



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 29 880 T2** 2005.09.22

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 047 452 B1**

(51) Int Cl.7: **A61K 47/48**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 29 880.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB98/03442**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 954 603.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/025383**

(86) PCT-Anmeldetag: **16.11.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **27.05.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.11.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **20.04.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.09.2005**

(30) Unionspriorität:
9724143 14.11.1997 GB

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

(73) Patentinhaber:
**Quadrant Drug Delivery Ltd., Ruddington,
Nottingham, GB**

(72) Erfinder:
**CHURCH, Jane, Nicola, Maidstone, GB; HARRIS,
Roy, Notts NG13 8EN, GB**

(74) Vertreter:
Samson & Partner, Patentanwälte, 80538 München

(54) Bezeichnung: **KONJUGATE ENTHALTEND ZWEI WIRKSTOFFE**

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

Gebiet der Erfindung

[0001] Diese Erfindung betrifft pharmazeutische Konjugate, insbesondere jene, die zwei wirksame Agentien umfassen, und deren Herstellung und Verwendung.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Pharmazeutische Konjugate und deren Herstellung werden in WO 98/17319 beschrieben. Insbesondere werden Konjugate von Albumin-Mikropartikeln, die mittels eines Spacers oder einer Abstandhalterstruktur an ein RGD-Peptid, wie Fibrinogen, gebunden sind, beschrieben. Ihre Herstellung hängt von dem Vorhandensein von funktionellen SH-Gruppen an dem Albumin ab. Es wird auch vorgeschlagen, dass Faktor VIII, z.B. als ein zweites wirksames Agens, für eine Verwendung bei der Behandlung von Hämophilie gebunden werden kann. Die Bindung kann chemisch oder durch Adsorption erfolgen.

Zusammenfassung der Erfindung

[0003] Die Erfindung beruht auf der Nützlichkeit von solchen Trägern, die weitere funktionelle Gruppen, wie NH_2 - und COOH -Gruppen, aufweisen, die auf Proteinen vorhanden sind, um eine Stelle für das Binden eines unterschiedlichen oder zusätzlichen zweiten wirksamen Agens bereitzustellen, und wird in Anspruch 1 definiert. Die Funktion von jedem wirksamen Agens kann nach dem Binden an den Träger bestehen bleiben. Die Erfindung ist von besonderem Wert in Verbindung mit aktiven Komponenten, die nicht leicht auf den Träger adsorbiert werden können.

[0004] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind jeweilige wirksame Agentien, die an eine Albumin-Mikrokapsel gebunden werden, Fibrinogen und ein anderes Glycoprotein, wie Faktor VIII. Solche Produkte können einen Nutzen haben, da ein wirksames Agens am Wirkort seine Wirkung entfaltet und das andere als ein Mittel, welches die zielgerichtete Ansteuerung des Wirkorts ermöglicht, wirkt ("targeting").

Kurze Beschreibung der Zeichnung

[0005] Eine Ausführungsform der Erfindung wird schematisch in der begleitenden Zeichnung veranschaulicht. Die Zeichnung zeigt vier Schritte, die jeweils sind: (i) eine Aktivierung von COOH -Gruppen auf einer Mikrokapsel, die ebenfalls SH-Gruppen auf ihrer Oberfläche aufweist, mit EDC; (ii) die Verwendung eines Dihydrazid-Reagens (in welchem die Hydrazid-Gruppen durch einen "Spacer" bzw. eine Abstandhalterstruktur voneinander getrennt sind), um freie Hydrazingruppen bereitzustellen, die mit der Mikrokapsel über den Spacer verknüpft sind; (iii) Umsetzung von Faktor VIII (FVIII) mit den freien Hydrazidgruppen, um gebundenen Faktor VIII zu erhalten; und (iv) das Binden von Fibrinogen (Fb) unter Verwendung der nicht-umgesetzten SH-Gruppen. Schritt (iv) kann ausgeführt werden, wie in WO 98/17319 beschrieben, oder mittels anderer Linker, wie nachfolgend beschrieben.

[0006] Das Produkt von Schritt (iv), welches Faktor VIII und Fibrinogen umfasst, ist bei der Behandlung von Hämophilie von Nutzen.

Beschreibung der Erfindung

[0007] Eines oder jedes der wirksamen Agentien kann ein Glycoprotein sein. Das erste Agens ist beispielsweise Faktor VIII. Andere geeignete Verbindungen umfassen Faktor IX, andere Blutfaktoren, einschließlich Blutgerinnungsfaktoren, Proteine der Gerinnungskaskade, thrombolytische Agentien, Antikörper und α -1-Antitrypsin.

[0008] Das zweite wirksame Agens ist beispielsweise Fibrinogen. Andere geeignete Verbindungen sind RGD-enthaltende Peptide und Fibrinogen- γ -Ketten.

[0009] Das wirksame Agens kann ein Peptid (womit ein jegliches Peptid, Polypeptid, Protein oder Konjugat davon gemeint ist) sein oder einen Peptidanteil umfassen, z.B. ein Glycoprotein. Solche Moleküle können an Mikrokapseln über einen Linker, welcher einen Spacer bzw. eine Abstandhalterstruktur umfasst, gebunden werden. Spezieller setzt die Erfindung die Tatsache ein, dass ein Träger für ein Protein, wie humanes Serumalbumin (HSA), freie Carboxyl-, Amino- und Thiolgruppen, mit welchen eine bifunktionelle Verbindung reagie-

ren kann, aufweist. Die bifunktionelle Verbindung weist vorzugsweise eine Gruppe auf, die selektiv mit der wirksamen Komponente, die konjugiert werden soll, reagieren kann.

[0010] Um Aktivität zu bewahren, können die jeweiligen Spacer von definierter und/oder unterschiedlicher Länge sein. Geeignete Spacerlängen sind 10 bis 600 nm, z.B. 20 bis 400 nm.

[0011] Der Spacer kann abhängig von den Erfordernissen der Anwendung durch Enzyme spaltbare Peptide, säure- oder alkalilabile Bindungen umfassen und von variabler Länge sein. Die Länge des Spacers kann ein anderer wichtiger Aspekt dieser Erfindung sein, da diese die Fähigkeit des Konjugats, Rezeptoren zielgerichtet anzusteuern, wie z.B. Fibrinogen zielgerichtet zu GPIIb/IIIa zu leiten, bestimmen kann.

[0012] Aufgrund der Erfindung kann eine kontrollierbare Vernetzung erzielt werden aufgrund der Spezifität von einer der Verknüpfungsgruppen für die funktionelle Gruppe, die auf Trägern, wie HSA, zur Verfügung steht. Eine kontrollierbare Vernetzung ist ein wichtiger Aspekt der Erfindung, da diese einen direkten Einfluss auf die Aktivität des angehefteten Moleküls haben kann.

[0013] Diese Erfindung stellt unter anderem reine, robuste, aus therapeutischer Sicht annehmbare Plättchen-Ersatzstoffe bereit. Reinheit kann in Abwesenheit von chemischen Vernetzungsmitteln und/oder grenzflächenaktiven Substanzen realisiert werden. Sie sind für eine Verwendung bei der Behandlung von Thrombozytopenie geeignet.

[0014] Es ist ein zusätzliches Merkmal der Erfindung, dass, da Fibrinogen als ein Mittel, welches die zielgerichtete Ansteuerung eines Wirkorts ermöglicht, wirkt, Produkte der Erfindung in nützlicher Weise andere gebundene wirksame Agentien aufweisen können. Solche Agentien werden in Hinblick auf den Wirkort, üblicherweise eine Wunde oder ein anderer Blutungsort, und auf die Natur des Problems, das angesprochen wird, ausgewählt.

[0015] Indem eine Kombination von z.B. Fibrinogen und Faktor VIII bereitgestellt wird, können die Produkte der Erfindung bei der Behandlung von Hämophilie nützlich sein. Zusätzlich oder als Alternative zu der Verwendung eines thrombolytischen Arzneimittels, wie Urokinase, können Blutgerinnsel durch die Anwendung von Ultraschall behandelt werden. Für diesen Zweck sind Luft enthaltende Mikrokapseln als Träger besonders geeignet.

[0016] Der Träger, der im Rahmen der Erfindung verwendet wird, wird vorzugsweise durch Sprühtrocknung unter Bedingungen, die eine gute Kontrolle der Teilchengröße und -größenverteilung ermöglichen, hergestellt. Beispielweise beträgt die bevorzugte Größe bis zu 6 µm, z. B. 1 bis 4 µm, damit die Teilchen durch Kapillaren hindurchtreten können.

[0017] Geeignete Materialien und Vorgehensweisen und auch Verfahren zum Stabilisieren der Mikropartikel durch Wärme oder durch chemische Vernetzung werden vollständig in WO-A-9218164, WO-A-9615814 und WO-A-9618388 beschrieben. Wie in der letztgenannten Veröffentlichung erläutert, beeinflussen die Bedingungen, die beschrieben werden, funktionelle Gruppen, wie die Thiolgruppen in Albumin, nicht, die dadurch für eine Reaktion mit biologischen Molekülen weiterhin zur Verfügung stehen.

[0018] Die im Rahmen dieser Erfindung verwendeten Mikropartikel können die physikalischen Eigenschaften aufweisen, die in den beiden oben angegebenen Veröffentlichungen beschrieben werden, indem sie z.B. elastisch und kugelförmig sind und Luft enthalten. Um unlösliche, vernetzte Mikrokapseln zu erhalten, kann das sprühtrocknete Produkt mit einem chemischen Vernetzungsmittel umgesetzt werden. Es werden jedoch Wärme und γ -Bestrahlung bevorzugt und können die trockenen Pulverprodukte auch sterilisieren.

[0019] Es wird üblicherweise ein unterschiedliches bifunktionelles Reagens eingesetzt werden, um den Träger mit jedem wirksamen Agens zu verknüpfen. Jede bifunktionelle Verbindung (nennen wir sie Y^1 - Y^2), die im Rahmen der Erfindung verwendet wird, kann ihrerseits durch Umsetzung von einfacheren Verbindungen Y^1 - Y^3 - Y^4 und Y^5 - Y^6 - Y^2 , wobei Y^1 spezifische Reaktivität gegenüber einer funktionellen Gruppe an dem Träger zeigt, Y^4 und Y^5 miteinander reagieren, so dass Y^3 und Y^6 zusammen der Spacer sind, und Y^2 die mit dem Agens reagierende Gruppe ist. Beispielsweise weist Y^1 eine Reaktivität gegenüber Thiolgruppen auf, insbesondere wenn funktionelle NH_2 - oder $COOH$ -Gruppen verwendet worden sind oder verwendet werden sollen, um ein wirksames Agens zu binden. Wie vollständiger in WO 98/17319 beschrieben, kann Y^1 I sein und/oder ist Y^4 $COOH$, wie in ICH_2COOH . Ein solcher Linker weist eine freie Carbonsäure auf, die, z.B. durch Verwendung von 1-Ethyl-3,3-dimethylaminopropylcarbodiimid (EDC), aktiviert und an die Amingruppen an einem Pep-

tid gebunden werden kann. Das Protein plus Linker wird dann mit HSA-Mikrokapseln, die freie Thiolgruppen enthalten, inkubiert.

[0020] Fibrinogen kann unter Verwendung eines herkömmlichen bifunktionellen Reagens, wie eines Polyaldehyds, gebunden werden. Glycolaldehyd ist bevorzugt. Ein anderes Beispiel für einen Spacer ist Sulfosuccinimidyl-4-(iodoacetyl)aminobenzoat (welches wasserlöslich ist) .

[0021] Ein anderer Linker, der verwendet werden kann, ist ein NHS-Ester. Ein NHS-Ester kann durch die Reaktion zwischen einer Carbonsäure und N-Hydroxysuccinimid in Gegenwart eines Carbodiimids gebildet werden. Die Bildung des aktiven Esters muss in einer nicht-wässrigen Umgebung ausgeführt werden, um eine Hydrolyse des Produkts zu verhindern. Das Carbodiimid der Wahl ist dementsprechend das in Wasser unlösliche Dicyclohexylcarbodiimid (DCC).

[0022] Die Umsetzung des aktiven Esters mit einem primären oder sekundären Amin führt zu der Bildung einer stabilen Amidbindung. Die hauptsächliche Zielfunktionalität für die Anheftung des Esters an Proteine sind der α -Aminoterminus und die ϵ -Aminogruppen von Lysin.

[0023] Die Löslichkeit von NHS-Estern reflektiert die Bedingungen, unter denen die Verbindungen synthetisiert werden, da sie in wässrigen Medien gänzlich unlöslich sind. Es ist oftmals notwendig, den aktiven Ester in einem Lösemittel zu lösen, bevor er zu der Amin-enthaltenden Verbindung hinzusetzt wird. Dies wirft Schwierigkeiten auf, wenn NHS-Ester zu Proteinen, die keine hohen Konzentrationen von Lösemitteln tolerieren, hinzugesetzt werden. In diesen Fällen kann N-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS), eine relativ wasserlösliche Alternative zu NHS, verwendet werden, um den aktiven Ester zu erzeugen. Sulfo-NHS-Ester sind in einer wässrigen Umgebung relativ stabil und hydrolysieren viel langsamer als NHS-Ester.

[0024] Ferner können Hydrazid-enthaltende Reagenzien als Vernetzungsmittel verwendet werden und werden zielgerichtet Carbonylgruppen an Molekülen ansteuern. Aldehyd-enthaltende Verbindungen werden spontan mit einem Hydrazid reagieren, wodurch eine Hydrazon-Bindung erzeugt wird. Wenn die Verbindung oder das Protein, die mit dem Hydrazon-Linker verknüpft werden sollen, keinerlei Aldehydgruppen aufweist, können diese erzeugt werden. Kohlenhydrat-Moleküle bieten die ideale Lösung und können in Aldehyde über eine milde Periodat-Oxidation von jeglichen cis-Hydroxylgruppen umgewandelt werden. Carbonsäuregruppen können ebenfalls mit einer Hydrazidverbindung umgesetzt werden, aber die Reaktion erfordert eine vorab erfolgende Aktivierung der Carbonsäure durch EDC. Proteine enthalten eine große Vielzahl von Carbonsäuregruppen und die jeweiligen Aminosäurekomponenten, die an dieser Art von Reaktion teilnehmen würden, sind die Seitenketten von Asparagin- und Glutaminsäureresten.

[0025] Eine andere Art von Linker, typischerweise eine heterobifunktionelle Verbindung, ist ein Maleimid. Maleimide sind das Produkt einer Reaktion zwischen Maleinsäureanhydrid und entweder Ammoniak oder einer primären Aminverbindung. Die Doppelbindung von Maleimiden ist in der Lage, mit freien Sulfhydrylgruppen unter Bildung von stabilen Thioetherbindungen zu reagieren. Der optimale pH für diese Alkylierungsreaktion liegt zwischen pH 6,5 und 7,5.

[0026] Es kann bevorzugt sein, EDC nicht zu verwenden. Beispielsweise umfasst ein bevorzugter Linker die Kombination eines NHS-Esters (siehe oben), welcher mit einer Maleimidgruppe gekoppelt ist. Der NHS-Ester, der EDC ersetzen würde, ist so gestaltet, dass er ohne die Notwendigkeit einer jeglichen Aktivierung mit freien Amingruppen reagiert, wodurch stabile Amidbindungen erzeugt werden. Dies bindet beispielsweise Fibrinogen kovalent an den Spacer. Die Maleimidgruppe, die gegenüber freien Thiolen hochgradig reaktiv ist, reagiert spezifisch mit dem Cys34-Rest an den Mikrokapseln, wodurch eine Thioetherbindung erzeugt wird.

[0027] Der m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester (MBS) ist ein kommerziell erhältliches heterobifunktionelles Vernetzungsmittel, das die Erfordernisse für die kovalente Bindung von Fibrinogen an HSA-Mikrokapseln in einer hochgradig kontrollierten Weise erfüllt. Das Vernetzungsmittel weist einen NHS-Ester auf, der von einer Maleimidgruppe durch Benzoesäure getrennt ist. Eine typische Vorgehensweise für dessen Verwendung umfasst die Reaktion von Fibrinogen mit MBS, wodurch das Protein als ein Maleimid-aktiviertes Zwischenprodukt erhalten wird.

[0028] Eine Reinigung, z.B. durch Ausfällung mittels PEG, kann ein jegliches nicht umgesetztes MBS entfernen, bevor das Protein-Zwischenprodukt mit den freien Thiolgruppen an HSA-Mikrokapseln umgesetzt wird. Aktuelle Analysentechniken können dann verwendet werden, um die Aktivität des Endprodukts zu bestimmen.

[0029] Das Beladen mit Fibrinogen oder einem anderen wirksamen Agens kann bei Verwendung dieser Vernetzungsmethode variiert werden. Die Anzahl von freien Thiolen, die an den Mikrokapseln für eine Bindung zur Verfügung steht, kann unter Verwendung von 2-Iminothiolan (Trautsches Reagens) erhöht und kontrolliert werden. Eine jegliche Zunahme der Anzahl von freien Thiolen würde zu einer erhöhten Anzahl von gebildeten Thietherbindungen und dementsprechend einer erhöhten Menge von gebundenem Fibrinogen führen.

[0030] Die Hydrazid-Vernetzungsmethode kann für die Bindung einer jeglichen Gruppierung, die eine Kohlenhydrat-Funktionalität aufweist, an HSA-Mikrokapseln angewendet werden. Spezielle Beispiele umfassen die γ -Kette von Fibrinogen, GB1b und Faktor VIII.

[0031] Ein anderer bifunktionaler Linker, der verwendet werden kann, ist ein Dihydrazid-Reagens, z.B. mit der Formel $H_2N-NH-(CH_2)_n-NH-NH_2$, wobei n 4 bis 20 ist. In einem speziellen Beispiel ist n 6 (Adipinsäuredihydrazid oder AADH). Geeignete Bedingungen für eine Verwendung von diesem, um ein gebundenes Glycoprotein bereitzustellen, werden für die Fachleute auf diesem Gebiet offensichtlich sein. Diese Verbindung wird bereitwillig mit Aldehydgruppen reagieren und kann mit Carbonsäuren über die Verwendung eines Carbodiiimid-Aktivators gekoppelt werden.

[0032] Um die γ -Kette von Fibrinogen an HSA-Mikrokapseln zu binden, kann es erforderlich sein, dass die Kohlenhydrat-Cluster, die an der γ -Kette lokalisiert sind, einer milden Oxidation mit Natriumperodat unterworfen werden müssen. Dies spaltet die cis-Diol-Komponente des Zuckerrings, wodurch reaktive Aldehyde erhalten werden. Wenn die Kette mit AADH umgesetzt wird, kann die abschließende Konjugation des Zwischenprodukts mit HSA-Mikrokapseln die Kopplung des freien Endes des Hydrazid-Linkers an die Carbonsäuregruppen der Mikrokapseln umfassen. Dies kann EDC erfordern.

[0033] Ein alternatives Anheftungsverfahren unter Verwendung des Hydrazid-Konzepts involviert ein heterobifunktionelles Vernetzungsmittel. Ein solcher Linker weist an einem Ende die Hydrazid-Funktionalität auf und ist, beispielsweise von einer Pyridyldithio-Gruppe ($S-SC_5H_4N$), entweder durch eine einfache Kohlenstoffkettenlänge oder eine komplexere aromatische Struktur getrennt. Die Hydrazidgruppe reagiert mit Aldehydgruppen an beispielsweise der mit Periodat behandelten γ -Kette, wodurch eine kovalente Hydrazon-Bindung erzeugt wird. Die Pyridyldithiol-Gruppe nimmt an einer Disulfid-Austauschreaktion mit dem freien Thiol, Cys34, an HSA-Mikrokapseln teil.

[0034] Die Kohlenhydrat-Anhänge, die sowohl die beta- als auch gamma-Ketten innerhalb der Fibrinogenstruktur beitragen, bilden ideale Stellen für eine Vernetzung. Jede Oligosaccharidkette enthält elf Monosaccharid-Einheiten insgesamt, welche eine Kombination von N-Acetylglucose-, Mannose-, Galactose- und N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)-Resten umfassen. Die Kohlenhydrate sind durch einen Asparaginrest an beide Fibrinogenketten gebunden.

[0035] Ein vernetzend wirkender Spacer, der auf der funktionellen Hydrazidgruppe basiert, ist für die kovalente Bindung von Agentien, wie Glycoproteinen, z.B. Fibrinogen oder Faktor VIII, an HSA-Mikrokapseln besonders geeignet. Dies kann durch die Kohlenhydrat-Gruppierung, d.h., potentiell ohne den Proteinabschnitt zu beeinflussen, erfolgen. Als ein erster Schritt ist eine Modifikation des terminalen Sialinsäurerests erforderlich. Eine selektive Periodatoxidation des in der Zuckerseitenkette vorhandenen Diols führt zu der Bildung eines aktiven Aldehyds. Die Natriumperodatkonzentration und die Reaktionstemperatur können kontrolliert werden, um zu bestimmen, ob allein Sialinsäurediole abgespalten werden oder ob die Oxidation nicht-selektiv abläuft. Eine weitere Inkubation mit einer funktionellen Hydrazidgruppe führt zu einer Hydrazonbildung. Eine Zugabe von Natriumcyanborhydrid bewirkt eine Reduktion und Stabilisierung der Hydrazonbindung ohne das Erfordernis für EDC.

[0036] 3-(2-Pyridyldithio)propionylhydrazid (PDPH) ist ein bevorzugtes Vernetzungsmittel dieser Art. Es kann sowohl an der Hydrazonbildung mit Fibrinogen als auch an einer freien Thiolreaktion mit HSA-Mikrokapseln teilnehmen. Die Disulfidbindung des Hydrazonderivatisierten Fibrinogen bricht und durchläuft einen freien Thiol-Austausch mit dem Cys-34-Rest an den HSA-Mikrokapseln unter Bildung einer zweiten Disulfidbindung. Dies bewirkt die Freisetzung von Pyridyl-2-dithion, dessen Anwesenheit durch Absorption bei 343 nm nachgewiesen werden kann.

[0037] Wie oben angegeben, können die Fibrinogen enthaltenden Produkte der Erfindung an dem Ort von Tumoren wirken. Sie können dementsprechend in der Tumorthherapie verwendet werden, z.B. durch Binden eines zytotoxischen Agens daran durch das besondere Verfahren dieser Erfindung oder durch die in WO-A-9618388 beschriebenen Methoden. Geeignete zytotoxische Agentien umfassen Methotrexat, Doxorubicin

bicin, Cisplatin und 5-Fluor-2'-desoxyuridin.

[0038] Das zielgerichtete Dirigieren von Arzneimitteln zu Tumorzellen kann erreicht werden, indem Produkte der Erfindung als Vehikel, die direkt mit den Zellen reagieren, verwendet werden oder indem sie an der Aggregation und Ablagerung von Fibrin an dem Ort einer Zellanheftung teilnehmen.

[0039] Produkte dieser Erfindung können mit zytotoxischen Agentien oder einer Kombination von zytotoxischen und das zielgerichtete Ansteuern eines Wirkorts vermittelnden ("targeting") Agentien beladen werden. Sie können dann verwendet werden, um die im Kreislauf disseminierten Tumorzellen zielgerichtet anzusteuern durch spezifische Wechselwirkungen mit den zellulären Glycoproteinrezeptoren (Suchen und Zerstören) oder durch Teilnahme an dem Plättchenaggregationsprozess an der Anheftungsstelle. In beiden Fällen wird das zytotoxische Arzneimittel am Ort der eindringenden Tumorzellen konzentriert.

[0040] Alternativ kann die Tumoraggregation im Kreislaufsystem oder sogar an der Anheftungsstelle gehemmt werden, indem die Tumorzelloberfläche mit Produkten der Erfindung überzogen wird und die Stellen/Mechanismen, die Plättchen aktivieren, blockiert werden. Dies würde es den natürlichen Abwehrmechanismen des Körpers dann erlauben, die Entfernung der Tumorzellen zu vereinfachen.

[0041] Produkte, die beispielsweise den GPIIb-Rezeptor (wechselwirkt mit dem von Willebrand-Faktor) oder Rezeptoren für Kollagen oder andere subendotheliale Matrixbestandteile enthalten, können ebenfalls abgegeben werden, um die Bindungsstellen für Tumorzellen potentiell durch Überziehen der subendothelialen Matrices zu blockieren. Das Produkt sollte nach wie vor eine Wechselwirkung mit Plättchen an dem Ort einer Wunde ermöglichen, sollte aber auch das Eindringen in Gefäßwände durch eine jegliche immobilisierte Tumorzelle begrenzen.

[0042] Ein bedeutender Vorteil der Erfindung ist, dass die Aktivität der wirksamen Agentien (oder eines anderen RGD-Peptids) substantiell bewahrt bleiben kann. Der Gehalt an aktivem Fibrinogen kann durch ELISA bestimmt werden; siehe WO 98/17319.

[0043] Ein Konjugat der Erfindung kann wenigstens 0,01%, vorzugsweise wenigstens 0,015%, mehr bevorzugt wenigstens 0,02% und am meisten bevorzugt wenigstens 0,025% aktives Glycoprotein umfassen. Die Fibrinogenmenge sollte nicht zu hoch sein, um eine Aggregation zu vermeiden, z.B. bis zu 1, 1,5, 2 oder 2,5%. Hinsichtlich des Fibrinogengehalts ist es wünschenswert, dass wenigstens 50%, vorzugsweise wenigstens 70%, mehr bevorzugt wenigstens 90% aktiv sein sollten. Dies kann bestimmt werden in Bezug auf den gesamten Fibrinogengehalt, der wiederum durch eine Methode, wie ELISA, gemessen werden kann. Das gesamte Fibrinogen kann auch durch radioaktive Markierung, z.B. mit ¹²⁵I, und Zählen durch herkömmliche Vorgehensweisen bestimmt werden.

[0044] Das Fibrinogen kann aus Blut gewonnen, transgen oder rekombinant, von voller Länge oder ein jegliches aktives Fragment davon sein. Fragmente davon werden unter anderem von Coller et al., J. Clin. Invest. 89:546-555 (1992) offenbart.

[0045] Für eine Verwendung als therapeutisches Agens kann ein Produkt der Erfindung verabreicht werden, wie es ist, oder gemischt mit einem jeglichen geeigneten Träger, der den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt ist. Die Menge des verabreichten Produkts wird weitgehend abhängig von der Schwere der Wunde oder des anderen Zustands oder Leidens, welcher bzw. welches behandelt werden muss, festgelegt. Eine typische Dosierung kann $1,5 \times 10^9$ Mikrokapseln pro kg Körpergewicht sein.

[0046] Die folgenden Beispiele veranschaulichen die Erfindung.

[0047] HSA-Mikrokapseln, die in den Beispielen verwendet wurden, wurden durch Sprühtrocknung hergestellt und wurden dann durch Erwärmen stabilisiert, wie in WO-A-9615814 beschrieben. Zwei funktionelle Gruppen an den HSA-Mikrokapseln wurden für eine kovalente Anheftung bestimmt, nämlich Amin- und freie Thiolgruppierungen. Es wurden für beide Proteine spezielle Vernetzungsmittel ausgewählt, damit sie diese unterschiedlichen Gruppen verwendeten.

[0048] Das in den Beispielen verwendete Fibrinogen war ein aus Blut gewonnenes, kommerziell erhältliches Produkt voller Länge (SNBTS), das zweifach virusinaktiviert worden war.

[0049] Alphanate[®] Factor VIII wurde von Grifols UK erhalten und stets verwendet. Aliquots von 1 internatio-

naler Einheit Faktor VIII/ml in destilliertem Wasser wurden bei -20°C aufbewahrt, bis sie benötigt wurden.

[0050] Faktor VIII wurde unter Verwendung von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und des homobifunktionellen Spacers Adipinsäuredihydrazid (AADH) gebunden. Die Aktivierung der Carboxylgruppen an dem Faktor VIII-Protein wird durch Umsetzen mit EDC vor der Zugabe von AADH vereinfacht. Die freie Hydrazidgruppierung an dem übrig bleibenden Ende des Vernetzungsmittels reagiert dann mit den Aminfunktionalitäten an den HSA-Mikrokapseln, wodurch ein Harnstoffderivat freigesetzt wird. Fibrinogen wurde unter Verwendung von MBS gebunden.

[0051] Der für die Analyse der Faktor VIII-Beladung und -Aktivität verwendete Assay ist der Quadrachest Coatest VIII: C/4-Assay-Kit. Der Assay nutzt die Cofaktor-Fähigkeiten von Faktor VIII aus.

[0052] Der Objektträger-Test-Assay zeichnet die Zeit auf, die das Endprodukt benötigt, um mit Thrombin unter Bildung von Aggregaten zu reagieren. Das Endprodukt (50 μl) wurde auf einen Mikroskopobjektträger gegeben und es wurde Thrombin (50 μl) hinzugesetzt. Die beiden wurden 2 s gerührt und die Zeit von dem Zeitpunkt an, wo Aggregate sich zu bilden beginnen, bis zu jenem, wo die Aggregation endet, wird aufgezeichnet.

[0053] In einem Wiederholungsexperiment wurde das Endprodukt unter Verwendung von 51 mg/ml Mannitol, 25 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, formuliert. Die Partikelzahlen der Proben wurden mittels des Coulter Multisizer erhalten und es wurde das Volumen von Formulierungsmittel, welches benötigt wird, um eine Probenkonzentration von 1500 Millionen Mikrokapseln pro ml zu erhalten, berechnet. Die Probe wurde bei 3500 Upm 2 min zentrifugiert und der Überstand vor der Resuspendierung in dem berechneten Volumen Formulierungspuffer abdekantiert.

Beispiel 1:

[0054] Aus einer 3 mg/ml-Stammlösung von MBS in DMF wurde ein Aliquot entnommen (8 μl , 24 μg , 72,5 nmol) und zu 20 mM Natriumphosphat, pH 7,5, (1867 μl) hinzugesetzt. Die Lösung wurde sorgfältig gemischt und Fibrinogen (125 μl einer 40 mg/ml-Lösung in destilliertem Wasser, 14,5 nmol) zugegeben, wodurch ein gesamtes Reaktionsvolumen von 2 ml erhalten wurde. Die Mischung wurde 30 min bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Rühren umgesetzt.

[0055] Mikrokapseln (100 mg, 1515 nmol) wurden in 1% Tween 80 versenkt und zweimal in destilliertem Wasser, einmal in Reaktionspuffer, 20 mM Natriumphosphat, pH 7,5, vor der Umsetzung gewaschen, um jegliche Exzipientien zu entfernen.

[0056] Die Fibrinogenlösung wurde dann zu den HSA-Mikrokapseln hinzugesetzt und weitere 30 min bei Raumtemperatur umgesetzt. Nachdem das Produkt zweimal in Reaktionspuffer gewaschen worden war, um einen jeglichen Überschuss von nicht-umgesetztem Fibrinogen zu entfernen, wurde der Überstand verworfen und 1 E FVIII (1E FVIII in destilliertem Wasser) hinzugesetzt. Das gesamte Reaktionsvolumen betrug 1 ml. Die HSA-Mikrokapseln wurden in 1% Tween 80 30 min versenkt und zweimal in destilliertem Wasser und einmal in 20 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,5, vor der Zugabe zu der jeweiligen Proteinprobe gewaschen.

[0057] Eine 0,1 mg/ml-Stammlösung von Adipinsäuredihydrazid (AADH) wurde in 20 mM Natriumphosphat, pH 7,5, hergestellt. Ein Aliquot (12 μl , 1,2 μg) wurde zu Puffer (988 μl) hinzugesetzt, wodurch ein Gesamtvolumen von 1 ml erhalten wurde. Dann wurde eine Einheit Faktor VIII hinzugesetzt.

[0058] Eine 0,02 mg/ml-EDC-Lösung in dem gleichen Puffer wurde durch Aliquotieren von 200 μl einer 1 mg/ml-Lösung in 10 ml Puffer hergestellt. EDC (41 μl , 0,82 ng, 5 Moläquivalente) wurde dann zu der Proteinlösung hinzugegeben und 4 h bei Raumtemperatur umgesetzt.

[0059] Proben, die derivatisierten FVIII enthielten, wurden 4 h in Gegenwart von Mikrokapseln und 30 min in Gegenwart von derivatisierten Fibrinogenproben unabhängig von der Reihenfolge der Umsetzung umgesetzt.

[0060] Nachdem die Reaktionszeit zwischen einem Protein und HSA-Mikrokapseln abgelaufen war, wurde die Probe vor der Zugabe des zweiten derivatisierten Proteins gewaschen. Wenn Fibrinogen zuerst reagieren gelassen wurde, wurden die Proben zweimal in Puffer gewaschen und der Überstand von der letzten Wäsche wurde vor der Zugabe von derivatisiertem FVIII abdekantiert. Wenn FVIII zuerst reagieren gelassen wurde, wurde ein einzelner Waschschriff verwendet.

[0061] Es wurden Kontrollen aufgenommen, die ein vernetztes Protein und Mikrokapseln enthielten. Eine Probe von Fibrinogen (5 mg) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (2 ml, 2,5 mg/ml Proteinkonzentration) wurde ebenfalls durch den Quadrachest Coatest-Assay getestet.

[0062] Aus diesen Experimenten erhaltene Ergebnisse sind in Tabelle 1 gezeigt. Die Konzentrationswerte sind nicht anhand der Kontrollproben korrigiert.

Tabelle 1

Probe	Objektträger- test/Sekunden	Formulierter Objektträger- test/ Sekunden	Konzentration/ μ Einheiten	Ausbeute/%
Kontrolle 1				
Fibrinogen-MBS + Mikrokapseln	1-3 1-4	2-15 3-8	(0,2331) (0,1351)	(23) (13)
Kontrolle 2				
FVIII/AADH/EDC + Mikrokapseln	N.B. N.B.	N.B. N.B.	0,2741 0,2589	27 26
Reaktion_1				
Fibrinogen-MBS zuerst	1-4 2-5	5-10 7-21	0,1718 0,0765	17 8
Reaktion 2				
FVIII/AADH/EDC zuerst	3-7 2-4	11-20 14-26	0,3311 0,3674	33 37
Nur Fibrinogen	N.B.	N.B.	0,1253	13

[0063] Die Objektträger-Test-Aktivität der Kontrolle 1 wurde mit den beiden Reaktionsproben verglichen. Es wurde festgestellt, dass die Zugabe und Umsetzung von derivatisiertem Faktor VIII vor der Zugabe von Fibrinogen zu einer Abnahme der Aktivität führte. Diese Abnahme kann auf eine verringerte Beladung mit Fibrinogen in Gegenwart von vernetztem FVIII zurückzuführen sein. Wenn jedoch derivatisiertes Fibrinogen zuerst mit den Mikrokapseln umgesetzt wurde, wurde verglichen mit der Kontrolle 1 keine signifikante Veränderung der Aktivität aufgezeichnet.

[0064] Die geringe prozentuale Ausbeute von FVIII, die in Reaktion 1 erhalten worden war, legt nahe, dass eine vorherige Reaktion von MBS-Fibrinogen mit Mikrokapseln die Beladung mit Faktor VIII zu behindern scheint. Dies könnte ein Ergebnis von übermäßig vorhandenem Fibrinogen, welches auf der Oberfläche der HSA-Mikrokapseln adsorbiert vorliegt, was die Vernetzungsstellen blockiert, sein.

[0065] Wenn die Reaktion 2 mit der Kontrolle 2 verglichen wird, ist die FVIII-Konzentration jedoch erhöht und dies kann auf die Verunreinigungen, wie Faktor VIII, Faktor IXa oder Faktor Xa, in dem Fibrinogen-Ausgangsmaterial zurückzuführen sein. Diese Verunreinigungen würden auch für die positive Aktivität, die bei der Fibrinogen-MBS-Kontrolle, in welcher kein FVIII vorhanden war, aufgezeichnet wurde, verantwortlich sein. Die Probe mit nur Fibrinogen lieferte unter Assaybedingungen ebenfalls ein positives Ergebnis, was das Vorhandensein von Verunreinigungen, die mit aus dem Assay erhaltenen Konzentrationswerten interferieren, bestätigt.

[0066] Die Ergebnisse zeigen, dass es vorzuziehen ist, derivatisierten FVIII unter Verwendung von AADH und EDC mit HSA-Mikrokapseln vor der Zugabe von derivatisiertem Fibrinogen umzusetzen, um ein Endprodukt zu erhalten, das hohe Aktivität von beiden Proteinen bewahrt.

Beispiel 2

[0067] Es wurde der in Beispiel 1 beschriebenen Methodik, bei welcher derivatisierter Faktor VIII vor der Zugabe von derivatisiertem Fibrinogen reagieren durfte, gefolgt. Es wurde eine Kontrolle mit aufgenommen, die nur rekombinantes Fibrinogen, welches mit MBS und Mikrokapseln umgesetzt wurde, enthielt. Es wurde auch eine Probe von rekombinantem Fibrinogen dem Assay unterzogen. Ergebnisse sind in Tabelle 2 gezeigt; sie sind nicht anhand der Kontrollwerte korrigiert.

Tabelle 2

Probe	Objektträger- test/Sekunden	Formulierter Objektträger test/Sekunde n	Konzentration/ μ Einheiten FVIII	Ausbeute/%
Nur Rfibrinogen	N.B.	N.B.	0,0354	4
Kontrolle Nur Rfibrinogen/MBS+ Mikrokapseln	3/4-8	16/17-24	0,1334	13
Reaktion FVIII/AADH/EDC zuerst + Rfibrinogen/MBS	5-9	21-34	0,3021	30

[0068] Rekombinantes Fibrinogen allein führte verglichen mit der SNBTS-Fibrinogen-Probe in Beispiel 1 zu einem viel kleineren Konzentrationswert, der ausgehend von dem Coatest-Assay aufgezeichnet wurde. Dieser Unterschied kann durch das Fehlen von Verunreinigungen in rekombinantem Fibrinogen erklärt werden. Die Konzentrationszunahme der Kontrollprobe war unerwartet und könnte auf die HSA-Mikrokapseln, die ebenfalls eine Wirkung auf den Assay in Abwesenheit von Faktor VIII haben, zurückzuführen sein.

[0069] Die Objektträgertest-Aktivität war geringer als für Produkte des Beispiels 1. Dieser Aktivitätsverlust könnte durch eine verringerte Beladung mit rekombinantem Fibrinogen unter den verwendeten Bedingungen verursacht werden. Es wird evident sein, dass Modifikationen vorgenommen werden können, um die Aktivität des Endprodukts zu optimieren.

Patentansprüche

1. Pharmazeutisches Konjugat, umfassend ein Trägerprotein mit funktionellen Gruppen, ausgewählt aus SH, NH₂ und COOH, wobei das Trägerprotein in Form von Mikropartikeln, die durch Wärme oder chemische Vernetzung stabilisiert sind, vorliegt, und an welches erste und zweite wirksame Agentien über einen ersten Linker an eine erste funktionelle Gruppe an dem Träger bzw. über einen zweiten Linker an eine zweite funktionelle Gruppe an dem Träger gebunden sind.

2. Konjugat nach Anspruch 1, wobei der Träger humanes Serumalbumin ist.

3. Konjugat nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei der Träger in Form von Mikrokapseln vorliegt.

4. Konjugat nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei das erste Agens ein Glycoprotein ist.
5. Konjugat nach Anspruch 4, wobei das erste Agens Faktor VIII ist.
6. Konjugat nach Anspruch 4 oder Anspruch 5, wobei das zweite Agens Fibrinogen ist.
7. Konjugat nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die erste funktionelle Gruppe NH_2 oder COOH ist.
8. Konjugat nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei der erste Linker von einem Dihydrazid abgeleitet ist.
9. Konjugat nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei der erste Linker wenigstens 10 nm lang ist.
10. Verwendung eines Konjugats nach einem der vorangegangenen Ansprüche für die Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung eines Zustands an einer Stelle in dem Körper eines Patienten, wobei eines der Agentien wirksam ist, um den Zustand zu behandeln, und das andere Agens als ein Mittel, welches die zielgerichtete Ansteuerung der Stelle ermöglicht, wirkt.
11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei der Zustand Bluten, z.B. Hämophilie, ist, die Stelle eine Wunde ist, das eine Agens Faktor VIII ist und das andere Agens Fibrinogen ist.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

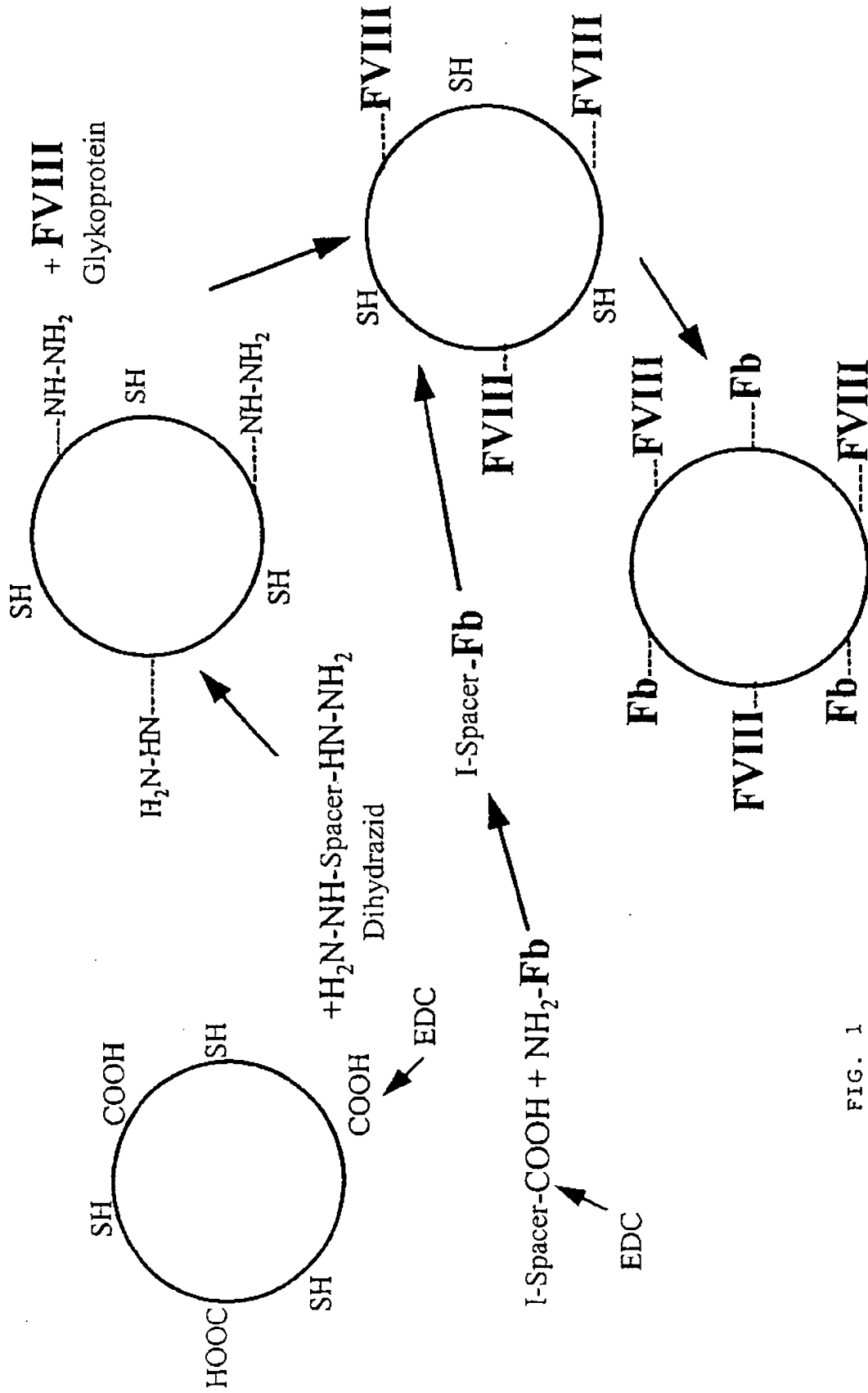


FIG. 1