



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 32 633 T2 2007.10.04**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 242 401 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 32 633.0**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/30149**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 982 077.0**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/038318**
(86) PCT-Anmeldetag: **21.11.2000**
(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **31.05.2001**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **25.09.2002**
(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **27.12.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **04.10.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C07D 305/14 (2006.01)**
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
167228 P 24.11.1999 US

(73) Patentinhaber:
Immunogen Inc., Cambridge, Mass., US

(74) Vertreter:
**PAe Reinhard, Skuhra, Weise & Partner GbR,
80801 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:
**CHARI, V., Ravi, Newton, MA 02461, US;
BLATTLER, A., Walter, Brookline, MA 02446, US**

(54) Bezeichnung: **ZYTOTOXISCHE MITTEL, DIE TAXANE ENTHALTEN UND IHRE THERAPEUTISCHE ANWENDUNG**

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

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

Beschreibung

[0001] Dies ist eine Continuation-Anmeldung von US Provisional Application Nr. 60/167,228, eingereicht am 24. November 1999.

Gebiet der Erfindung

[0002] Die vorliegende Erfindung betrifft neue zytotoxische Mittel und ihre therapeutische Anwendung. Die Erfindung betrifft insbesondere neue zytotoxische Mittel, die Taxane umfassen und deren therapeutische Anwendung. Diese neuen zytotoxischen Mittel weisen eine therapeutische Anwendbarkeit als Folge der Abgabe beziehungsweise des Transports der Taxane an eine spezifische Zellpopulation in einer zielgerichteten Art und Weise auf, durch chemisches Binden der Taxane an ein Zell bindendes Mittel.

Hintergrund der Erfindung

[0003] Es sind viele Berichte über das versuchsweise spezifische Targeting von Tumorzellen mit monoklonalen Antikörper-Arzneistoffkonjugaten erschienen (Sela et al., in *Immunoconjugates* 189-216 (C. Vogel, Herausgeber 1987); Ghose et al., in *Targeted Drugs* 1-22 (E. Goldberg, Herausgeber 1983); Diener et al., in *Antibody mediated delivery Systems* 1-23 (J. Rodwell, Herausgeber 1988); Bumol et al., in *Antibody mediated delivery systems* 55-79 (J. Rodwell, Herausgeber 1988)). Alle Referenzen und Patente, die hierin erwähnt sind, sind durch Bezugnahme mit aufgenommen.

[0004] Zytotoxische Arzneistoffe wie beispielsweise Methotrexat, Daunorubicin, Doxorubicin, Vincristin, Vinblastin, Melphalan, Mitomycin C und Chlorambucil wurden an eine Vielzahl muriner monoklonaler Antikörper konjugiert. In einigen Fällen wurden die Arzneistoffmoleküle an die Antikörpermoleküle durch ein Zwischenträger-Molekül, wie beispielsweise Serumalbumin (Garnett et al., 46 *Cancer Res.* 2407-2412 (1986); Ohkawa et al. 23 *Cancer Immunol. Immunother.* 81-86 (1986); Endo et al., 47 *Cancer Res.* 1076-1080 (1980)), Dextran (Hurwitz et al., 2 *Appl. Biochem.* 25-35 (1980); Manabi et al., 34 *Biochem. Pharmacol.* 289-291 (1985); Dillman et al., 46 *Cancer Res.* 4886-4891 (1986); Shoal et al., 85 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 8276-8280 (1988)), oder Polyglutaminsäure gebunden (Tsukada et al., 73 *J. Natl. Canc. Inst.* 721-729 (1984); Kato et al. 27 *J. Med. Chem.* 1602-1607 (1984); Tsukada et al., 52 *Br. J. Cancer* 111-116 (1985)).

[0005] Ein breites Aufgebot an Linker-Technologien wurde zur Herstellung derartiger Immunkonjugate verwendet und sowohl spaltbare als auch nicht-spaltbare Linker wurden untersucht. In den meisten Fällen konnte das volle zytotoxische Potential der Arzneistoffe jedoch nur beobachtet werden, wenn die Arzneistoffmoleküle aus den Konjugaten in unmodifizierter Form am Zielort freigesetzt wurden.

[0006] WO 98/19705 beschreibt Verfahren zum Konjugieren von Arzneistoffen, einschließlich von Taxolen unter anderen Beispielen, an zellbindende Mittel, einschließlich unter anderem von Antikörpern, über einen verzweigten Peptid-Linker. In den für Taxane angegebenen Beispielen werden zwei Paclitaxel-Moleküle über eine Carbonatbindung an C-7 an einen langen symmetrischen Peptidlinker gebunden, der eine Maleimidogruppe zum Koppeln eines Zellbindungsmittels enthält. Der Peptidlinker enthält zwei Lysinreste zur unmittelbaren Freisetzung von Paclitaxel. EP-A-0 624 377 umfasst dieselbe Offenbarung wie WO 98/19705 und beschreibt Arzneistoffe, die über Peptidlinker an zellbindende Mittel gebunden sind, die durch lysosomale Enzyme gespalten werden können.

[0007] *J. Med. Chem.*, Band 42, 1999, Seiten 4919 bis 4924 offenbart Paclitaxel-Konjugate, die eine Bindung durch C-2' über einen einfachen Succinat-Linker umfassen. Dasselbe trifft für EP-A-1 033 372 und WO 99/25729 zu, die die Verwendung von öffentlich bekannten Taxanen feststellen.

[0008] WO 89/12624 beschreibt heterobifunktionelle Kopplungsmittel, die sterisch gehinderte Disulfid-Brücken zwischen Amin-enhaltendem Material wie beispielsweise Proteinen oder Peptiden, beispielsweise Antikörpern oder Antikörperfragmenten, insbesondere eines Anti-Tumor-Antikörpers, Träger-Proteinen, aminierten chromatographischen Trägern und aminierten Membranen und Thiol enthaltenen Materialien wie beispielsweise Toxinen, Fab-Fragmenten, Cytokinen mit Thiolgruppen, die für ihre biologische Aktivität nicht notwendig sind, wie beispielsweise Interleukine, Interferone etc. und andere Proteine wie beispielsweise TPA, chromatographische Materialien, Polysaccharide und inerte Materialien, vorzugsweise enzymatisch aktive Toxine von bakteriellem, Pilz- oder Pflanzen-Ursprung, bereitstellen.

[0009] WO 98/52614 beschreibt die Bindung von Arzneistoffmolekülen an Transportpolymere, die dazu in der

Lage sind, Arzneistoffe durch Zellmembranen zu transportieren. Ins Auge gefasste Arzneistoffmoleküle schließen Metall-Chelate, kleine organische Moleküle wie beispielsweise Taxane und Makromoleküle ein. Die Bindung erfolgt auf einem solchen Wege, dass unverändert Arzneistoff aus dem Polymer freigesetzt wird.

[0010] Einer der spaltbaren Linker, der für die Herstellung von Antikörper-Arzneistoffkonjugaten verwendet wird, ist ein Säure-labiler Linker auf Grundlage von cis-Aconitinsäure, der von der sauren Umgebung unterschiedlicher intrazellulärer Kompartimente wie beispielsweise den Endosomen, was während einer Rezeptor-vermittelten Endozytose eintritt, und den Lysosomen, profitiert. Shen und Ryser haben dieses Verfahren zur Herstellung von Konjugaten von Daunorubicin mit makromolekularen Trägern eingeführt (102 Biochem. Biophys. Res. Commun. 1048-1054 (1981)). Yang und Reisfeld verwendeten dieselbe Technologie, um Daunorubicin an Anti-Melanom-Antikörper zu binden (80 J. Natl. Canc. Inst. 1154-1159 (1988)). Dillman et al. verwendeten ebenfalls einen Säure-labilen Linker in einer ähnlichen Weise zur Herstellung von Konjugaten von Daunorubicin mit einem Anti-T-Zell-Antikörper (48 Cancer Res. 6097-6102 (1988)).

[0011] Ein alternativer Ansatz, erforscht von Trouet et al., schloss die Bindung von Daunorubicin an einen Antikörper über einen Peptid-Spacer-Arm ein (79 Proc. Natl. Acad. Sci. 626-629 (1982)). Dies wurde unter der Prämisse durchgeführt, dass freier Arzneistoff aus einem solchen Konjugat durch die Wirkung lysosomaler Peptidasen freigesetzt werden könnte.

[0012] Jedoch haben in vitro Zytotoxizitätstests gezeigt, dass Antikörper-Arzneistoff-Konjugate selten dieselbe zytotoxische Wirksamkeit wie die freien unkonjugierten Arzneistoffe erreichen. Dies legt nahe, dass Mechanismen, durch die Arzneistoff-Moleküle aus den Antikörpern freigesetzt werden, sehr uneffizient sind. Auf dem Gebiet von Immuntoxinen wurde gezeigt, dass Konjugate, die über Disulfid-Brücken zwischen monoklonalen Antikörpern und katalytisch aktiven Proteintoxinen gebildet wurden, zytotoxischer als Konjugate sind, die andere Linker enthalten. Siehe Lambert et al., 260 J. Biol. Chem. 12035-12041 (1985); Lambert et al., in Immunotoxins 175-209 (A. Frankel, Herausgeber 1988); Ghetie et al., 48 Cancer Res. 2610-2617 (1988). Dies wurde der hohen intrazellulären Konzentration von Glutathion zugeschrieben, die zu einer effizienten Spaltung der Disulfid-Brücke zwischen einem Antikörper-Molekül und einem Toxin beiträgt. Trotzdem existieren nur einige berichtete Beispiele der Verwendung von Disulfid-Brücken zur Herstellung von Konjugaten zwischen Arzneistoffen und Makromolekülen. Shen et al. (260 J. Biol. Chem. 10905-10908 (1985)) beschreiben die Umwandlung von Methotrexat in ein Mercaptoethylamidderivat gefolgt von einer Konjugation mit Poly-D-lysin über eine Disulfid-Brücke. Ein anderer Bericht beschrieb die Herstellung eines Konjugats des Trisulfid enthaltenden toxischen Arzneistoffs Calicheamycin mit einem Antikörper (Hinman et al., 53 Cancer Res. 3336-3342 (1993)).

[0013] Ein Grund für das Fehlen von Disulfid-gebundenen Antikörper-Arzneistoff-Konjugaten ist die mangelnde Verfügbarkeit zytotoxischer Arzneistoffe, die eine Schwefel-Atom enthaltende Komponente besitzen, die einfach zur Bindung des Arzneistoffs an einen Antikörper über eine Disulfid-Brücke verwendet werden können. Darüber hinaus ist eine chemische Modifikation existierender Arzneistoffe ohne Verringerung ihres zytotoxischen Potentials schwierig.

[0014] Ein anderer Hauptnachteil bei existierenden Antikörper-Arzneistoff-Konjugaten ist ihr mangelndes Vermögen, eine ausreichende Konzentration eines Arzneistoffes an den Zielort wegen der beschränkten Anzahl von als Ziel definierten Antigenen zu liefern und wegen der relativ moderaten Zytotoxizität von cancerostatischen Arzneistoffen wie Methotrexat, Daunorubicin und Vincristin. Um eine signifikante Zytotoxizität zu erreichen, wird eine Bindung einer großen Anzahl von Arzneistoffmolekülen entweder direkt an den Antikörpern oder durch ein polymeres Tragemolekül notwendig. Jedoch zeigen derartig schwere modifizierte Antikörper oftmals eine verschlechterte Bindung an das Ziel-Antigen und eine rasche in vitro Clearance aus dem Blutstrom.

[0015] Trotz der oben beschriebenen Schwierigkeiten wurde von nützlichen zytotoxischen Mitteln, die Zellbindungskomponenten umfassen, und der Gruppe von zytotoxischen Arzneistoffen, die als Maytansinoide bekannt ist, berichtet (USP 5,208,020, USP 5,416,064 und R.V.J. Chari, 31 Advanced Drug Delivery Reviews 89-104 (1998)). In ähnlicher Weise wurde von nützlichen zytotoxischen Mitteln, die Zellbindungskomponenten und Analoge und Derivate des wirksamen Antitumor-Antibiotikums CC-1065 umfassen, ebenfalls berichtet (USP 5,475,092 und USP 5,585,499).

[0016] Paclitaxel (Taxol), ein zytotoxisches Naturprodukt und Docetaxel (Taxotere), ein halbsynthetisches Derivat (siehe [Fig. 1](#)) sind in der Behandlung von Krebs weithin verwendet. Diese Verbindungen gehören zur Familie von Verbindungen, die als Taxane bezeichnet werden. Taxane sind Mitose-Spindelgifte, die die Depolymerisation von Tubulin hemmen, was eine Zunahme der Rate beziehungsweise Geschwindigkeit des Mikrotubuli-Zusammenbaus und einen Zelltod zur Folge hat. Während Docetaxel und Paclitaxel nützliche Mittel bei

der Behandlung von Krebs sind, ist ihre Anti-Tumor-Aktivität wegen ihrer unspezifischen Toxizität gegenüber normalen Zellen beschränkt.

[0017] Weiterhin sind Verbindungen wie Paclitaxel und Docetaxel selbst nicht ausreichend wirksam, um in Konjugaten von zellbindenden Mitteln verwendet zu werden. Kürzlich wurden einige neue Docetaxel-Analoga mit einer größeren Wirkstärke als entweder Docetaxel oder Paclitaxel beschrieben (Tao Wang et al., Synthesis and Biological Activity of Advanced 2nd Generation Taxoids, Dept. of Chem, State University of NY at Stony Brook, NY 11794-3400; Dept of Exp Therapeutics, Roswell Park Cancer Inst, Elm and Carlton Streets, Buffalo, NY 14263, Seiten 1-12; und [Fig. 1](#)). Jedoch fehlt diesen Verbindungen eine geeignete Funktionalität, die eine Bindung über eine spaltbare Bindung an Zellbindungsmittel ermöglicht.

[0018] Demgemäß besteht ein großer Bedarf nach einem Verfahren zur Behandlung von Krankheiten mit Taxanen, wobei deren Nebenwirkungen reduziert werden, ohne ihre Zytotoxizität zu beeinträchtigen.

Zusammenfassung der Erfindung

[0019] Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Taxane bereitzustellen, die in hohem Maße toxisch sind und die in der Behandlung vieler Erkrankungen noch effektiv verwendet werden können.

[0020] Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, neue Taxane bereitzustellen.

[0021] Diese und weitere Aufgaben wurden durch Bereitstellung eines zytotoxischen Mittels gelöst, das ein oder mehrere Taxane an ein Zellbindungsmittel gebunden umfasst.

[0022] In einer zweiten Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung eine therapeutische Zusammensetzung bereit, die Folgendes umfasst:

- (A) eine wirksame Menge eines oder mehrerer Taxane, gebunden an ein Zellbindungsmittel, und
- (B) einen pharmazeutisch verträglichen Träger, Verdünnungsmittel oder Trägerstoff.

[0023] In einer dritten Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Abtöten ausgewählter Zellpopulationen bereit, umfassend das In-Berührung-Bringen von Zielzellen oder Gewebe-enhaltenden Zielzellen mit einer zytotoxischen Menge eines zytotoxischen Mittels, das ein oder mehrere Taxane gebunden an ein Zellbindungsmittel umfasst.

[0024] In einer vierten Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung Taxane bereit, die eine Bindungsgruppe umfasst, die dazu in der Lage ist, Taxane an ein Zellbindungsmittel oder andere chemische Komponenten zu binden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0025] [Fig. 1](#) ist eine chemische Formel, die die Strukturen verschiedener Taxane repräsentiert, einschließlich einiger der wirksameren Taxane, beschrieben von Ojima et al., siehe oben.

[0026] [Fig. 2](#) ist eine chemische Formel, die Strukturen einiger der Disulfid-enhaltenden Taxane gemäß der vorliegenden Erfindung repräsentiert.

[0027] [Fig. 3](#) zeigt die Struktur von 10-Diacetylbaccatin III, das das Ausgangsmaterial zur Herstellung von Taxanen ist.

[0028] [Fig. 4](#) zeigt die Anti-Tumor-Wirkung von Anti-EGF-Rezeptor-Antikörper-Taxankonjugaten auf humane Plattenepithelkrebs(A431) xenotransplantate in SCID-Mäusen.

[0029] [Fig. 5](#) zeigt die Körpergewichtsveränderung der SCID-Mäuse, die in dem in Beispiel 10 beschriebenen Experiment verwendet wurden.

[0030] [Fig. 6](#) zeigt die Ergebnisse einer Zytotoxizitätsbestimmung für das Anti-EGF-Rezeptortaxankonjugat auf die Targetantigen-positive Zell-Linie A431 und für das N901-Taxankonjugat, für das die A431-Zell-Linie das Zielantigen nicht exprimiert.

[0031] [Fig. 7](#) zeigt die zytotoxische Wirksamkeit und Selektivität des TA.1-Taxankonjugats in der Zielanti-

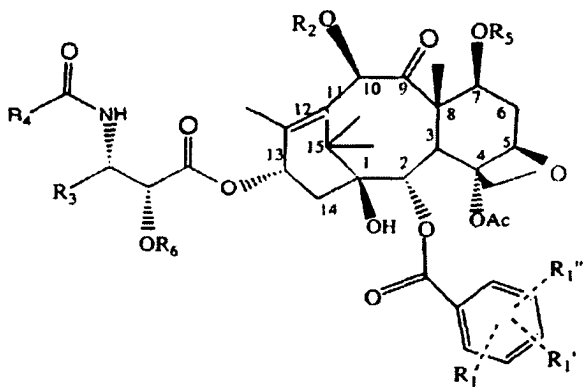
gen-positiven Zell-Linie SK-BR-3 und die Zielantigen-negative Zell-Linie A431.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0032] Die vorliegende Erfindung basiert auf der Synthese neuer Taxane, die eine hohe Zytotoxizität beibehalten und die effektiv an Zellbindungsmittel gebunden werden können. Es wurde kürzlich gezeigt, dass die Bindung von in hohem Maße zytotoxischen Arzneistoffen an Antikörper unter Verwendung einer spaltbaren Bindung, wie beispielsweise einer Disulfid-Brücke, die Freisetzung von voll aktivem Arzneistoff innerhalb der Zelle sicherstellt und solche Konjugate sind in einer Antigen-spezifischen Art und Weise zytotoxisch (R.V.J. Chari et al., 52 Cancer Res. 127-131 (1992); U.S. Pat. Nr. 5,475,092 und U.S. Pat. 5,416,064). Jedoch zeigt der Stand der Technik, dass es extrem schwierig ist, existierende Arzneistoffe zu modifizieren, ohne ihr zytotoxisches Potential zu verringern. Die offenbarte Erfindung überwindet dieses Problem durch Modifizieren der offenbarten Taxane mit chemischen Komponenten und insbesondere solchen, die Thiol oder Disulfidgruppen enthalten, an die geeignete Zellbindungsmittel gebunden werden können. Als Folge konservieren die offenbarten neuen Taxane die zytotoxische Potenz bzw. Wirksamkeit bekannter Taxane und in einigen Fällen können sie diese sogar erhöhen. Die Zellbindungsmittel-Taxankomplexe ermöglichen ein volles Maß an zytotoxischer Wirkung der Taxane in einer zielgerichteten Anwendung gegen unerwünschte Zellen und verhindert deswegen Nebenwirkungen aufgrund einer Schädigung von nicht als Ziel definierten gesunden Zellen. Diese Erfindung ermöglicht, dass Taxane ortsgerichtet ausgerichtet werden, was bis jetzt nicht möglich war. Somit stellt die vorliegende Erfindung nützliche Mittel zur Eliminierung erkrankter oder abnormaler Zellen bereit, die getötet oder lysiert werden sollen, wie beispielsweise Tumorzellen (insbesondere feste Tumorzellen), Virus-infizierte Zelle, mit Mikroorganismen infizierte Zellen, Parasiten-infizierten Zellen, Autoimmunzellen (Zellen, die Autoantikörper produzieren), aktivierte Zellen (solche, die in einer Transplantatabstoßung oder Graft-Versus-Host-Disease involviert sind) oder irgendeinen anderen Typ von erkrankten oder abnormalen Zellen, während sie nur minimale Nebenwirkungen zeigen.

[0033] Das zytotoxische Mittel gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst ein oder mehrere Taxane, die an ein Zellbindungsmittel über ihre Bindungsgruppe gebunden sind. Die Bindungsgruppe ist Teil einer chemischen Komponente, die kovalent an ein Taxan über konventionelle Verfahren gebunden wird. In einer bevorzugten Ausführungsform kann die chemische Komponente an Taxan über eine Ether-Bindung kovalent gebunden sein.

[0034] Die in der vorliegenden Erfindung nützlichen Taxane weisen die unten dargestellte Formel (I) auf:



(I)

[0035] Diese neuen Taxane können in vier Ausführungsformen unterteilt werden, nämlich jeweils (1), (2), (3) und (4). Beispiele der vier Ausführungsformen sind in [Fig. 2](#) dargestellt.

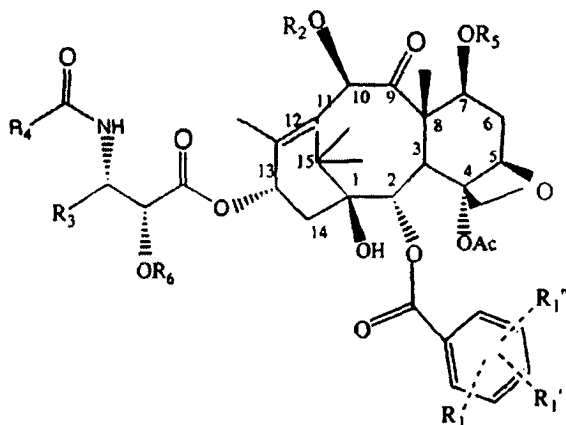
[0036] In den Ausführungsformen (1) bis (4) ist eine Elektronen ziehende Gruppe, wie beispielsweise F, NO₂, CN, Cl, CHF₂ oder CF₃ oder eine Elektronen schiebende Gruppe wie beispielsweise OCH₃, OCH₂CH₃, NR₇R₈, OR₉, und R₁ und R₁' sind gleich oder verschieden, und sind H, eine Elektronen ziehende Gruppe oder eine Elektronen schiebende Gruppe. R₁ kann ebenfalls H sein.

[0037] R₇ und R₈ sind gleich oder verschieden und sind lineare, verzweigte oder zyklische Alkylgruppen mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder einfaches oder substituiertes Aryl mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen. Vorzugsweise ist die Anzahl der Kohlenstoffatome für R₇ und R₈ 1 bis 4. Ebenfalls sind vorzugsweise R₇ und R₈ gleich. Beispiele für bevorzugte NR₇R₈-Gruppen schließen Dimethylamino, Diethylamino, Dipropylamino und Dibutyl-

amino ein, wobei die Butylkomponente entweder primär, sekundär, tertiär oder Isobutyl ist. R_9 ist lineares, verzweigtes oder zyklisches Alkyl mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen. R_1 ist vorzugsweise F, NO_2 oder CF_3 .

[0038] Vorzugsweise liegt R_1 in der Metaposition vor und sind R_1 und R_1'' H.

[0039] In den Ausführungsformen (1), (2) und (4) ist $R_2\text{O}$ ein heterozyklischer, linearer oder verzweigter oder zyklischer Ester oder ein Ether mit von 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder ein



(I)

Carbamat der Formel $-\text{OCONR}_{10}\text{R}_{11}$, wobei R_{10} und R_{11} gleich oder verschieden sind und H linear oder verzweigt oder zyklisches Alkyl mit 1 bis 10 Atomen oder einfaches oder substituiertes Aryl mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen sind. Für Ester schließen bevorzugte Beispiele für R_2 $-\text{COCH}_2\text{CH}_3$ und $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ein. Für Carbamate schließen bevorzugte Beispiele für R_2 $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CO-Morpholino}$, $-\text{CO-Piperazino}$, $-\text{CO-Piperidino}$ oder $-\text{CO-N-Methylpiperazino}$ ein.

[0040] In Ausführungsform 3 ist R_2 die Verbindungs-Gruppe.

[0041] In den Ausführungsformen (1), (3) und (4) ist R_3 Aryl oder ist lineares, verzweigtes oder zyklisches Alkyl mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen, vorzugsweise $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$.

[0042] In Ausführungsform (2) ist R_3 $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$.

[0043] In allen Ausführungsformen ist R_4 $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ oder $-\text{C}_6\text{H}_5$.

[0044] In den Ausführungsformen (1) und (2) ist R_5 die Verbindungsgruppe und ist R_6 H oder $R_6\text{O}$ weist dieselbe Definition wie oben für $R_2\text{O}$ für die Ausführungsformen (1), (2) und (4) auf.

[0045] In Ausführungsform (3) ist R_5 H oder $R_5\text{O}$ weist dieselbe Definition wie oben für $R_2\text{O}$ für die Ausführungsformen (1), (2) und (4) auf.

[0046] In Ausführungsform (3) ist R_6 H oder $R_6\text{O}$ weist dieselbe Definition wie oben für $R_2\text{O}$ für die Ausführungsformen (1), (2) und (4) auf.

[0047] In Ausführungsform (4) ist R_5 H oder weist $R_5\text{O}$ dieselbe Definition wie oben für $R_2\text{O}$ für die Ausführungsformen (1), (2) und (4) auf und ist R_6 eine Verbindungsgruppe.

[0048] Die bevorzugten Positionen zur Einfügung der Verbindungsgruppe sind R_2 und R_5 , wobei R_2 am meisten bevorzugt ist. Geeignete Verbindungsgruppen sind in der Technik wohlbekannt und schließen Disulfidgruppen und Thioethergruppen ein.

[0049] Wenn die Bindungsgruppe eine Thiol- oder Disulfid-enthaltende Gruppe ist, kann die Seitenkette, die eine Thiol- oder Disulfidgruppe trägt, linear oder verzweigt sein, aromatisch oder heterozyklisch. Der Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet kann leicht geeignete Seitenketten identifizieren. Spezielle Beispiele für die Thiol- oder Disulfid-enthaltenden Substituenten schließen $-(\text{CH}_2)_n\text{SZ}$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{SZ}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_3)\text{SZ}$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_3)\text{SZ}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{SZ}$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{SZ}$, $-\text{CONR}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{SZ}$, $-\text{CONR}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_3)\text{SZ}$ oder $-\text{CONR}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{SZ}$, $-\text{CO-Morpholino-XSZ}$, $-\text{CO-Piperazino-XSZ}$;

-CO-Piperidino-XSZ und -CO-N-Methylpiperazino-XSZ, wobei Z H oder SR ist, X ein lineares Alkyl oder ein verzweigtes Alkyl mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen ist.

[0050] R und R₁₂ sind gleich oder verschieden und sind lineares Alkyl, verzweigtes Alkyl oder zyklisches Alkyl mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder einfaches oder substituiertes Aryl mit von 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder heterozyklisch und R₁₂, kann zusätzlich H sein und, n ist eine ganze Zahl von 1 bis 10.

[0051] Beispiele für lineare Alkyle schließen Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl, Pentyl und Hexyl ein.

[0052] Beispiele für verzweigte Alkyle schließen Isopropyl, Isobutyl, sec-Butyl, tert-Butyl, Isopentyl und 1-Ethyl-propyl ein.

[0053] Beispiele für zyklische Alkyle schließen Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclopentyl und Cyclohexyl ein.

[0054] Beispiele für einfache Aryle schließen Phenyl und Naphthyl ein.

[0055] Beispiele für substituierte Aryle schließen Aryle ein, wie beispielsweise solche, die oben beschrieben wurden, substituiert mit Alkylgruppen, mit Halogenen wie beispielsweise Cl, Br, F, Nitrogruppen, Aminogruppen, Sulfonsäuregruppen, Carboxylsäuregruppen, Hydroxygruppen oder Alkoxygruppen.

[0056] Beispiele für Heterozyklen sind Verbindungen, bei denen die Heteroatome aus O, N und S ausgewählt sind und schließen Morpholino, Piperidino, Piperazino, N-Methylpiperazino, Pyrrolyl, Pyridyl, Furyl und Thiophen ein.

[0057] Die Taxane der vorliegenden Erfindung, die einen Thiol- oder Disulfid-enthaltenden Substituenten aufweisen, sind an sich selbst neu.

[0058] Die Taxane, die einen Thiol- oder Disulfid-enthaltenden Substituenten aufweisen, können gemäß bekannter Verfahren synthetisiert werden. Das Ausgangsmaterial für die Synthese ist kommerziell erhältliches 10-Diacetylbaccatin III, dargestellt in [Fig. 3](#). Die Chemie zur Einführung verschiedener Substituenten ist in mehreren Publikationen beschrieben (Ojima et al., J. Med. Chem. 39, 3889-3896 (1996); Ojima et al., 40 J. Med. Chem. 267-278 (1997); I. Ojima et al., 96 Proc. Natl. Acad. Sci., 4256-4261 (1999); I. Ojima et al., U.S. Pat. Nr. 5,475,011 und U.S. Pat. Nr. 5,811,452.

[0059] Der Substituent R₁ am Phenylring und die Position des Substituenten R₁ kann variiert werden, bis eine Verbindung der gewünschten Toxizität erzielt wird. Darüber hinaus kann der Grad der Substitution am Phenylring variiert werden, um die erwünschte Toxizität zu erreichen. Das heißt, der Phenylring kann ein oder mehrere Substituenten aufweisen (beispielsweise Mono-, Di- oder Tri-Substitution des Phenylrings), welche ein weiteres Mittel zum Erreichen einer erwünschten Toxizität bereitstellen. Eine hohe Zytotoxizität ist als eine Toxizität definiert, die einen IC₅₀, im Bereich von 1×10^{-12} bis 3×10^{-9} M aufweisen, wenn sie in vitro mit kultivierten Krebszellen nach einer 72-stündigen Expositionszeit gegenüber dem Arzneistoff in vitro gemessen wurden. Ein Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet kann die geeignete chemische Komponente für R₁ und die geeignete Position für R₁ unter Verwendung von lediglich Routineexperimenten bestimmen.

[0060] Beispielsweise wird erwartet, dass Elektronen ziehende Gruppen an der Meta-Position die zytotoxische Wirksamkeit erhöhen, während eine Substitution in der Para-Position erwarteterweise die Wirkstärke im Vergleich zum Stamm-Taxan nicht erhöhen wird. Typischerweise werden einige repräsentative Taxane mit Substituenten in unterschiedlichen Position (ortho, meta und para) anfänglich hergestellt und bezüglich einer in vitro Zytotoxizität ausgewertet.

[0061] Der Disulfid- oder Thiol-enthaltende Substituent kann an einer der Positionen eingebracht werden, in denen bereits eine Hydroxylgruppe existiert. Die Chemie zum Schützen der verschiedenen Hydroxylgruppen, während die erwünschte reagiert, wurde kürzlich beschrieben (siehe beispielsweise die oben zitierten Referenzen). Der Substituent wird durch einfaches Umwandeln der freien Hydroxylgruppe in einen Disulfid-enthaltenden Ether, einen Disulfid-enthaltenden Ether, einen Disulfid-enthaltenden Ester oder ein Disulfid-enthaltendes Carbamat eingebracht. Diese Transformation wird wie folgt erreicht. Die erwünschte Hydroxylgruppe wird durch Behandlung mit dem kommerziell erhältlichen Reagenz Lithiumhexamethyldisilazan (1,2 Äquivalente) in Tetrahydrofuran bei -40°C wie in I. Ojima et al., siehe oben, deprotoniert. Das sich ergebende Alkoxid-Anion wird dann mit einem Überschuss einer Dihalovrbinding umgesetzt, wie beispielsweise Dibromethan, so dass

sich ein Haloether ergibt. Die Verdrängung des Halogens durch ein Thiol (durch Umsetzung mit Kaliumthioacetat und Behandlung mit einer milden Base oder Hydroxylamin) wird das erwünschte Thiol-enthaltende Taxan bereitstellen. Die Thiolgruppe kann durch Umsetzung mit Methylmethanthiolsulfonat oder Dithiodipyridin jeweils in ein Methyl- oder Pyridyldisulfid umgewandelt werden. Dieses Verfahren ist in U.S. Pat. Nr. 5,416,064 beschrieben.

[0062] Alternativ kann die erwünschte Hydroxylgruppe direkt durch Reaktion mit einem Acylhalogenid verestert werden, wie beispielsweise einem 3-Brompropionylchlorid, so dass sich ein Bromester ergibt. Die Verdrängung der Bromgruppe durch Behandlung mit Kaliumthioacetat und eine weitere Verarbeitung wie oben beschrieben, ergibt den Thiol- oder Disulfid-enthaltenden Taxanester. Um Disulfid-enthaltende Carbamate herzustellen, kann die Hydroxylgruppe mit einem im Handel erhältlichen Chloroformiat umgesetzt werden, wie beispielsweise Para-Nitrophenylchloroformiat, gefolgt von Reaktion mit einem Aminoalkyldisulfid (beispielsweise Methylthiocysteamin).

[0063] Disulfid-enthaltende und Thiol-enthaltende Taxan-Arzneistoffe der Erfindung können auf ihre Fähigkeit hin überprüft werden, die Proliferation verschiedener unerwünschter Zell-Linien in vitro zu unterdrücken. Beispielsweise können Zell-Linien wie beispielsweise die humane epidermoide Karzinomlinie A431, die humane Brusttumormlinie SKBR3 und die Burkitt Lymphomlinie Namalwa einfach zur Bestimmung der Zytotoxizität dieser Verbindungen verwendet werden. Zu evaluierende Zellen können den Verbindungen für 72 Stunden gegenüber ausgesetzt werden und die überlebenden Fraktionen der Zellen können in direkten Assays durch bekannte Verfahren gemessen werden. Die IC_{50} -Werte können dann aus den Ergebnissen der Assays berechnet werden.

[0064] Die Wirksamkeit der Verbindungen der Erfindung als therapeutische Mittel hängt von der sorgfältigen Auswahl eines geeigneten Zellbindungsmittels ab. Zellbindungsmittel können von irgendeiner gegenwärtig bekannten Art sein oder derjenigen, die bekannt werden und schließen Peptide und Nicht-Peptide ein. Im Allgemeinen können diese Antikörper oder Fragmente hiervon (insbesondere monoklonale Antikörper), Lymphokine, Hormone, Wachstumsfaktoren, Vitamine, Nahrungs-Transportmoleküle (wie beispielsweise Transferrin) oder irgendein anderes Zellbindungsmolekül oder -substanz sein.

[0065] Speziellere Beispiele von Zellbindungsmitteln, die verwendet werden können, schließen Folgendes ein:

- Fragmente von Antikörpern wie beispielsweise sFv, Fab, Fab' und F(ab')₂ (Parham, 131 J. Immunol. 2895-2902 (1983); Spring et al., 113 J. Immunol. 470-478 (1974); Nisonoff et al. 89 Arch. Biochem. Biophys. 230-244 (1960));
- Interferone (beispielsweise α , β , γ);
- Lymphokine wie beispielsweise IL2, IL3, IL4, IL6;
- Hormone wie beispielsweise Insulin, TRH (Thyrotropin-freisetzende Hormone), MSH (Melanozyten-stimulierendes Hormon), Steroidhormone wie beispielsweise Androgene und Östrogene;
- Vitamine wie beispielsweise Folsäure;
- Wachstumsfaktoren und Kolonie-stimulierende Faktoren wie beispielsweise EGF, TGF- α , G-CSF, M-CSF und GM-CSF (Burgess, 5 Immunology Today 155-158 (1984)); und
- Transferrin (O'Keefe et al., 1601. Biol. Chem. 932-937 (1985)).

[0066] Monoklonale Antikörpertechniken ermöglichen die Produktion extrem spezifischer Zellbindungsmittel in Form spezifischer monoklonaler Antikörper oder Fragmente hiervon. Insbesondere sind in der Technik wohl-known Techniken zur Erzeugung monoklonaler Antikörper oder von Fragmenten hiervon durch Immunisieren von Mäusen, Ratten, Hamstern oder irgendeines anderen Säugetiers mit dem Antigen von Interesse, wie beispielsweise der intakten Targetzelle, Antigene, die aus der Targetzelle isoliert wurden, ganzen Viren, attenuierten ganzen Viren und viralen Proteinen, wie beispielsweise viralen Hüllproteinen. Empfindlich gemachte humane Zellen können ebenfalls verwendet werden. Ein weiteres Verfahren zur Erzeugung monoklonaler Antikörper oder Fragmenten hiervon ist die Verwendung von Phagenbibliotheken von sFv (einkettige variable Region), insbesondere humanes sFv. Siehe beispielsweise Griffiths et al., USP 5,885,793; McCafferty et al., WO 92/01047, Liming et al., WO 99106587).

[0067] Die Auswahl der geeigneten Zellbindungsmittel ist eine Frage der Auswahl, die von der speziellen, als Ziel definierten Zellpopulation abhängt, jedoch im Allgemeinen sind monoklonale Antikörper bevorzugt, wenn ein Geeigneter verfügbar ist.

[0068] Beispielsweise ist der monoklonale Antikörper 15 ein muriner IgG_{2a}-Antikörper, der für das Common

Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen (CALLA) spezifisch ist (Ritz et al., 283, Nature 583-585 (1980)) und kann verwendet werden, wenn die Zielzellen CALLA wie beispielsweise bei einer Erkrankung einer akuten lymphoblastischen Leukämie exprimieren. In ähnlicher Weise ist der monoklonale Antikörper Anti-B4 ein murines IgG₁, das an das CD19-Antigen an B-Zellen bindet (Nadler et al., 131 J. Immunol. 244-250 (1983)) und kann verwendet werden, wenn die Zielzellen B-Zellen oder erkrankte Zellen sind, die dieses Antigen exprimieren, wie beispielsweise in einem Nicht-Hodgkinschen Lymphom oder einer chronischen lymphoblastischen Leukämie.

[0069] Zusätzlich kann GM-CSF, das an Myeloid-Zellen bindet, als Zellbindungsmittel an erkrankte Zellen aus einer akuten myelogenen Leukämie verwendet werden. IL-2, das an aktivierte T-Zellen bindet, kann zur Vorbeugung einer Transplantatabstoßung, zur Therapie und Vorbeugung einer Graft-Versus-Host-Disease und zur Behandlung einer akuten T-Zell-Leukämie verwendet werden. MSH, das an Melanozyten bindet, kann zur Behandlung eines Melanoms verwendet werden. Folsäure, das den Folat-Rezeptor als Ziel definiert, der auf Ovarial- und anderen Krebsarten exprimiert wird, ist ebenfalls ein geeignetes Zellbindungsmittel.

[0070] Krebs der Brust und Hoden kann erfolgreich mit Östrogen (oder Östrogenanaloga) oder Androgen (oder Androgenanaloga) jeweils als Zellbindungsmittel als Ziel definiert werden.

[0071] Konjugate der Taxane der Erfindung und eines Zellbindungsmittels können unter Verwendung irgendeiner Technik gebildet werden, die gegenwärtig bekannt sind oder später entwickelt werden. Zahlreiche Verfahren zur Konjugation sind in U.S. Pat. Nr. 5,416,064 und U.S. Pat. Nr. 5,475,092 gelehrt worden. Der Taxanester kann modifiziert werden, so dass sich eine freie Aminogruppe ergibt und kann dann an einen Antikörper oder ein anderes Zellbindungsmittel über einen säurelabilen Linker oder einen photolabilen Linker gebunden werden. Der Taxanester kann mit einem Peptid kondensiert und anschließend an ein Zellbindungsmittel gebunden werden, um einen Peptidase-labilen Linker zu erzeugen. Die Hydroxylgruppe am Taxanester kann succinyliert und an ein Zellbindungsmittel gebunden werden, um ein Konjugat zu erzeugen, das durch intrazelluläre Esterasen gespalten werden kann, um freien Arzneistoff freizusetzen. Am meisten bevorzugt werden die Taxanether, -Ester oder -Carbamate behandelt, so dass eine freie oder geschützte Thiolgruppe erzeugt wird und danach werden die Disulfid- oder Thiol-enthaltenden Taxane an das Zellbindungsmittel über Disulfid-Brücken gebunden.

[0072] Repräsentative Konjugate der Erfindung sind Antikörper-Taxan, Antikörperfragment-Taxan, epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)-Taxan, Melanozyten-stimulierendes Hormon (MSH)-Taxan, Schilddrüsen-stimulierendes Hormon (TSH)-Taxan, Östrogen-Taxan, Östrogenanalog-Taxan, Androgen-Taxan, Androgenanalog-Taxan und Folat-Taxan.

[0073] Taxan-Konjugate von Antikörpern, Antikörperfragmenten, Protein- oder Peptidhormonen, Protein- oder Peptidwachstumsfaktoren und anderen Proteinen werden in derselben Art und Weise durch bekannte Verfahren hergestellt. Beispielsweise können Peptide und Antikörper mit Vernetzungsreagenzien wie beispielsweise N-Succinimidyl-3(2-pyridyldithio)propionat, N-Succinimidyl-4(2-pyridyldithio)pentanoat (SPP), 4-Succinimidyl-oxycarbonyl- α -methyl- α (2-pyridyldithio)toluol (SMPT), N-Succinimidyl-3(2-pyridyldithio)butyrat (SDPB), 2-Iminothiolan oder S-Acetylbernsteinsäureanhydrid durch bekannte Verfahren modifiziert werden. Siehe Carlsson et al., 173 Biochem. J. 723-737 (1978); Blattler et al., 24 Biochem. 1517-1524 (1985); Lambert et al., 22 Biochem. 3913-3920 (1983); Klotz et al., Arch. Biochem. Biophys. 605 (1962); und Liu et al., 18 Biochem. 690 (1979), Blakey und Thorpe, 1 Antikörper, Immunoconjugates Zellbindungsmittel & Radiopharmaceuticals, 1-16 (1988), Worrell et al., 1 Anti-Cancer Drug Design 179-184 (1986). Das freie oder geschützte Thiol-enthaltende Zellbindungsmittel, das somit gewonnen wurde, wird dann mit einem Disulfid- oder Thiol-enthaltenden Taxan zur Erzeugung von Konjugaten umgesetzt. Die Konjugate können durch HPLC oder durch Gelfiltration aufgereinigt werden.

[0074] In ähnlicher Weise können Östrogen- und Androgen-Zellbindungsmittel, wie beispielsweise Östradiol und Androstendiol an der C-17 Hydroxygruppe mit einer geeigneten Disulfid-enthaltenden Carbonsäure unter Verwendung beispielsweise von Dicyclohexylcarbodiimid als Kondensationsmittel verestert werden. Beispiele für solche Carbonsäuren, die verwendet werden können, sind 3(2-Pyridyldithio)propansäure, 3-Methyldithiopropansäure, 4-(2-Pyridyldithio)pentansäure und 3-Phenyldithiopropansäure. Die Veresterung der C-17 Hydroxygruppe kann ebenfalls durch Umsetzung mit einer geeigneten geschützten Thiolgruppe erreicht werden, die Carbonsäurechlorid enthält, wie beispielsweise 3-S-Acetylpropanoylchlorid. Weitere Verfahren zur Veresterung können ebenfalls verwendet werden, wie sie in der Literatur beschrieben sind (Haslam, 36 Tetrahedron 2409-2433 (1980)). Das geschützte oder freie Thiol-enthaltende Androgen oder Östrogen kann dann mit einem Disulfid- oder Thiol-enthaltenden Taxan umgesetzt werden, um Konjugate zu erzeugen. Die Konjugate können

durch Säulenchromatographie auf Silicagel oder durch HPLC aufgereinigt werden. Die Folsäure kann mit einem geeigneten Hydrazid, wie beispielsweise 4-(2-Pyridyldithio)pentansäurehydrazid in Gegenwart eines Kondensationsmittels, wie beispielsweise Dicyclohexylcarbodiimid kondensiert werden, so dass sich ein Hydrazon, das aktives Disulfid enthält, ergibt. Das Disulfid-enthaltende Folat kann dann mit einem Thiol-enthaltenden Taxan umgesetzt werden, so dass ein Konjugat erzeugt wird, das durch Säulenchromatographie über Silicagel oder durch HPLC aufgereinigt wird.

[0075] Vorzugsweise sind monoklonale Antikörper oder Zellbindungsmittel-Taxankonjugate solche, die über eine Disulfid-Brücke wie oben beschrieben verbunden sind, die dazu in der Lage sind, Taxanmoleküle abzugeben. Derartige Zellbindungskonjugate werden durch bekannte Verfahren hergestellt, wie beispielsweise durch Modifizieren monoklonaler Antikörper mit Succinimidylpyridyldithiopropionat (SPDP) (Carlsson et al., 173 Biochem. J. 723-737 (1978)). Die sich ergebende Thiopyridylgruppe wird dann durch Behandlung mit Thiol-enthaltenden Taxanen verdrängt, so dass Disulfid-verbundene Konjugate erzeugt werden. Alternativ wird im Falle der Aryldithiotaxane die Bildung des Zellbindungskonjugates durch direkte Verdrängung des Aryl-Thiols des Taxanes durch Sulfhydrylgruppen bewirkt, die früher in Antikörpermoleküle eingebracht waren. Konjugate, die 1 bis 10 Taxan-Arzneistoffe gebunden über eine Disulfid-Brücke enthalten, werden in einfacher Weise durch irgendein Verfahren hergestellt.

[0076] Spezieller wird eine Lösung des Dithiopyridyl-modifizierten Antikörpers in einer Konzentration von 1 mg/ml in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer bei pH 6,5, der 1 mM EDTA enthält, mit dem Thiol-enthaltenden Taxan behandelt (1,25 molare Äquivalente/Dithiopyridylgruppe). Die Freisetzung des Thiopyridins aus dem modifizierten Antikörper wird spektrophotometrisch bei 343 nm überwacht und ist in ungefähr 20 Stunden abgeschlossen. Das Antikörper-Taxankonjugat wird aufgereinigt und von nicht umgesetztem Arzneistoff und anderen Niedermolekulargewichtsmaterialien durch Gelfiltration durch eine Säule von Sephadex G-25 oder Sephacryl S300 befreit. Die Anzahl der Taxan-Komponenten, die pro Antikörpermolekül gebunden ist, kann durch Messen des Verhältnisses der Extinktion bei 230 nm und 275 nm bestimmt werden. Ein Durchschnitt von 1 bis 10 Taxanmolekülen/Antikörpermolekülen kann über Disulfid-Brücken durch dieses Verfahren gebunden werden.

[0077] Antikörper-Taxankonjugate mit nicht-spaltbaren Bindungen können ebenfalls hergestellt werden. Der Antikörper kann mit Vernetzungsmitteln wie beispielsweise Succinimidyl-4(maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (SMCC), Sulfo-SMCC, m-Maleimidobenzoyl-N-Hydroxysuccinimidester (MBS), Sulfo-MBS oder Succinimidyl-Todacetat wie in der Literatur beschrieben modifiziert werden, um 1 bis 10 reaktive Gruppen einzubringen. Siehe Yoshitake et al., 101 Euro. J. Biochem. 395-399 (1979); Hashida et al., J. Applied Biochem. 56-63 (1984); und Liu et al., 18 Biochem. 690-697 (1979). Der modifizierte Antikörper wird dann mit dem Thiol-enthaltenden Taxanderivat zur Erzeugung eines Konjugats umgesetzt. Das Konjugat kann durch Gelfiltration durch eine Sephadex G-25-Säule aufgereinigt werden.

[0078] Die modifizierten Antikörper oder Fragmente hiervon werden mit den Thiol-enthaltenden Taxanen (1,25 Molaräquivalent/Maleimidogruppe) behandelt. Die Gemische werden über Nacht bei ungefähr 4°C inkubiert. Die Antikörper-Taxankonjugate werden durch Gelfiltration durch eine Sephadex G-25-Säule aufgereinigt. Typischerweise werden durchschnittlich 1 bis 10 Taxane pro Antikörper gebunden.

[0079] Ein bevorzugtes Verfahren besteht darin, Antikörper oder Fragmente hiervon mit Succinimidyl-4-(maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (SMCC) zur Einbringung von Maleimidogruppen gefolgt von einer Umsetzung des modifizierten Antikörpers oder Fragmentes mit den Thiol-enthaltenden Taxanen einzubringen, um ein Thioether-gebundenes Konjugat zu ergeben. Wiederum können sich Konjugate mit 1 bis 10 Arzneistoffmolekülen pro Antikörpermolekül ergeben.

[0080] Die Zytotoxizität der Taxane und ihrer Antikörperkonjugate an nicht-adhärenente Zell-Linien wie beispielsweise Namalva und HL-60 können durch Rückextrapolierung von Zellproliferationskurven wie in Goldmacher et al., 135 J. Immunol. 3648-3651 (1985) beschrieben gemessen werden. Die Zytotoxizität dieser Verbindung an adhärenente Zell-Linien wie beispielsweise SKBR3 und A431 kann durch klonngene Assays bestimmt werden, wie in Goldmacher et al., 102 J. Cell Biol. 1312-1319 (1986) beschrieben ist.

[0081] Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls eine therapeutische Zusammensetzung bereit, die Folgendes umfasst:

- (A) eine wirksame Menge eines oder mehrerer Taxane, gebunden an ein Zellbindungsmittel, und
- (B) einen pharmazeutisch verträglichen Träger, Verdünnungsmittel oder Trägerstoff.

[0082] In ähnlicher Weise stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Abtöten ausgewählter Zellpopulationen bereit, das das In-Berührung-Bringen von Zielzellen oder Gewebe, das Zielzellen enthält, mit einer wirksamen Menge eines zytotoxischen Mittels umfasst, umfassend ein oder mehrere Taxane gebunden an ein Zellbindungsmittel.

[0083] Das zytotoxische Mittel wird wie oben beschrieben hergestellt.

[0084] Geeignete pharmazeutisch verträgliche Träger, Verdünnungsmittel und Trägerstoffe sind wohlbekannt und können durch den Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet bestimmt werden, wie es die klinische Situation erfordert.

[0085] Beispiele für geeignete Träger, Verdünnungsmittel und/oder Träger schließen Folgendes ein: (1) Dulbeccos Phosphat-gepufferte Salzlösung, pH ungefähr 7,4, die ungefähr 1 mg/ml bis 25 mg/ml humanes Serumalbumin enthält, (2) 0,9% Salzlösung (0,9% G/V NaCl), und (3), 5% (G/V) Dextrose; und kann ebenfalls ein Antioxidans enthalten wie beispielsweise Tryptamin und ein Stabilisierungsmittel wie beispielsweise Tween 20.

[0086] Das Verfahren zum Abtöten ausgewählter Zellpopulationen kann in vitro, in vivo oder ex vivo ausgeübt werden.

[0087] Beispiele für in vitro-Anwendungen schließen Behandlungen von autologem Knochenmark vor ihrer Transplantation in denselben Patienten ein, um erkrankte oder maligne Zellen abzutöten. Behandlungen von Knochenmark vor ihrer Transplantation, um kompetente T-Zellen abzutöten und eine Graft-Ver-sus-Host-Krankheit (GVHD) zu verhindern; Behandlungen von Zellkulturen, um alle Zellen abzutöten außer erwünschte Varianten, die das Zielantigen nicht exprimieren; oder um Varianten abzutöten, die unerwünschtes Antikörper exprimieren.

[0088] Die Bedingungen einer nicht-klinischen in vitro-Anwendung sind leicht von dem Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet zu bestimmen.

[0089] Beispiele für eine klinische ex vivo-Anwendung bestehen darin, Tumorzellen oder Lymphoidzellen aus Knochenmark vor einer autologen Transplantation in der Krebsbehandlung oder in der Behandlung einer Autoimmunkrankheit zu entfernen oder T-Zellen und andere Lymphoidzellen aus autologen oder allogenen Knochenmark oder Gewebe vor einer Transplantation zu entfernen, um eine GVHD zu vermeiden. Die Behandlung kann wie folgt durchgeführt werden. Knochenmark wird vom Patienten oder einem anderen Individuum gewonnen und danach in einem Medium inkubiert, das Serum enthält, dem das zytotoxische Mittel der Erfindung zugesetzt wurde, wobei sich die Konzentrationen von ungefähr 10 μ m bis 1 pM bewegen, für ungefähr 30 Minuten bis ungefähr 48 Stunden bei ungefähr 37°C. Die exakten Bedingungen der Konzentration und Zeit der Inkubation, das heißt die Dosis, sind leicht für den Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet zu bestimmen. Nach der Inkubation werden die Knochenmarkszellen mit Medium gewaschen, das Serum enthält und werden dem Patienten intravenös gemäß bekannter Verfahren wieder zurück verabreicht. Unter Umständen, unter denen der Patient eine andere Behandlung empfängt wie beispielsweise eine ablative Chemotherapie oder eine Ganzkörperbestrahlung zwischen dem Zeitpunkt der Gewinnung des Marks und der Reinfusion der behandelten Zellen werden die behandelten Markzellen in flüssigem Stickstoff gefroren unter Verwendung von medizinischer Standardausrüstung aufbewahrt.

[0090] Zur klinischen in vivo-Anwendung wird das zytotoxische Mittel der Erfindung als Lösung oder als lyophilisiertes Pulver verabreicht werden, das bezüglich einer Sterilität und auf Endotoxinkonzentrationen getestet ist. Beispiele für geeignete Vorschriften der Konjugatverabreichung sind wie folgt. Konjugate werden wöchentlich für 4 Wochen als intravenöser Bolus jede Woche verabreicht. Die Bolus-Dosen werden in 50 bis 100 ml normaler beziehungsweise physiologischer Salzlösung verabreicht, der 5 bis 10 ml humanes Serumalbumin zugesetzt werden kann. Die Dosierungen werden 10 μ g bis 2000 mg pro Verabreichung intravenös (im Bereich von 100 ng bis 20 mg/kg pro Tag) sein. Nach 4-wöchiger Behandlung kann der Patient eine Behandlung auf einer wöchentlichen Basis empfangen. Spezielle klinische Vorschriften bezüglich des Verabreichungsweges, der Trägerstoffe, Verdünnungsmittel, Dosierungen, Zeitpunkte etc. können vom Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet bestimmt werden, wie es die klinische Situation erfordert.

[0091] Beispiele von medizinischen Zuständen, die gemäß der in vivo oder ex vivo-Verfahren des Abtötens ausgewählter Zellpopulationen behandelt werden können, schließen eine Malignität irgendeines Typs ein, einschließlich beispielsweise Krebs der Lunge, Brust, Colon, Prostata, Nieren, Pankreas, Ovar und lymphatischen Organen; Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise systemischer Lupus, rheumatoide Arthritis und multiple

Sklerose. Transplantatabstoßungen wie beispielsweise Nierentransplantatabstoßung, Lebertransplantatabstoßung, Lungentransplantatabstoßung, Herztransplantatabstoßung und Knochenmarkstransplantationsabstoßung; Graft-Versus-Host-Krankheit; virale Infektionen wie beispielsweise CMV-Infektionen, HIV-Infektionen, AIDS etc.; und Parasiteninfektionen wie beispielsweise Giardiasis, Amoebiasis, Schistosomiasis und andere, wie sie vom Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet bestimmt werden.

Beispiele

[0092] Die Erfindung wird nunmehr unter Bezugnahme auf nicht einschränkende Beispiele beschrieben werden. Soweit nichts anderes angegeben ist, sind alle Prozentsätze, Verhältnisse, Teile etc. auf das Gewicht bezogen.

Beispiel 1

In vitro Zytotoxizität-Assays

[0093] Die Sulfid-, Disulfid- und Sulfidryl-enthaltenden Taxan-Arzneistoffe der Erfindung können bezüglich ihrer Fähigkeit evaluiert werden, eine Proliferation verschiedener humaner Tumorzell-Linien in vitro zu unterdrücken. Zwei adherente Zell-Linien, nämlich A431 (humanes epidermoides Karzinom) und SKBR3 (humaner Brusttumor) und die nicht adherente Zell-Linie, Namalwa (Burkitt Lymphom) werden zur Bestimmung der Zytotoxizität dieser Verbindungen verwendet. Die Zellen werden gegenüber den Verbindungen für 24 Stunden exponiert und die überlebenden Fraktionen der Zellen werden in direkten Assays gemessen (A431 und SKBR3 werden bezüglich einer Ausplattierungseffizienz untersucht (Goldmacher et al., 102 J. Cell Biol. 1312-1319 (1986) und Namalwa werden durch Wachstums-Rück-Extrapolation untersucht (Goldmacher et al, 135 J. Immunol. 3648-3651 (1985)). IC_{50} -Werte werden dann aus diesen Daten berechnet.

Beispiel 2

Konjugation an Antikörper

[0094] Konjugation von Thiol-enthaltendem Taxan an Antikörper über Disulfid-Brücken: Die Konjugation von Thiol-enthaltenden Taxanen an Antikörper oder Fragmenten hiervon über Disulfid-Brücken wird in zwei Schritten dargestellt. Im ersten Schritt werden Dithiopyridylgruppen in Antikörper oder Antikörperfragmente unter Verwendung von Succinimidylpyridyldithiopentanoat (SPP) wie von Carlsson et al. beschrieben eingebracht. Die Thiopyridylgruppen werden dann durch Reaktion mit dem Thiol-enthaltenden Taxan zur Erzeugung eines Konjugats verdrängt.

[0095] Erzeugung von Antikörper-SS-Taxankonjugaten. Antikörper Anti-B4, Anti-EGF-Rezeptor und N901 oder Fragmente hiervon werden mit SPDP oder SPP wie in der Literatur beschrieben modifiziert. Zwischen 1 bis 10 Dithiopyridylgruppen werden durchschnittlich pro Antikörpermolekül eingebracht.

[0096] Eine Lösung des Dithiopyridyl-modifizierten Antikörpers in einer Konzentration von 1 mg/ml in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,5, der 1 nM EDTA bei 25° enthält, wird mit einem Thiol-enthaltenden Taxan (1,25 Moläquivalent/Dithiopyridylgruppe). Die Freisetzung von Thiopyridin aus dem modifizierten Antikörper oder Fragment hiervon wird spektrophotometrisch bei 343 nm überwacht und ist in ungefähr 20 Stunden abgeschlossen. Das Antikörper-Taxankonjugat wird aufgereinigt und von nicht umgesetztem Arzneistoff und anderem Niedermolekulargewichtsmaterial durch Gelfiltration durch eine Säule von Sephadex G-25 befreit. Die Anzahl der Taxanmoleküle, die pro Antikörpermolekül gebunden ist, wird durch Messen des Verhältnisses zwischen der Extinktion bei 230 nm und 275 nm gemessen. Ein Durchschnitt von 1-10 Taxanmolekülen pro Antikörpermolekül kann über die Disulfid-Brücken durch dieses Verfahren gebunden werden.

[0097] Konjugation von Thiol-enthaltendem Taxan an Antikörper über eine nicht spaltbare Thioetherbindung: Die Konjugation eines Thiol-enthaltenden Taxans wird in zwei Schritten durchgeführt. Der Antikörper oder das Fragment hiervon wird zunächst mit Succinimidylmaleimidomethylcyclohexancarboxylat (SMCC) zur Einbringen von Maleimidogruppen umgesetzt. Der modifizierte Antikörper wird dann mit dem Thiol-enthaltenden Taxan unter Bildung von Thioetherbindungen umgesetzt.

[0098] Herstellung von Antikörper-Taxankonjugaten (nicht spaltbar). Antikörper, Anti-B4, Anti-EGF-Rezeptor und N901 oder Fragmente hiervon werden mit SMCC wie in der Literatur beschrieben modifiziert.

[0099] Die modifizierten Antikörper oder Antikörperfragmente werden mit Thiol-enthaltendem Taxan (1,25 molare Äquivalente/Maleimidogruppe) behandelt. Die Gemische werden über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Antikörper-Taxankonjugate werden wie oben beschrieben aufgereinigt. Typischerweise werden durchschnittlich 1-10 Taxanmoleküle pro Antikörpermolekül verbunden.

Spezielle Herstellung von Antikörper-Taxankonjugaten.

[0100] Murine monoklonale Antikörper, die gegen den humanen EGF-Rezeptor (EGFR) gerichtet sind, wurden entwickelt. Der EGF-Rezeptor wird bekanntermaßen in mehreren humanen Plattenepithelzellkarzinomen überexprimiert, wie beispielsweise Kopf und Nacken, Lunge und Brust. Vier unterschiedliche Antikörper, nämlich KS-61 (IgG2a), KS-77 (IgG1), KS-78 (Ig2a) und KS-62 (IgG2a) wurden an Taxane über Disulfid-Brücken gebunden. Der murine monoklonale Antikörper TAI, gerichtet gegen das Neu-Onkogen, überexprimiert in humanem Brust- und Ovarialkrebs, wurde zur Herstellung von TAI-Taxankonjugaten verwendet. Die Herstellung dieser speziellen Konjugate ist in den Beispielen 3 bis 7 beschrieben.

Beispiel 3

Herstellung von Anti-EGFR Antikörper KS-61-Taxankonjugat

[0101] Der Anti-EGFR Antikörper KS-61 wurde zunächst mit N-Succinimidyl-4-[2-pyridyldithio]pentanoat (SPP) zur Einführung von Dithiopyridylgruppen modifiziert. Der Antikörper (2,3 mg/ml) in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5, der NaCl (50 mM) und EDTA (2 mM) enthielt, wurde mit SPP (11 molare Äquivalente in Ethanol) behandelt. Die endgültige Ethanol-Konzentration betrug 1,4% (V/V). Nach 90 Minuten bei Umgebungstemperatur wurde Lysin (50 mM) zugesetzt, um die Entfernung von irgendwelchen nicht kovalent gebundenem SPP zu unterstützen. Man ließ die Reaktion für 2 Stunden fortlaufen und danach wurde durch Gelfiltration durch eine Sephadex G-25-Säule, die im obigen Puffer äquilibriert wurde, gereinigt. Antikörper enthaltende Fraktionen wurden gepoolt und der Grad der Modifikation wurde durch Behandlung einer Probe mit Dithiothreitol und durch Messen der Veränderung der Extinktion bei 343 nm (Freisetzung von Pyridin-2-thion mit $\epsilon_{343}=8,080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bestimmt. Die Gewinnung des Antikörpers betrug ungefähr 90% mit 5,0 Pyridyldithiopyridin pro Antikörpermolekül gebunden.

[0102] Der modifizierte Antikörper wurde mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5, verdünnt, der NaCl (50 mM) und EDTA (2 mM) in einer Endkonzentration von 1,28 mg/ml enthielt. Taxan-SH (1,7 Äq. pro Dithiopyridylgruppe) in Ethanol (10% V/V im endgültigen Reaktionsgemisch) wurde danach der modifizierten Antikörperlösung zugesetzt. Die Reaktion schritt bei Umgebungstemperatur unter Argon für 24 Stunden voran. Der Fortschritt der Reaktion wurde spektrophotometrisch bei 343 nm zur Freisetzung vom Pyridin-2-thion überwacht, verursacht durch Disulfid-Austausch zwischen den Taxan-SH und den Dithiopyridylgruppen am Antikörper. Die Zunahme der Extinktion bei 343 nm zeigte an, dass sich das Taxan an den Antikörper gebunden hatte. Das Reaktionsgemisch wurde dann auf eine Sephadex G-25 SF Gelfiltrationssäule aufgeladen, die mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, pH 6,5) äquilibriert war, die 20% Propylenglykol enthielt. Der Hauptpeak umfasste monomeres KS-61-Taxan. Die Konzentration des Konjugats wurde durch Messen der Extinktion bei 280 nm bestimmt. Das Konjugat wurde mit Tween 80 (0,05%) und humanem Serumalbumin (HSA, 1 mg/ml) formuliert.

Beispiel 4

Herstellung von Anti-EGFR Antikörper KS-77-Taxankonjugat

[0103] Der Anti-EGFR Antikörper KS-77 wurde mit N-Succinimidyl-4-[2-pyridyldithio]pentanoat (SPP) zur Einführung von Dithiopyridylgruppen modifiziert. Der Antikörper (5,0 mg/ml) in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5, wurde mit SPP (11 molare Äquivalente in Ethanol) behandelt. Die endgültige Ethanolkonzentration betrug 2% (V/V). Nach 90 Minuten bei Umgebungstemperatur wurde Lysin (50 mM) zugesetzt, um bei der Entfernung von jeglichem nicht kovalent gebundenem SPP zu helfen. Man ließ das Reaktionsgemisch für 2 Stunden inkubieren und danach wurde es durch Gelfiltration durch eine Sephadex G-25-Säule aufgereinigt, die im obigen Puffer äquilibriert wurde. Antikörper enthaltende Fraktionen wurden gepoolt und der Modifikationsgrad wurde durch Behandeln einer Probe mit Dithiothreitol und Messen der Veränderung in der Extinktion bei 343 nm (Freisetzung von 2-Mercaptopyridin mit $\epsilon_{343}=8,080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bestimmt. Die Wiedergewinnung des Antikörpers betrug ungefähr 90% mit 4,24 Pyridyldithiopyridin gebunden pro Antikörpermolekül.

[0104] Der modifizierte Antikörper wurde mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5, verdünnt, der NaCl (50

mM) und EDTA (2 mM) in einer Endkonzentration von 1,4 mg/ml enthielt. Taxan-SH (1,7 Äquivalente pro Dithiopyridylgruppe) in Ethanol (10% V/V im endgültigen Reaktionsgemisch) wurde der modifizierten Antikörperlösung zugesetzt. Die Reaktion schritt bei Umgebungstemperatur unter Argon für 24 Stunden voran. Eine Zunahme der Extinktion bei 343 nm wurde erwähnt, was darauf hinweist, dass Pyridin-2-thion freigesetzt wurde und sich das Taxan an den Antikörper gebunden hatte. Das Reaktionsgemisch wurde dann auf eine Sephacryl S300HR Gelfiltrationssäule aufgeladen, die mit die Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, pH 6,5) äquilibriert war. Der Hauptpeak umfasste monomeres KS-77-Taxan. Die Konzentration von Antikörper KS-77 wurde durch Messen der Extinktion bei 280 nm bestimmt. Das Konjugat wurde mit Tween 80 (0,06%) und HSA (1 mg/ml) formuliert.

Beispiel 5

Herstellung von Anti-EGFR Antikörper KS-62-Taxankonjugat

[0105] Das Anti-EGF Antikörper-Taxankonjugat (KS-62 Taxan) wurde in einer Art und Weise hergestellt, die derjenigen in Beispiel 4 beschriebenen Weise ähnlich ist. Der modifizierte Antikörper wurde mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5, verdünnt, der NaCl (50 mM) und EDTA (2 mM) in einer Endkonzentration von 2,5 mg/ml enthielt. Der Antikörper wurde mit SPP modifiziert, um 5,25 Pyridyldithiogruppen pro Antikörpermolekül einzubringen. Taxan-SH (1,7 Äq.) in Ethanol (10% V/V im endgültigen Reaktionsgemisch) wurden dann der modifizierten Antikörperlösung zugesetzt. Die Reaktion schritt bei Umgebungstemperatur unter Argon für 24 Stunden voran. Das Konjugat wurde durch Passage durch eine Sephacryl S300HR Gelfiltrationssäule aufgereinigt, die mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, pH 6,5) äquilibriert wurde. Der Hauptpeak umfasste monomeres KS-62 Taxan. Das Konjugat wurde in PBS formuliert, das Tween 80 (0,01 % G/V) und HSA (1 mg/ml) enthielt.

Beispiel 6

Herstellung von Anti-EGFR Antikörper KS-78-Taxankonjugat

[0106] Das Anti-EGFR Antikörper-Taxankonjugat KS-78-Taxan wurde in einer Art und Weise hergestellt, die derjenigen in Beispiel 4 beschriebenen ähnlich ist. Der modifizierte Antikörper wurde mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5, verdünnt, der NaCl (50 mM) und EDTA (2 mM) in einer Endkonzentration von 1,6 mg/ml enthielt. Der Antikörper wurde mit SPP modifiziert, um 4,5 Pyridyldithiogruppen pro Antikörpermolekül einzubringen. Taxan-SH (1,7 Äq.) in Ethanol (15% V/V im endgültigen Reaktionsgemisch) wurden dann der modifizierten Antikörperlösung zugesetzt. Die Reaktion schritt bei Umgebungstemperatur unter Argon für 24 Stunden voran. Die Lösung wurde dann in zwei Ansätze aufgespalten, nämlich Ansatz A und Ansatz B, die separat behandelt wurden. Ansatz A wurde gegen PBS, pH 6,5, dialysiert, das zwei 2 mM CHAPS (3-[(Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat) und 20% (V/V) Propylenglykol enthielt. Der pH der endgültigen Lösung betrug 6,0. Ansatz B wurde in PBS, pH 6,5, dialysiert, das 20% (V/V) Propylenglykol enthielt. Nach den Dialysen wurde HSA (1 mg/ml) beiden Ansätzen zugesetzt. Charge B beziehungsweise Ansatz B wurde weiter mit Tween 80 (0,05%, G/V) behandelt.

Beispiel 7

Herstellung von TA 1-Taxankonjugat

[0107] Der murine monoklonale Antikörper TA1, der an das Neu-Onkogen bindet, das auf Brust- und Ovarialtumoren exprimiert wird, wurde in der Herstellung von Taxankonjugaten verwendet. TA 1 (3,2 mg/ml) in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5, der NaCl (50 mM) und EDTA (2 mM) enthielt wurde mit SPP (8,0 molare Äquivalente in Ethanol) behandelt.

[0108] Die endgültige Ethanolkonzentration betrug 5% (V/V). Nach 90 Minuten bei Umgebungstemperatur wurde Lysin (50 mM) zugesetzt, um bei der Entfernung jeglich nicht kovalent gebundenen SPPs zu helfen. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 Stunden inkubiert und danach durch eine Sephadex G-25-Säule filtriert, die im obigen Puffer äquilibriert wurde. Antikörper-enthaltende Fraktionen wurden gepoolt und der Modifikationsgrad wurde durch Behandeln einer Probe mit Dithiothreitol und durch Messen der Veränderung der Extinktion bei 343 nm (Freisetzung von Pyridin-2-thion mit $\epsilon_{343}=8,080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bestimmt. Die Gewinnung des Antikörpers betrug ungefähr 90%, wobei 4,9 Pyridyldithiogruppen pro Antikörpermolekül gebunden wurden.

[0109] Der modifizierte Antikörper wurde mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5, verdünnt, der NaCl (50

mM) und EDTA (2 mM) in einer Endkonzentration von 1,0 mg/ml enthielt. Taxan-SH (1,7 Äq. pro Pyridyldithio-gruppe, die eingebaut wurde) in Ethanol (10% V/V im endgültigen Reaktionsgemisch) wurden danach der modifizierten Antikörperlösung zugesetzt. Die Reaktion schritt bei Umgebungstemperatur unter Argon für 24 Stunden voran. Die Freisetzung vom Pyridin-2-thion (überwacht bei 343 nm) zeigte, dass der Disulfid-Austausch zwischen dem Taxan-SH und dem Pyridyldithinsubstituenten am Antikörper vollständig war. Ein Anteil des Reaktionsgemisches (4,0 mg) wurde dann auf eine Sephacryl S300HR Gelfiltrationssäule aufgeladen, die mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, pH 6,5) äquilibriert war (PBS, pH 6,5). Der Hauptpeak umfasste monomeres TA1-Taxan. Das verbleibende Konjugat wurde zu 0,5 mg/ml verdünnt und in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5, der NaCl (50 mM), EDTA (2 mM) und 20% Propylenglykol enthielt, dialysiert. Die Konzentration von Antikörper TA1 wurde in beiden Spezies durch Messen der Extinktion bei 280 nm bestimmt. Die Konjugate wurde in PBS formuliert, das Tween 80 (0,05%) und HSA (1 mg/ml) enthielt.

Beispiel 8

Weitere Verfahren zur Verbindung von Taxanen

Säurelabile Linker

[0110] Taxane können mit N-geschützten Aminosäuren verestert werden, wie beispielsweise N-t-boc-L-Alanin in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid und Dimethylaminopyridin (DMAP) durch Standardverfahren, die in der chemischen Literatur beschrieben sind. Die Spaltung der t-boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure ergibt einen Taxan-Ester, der eine terminale Aminogruppe enthält. Diese Aminogruppe, die ein Taxan enthält, kann an Antikörper oder Fragmente hiervon gebunden werden und an andere Zellbindungsmittel über einen säurelabilen Linker wie es kürzlich beschrieben wurde (Blättler et al., 24 Biochemistry, 1517-1524 (1985), U.S. Patente Nr. 4,542,225, 4,569,789 und 4,764,368).

Photolabile Linker

[0111] Das Aminogruppen enthaltende Taxanderivat, das oben beschrieben wurde, kann an Zellbindungsmittel über photolabile Linker wie kürzlich beschrieben gebunden werden (Senter et al., 42 Photochemistry and Photobiology, 231-237 (1985), U.S. Patent Nr. 4,625,014).

Peptidase-labile Linker

[0112] Das Aminogruppen-enthaltende Taxan, das oben beschrieben wurde, kann ebenfalls an Zellbindungsmittel über Peptid-Spacer-Linker gebunden werden. Es wurde kürzlich gezeigt, dass kurze Peptid-Spacer zwischen Arzneistoffen und makromolekularen Proteincarriern in Serum stabil sind, jedoch einfach durch intrazelluläre lysosomale Peptidasen hydrolysiert werden (Trouet et al., 79 Proc. Natl. Acad. Sci. 626-629 (1982)). Das Aminogruppen-enthaltende Taxan kann mit Peptiden wie beispielsweise Ala-Leu, Leu-ala-Leu oder einem Dimer von Ala-Leu unter Verwendung eines Kondensationsmittels wie beispielsweise 1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimid-HCl kondensiert, so dass sich ein Peptidderivat des Taxans ergab, das danach an Zellbindungsmittel gebunden werden kann.

Esterase-labile Linker

[0113] Taxane können durch Reaktion der Hydroxylgruppe mit Bernsteinsäureanhydrid verestert und danach an ein Zellbindungsmittel gebunden werden, um ein Konjugat zu erzeugen, das durch intrazelluläre Esterasen zur Freisetzung des freien Arzneistoffes gespalten werden kann (siehe beispielsweise: Awoud-Pirak et al., 38 Biochem. Pharmacol., 641-648 (1989), Laguzza et al., 32 J. Med. Chem., 549-555 (1989)).

Beispiel 9

In vivo Anti-Tumor Aktivität

[0114] Die Anti-Tumor-Wirkung des Anti-EGF Rezeptorantikörper-Taxankonjugats auf humane Plattenepithelkarzinom(A431) xenotransplantate in SCID-Mäusen wurde wie folgt etabliert. Die Anti-Tumor-Wirkung zweier unterschiedlicher Anti-humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor-Taxankonjugate (Anti-EGFR-Taxankonjugate), KS-61-Taxan und KS-77-Taxan wurde in einem humanen Tumor-Xenotransplantatmodell in SCID-Mäusen evaluiert.

[0115] 5 Wochen alte weibliche SCID-Mäuse (25 Tiere) wurden subkutan in die rechte Flanke mit A431 humanem Plattenepithelkarzinomzellen ($1,5 \times 10^6$ Zellen/Maus) in 0,1 ml serumfreien Medium inokuliert. Die Tumore wurden für 11 Tage bis zu einer durchschnittlichen Größe von $100,0 \text{ mm}^3$ (Bereich von $54\text{--}145 \text{ mm}^3$) gezüchtet. Die Tiere wurden dann zufallsbedingt in vier Gruppen eingeteilt (3-5 Tiere pro Gruppe), gemäß ihrer Tumorgöße. Die erste Gruppe empfing KS-61-Taxankonjugat (10 mg/kg, qd \times 5), das intravenös verabreicht wurde. Die zweite Gruppe empfing KS-77-Taxankonjugat (10 mg/kg, qd \times 5), das intravenös verabreicht wurde. Die dritte Gruppe empfing freies (nicht konjugiertes) Taxan (0,24 mg/kg, qd \times 5, intravenös) in derselben Dosis wie diejenige, die im Konjugat vorlag. Die vierte Gruppe, ein Kontrollgruppe von Tieren, empfing PBS unter Verwendung derselben Behandlungsvorschrift wie in die Gruppen 1 bis 3.

[0116] Die Größe der Tumore wurde zweimal wöchentlich gemessen und die Tumorumfänge wurden mit der folgenden Formel berechnet: % (Länge \times Breite \times Höhe). Das Gewicht der Tiere wurde ebenfalls zweimal pro Woche gemessen. Die Ergebnisse sind in den [Fig. 4](#) und [Fig. 5](#) dargestellt. Die Tumoren in der Kontrollgruppe der Mäuse wuchsen bis zu einer Größe von ungefähr 1000 mm^3 in 31 Tagen. Die Behandlung mit freiem Taxan zeigte keine therapeutische Wirkung und die Tumoren in dieser Gruppe wuchsen in im Wesentlichen derselben Geschwindigkeit wie in der Kontrollgruppe von Tieren, die PBS erhielt.

[0117] Im Gegensatz hierzu zeigten beide der Anti-EGFR-Taxankonjugate eine bemerkenswerte Anti-Tumor-Aktivität, die eine vollständige Hemmung des Tumorwachstums in allen behandelten Tieren für eine Zeitdauer des Experimentes – 34 Tage für das KS-61-Taxankonjugat und 27 Tage für das KS-77-Taxankonjugat zur Folge hatte. Die Daten zeigen ebenfalls, dass die zielgerichtete Abgabe des Taxans unter Verwendung eines Tumorspezifischen Antikörpers für die Anti-Tumor-Aktivität essentiell ist, weil eine äquivalente Dosis von nicht konjugiertem Taxan keine Anti-Tumor-Wirkung in diesem Modell zeigte. Bedeutenderweise waren die Dosen von Antikörper-Taxankonjugat, die verwendet wurden, gegenüber den Tieren nicht toxisch, wie es durch das Fehlen irgendeines Gewichtsverlustes demonstriert wird (siehe [Fig. 5](#)).

Beispiel 10

In vitro Zytotoxizität von Antikörper-Taxankonjugaten

[0118] Die Zytotoxizität von Anti-EGFR-Taxankonjugat, KS-78-Taxan wurde in einem klonogenen Assay unter Verwendung der EGF-Rezeptor-positiven humanen A431 Zell-Linie (ATCC CRL 1555) gemessen. N901-Taxankonjugat, ein ähnliches Konjugat, das mit dem monoklonalen Mausantikörper N901 gegen humanes CD56 hergestellt wurde, wurde als Spezifitäts-Kontrolle getestet, weil A431-Zellen sein Targetantigen, nämlich CD56, nicht exprimieren. Die Zytotoxizität des TA.1-Taxankonjugats, ein Konjugat, das mit dem monoklonalen Mausantikörper TA.1 gegen humanes Neu-Antigen hergestellt wurde, wurde mit der Antigen-positiven humanen Zell-Linie SK-BR-3 (ATCC HTB 30) und der Antigen negativen A431-Zell-Linie gemessen. Die Zellen wurden in unterschiedlichen Dichten in 6-Well-Gewebskulturplatten in DMEM-Medium ausplattiert, das mit 10% fötalem Kalbsserum ergänzt wurde. Immunkonjugate in verschiedenen Konzentrationen wurden zugesetzt und die Zellen wurden in einer angefeuchteten Atmosphäre bei 37°C in 6% CO_2 gehalten, bis Kolonien von ungefähr 20 Zellen oder mehr gebildet wurden (6 bis 10 Tage). Kontrollplatten enthielten kein Immunkonjugat. Die Zellen wurden dann mit Formaldehyd fixiert, mit Kristall violett angefärbt und unter einem Mikroskop mit geringer Vergrößerung gezählt. Die Ausplattierungseffizienz wurde danach aus der Kolonienanzahl bestimmt und die überlebenden Zellfraktionen wurden als das Verhältnis der Ausplattierungseffizienz der behandelten Probe und der Ausplattierungseffizienz der Kontrolle berechnet.

[0119] [Fig. 6](#) zeigt die Ergebnisse der Zytotoxizitätsbestimmung für die beiden Ansätze des KS-78-Taxankonjugats auf die Targetantigen-positive Zell-Linie A431. Konjugate von beiden Ansätzen zeigen eine ähnliche Toxizität für die Zielzellen; eine Behandlung für 6 Tage bei Konzentrationen von 10^{-8} M erreichten überlebende Fraktionen von weniger als 10^{-2} (weniger als 1 % der Zellen überleben). Ein Kontrollkonjugat, N901-Taxan, für das keine Antigene auf der Oberfläche von A431-Zellen vorliegen, zeigt keine Toxizität für die Zellen bei Konzentrationen von bis zu $3 \cdot 10^{-8}$ M. Unkonjugierter KS-78-Antikörper zeigt ebenfalls einen sehr geringen zytotoxischen Effekt. Diese Ergebnisse demonstrieren die Targetantigen-spezifische Zytotoxizität des KS-78-Taxankonjugats.

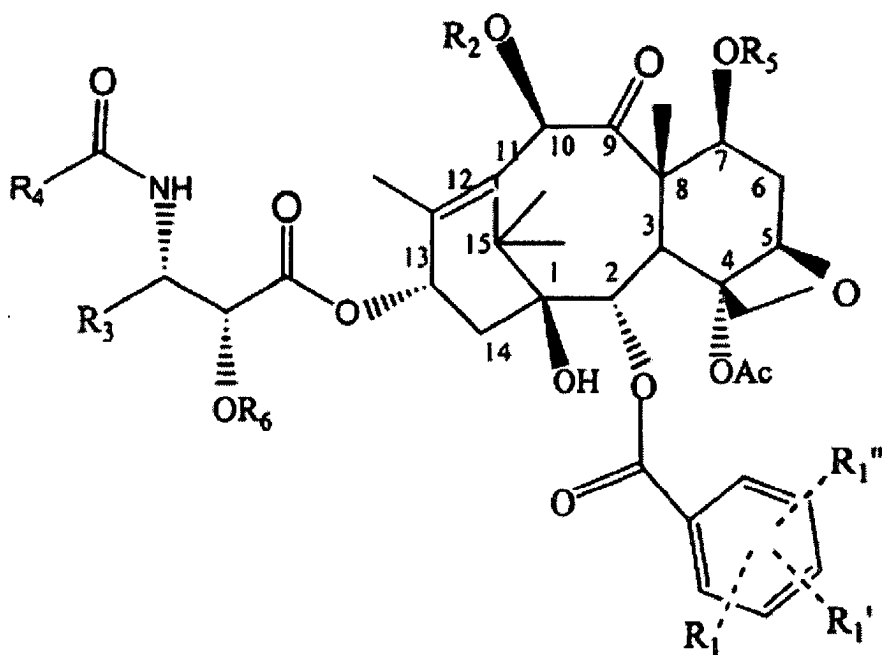
[0120] Die zytotoxische Potenz und Selektivität des TA.1-Taxankonjugates wurde mit der Targetantigen-positiven Zell-Linie SK-BR-3 und der Targetantigen-negativen Zell-Linie A431 untersucht. Die Ergebnisse sind in [Fig. 7](#) dargestellt. In einer Konjugatkonzentration von 10^{-9} M wurden mehr als 90% der Ziel-SK-BR-3-Zellen abgetötet (überlebende Fraktion von weniger als 0,1), während keine Toxizität gegenüber der Nicht-Target-A431-Zellen beobachtet wurde. Diese Ergebnisse demonstrieren das selektive Abtöten von Antigenpositi-

ven Zellen und das die zytotoxische Wirkung des Konjugats von der spezifischen Bindung durch ihren Antikörperbestandteil abhängig ist.

[0121] Während die Erfindung ausführlich und unter Bezugnahme auf spezielle Ausführungsformen hiervon beschrieben wurde, wird für den Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet klar sein, dass verschiedene Veränderungen und Modifikationen hierin durchgeführt werden können, ohne vom Geist und Umfang der Erfindung abzuweichen.

Patentansprüche

1. Cytotoxische Verbindung, dargestellt durch Formel (I):



(I)

wobei:

R₁ H, eine Elektronen ziehende Gruppe oder eine Elektronen schiebende Gruppe ist, und R₁' und R₁'' gleich oder unterschiedlich sind und H, eine Elektronen ziehende Gruppe oder eine Elektronen schiebende Gruppe sind;

R₂O ein heterocyclischer, linearer, verzweigter oder cyclischer Ester oder Ether mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder ein Carbamat der Formel -OCONR₁₀R₁₁ ist, wobei R₁₀ und R₁₁ gleich oder unterschiedlich sind und H, ein lineares, verzweigtes oder cyclisches Alkyl mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder Aryl sind;

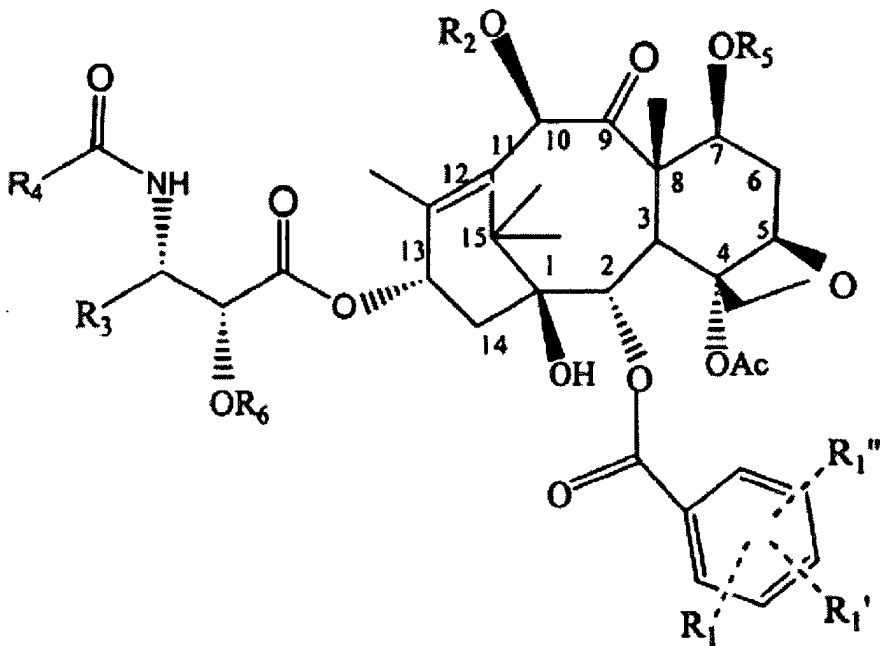
R₃ Aryl, ein lineares, verzweigtes oder cyclisches Alkyl mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen ist;

R₄ -OC(CH₃)₃ oder Phenyl ist;

R₅ eine Thiol oder Disulfid enthaltende Linkergruppe zum kovalenten Binden an ein Zellbindungsmittel über die Thiol- oder Disulfidreste ist; und

R₆ H ist oder R₆O ein heterocyclischer, linearer, verzweigter oder cyclischer Ester oder Ether mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder ein Carbamat der Formel -OCONR₁₀R₁₁ ist, wobei R₁₀ und R₁₁ gleich oder unterschiedlich sind und H, ein lineares, verzweigtes oder cyclisches Alkyl mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder Aryl sind.

2. Cytotoxische Verbindung dargestellt durch Formel (I):



(I)

wobei:

R_1 H, eine Elektronen ziehende Gruppe oder eine Elektronen schiebende Gruppe ist, und R_1' und R_1'' gleich oder unterschiedlich sind und H, eine Elektronen ziehende Gruppe oder eine Elektronen schiebende Gruppe sind;

R_2O ein heterocyclischer, linearer, verzweigter oder cyclischer Ester oder Ether mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder ein Carbamat der Formel $-OCONR_{10}R_{11}$ ist, wobei R_{10} und R_{11} gleich oder unterschiedlich sind und H, ein lineares, verzweigtes oder cyclisches Alkyl mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder Aryl sind;

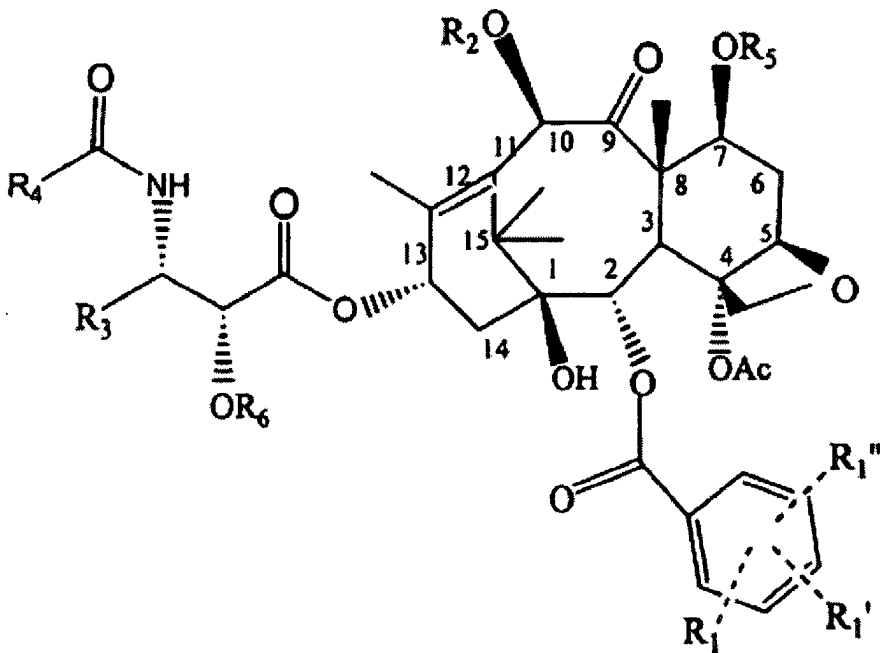
R_3 $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ist;

R_4 $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ oder Phenyl ist;

R_5 eine Thiol oder Disulfid enthaltende Linkergruppe zum kovalenten Binden an ein Zellbindungsmittel über die Thiol- oder Disulfidreste ist; und

R_6 H ist oder R_6O ein heterocyclischer, linearer, verzweigter oder cyclischer Ester oder Ether mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder ein Carbamat der Formel $-OCONR_{10}R_{11}$ ist, wobei R_{10} und R_{11} gleich oder unterschiedlich sind und H, ein lineares, verzweigtes oder cyclisches Alkyl mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder Aryl sind.

3. Cytotoxische Verbindung, dargestellt durch Formel (I):



(I)

wobei:

R_1 H, eine Elektronen ziehende Gruppe oder eine Elektronen schiebende Gruppe ist, und R_1' und R_1'' gleich oder unterschiedlich sind und H, eine Elektronen ziehende Gruppe oder eine Elektronen schiebende Gruppe sind;

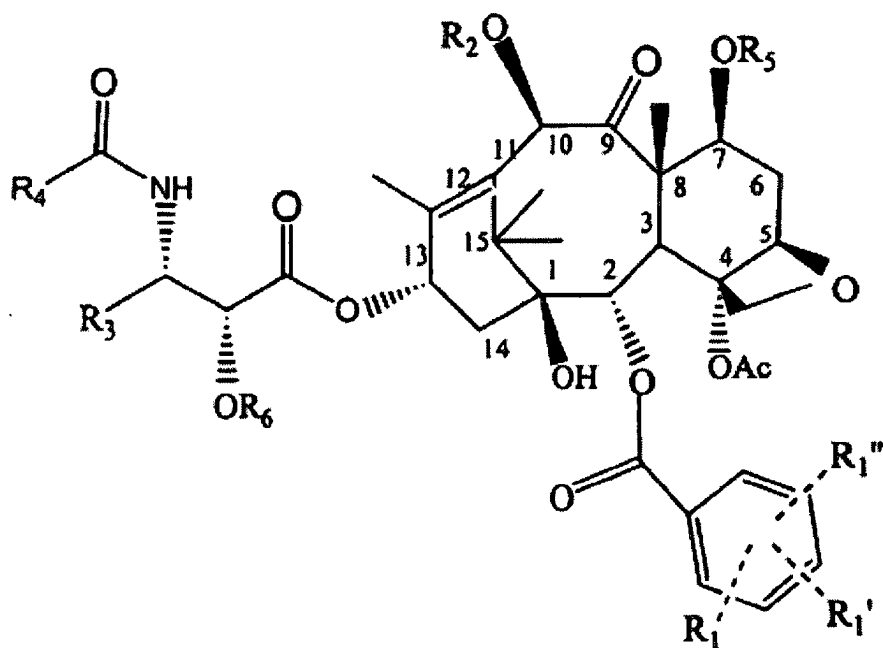
R_2 eine Thiol oder Disulfid enthaltende Linkergruppe zum kovalenten Binden an ein Zellbindungsmittel über die Thiol- oder Disulfidreste ist;

R_3 Aryl oder ein lineares, verzweigtes oder cyclisches Alkyl mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen ist;

R_4 $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ oder Phenyl ist;

R_5 H ist oder $R_5\text{O}$ ein heterocyclischer, linearer, verzweigter oder cyclischer Ester oder Ether mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder ein Carbamat der Formel $-\text{OCONR}_{10}\text{R}_{11}$ ist, wobei R_{10} und R_{11} gleich oder unterschiedlich sind und H, ein lineares, verzweigtes oder cyclisches Alkyl mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder Aryl sind; und R_6 H ist oder $R_6\text{O}$ ein heterocyclischer, linearer, verzweigter oder cyclischer Ester oder Ether mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder ein Carbamat der Formel $-\text{OCONR}_{10}\text{R}_{11}$ ist, wobei R_{10} und R_{11} gleich oder unterschiedlich sind und H, ein lineares, verzweigtes oder cyclisches Alkyl mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder Aryl sind.

4. Cytotoxische Verbindung, dargestellt durch Formel (I):



(I)

wobei:

R_1 H, eine Elektronen ziehende Gruppe oder eine Elektronen schiebende Gruppe ist, und R_1' und R_1'' gleich oder unterschiedlich sind und H, eine Elektronen ziehende Gruppe oder eine Elektronen schiebende Gruppe sind;

R_2 H ist oder R_2O ein heterocyclischer, linearer, verzweigter oder cyclischer Ester oder Ether mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder ein Carbamat der Formel $-OCONR_{10}R_{11}$ ist, wobei R_{10} und R_{11} gleich oder unterschiedlich sind und H, ein lineares, verzweigtes oder cyclisches Alkyl mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder Aryl sind;

R_3 Aryl oder ein lineares, verzweigtes oder cyclisches Alkyl mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen ist;

R_4 $-OC(CH_3)_3$ oder Phenyl ist;

R_5 H ist oder R_5O ein heterocyclischer, linearer, verzweigter oder cyclischer Ester oder Ether mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder ein Carbamat der Formel $-OCONR_{10}R_{11}$ ist, wobei R_{10} und R_{11} gleich oder unterschiedlich sind und H, ein lineares, verzweigtes oder cyclisches Alkyl mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder Aryl sind;

R_6 eine Thiol oder Disulfid enthaltende Linkergruppe zum kovalenten Binden an ein Zellbindungsmittel über die Thiol- oder Disulfidreste ist.

5. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei R_1 F, NO_2 , CN, Cl, CHF_2 , CF_3 , $-OR_9$ oder $-NR_7R_8$ ist, wobei:

R_7 und R_8 gleich oder unterschiedlich sind und lineares, verzweigtes oder cyclisches Alkyl mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder einfaches oder substituiertes Aryl mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen sind, und R_9 ein lineares, verzweigtes oder cyclisches Alkyl mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen ist.

6. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei R_1 $-OCH_3$ oder $-OCH_2CH_3$ ist.

7. Verbindung gemäß Anspruch 5, wobei R_7 und R_8 jeweils 1 bis 4 Kohlenstoffatome besitzen.

8. Verbindung gemäß Anspruch 5 oder 7, wobei R_7 und R_8 gleich sind.

9. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1, 2 oder 4 bis 8, wobei R_2 $-COCHC_2H_3$, $-COCH_2CH_2CH_3$, $-CONHCH_2CH_3$, $-CONHCH_2CH_2CH_3$, $-CO$ -Morpholino, $-CO$ -Piperadino, $-CO$ -Piperazino oder $-CO$ -N-Methylpiperazino ist.

10. Verbindung gemäß Anspruch 3, wobei R_5 $-COCH_2CH_3$, $-COCH_2CH_2CH_3$, $-CONHCH_2CH_3$, $-CONHCH_2CH_2CH_3$, $-CO$ -Morpholino, $-CO$ -Piperidino, $-CO$ -Piperazino oder $-CO$ -N-Methylpiperazino ist.

11. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Thiol oder Disulfid enthaltende Linkergruppe R_6 , R_5 oder R_2 ist:

$-(\text{CH}_2)_n\text{SZ}$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{SZ}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_3)\text{SZ}$,
 $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_3)\text{SZ}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{SZ}$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{SZ}$,
 $-\text{CONR}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{SZ}$, $-\text{CONR}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_3)\text{SZ}$,
 $-\text{CONR}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{SZ}$, $-\text{CO-Morpholino-XSZ}$, $-\text{CO-Piperidino-XSZ}$, $-\text{CO-Piperazino-XSZ}$ oder $-\text{CO-N-Methylpiperazino-XSZ}$, wobei

Z H oder SR ist, wobei R und R_{12} gleich oder unterschiedlich sind, und lineares Alkyl, verzweigtes Alkyl oder cyclisches Alkyl mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder einfaches oder substituiertes Aryl mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder heterocyclisch ist, und R_{12} zusätzlich H sein kann, X ein lineares Alkyl oder verzweigtes Alkyl mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen ist und n eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist.

12. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei R_1 in der Metaposition ist und R_1' und R_1'' H sind.

13. Verfahren zur Synthese der Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, umfassend das Einführen eines Disulfid oder Thiol enthaltenden Substituenten in die Verbindung der Formel I, der ein solcher Substituent fehlt, in einer der Positionen OR_2 , OR_5 oder OR_6 , die ein Hydroxyl ist, und Umwandeln in einen Thiol oder Disulfid enthaltenden Ether, Ester oder Carbamat.

14. Cytotoxisches Mittel, umfassend ein oder mehrere Taxane, die kovalent an ein Zellbindungsmittel über eine Linkergruppe gebunden sind, wobei mindestens eines der Taxane eine Verbindung, dargestellt durch Formel (I), wie in einem der Ansprüche 1 bis 12 definiert, ist.

15. Therapeutische Zusammensetzung, umfassend:

- (A) eine therapeutisch wirksame Menge des cytotoxischen Mittels gemäß Anspruch 14; und
- (B) einen pharmazeutisch annehmbaren Träger.

16. Cytotoxisches Mittel gemäß Anspruch 14, wobei das Zellbindungsmittel ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Antikörpern, Antikörperfragmenten, Interferonen, Lymphokinen, Hormonen, Vitaminen, Wachstumsfaktoren, Kolonie stimulierenden Faktoren und Transferrin.

17. Cytotoxisches Mittel gemäß Anspruch 14 oder 16, wobei das Zellbindungsmittel ein Antikörper ist.

18. Cytotoxisches Mittel gemäß einem der Ansprüche 14, 16 oder 17, wobei das Zellbindungsmittel ein monoklonaler Antikörper ist.

19. Cytotoxisches Mittel gemäß einem der Ansprüche 14 oder 16 bis 18, wobei das Zellbindungsmittel ein Antigen spezifisches Antikörperfragment ist.

20. Cytotoxisches Mittel gemäß einem der Ansprüche 14 oder 16 bis 19, wobei das Antikörperfragment sFV, Fab, Fab' oder $\text{F}(\text{ab}')_2$ ist.

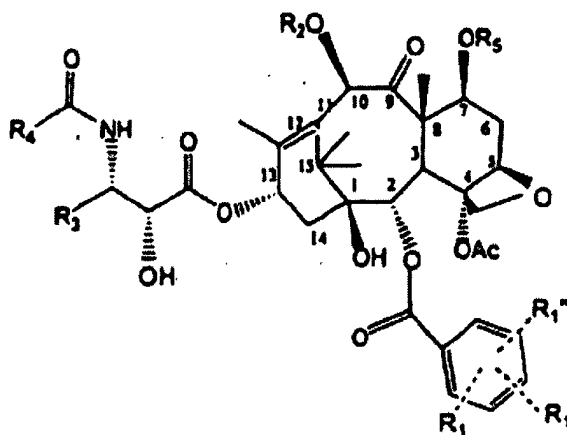
21. Cytotoxisches Mittel gemäß einem der Ansprüche 14 oder 16 bis 20, wobei das Zellbindungsmittel ein Wachstumsfaktor oder ein Kolonie stimulierender Faktor ist.

22. Cytotoxisches Mittel gemäß einem der Ansprüche 14 oder 16 bis 20 zur Verwendung in einem Verfahren zum Töten ausgewählter Zellpopulationen, umfassend das Inkontaktbringen von Zielzellen oder Gewebe, das Zielzellen enthält, mit einer wirksamen Menge des cytotoxischen Mittels.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

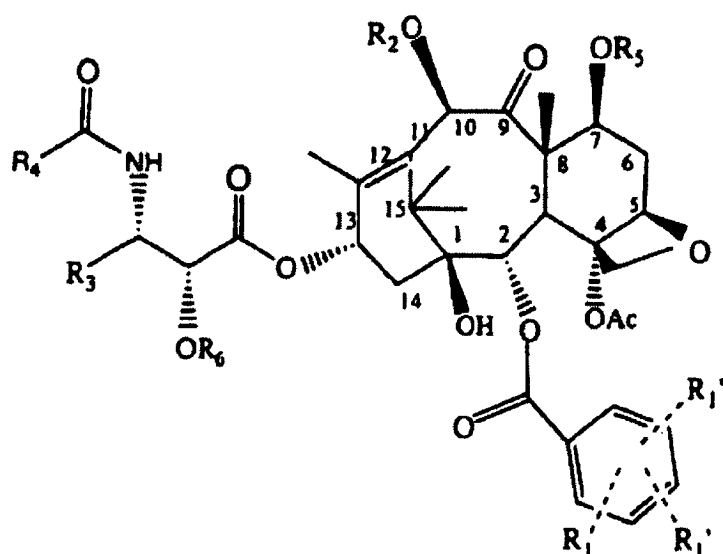
Anhängende Zeichnungen

FIG. 1



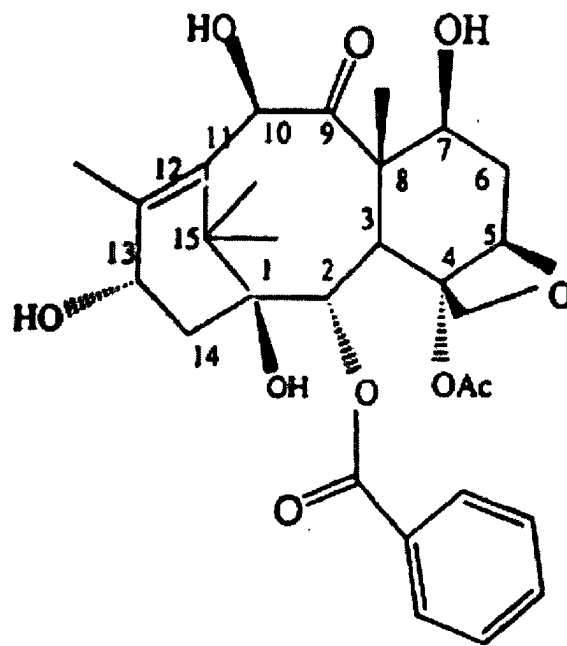
Verbindung	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
PACLITAXEL (TAXOL)	-H	-COCH ₃	-C ₆ H ₅	-C ₆ H ₅	H
DOCETAXAL (TAXOTERE)	-H	-H	-C ₆ H ₅	-OC(CH ₃) ₃	H
Wirksamere Taxane	-F -F -Cl -OCH ₃	-COCH ₂ CH ₃ -COCH ₂ CH ₃ -COCH ₂ CH ₃ -COCH ₃	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂ -CH=C(CH ₃) ₂ -CH ₂ CH(CH ₃) ₂ -CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-OC(CH ₃) ₃ -OC(CH ₃) ₃ -OC(CH ₃) ₃ -OC(CH ₃) ₃	H H H H

Figur 2

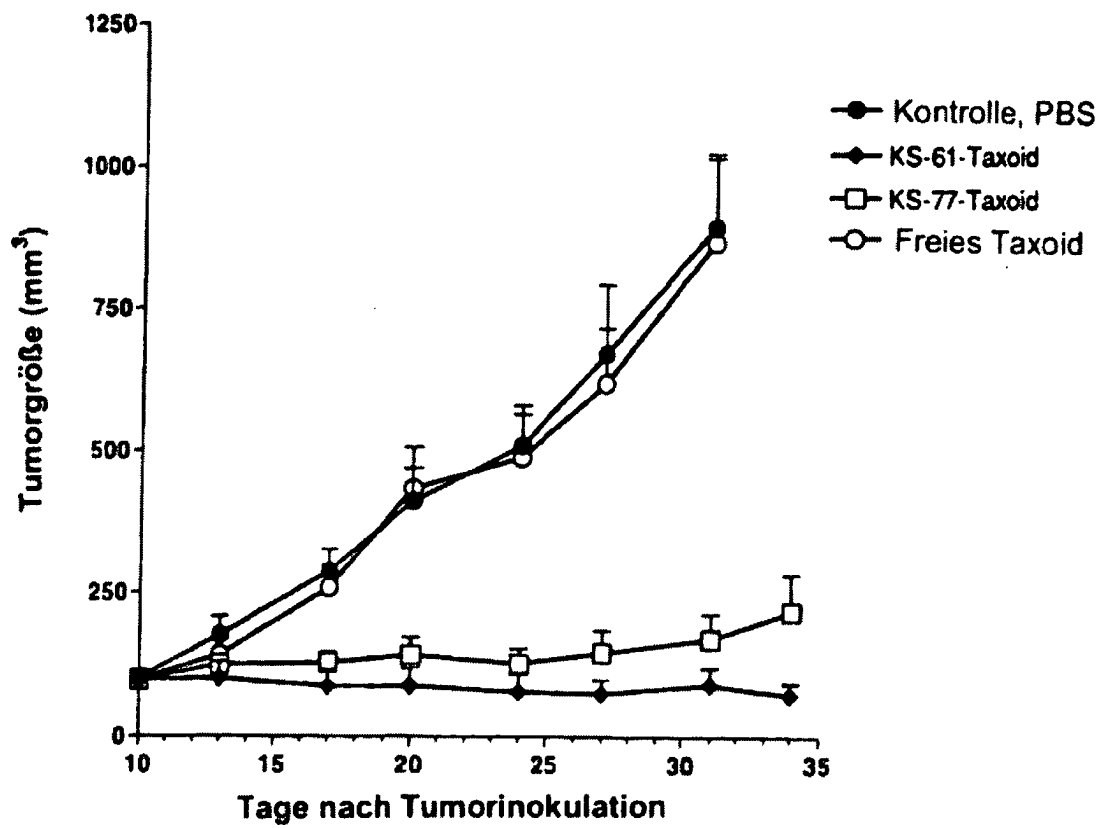


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
1	-F	-COCH ₂ CH ₃ , -CH ₂ CH ₃ , or -CONHCH ₂ CH ₃	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂ or -C ₆ H ₅	-OC(CH ₃) ₃ or -C ₆ H ₅	-CH ₂ CH ₂ SH or -COCH ₂ CH ₂ SH	-COCH ₂ CH ₃ , -CH ₂ CH ₃ , or CONHCH ₂ CH ₃
2	-F	-COCH ₂ CH ₃ , -CH ₂ CH ₃ , or -CONHCH ₂ CH ₃	-CH=C(CH ₃) ₂ or -C ₆ H ₅	-OC(CH ₃) ₃ or -C ₆ H ₅	-CH ₂ CH ₂ SH or -COCH ₂ CH ₂ SH	-COCH ₂ CH ₃ , -CH ₂ CH ₃ , or CONHCH ₂ CH ₃
3	-F	-COCH ₂ CH ₂ SH -CH ₂ CH ₂ SH	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂ or -C ₆ H ₅	-OC(CH ₃) ₃ or -C ₆ H ₅	-COCH ₂ CH ₃ , -CH ₂ CH ₃ , or -CONHCH ₂ CH ₃	-COCH ₂ CH ₃ , -CH ₂ CH ₃ , or CONHCH ₂ CH ₃
4	-F	-COCH ₂ CH ₃ , -CH ₂ CH ₃ , or -CONHCH ₂ CH ₃	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂ or -C ₆ H ₅	-OC(CH ₃) ₃ or -C ₆ H ₅	-COCH ₂ CH ₃ , -CH ₂ CH ₃ , or -CONHCH ₂ CH ₃	-CH ₂ CH ₂ SH or COCH ₂ CH ₂ SH

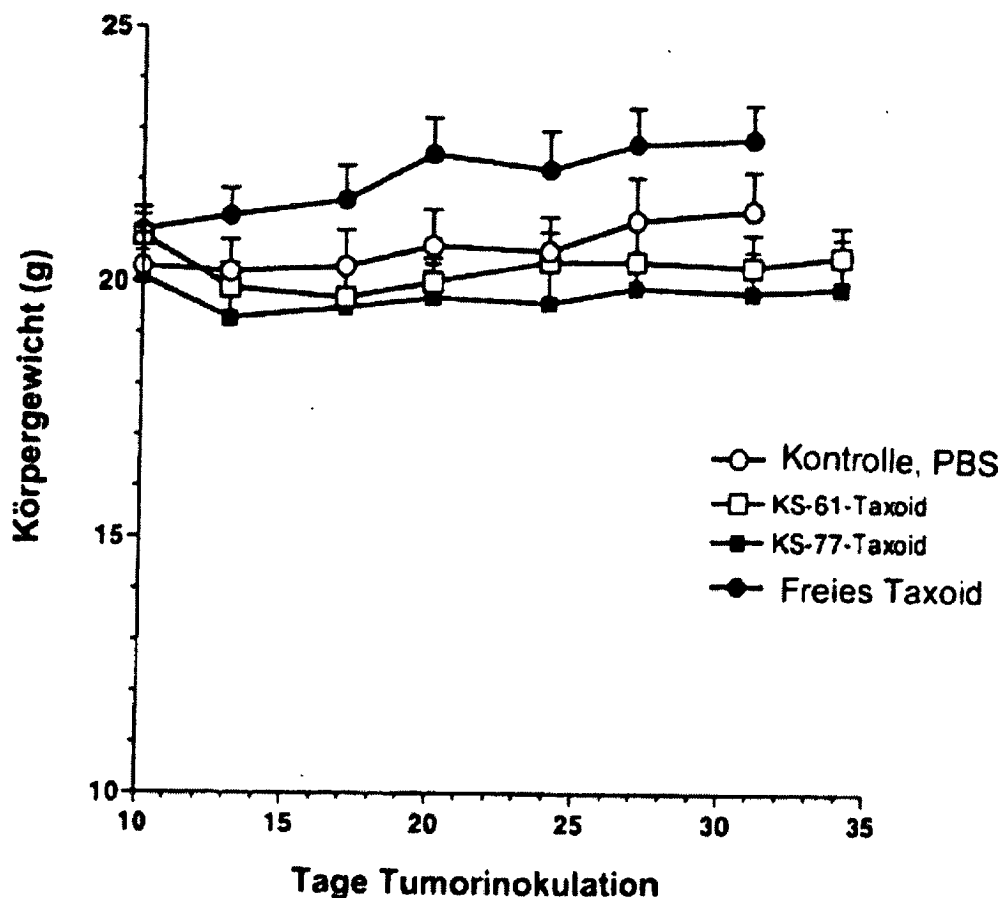
Figur 3



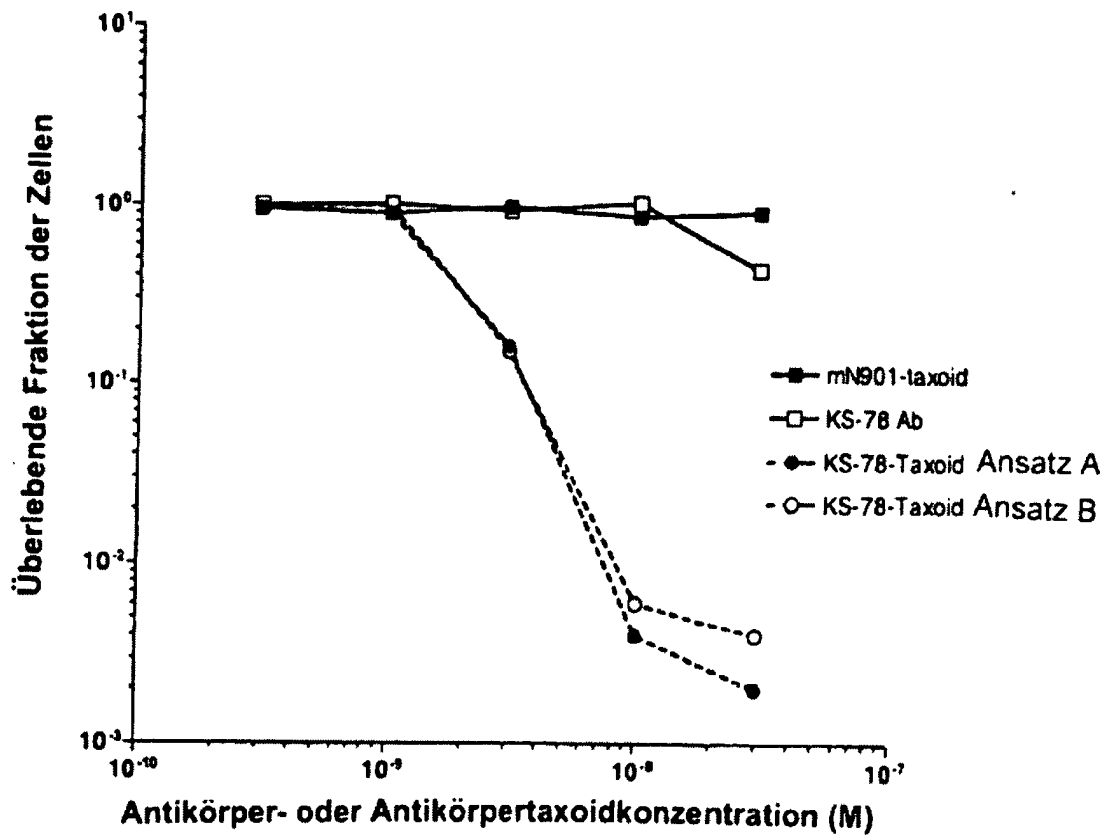
Figur 4



Figur 5



Figur 6



Figur 7

