünnschichtchromatographie unter den gleichen Bedingungen wie im Beispiel 2 waren 0,57 für Cytorhodin S und 0,28 für das γ -Aminobutytratderivat. Die Retentionszeiten bei der HPLC-Analyse unter den gleichen Bedingungen wie im Beispiel 2 waren 36 min für Cytorhodin S und 29 min für das γ -Aminobutytratderivat. Die Reinigung durch HPLC unter den gleichen Bedingungen wie im Beispiel 2 ergab etwa 1,5 mg des γ -Aminobutytratderivats.

Überdies ergaben Messungen der Massenzahl des genannten Derivats mittels eines FAB/MS-Spektrometers (JMS-DX300) ein Massenspektrum von 1028 ($M+H^+$), welches mit der Massenzahl, wie sie berechnet wurde, identisch war.

Außerdem wurde im Absorptionsspektrum des Derivates die spezifische Absorption um 495 nm für den Anthracyclinring von Cytorhodin S gut beibehalten.

Beispiel 5

Zu einer Lösung von 2,5 mg Cytorhodin S- γ -aminobutytratderivat in DMF (Konzentration 50 mg/ml) wurde eine DMF-Lösung von 515 μ g Dicyclohexylcarbodiimid (Konzentration 50 mg/ml), welche einer äquimolaren Menge, bezogen auf das Cytorhodin S-Derivat, entspricht, zugesetzt. Das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur 1 Stunde lang umgesetzt.

Zu einer Lösung von 20 mg Kaninchen-Immunglobulin (hergestellt von der Firma Sigma) in 1 ml 50 mM Phosphatpufferlösung (pH 7,5) wurde die oben hergestellte DMF-Lösung des Cytorhodin S-Derivats zugesetzt. Das Gemisch wurde 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur umgesetzt. Das Cytorhodin S- γ -aminobutytratderivat entspricht 20 Mol-Äquivalenten, bezogen auf das Kaninchen-Immunglobulin. Dann wurde 1M Tris-chlorwasserstoffsäure-Pufferlösung (pH 7,8) rasch zugesetzt, und das Gemisch wurde gerührt und 10 min stehengelassen. Die entstandene Masse wurde einer PD-10-Säule (hergestellt von der Firma Pharmacia), die vorher mit 50 mM Phosphatpufferlösung ins Gleichgewicht gebracht worden war, zur Trennung und Reinigung aufgegeben.

Beispiel 6

Zu einer Lösung von 5 mg Cytorhodin S in 1 ml Methanol wurden eine 1M wässrige Essigsäurelösung von 3,3 mg Lysin (Konzentration 10 mg/ml), entsprechend 6 Mol-Äquivalenten, bezogen auf das Cytorhodin S, und 1,4 mg Natriumcyanoborhydrid, entsprechend 3 Mol-Äquivalenten, zugesetzt. Das Gemisch wurde 24 Stunden lang bei 25 °C umgesetzt. Das so erhaltene Reaktionsgemisch wurde nach Prüfung auf Vorliegen oder Abwesenheit von Produkt, durch HPLC auf Reinheit analysiert und anschließend gereinigt. Der Rf-Wert für das Lysinderivat betrug bei der unter den gleichen Bedingungen wie in Beispiel 2 durchgeführten Dünnschichtchromatographie 0,20.

Die Retentionszeit für das Lysinderivat bei der HPLC-Analyse unter den gleichen Bedingungen wie im Beispiel 2 betrug 27 min und 28 min. Die Reinigung durch HPLC unter den gleichen Bedingungen wie in Beispiel 2 ergab etwa 2,6 mg des Lysinderivates.

Überdies wurde die Massenzahl des genannten Derivates mittels eines FAB/MS-Spektrometers (JMS-DX300) gemessen, wobei ein Massenspektrum von 1071 ($M+H^+$) erhalten wurde, welches mit der berechneten Massenzahl identisch war.

Außerdem wurde im Absorptionsspektrum des Derivats eine spezifische Absorption um 495 nm für den Anthracyclinring von Cytorhodin S gut beibehalten.

Beispiel 7

Zu einer Lösung von 5 mg Cytorhodin S in 1 ml Methanol wurden eine Methanollösung von 1,7 mg Aminoethanthiol (Konzentration 1 mg/ml), entsprechend 6 Mol-Äquivalenten, bezogen auf das Cytorhodin S, und 1,4 mg Natriumcyanoborhydrid, entsprechend 3 Mol-Äquivalenten, zugesetzt. Das Gemisch wurde 24 Stunden lang bei 25 °C umgesetzt. Das so erhaltene Reaktionsgemisch wurde, nach Prüfung durch Dünnschichtchromatographie auf das Vorliegen oder auf die Abwesenheit des Produktes, durch HPLC auf Reinheit analysiert und anschließend gereinigt. Der Rf-Wert für das Aminoethanthiolderivat betrug bei der Dünnschichtchromatographie unter den gleichen Bedingungen wie in Beispiel 2 0,25. Die Retentionszeit bei der HPLC-Analyse unter den gleichen Bedingungen wie in Beispiel 2 betrug für das Aminoethanthiolderivat 28 min. Die Reinigung durch HPLC unter den gleichen Bedingungen wie im Beispiel 2 ergab etwa 1,6 mg des

Aminoethanthiolderivats.

Überdies wurde die Massenzahl des genannten Derivats mittels eines FAB/MS-Spektrometers (JMS-DX300) gemessen, wobei ein Massenspektrum von 1002 ($M+H^+$) erhalten wurde, das mit der errechneten Massenzahl identisch war.

5 Außerdem war im Absorptionsspektrum des Derivats eine spezifische Absorption um 495 nm für den Anthracyclinring von Cytorhodin S gut beibehalten.

10 Andererseits wurde die Einführung der -SH-Gruppe zusätzlich durch die Umsetzung mit N-Ethylmaleimid bestätigt, wobei sich die Lage der Flecken und Peaks bei der Dünnschichtchromatographie und der HPLC änderten. (Die beim Aminoethanthiolderivat beobachteten Änderungen wurden bei Cytorhodin S und Aminocytorhodin S nicht beobachtet.)

Beispiel 8

15 Zu einer Lösung von 5 mg Cytorhodin S in 1 ml Methanol wurden eine Methanollösung von 2,7 mg Cystein (Konzentration 1 mg/ml), entsprechend 6 Mol-Äquivalenten, bezogen auf Cytorhodin S, und 1,4 mg Natriumcyanoborhydrid, entsprechend 3 Mol-Äquivalenten, zugesetzt. Das Gemisch wurde 24 Stunden lang bei 25 °C umgesetzt. Das so erhaltene Reaktionsgemisch wurde nach Prüfung durch Dünnschichtchromatographie auf das Vorliegen oder auf die Abwesenheit des Produktes, durch HPLC auf Reinheit analysiert und anschließend gereinigt. Der Rf-Wert für das Cysteinderivat bei der Dünnschichtchromatographie unter den gleichen Bedingungen wie in Beispiel 2 betrug 0,35. Die Retentionszeit für das Cysteinderivat bei der HPLC-Analyse unter den gleichen Bedingungen wie in Beispiel 2 betrug 32 min. Die Reinigung durch HPLC unter den gleichen Bedingungen wie in Beispiel 2 ergab etwa 1,8 mg des Cysteinderivats.

20 Überdies wurde die Massenzahl des genannten Derivats mittels eines FAB/MS-Spektrometers (hergestellt von der Firma Nihon Denshi) gemessen, wobei ein Massenspektrum von 1046 ($M+H^+$) erhalten wurde, welches identisch mit der berechneten Massenzahl war.

25 Außerdem wurde die Einführung der -SH-Gruppe in der gleichen Weise wie im Beispiel 7 durch Umsetzung mit N-Ethylmaleimid bestätigt, wobei sich die Lagen der Flecken und Peaks (Dünnschichtchromatographie und HPLC) änderten.

Beispiel 9

30 Zu einer Lösung von 11 mg Kaninchen-Immunglobulin (hergestellt von der Firma Sigma) in 1 ml 50 mM Phosphatpufferlösung (pH 7,5), enthaltend 1 mM EDTA, wurde eine DMF-Lösung von 191 µg N-γ-Maleimidobutyryloxysuccinimid (hergestellt von der Firma Behring Diagnostics, nachstehend mit GMBS bezeichnet) (Konzentration 50 mg/ml) zugesetzt. Das Gemisch wurde 2 Stunden lang bei 25 °C umgesetzt. Zu der Reaktionslösung wurden 50 µl 1M Tris-chlorwasserstoffsäurepufferlösung (pH 7,8) gegeben, und das Gemisch wurde 5 Minuten lang bei 25 °C stehengelassen. Das Reaktionsgemisch wurde dann über eine PD-10-Säule (hergestellt von der Firma Pharmacia), die vorher mit 50 mM Phosphatpufferlösung (pH 7,5), enthaltend 1 mM EDTA, ins Gleichgewicht gebracht worden war, fraktioniert, wobei ein Kaninchen-Immunglobulin vom Typus mit eingeführtem Maleimid erhalten wurde. Das Cytorhodin S-Derivat des Typus mit eingeführter -SH-Gruppe, wie es oben in Beispiel 7 erzeugt worden ist, wurde mit dem Kaninchen-Immunglobulin vom Typus mit eingeführtem Maleimid umgesetzt.

40 Eine Lösung von 1,5 mg des Cytorhodin S-aminoethandiolderivats in DMF (Konzentration 100 mg), was 2 Mol-Äquivalenten, bezogen auf die im Kaninchen-Immunglobulin eingeführte Maleimidgruppe, entspricht, wurde einer wässrigen Lösung des Kaninchen-Immunglobulins vom Typus mit eingeführtem Maleimid, wie es oben hergestellt wurde, zugesetzt. Das Gemisch wurde 12 Stunden lang bei 5 °C umgesetzt.

Beispiel 10

50 Zu einer Lösung von 5 mg Cytorhodin S in 1 ml Methanol wurden eine Methanollösung von 3,2 mg Glycinethylester (Konzentration 1 mg/ml), entsprechend 6 Mol-Äquivalenten, bezogen auf das Cytorhodin S, und 1,4 mg Natriumcyanoborhydrid, entsprechend 3 Mol-Äquivalenten, zugesetzt. Das Gemisch wurde 24 Stunden lang bei 25 °C umgesetzt. Das so erhaltene Reaktionsgemisch wurde nach Prüfung durch Dünnschichtchromatographie auf das Vorliegen oder auf die Abwesenheit des Produktes durch HPLC auf Reinheit analysiert und anschließend gereinigt. Der RF-Wert für das Glycinethylesterderivat bei der unter den gleichen Bedingungen wie im Beispiel 2 durchgeführten Dünnschichtchromatographie betrug 0,34. Die Retentionszeit für das Glycinethylesterderivat bei der unter den gleichen Bedingungen wie im Beispiel 2 durchgeführten HPLC-Analyse betrug 32 min und 33 min. Die Reinigung durch HPLC unter den gleichen Bedingungen wie im Beispiel 2 ergab etwa 1,4 mg des Glycinethylesterderivats.

55 Überdies wurde die Massenzahl des genannten Derivats mittels eines FAB/MS-Spektrometers (JMS-DX300) gemessen, wobei ein Massenspektrum von 1028 ($M+H^+$) erhalten wurde, welches mit der berechneten Massenzahl identisch ist.

60 Auch wurde im Absorptionsspektrum des Derivates eine spezifische Absorption um 495 nm für den

Anthracyclinring von Cytorhodin S gut beibehalten.

Beispiel 11

5 An weibliche, 7 - 10 Wochen alte BALB/C-Mäuse wurden intraperitoneal 25 µg gereinigtes Human-CEA je Maus gemeinsam mit komplettem Freund's Adjuvans verabreicht. Nach 10 Wochen wurde eine Lösung von 25 µg CEA in physiologischer Kochsalzlösung intravenös verabreicht. Am dritten Tag nach der Verabreichung wurde die Milz isoliert, und die Milzzellen wurden mit Myelomzellen vom nicht-produktiven Typus X63-Ag 8,653 verschmolzen. Die Zellfusion und die nachfolgende Züchtung und Clonung wurden grundsätzlich nach dem Verfahren von Oi und Mitarbeitern (Oi V. T. & Herzenberg, L. A., Selected methods in Cellular Immunology, 10 B. B. Mishell & S. M. Shiigi, Hsg., S. 351, Freeman & Co., San Francisco 1980) ausgeführt. Das Verhältnis der Milzzellen zu den Myelomzellen betrug 10:1. Das Gemisch wurde eine kurze Zeit lang zentrifugiert, wobei ein Kügelchen erhalten wurde. Zu dem Kügelchen wurden tropfenweise 0,5 ml 42,5 %iges Polyethylenglykol (MG 2.000, enthaltend 15 % Dimethylsulfoxid) zugesetzt, und das Gemisch wurde langsam 2 min lang bei 37 °C geführt. Das entstandene Gemisch wurde mit RPMI-Medium im Verhältnis 20:1 verdünnt. Nachdem es 15 zentrifugiert worden war, wurde es in RPMI-1640-Medium, das Rinderembryoserum enthielt, suspendiert. Die Suspension wurde auf einer 96-Loch-Mikrotiterplatte in einer Menge von jeweils 5 x 10⁵-Zellen verteilt. Nach Bebrütung über Nacht bei 37 °C wurde je ein Tropfen HAT-Medium (100 µM Hypoxanthin, 4 x 10⁻⁴ µM Aminopterin, 1,6 x 10⁻² µM Thymidin) zugesetzt.

20 Die Selektion von Hybridomen mittels HAT-Medium wurde am 2., 3., 5., 7., 10. und 13. Tag durch Austausch der Hälfte des Mediums in jedem Loch durch frisches HAT-Medium vorgenommen. Die Anti-CEA-Aktivität der überstehenden Flüssigkeit aus der Kultur wurde durch RIA oder EIA getestet. Die Zellen, die sich beim Test als aktiv erwiesen, wurden in ein größeres Kultursystem überführt, oder unter Anwendung einer einschränkenden Verdünnungsmethode geclont. Die so erhaltenen verschmolzenen Zellen wurden in das Peritoneum von Mäusen desselben Stammes transplantiert, die vorher mit 0,5 ml Tetramethylpentadecan 25 behandelt worden waren. Ein bis zwei Wochen nach der Transplantation wurden einige ml Ascites erhalten, in welchen homogene, monoclonale Antikörper in einer Konzentration von 5-10 mg/ml enthalten waren.

Ein Cytorhodin S-Komplex mit dem so erhaltenen monoclonalen Antikörper gegen CEA (MA 204) wurde in der gleichen Weise wie im Beispiel 3 hergestellt.

30 Prüfung des Cytorhodin S-Immunglobulin-Komplexes auf Antikrebswirksamkeit

In einer 96 Loch-Mikrotiterplatte wurden 200 µl Tumorzelllinie L1210 (5x10⁴ Zellen/ml) verteilt, die in RPMI 1640-10 %igem Fötalkalbsserum (1 x 10⁴ Zellen/Loch) gezüchtet worden war. Zu der Zellkultur wurden je 10 µl Cytorhodin S (CYT) und Cytorhodin S-Immunglobulin-Komplex [CYT-Kaninchen-(=Rab) IgG] 35 zugesetzt. Das Gemisch wurde 18 Stunden lang bei 37 °C bebrütet. Dann wurden 25 µl Tritium-markiertes Thymidin in einer Konzentration von 0,5 µCi/Loch zugesetzt, und das Gemisch wurde 6 Stunden lang bei 37 °C bebrütet. Anschließend wurden die Zellen mittels eines Zellenkollektors auf einem Filter abgetrennt, getrocknet, und die Menge des der Zelle einverleibten, markierten Thymidins wurde mittels eines Flüssigkeitsszintillationszählers zum Vergleich der DNS-Syntheseaktivität der Zelle bestimmt. Die Ergebnisse sind in Fig. 4 dargestellt. Fig. 4 zeigt, daß die Antikrebswirksamkeit von CYT in dem CYT-Kaninchen-IgG 40 annähernd beibehalten wird.

In gleicher Weise wurde die Wirkung des Cytorhodin S-Derivates (Cytorhodin S-Anti-CEA-Monoclonaler-Antikörper-Komplex) bei Colo 205, welches eine CEA-produzierende Zelle ist, geprüft. Die Ergebnisse sind in Fig. 5 dargestellt. Die Mengen der verwendeten Testmaterialien waren wie folgt:

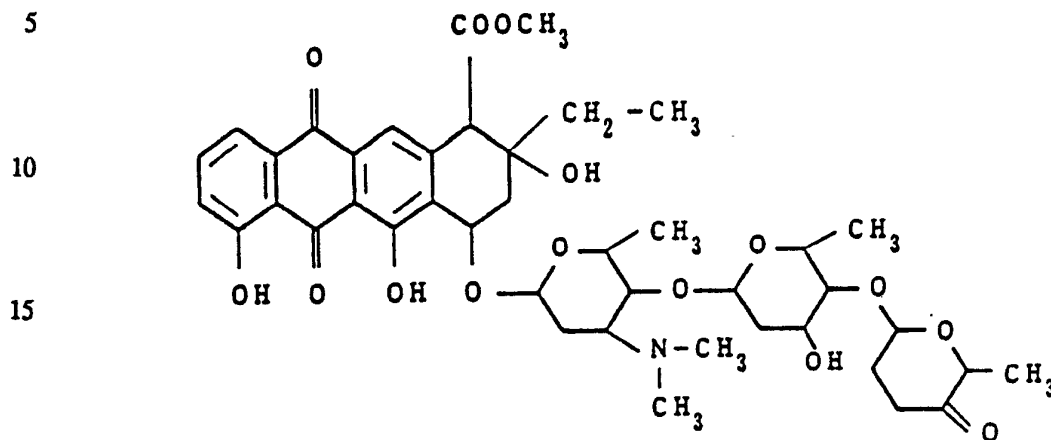
45 Proben:	Arzneimittel/Antikörper;	Verhältnis
CYT	0,2 µg/ml	
CYT-MA 204*	0,2 µg**/6,3 µg/ml;	2:1
CYT-Rab IgG	0,2 µg*/12,5 µg/ml;	2:1
50 MA 204*	0,5 µg/ml	
Zelle	Colo 205, 5 x 10 ⁴ /Loch	

55 * MA 204 ist Anti-CEA-Monoclonaler-Antikörper.
 ** zeigt CYT-Aktivitätsäquivalent (CYT Äqu.) an.

60 Da MA 204 eine höhere Selektionsspezifität hat als Rab IgG, weist die höhere Zellwachstumshemmbarkeit von CYT-MA 204 gegenüber jener von CYT-Rab IgG, dargestellt in Fig. 5, darauf hin, daß der Cytorhodin S-Immunglobulin-Komplex der Erfindung auf Krebszellen selektiv wirkt.

Vergleich mit Aclacinomycin-Immunglobulin-Komplex

Zu Vergleichszwecken wurde ein Immunglobulin-Komplex mit Aclacinomycin A



25

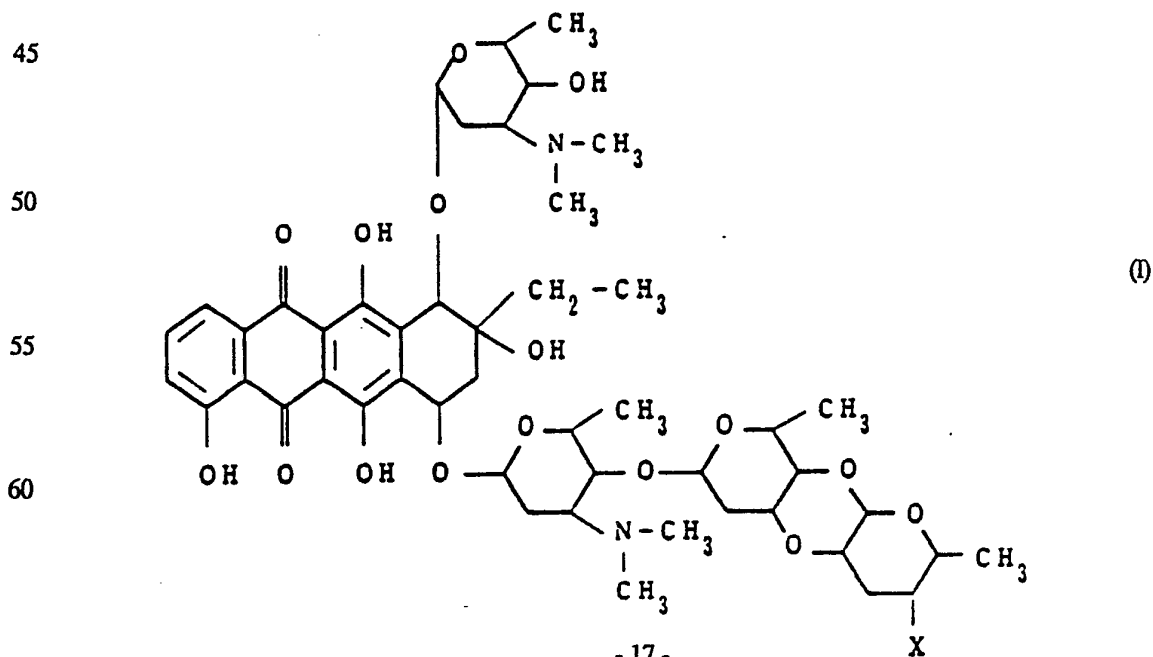
30

welches dem Cytorhodin S strukturell ähnlich ist, in der gleichen Weise wie im Beispiel 3 hergestellt. Während Cytorhodin S in einem Anteil von 5-12 Molekülen je Molekül des Antikörpers zugesetzt wurde, wurde Aclacinomycin in einem so kleinen Anteil wie 2 Moleküle je Molekül des Antikörpers zugesetzt. Die DNS-Synthese-Hemmwirksamkeit der zwei Antikörperkomplexe in L1210 wurde anhand der Menge von Tritium-markiertem Thymidin, das den Zellen einverleibt wurde, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Fig. 6 dargestellt. Fig. 6 zeigt, daß die Wirksamkeit des Cytorhodin S-Komplexes gegen die Zellen höher war als jene des Aclacinomycin-Komplexes.

35 **PATENTANSPRÜCHE**

40

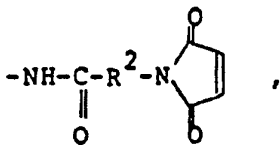
1. Cytorhodin S-Derivat, gekennzeichnet durch die allgemeine Formel (I)



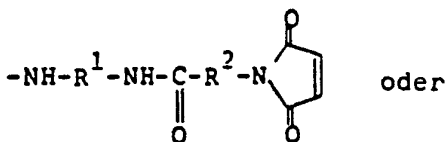
worin X eine Gruppe der Formel



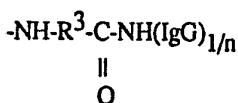
5



10



15



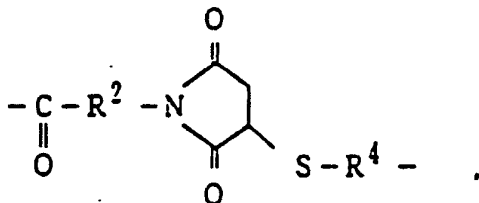
20

darstellt, wobei R^1 eine zweiwertige Kohlenwasserstoffgruppe, die durch beliebige Substituenten substituiert sein kann, bedeutet, R^2 eine zweiwertige Kohlenwasserstoffgruppe ist, R^3 eine zweiwertige organische Gruppe bedeutet, IgG einen Immunglobulinrest bedeutet, und n eine ganze Zahl von 1 bis 15 bedeutet, und ein Salz davon.

25

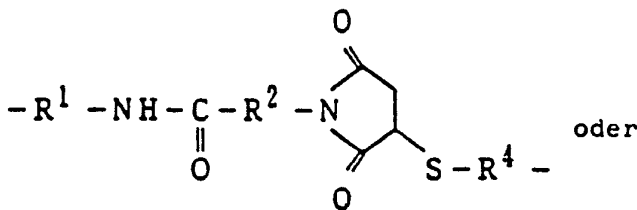
2. Cytorhodin S-Derivat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß R^3 für R^1 oder eine Gruppe der Formel

30



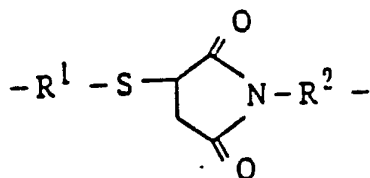
35

40



45

50



55

steht, wobei R^4 eine zweiwertige Kohlenwasserstoffgruppe bedeutet.

3. Cytorhodin S-Derivat nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß R^2 eine Propylengruppe und R^4 eine Methylgruppe ist.

4. Cytorhodin S-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß n 5 bis 12 ist.

5. Cytorhodin S-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das IgG ein Rest des Antikörpers gegen carcinoembryonisches Antigen (CEA) ist.

6. Verfahren zur Herstellung eines Cytorhodin S-Derivats der allgemeinen Formel (I)

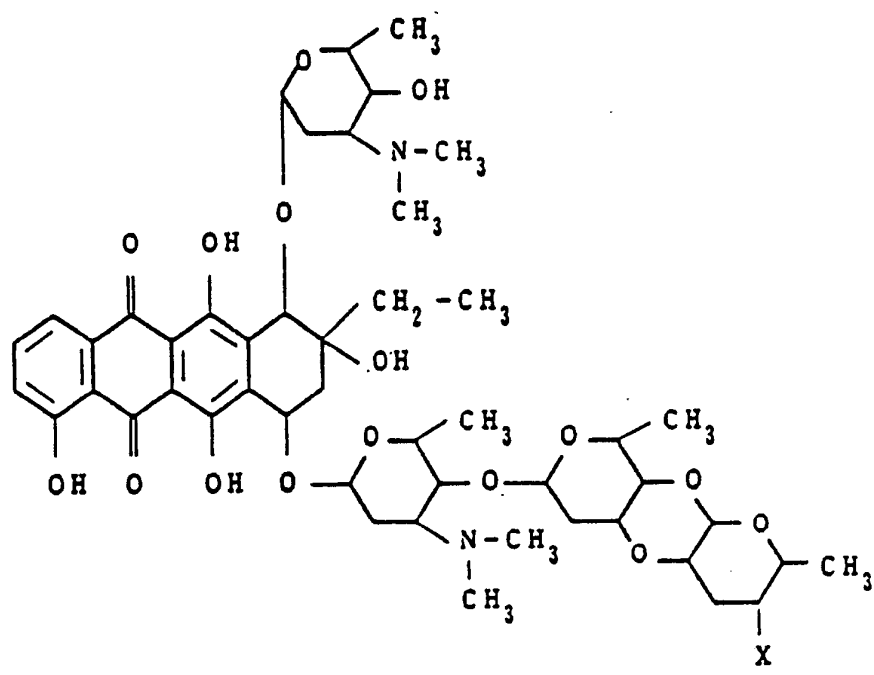
5

10

15

20

25



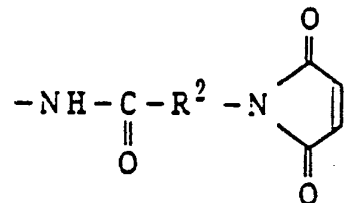
(I)

30

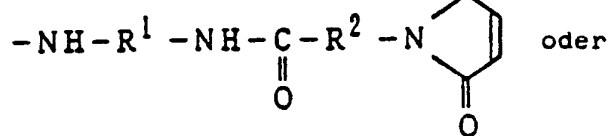
worin X eine Gruppe der Formel



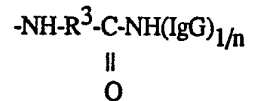
35



40



45

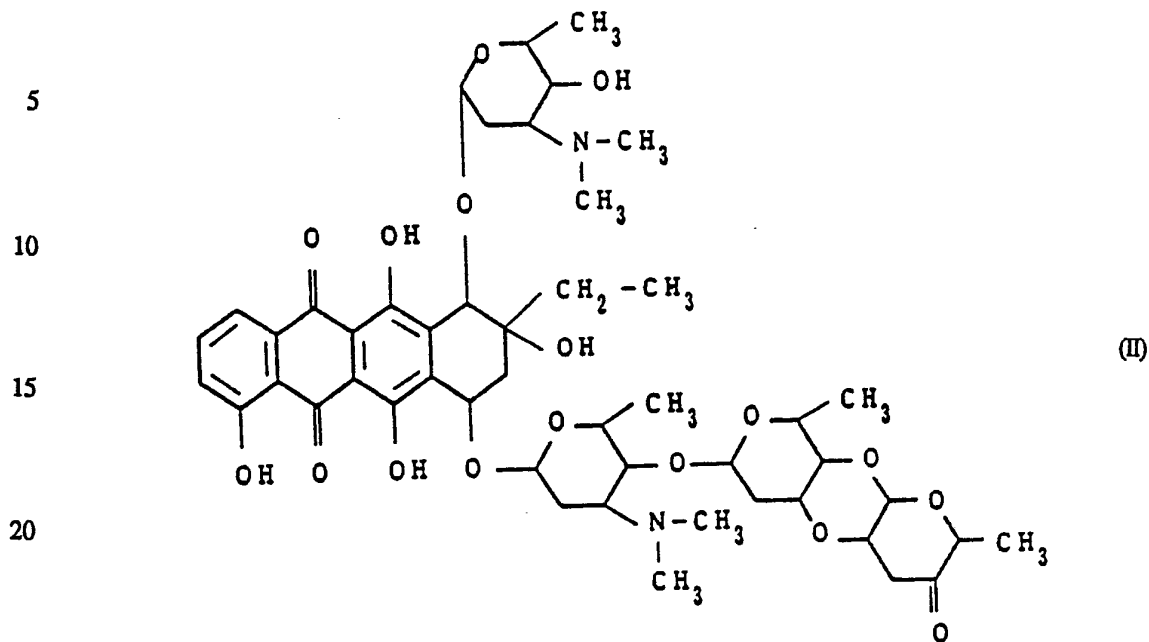


50

bedeutet, wobei R¹ eine zweiwertige Kohlenwasserstoffgruppe bedeutet, welche durch beliebige Substituenten substituiert sein kann, R² eine zweiwertige Kohlenwasserstoffgruppe bedeutet, R³ einen zweiwertigen, organischen Rest bedeutet, IgG einen Immunglobulinrest bedeutet, und n eine ganze Zahl von 1 bis 15 bedeutet, dadurch gekennzeichnet, daß ein Cytorhodin S der Formel (II)

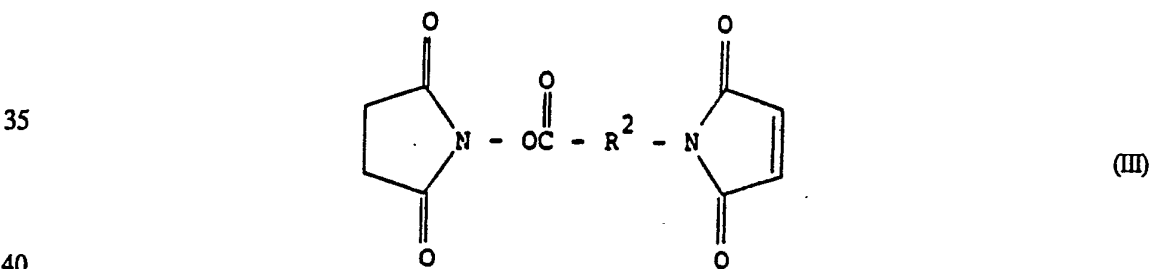
55

60



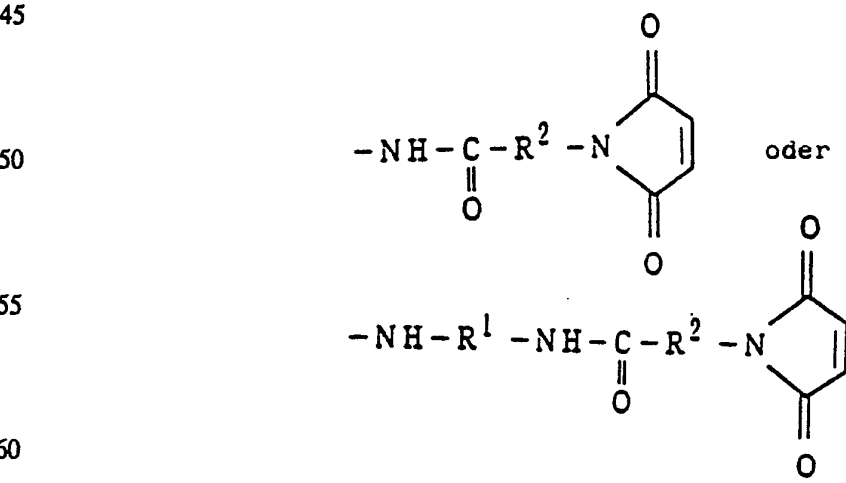
30

mit einem Alkalimetallcyanoborhydrid in Gegenwart eines Ammoniumsalzes oder einer durch $\text{NH}_2\text{-R}^1\text{-NH}_2$ repräsentierten Verbindung, wobei R^1 die gleiche Bedeutung wie oben definiert hat, reduziert wird zur Gewinnung eines Cytorhodin S-Derivats, worin X in der oben angegebenen Formel (I) -NH_2 oder $\text{-NH-R}^1\text{-NH}_2$ ist, und erforderlichenfalls dieses Produkt mit einer Maleimidverbindung der Formel (III)



45

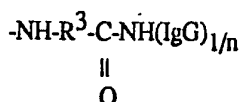
worin R^2 die gleiche Bedeutung wie oben definiert hat, umgesetzt wird, zur Gewinnung eines Cytorhodin S-Derivats (I), worin X



ist, und weiterhin, falls erforderlich, dieses Produkt mit einem Thiolderivat von Immunglobulin der Formel (IV)

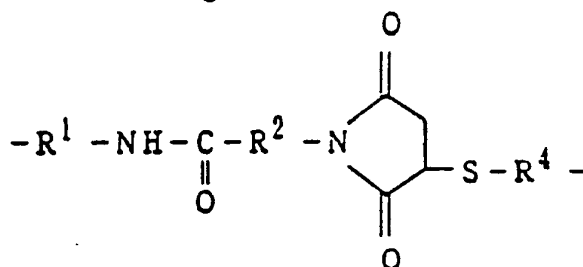
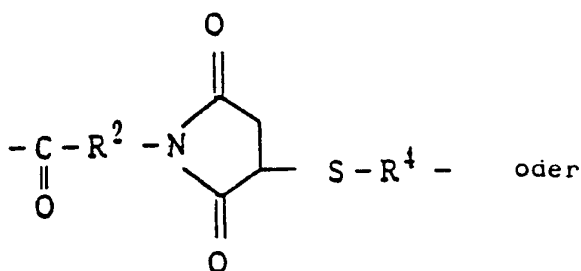


worin R⁴ eine zweiwertige Kohlenwasserstoffgruppe bedeutet, IgG die gleiche Bedeutung wie oben definiert hat, und n' eine ganze Zahl von 1 bis 20 bedeutet, umgesetzt wird zur Gewinnung eines Cytorhodin S-Derivats (I), worin X



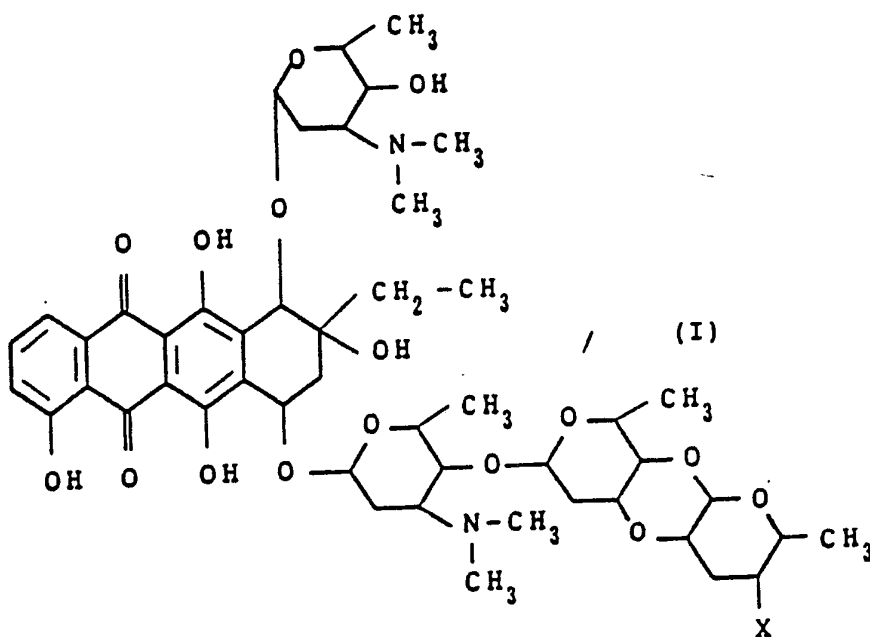
ist.

7. Verfahren zur Herstellung eines Cytorhodin S-Derivats nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß R³



ist.

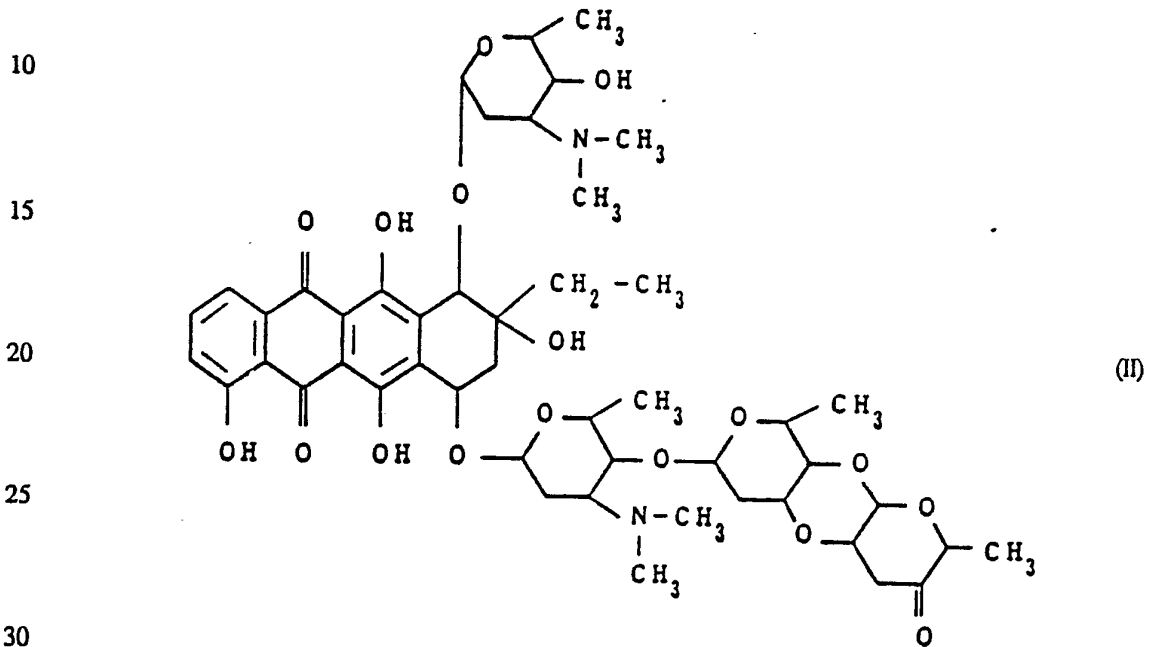
8. Verfahren zur Herstellung eines Cytorhodin S-Derivats der Formel (I)



worin X eine Gruppe $\text{-NH-R}^1\text{-SH}$ oder $\text{-N-R}^3\text{-C-NH(IgG)}_{1/n}$ bedeutet, in der R^1 eine zweiwertige

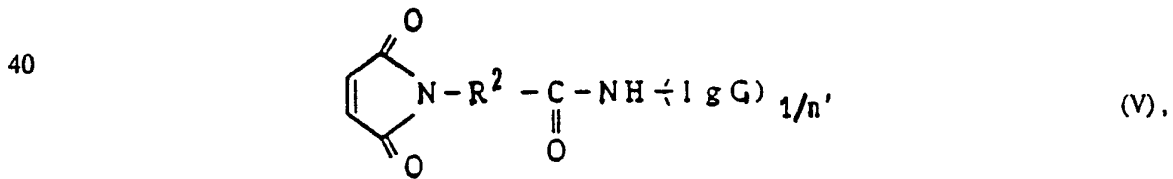


5 Kohlenwasserstoffgruppe, die durch beliebige Substituenten substituiert sein kann, bedeutet, R^3 eine zweiwertige, organische Gruppe bedeutet, IgG einen Immunglobulinrest bedeutet, und n eine ganze Zahl von 1 bis 15 bedeutet, dadurch gekennzeichnet, daß ein Cytorhodin S der Formel (II)



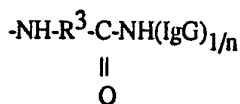
mit einem Alkalimetallcyanoborhydrid in Gegenwart einer durch $\text{NH}_2\text{-R}^1\text{-SH}$ repräsentierten Verbindung, wobei R^1 die gleiche Bedeutung wie oben definiert hat, reduziert wird zur Gewinnung eines Cytorhodin S-Derivats (I),

35 worin X in der oben erwähnten Formel (I) $\text{-NH-R}^1\text{-SH}$ ist, und erforderlichenfalls dieses Produkt mit einem Maleimiderivat von Immunglobulin der Formel (V)



worin R^2 und IgG die gleichen Bedeutungen wie oben definiert haben, und n' eine ganze Zahl von 1 bis 20 bedeutet, umgesetzt wird zur Gewinnung eines Cytorhodin S-Derivats (I), worin X

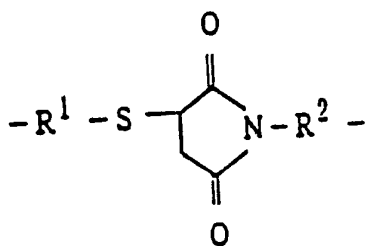
50



55 ist.

9. Verfahren zur Herstellung eines Cytorhodin S-Derivats nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß R^3

5



10 ist.

10. Verfahren zur Herstellung eines Cytorhodin S-Derivats der Formel (I)

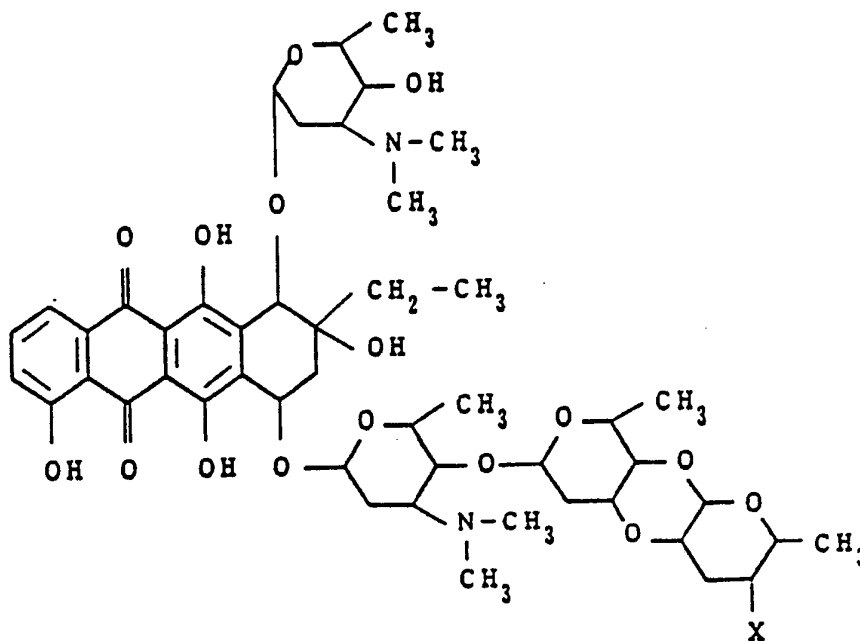
15

20

25

30

35



(I)

worin X eine $-NH-R^1-COOH-$ oder $-NH-R^3-\overset{\parallel}{C}-NH(IgG)_{1/n}$ -Gruppe bedeutet, in welcher R^1 eine zweiwertige

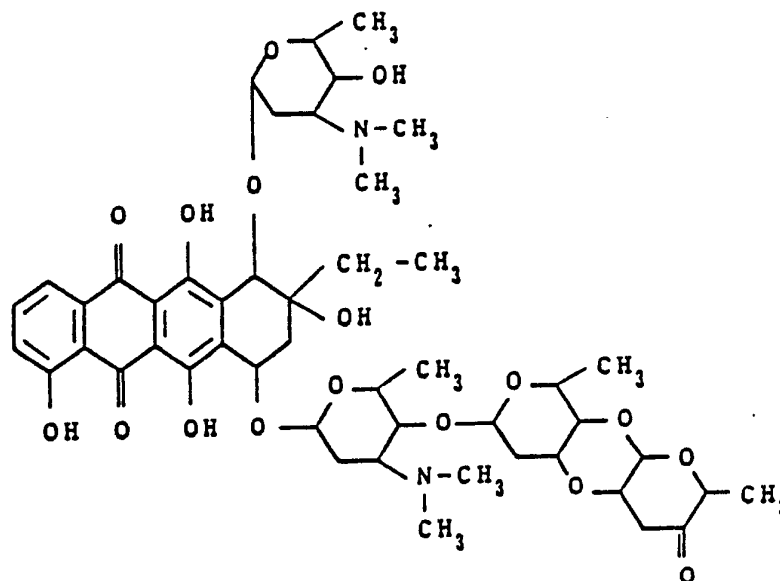
40 Kohlenwasserstoffgruppe bedeutet, die durch beliebige Substituenten substituiert sein kann, R^3 eine zweiwertige, organische Gruppe bedeutet, IgG einen Immunglobulinrest bedeutet, und n eine ganze Zahl von 1 bis 15 bedeutet, dadurch gekennzeichnet, daß Cytorhodin S der Formel (II)

45

50

55

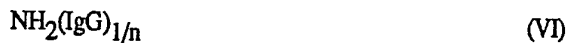
60



(II)

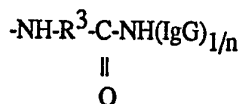
mit einem Alkalimetallcyanoborhydrid in Gegenwart einer durch $\text{NH}_2\text{-R}^1\text{-COOH}$ repräsentierten Verbindung, worin R^1 die gleiche Bedeutung wie oben definiert hat, reduziert wird, zur Gewinnung eines Cytorhodin S-Derivats, worin X in der oben angeführten Formel (I) $\text{-NH-R}^1\text{-COOH}$ bedeutet, und erforderlichenfalls dieses Produkt mit einem Immunglobulin der Formel (VI)

5



worin IgG die gleiche Bedeutung wie oben definiert hat, und n eine ganze Zahl von 1 bis 15 bedeutet, umgesetzt wird zur Gewinnung eines Cytorhodin S-Derivats (I), worin X in der Formel (I)

10



ist.

15

11. Verfahren zur Herstellung eines Cytorhodin-S-Derivats nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß R^3 R^1 ist.

20

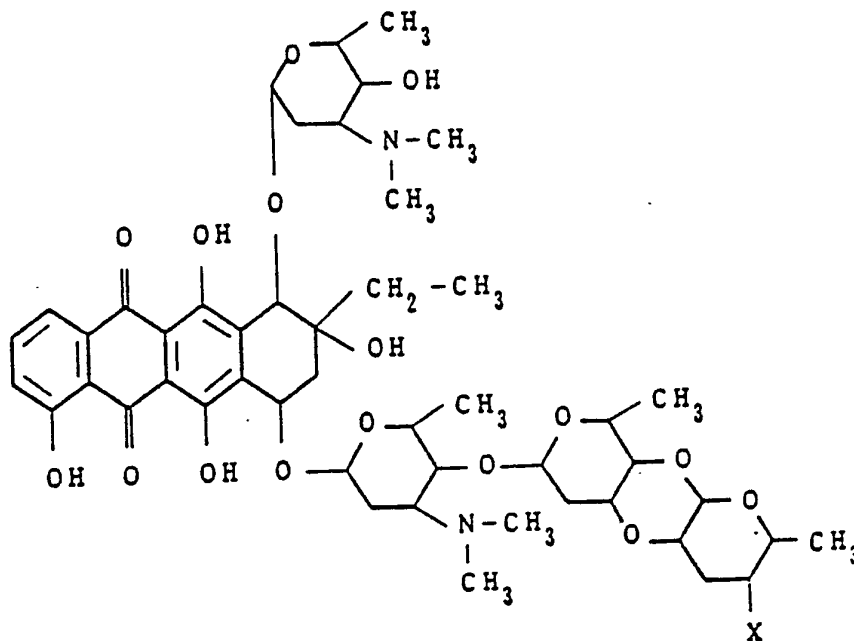
12. Antikrebsmittel, enthaltend ein Cytorhodin-S-Derivat, das durch die allgemeine Formel (I)

25

30

35

40

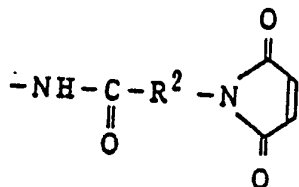


repräsentiert wird, worin X eine Gruppe der Formel

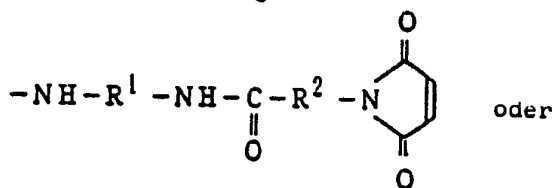
45

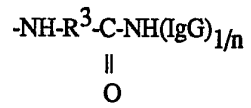


50



55





- 5 darstellt, wobei R^1 eine zweiwertige Kohlenwasserstoffgruppe, die durch beliebige Substituenten substituiert sein kann, bedeutet, R^2 eine zweiwertige Kohlenwasserstoffgruppe bedeutet, R^3 eine zweiwertige, organische Gruppe bedeutet, und n eine ganze Zahl von 1 bis 15 bedeutet.

10

Hiezu 4 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

