(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 30 787 T2** 2004.06.03

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 794 788 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 30 787.8**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/15875**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 943 691.6**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/017613**
(86) PCT-Anmeldetag: **06.12.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **13.06.1996**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.09.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **14.05.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **03.06.2004**

(51) Int Cl.[7]: **A61K 31/715**
A61K 38/14, A61K 51/06, C07H 15/02, C07K 9/00

(30) Unionspriorität:
351651 **07.12.1994** **US**

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

(73) Patentinhaber:
Neorx Corp., Seattle, Wash., US

(74) Vertreter:
derzeit kein Vertreter bestellt

(72) Erfinder:
THEODORE, Louis J., Lynnwood, US;
AXWORTHY, Donald B., Brier, US; RENO, John M., Brier, US

(54) Bezeichnung: **AUF DIE LEBER ZIELENDE VERBINDUNGEN UND REAGENTIEN ZU DEREN HERSTELLUNG**

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

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft auf die Leber zielende Verbindungen, ReAgentien, die bei der Herstellung solcher Verbindungen nützlich sind, und damit zusammenhängende Verfahren und Zusammensetzungen. Auf die Leber zielende Verbindungen werden durch Stoffwechselmechanismen verarbeitet, die sich im allgemeinen in Umfang oder Art von den Stoffwechselmechanismen unterscheiden, die man bei Verbindungen antrifft, die nicht so ausgerichtet sind. Auf die Leber zielende Verbindung werden über die Leber aus dem Empfänger eliminiert und zeigen im allgemeinen eine verringerte Serumhalbwertszeit im Vergleich zu nicht-gerichteten Gegenstückverbindungen.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Herkömmliche Krebstherapie leidet unter dem Problem, daß das allgemein erreichbare Targeting-Verhältnis (Verhältnis von verabreichter Dosis, die sich zum Tumor hin lokalisiert, gegenüber verabreichter Dosis, die im Blut zirkuliert, oder Verhältnis von verabreichter Dosis, die sich zum Tumor hin lokalisiert, gegenüber verabreichter Dosis, die zum Knochenmark wandert) niedrig ist. Eine Verbesserung des Targeting-Verhältnisses von Dosis zu Tumor wird angestrebt.

[0003] Ein Verfahren, das im Bemühen eingesetzt wird, das Targeting-Verhältnis zu verbessern, ist, die Serumkonzentration einer Verbindung zu verringern. Ein Verfahren zur Verringerung der Serumkonzentration einer verabreichten Verbindung ist, anschließend ein Molekül zu verabreichen, das so konstruiert ist, daß es schnell über die Leber eliminiert wird und sich an die zuerst verabreichte Verbindung bindet. Galactose-HSA-Biotin-Konjugate, diskutiert in PCT-Patentanmeldung Nr. PCT/US93/05406, erleichtern die Elimination von zirkulierenden Targetingmittel-Streptavidin-Konjugaten aus dem Blutstrom. Galactosylierte Antikörper, die auf einen Teil eines vorverabreichten Moleküls zielen, sind auch für diesen Zweck eingesetzt worden.

[0004] Zusätzlich ist die Leber anfällig für eine Vielzahl von Zuständen, für die Leberzuführung eines aktiven Agens nützlich wäre. Unter diesen Umständen ist Zuführung von aktivem Agens über die Leberarterie vorgeschlagen worden. Diese Methodik ist invasiv und daher werden andere Verfahren der Zuführung von aktivem Agens zur Leber gesucht.

[0005] Haensler et al. beschreiben in Bioconjugate Chemistry, 4(1), 1993, 85–93 ein Trägersystem für selektive Genzuführung zur Leber, die erreicht wird durch Anhängen von einem oder drei Thiogalactosylresten an die zentrale Aminogruppe von Spermidin-Bisacridin über einen Spacerarm.

[0006] Makhlous et al. beschreiben in Carbohydrate Research, 132 (1984) 93–103 die Konjugation von bis zu drei Galactosyl- oder Lactosyleinheiten an Rinderserumalbumin (BSA) über einen Spacer (TA), um $(Gal)_{1-3}$-TA-VSA und $(Lac)_{1-3}$-TA-BSA zu erhalten.

[0007] Peter, G et al. beschreiben in Lieb. Ann. Chem 9 (1990) 863–869 einen Galactose-Cluster, der bis zu drei Galactoseeinheiten enthält, gebunden an Cholesterol-Derivate, über einen Spacer.

[0008] Merwin et al. beschreiben in Bioconjugate Chemistry, 5(6) (1994), 612–620 die gezielte Zuführung des Tris(N-acetylgalactosaminaminohexylglycosid)amids von Tyrosyl(glutomyl)-glutamat, gebunden an Polylysin und komplexiert an DNA, um das DNA zu Hepatozyten zu lenken.

[0009] Lee et al. beschreiben in Glycoconjugate, 4 (1987), 317–328 zwei- und dreiwertige Cluster-Glycoside, die an Tyrosin konjugiert sind.

[0010] Biessen et al. beschreiben in J. Hepatology, 21 (5) (1994) 806–815 die Kopplung von 5,-Iod-2'-deoxyuridin mit linearem Polylactose-derivatisiertem Polylysin. Die Verbindungen wurden mit 2-130 Lactoseresten pro Molekül modifiziert.

Zusammenfassung der Erfindung

[0011] Die vorliegende Erfindung betrifft auf die Leber zielende Verbindungen, ReAgentien und Verfahren zur Herstellung und Verwendung solcher Verbindungen. Auf die Leber zielende Verbindungen können eingesetzt werden, um ein aktives Agens zur Leber zuzuführen, um das Targeting-Verhältnis zu verbessern oder beides. Auf die Leber zielende Verbindungen können auch eingesetzt werden, um zuvor verabreichte Einheiten oder toxische oder potentiell toxische Einheiten zur Eliminierung zu einem Leberstoffwechselweg zu lenken.

[0012] Ein neues Reagenz gemäß der Erfindung beinhaltet:

einen Hexose-Cluster, gekennzeichnet durch mindestens neun Hexosereste, die in einer verzweigten Konfiguration verbunden sind, die aus zwei- oder dreiarmigen Zweigen besteht; und

eine chemisch reaktive Gruppe, die in der Lage ist, mit einem Element von einem Ligand/Antiligand-Paar, einer Gruppe, die an eine bestimmte Target-Zellpopulation bindet, oder einem diagnostischen oder therapeutischen Mittel zu reagieren, wobei die Reaktion eine notwendige Funktion der Komponente, mit der die chemisch re-

aktive Gruppe reagiert, nicht beeinträchtigt.

[0013] Eine neue, auf die Leber zielende Verbindung gemäß der Erfindung beinhaltet:
einen Hexose-Cluster, gekennzeichnet durch mindestens neun Hexosereste, die in einer verzweigten Konfiguration verbunden sind, die aus zwei- oder dreiarmigen Zweigen besteht; und
ein Element aus einem Ligand/Antiligand-Paar, eine Gruppe, die an eine bestimmte Target-Zellpopulation bindet, und/oder ein diagnostisches oder therapeutisches Mittel.

[0014] Eine Ausführungsform von auf die Leber zielenden Verbindungen der vorliegenden Erfindung schließt im allgemeinen eine Lenkereinheit und ein aktives Agens ein. In dieser Ausführungsform der vorliegenden Erfindung können ein oder mehrere aktive Agentien direkt oder indirekt an die Lenkereinheit gebunden sein. Beispiele für indirekte Bindung schließen die Verwendung von polymeren Trägern, Liposomen, teilchenförmigen Dosierungsformen und dergleichen ein. Solche auf die Leber zielenden Verbindungen sind besonders nützlich für die Zuführung von aktiven Agentien zur Leber, um Lebererkrankungen zu behandeln. Die Lenkereinheit lenkt die Lokalisierung der auf die Leber zielenden Verbindung zur Leber und das aktive Agens behandelt das Leiden.

[0015] In der Situation, in der eine Verbesserung des Target-Verhältnisses angestrebt wird, schließen auf die Leber zielende Verbindungen der vorliegenden Erfindung im allgemeinen eine Targetingeinheit ein, die auf die zu behandelnde/diagnostizierende Target-Zellpopulation abzielt, sowie einen Lenker und fakultativ einen Effektor vom Typ aktives Agens. Unter diesen Umständen lenkt die Targetingeinheit die Lokalisierung der Verbindung zu Target-Zellen, das aktive Agens behandelt das Leiden und die Lenkereinheit erleichtert die Entfernung der Verbindung aus dem Kreislauf über die Leber, wodurch die Einwirkung des aktiven Agens auf das normale Gewebe des Empfängers verringert wird.

[0016] In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung schließen die auf die Leber zielenden Verbindungen der vorliegenden Erfindung allgemein eine Lenkereinheit und eine Bindungseinheit ein, die ein zuvor verabreichtes Agens oder anderes toxisches Agens im Blutstrom oder extravaskulären Fluidraum des Empfängers erkennt. Solche auf die Leber zielenden Verbindungen sind besonders nützlich für die Ausscheidung von zuvor verabreichten Molekülen, wie etwa Targetingeinheit-Rezeptor-Konstrukten, die konstruiert sind, um mit Targetstellen zusammenzuwachsen und die Lokalisierung von anschließend verabreichtem, aktives Agens enthaltenden Molekülen, die die Rezeptoren erkennen, zu erleichtern. Folglich ist diese Ausführungsform der vorliegenden Erfindung besonders geeignet zur Verwendung in Pretargeting-Protokollen, wie hierin beschrieben.

[0017] Alternativ kann die Bindungseinheit auf toxische oder potentiell toxische Einheiten gerichtet sein, die im Kreislauf oder extravaskulären Fluidraum des Empfängers lokalisiert sind. Die Lenkereinheit lenkt die Lokalisierung der auf die Leber zielenden Verbindung zur Leber und die Bindungseinheit bindet sich an das Molekül, das über den Leberweg eliminiert werden soll.

[0018] Die Lenkereinheiten der vorliegenden Erfindung sind verzweigte Zuckerkonstrukte (d. h. Zucker-Cluster), die von einer Population von Rezeptoren auf der Leber erkannt werden. Beispielhafte Zucker für diesen Zweck sind Galactose und Mannose. Die verzweigte Konfiguration erleichtert typischerweise die Erkennung der Zucker durch Leberrezeptoren, da solche Rezeptoren oft sehr wirkungsvoll Cluster von Zuckern bestimmter Konfigurationen verarbeiten.

[0019] Bevorzugtere Lenkereinheiten gemäß der vorliegenden Erfindung enthalten Galactose oder Galactosederivate. Lenkereinheiten mit 16 und 32 Galactoseresten sind im allgemeinen bevorzugt zur Verwendung für Pretargeting-Aspekte der vorliegenden Erfindung. Alternative, sich verzweigende Strukturen, wie etwa diejenigen mit 9, 27, etc. Zuckern, werden ebenfalls von der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogen.

[0020] Lenkereinheiten können in auf die Leber zielende Verbindungen unter Verwendung geeigneter ReAgentien dafür eingebaut werden. Die Lenkerre Agentien der vorliegenden Erfindung umfassen einen Galactose-Cluster, wie etwa diejenigen, die oben beschrieben sind, und eine funktionelle Gruppe, wie etwa einem Amin, aktivierten Ester, Maleimid, Alkylhalogenid, Hydrazid, Thiol, Imidat, Aldehyd oder dergleichen.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0021] **Fig.** 1 veranschaulicht das Tumoraufnahmeprofil von NR-LU-10-Streptavidin-Konjugat (LU-10-StrAv) im Vergleich mit einem Kontrollprofil von nativem vollständigen NR-LU-10-Antikörper.

[0022] **Fig.** 2a, 2b und 2c stellen schematisch die Herstellung eines Konjugats aus einem Cluster von sechzehn Galactoseresten und Biotin dar.

[0023] **Fig.** 3 stellt schematisch die Synthese eines Galactose-Clusters, der acht Galactosereste enthält, dar.

[0024] **Fig.** 4 zeigt schematisch die Synthese eines verlängerten Galactose-Clusters, der acht Galactosereste enthält.

[0025] **Fig.** 5 zeigt schematisch die Synthese von N-N'-Bis(disulfid-4-methylphenyl)gamma,gamma'-diaminoisovalerat-N-hydroxysuccinimid.

[0026] Vor Darstellung der Erfindung könnte es hilfreich sein, Definitionen für bestimmte Begriffe anzugeben, die in der Offenbarung verwendet werden sollen.

[0027] Targetingeinheit: Ein Molekül, das sich an eine definierte Population von Zellen binden Die Targetingeinheit kann sich an einen Rezeptor, ein Oligonucleotid, ein enzymatisches Substrat, eine antigenische Determinante oder andere Bindungsstelle binden, die auf oder in der Target-Zellpopulation vorhanden ist. Antikörper wird in der Beschreibung durchgängig als ein prototypisches Beispiel einer Targetingeinheit verwendet. Tumor bei der Beschreibung der vorliegenden Erfindung wird als ein prototypisches Beispiel für ein Target verwendet.

[0028] Ligand/Antiligand-Paar: Ein komplementärer/antikomplementärer Satz von Molekülen, die spezifische Bindung zeigen, im allgemeinen mit relativ hoher Affinität. Beispielhafte Ligand/Antiligand-Paare schließend Zink-Fingerprotein/dsDNA-Fragment, Enzym/Inhibitor, Hapten/Antikörper, Lectin/Kohlehydrat, Ligand/Rezeptor, S-Protein/S-Peptid, Kopfaktivatorprotein (das sich an sich selbst bindet), Cystatin-C/Cathepsin B und Biotin/Avidin ein. Biotin/Avidin wird in der Beschreibung durchgängig als ein prototypisches Beispiel für ein Ligand/Antiligand-Paar verwendet.

[0029] Antiligand: Wie hierin definiert, zeigt ein "Antiligand" hohe Affinität und vorzugsweise mehrwertige Bindung des komplementären Liganden. Vorzugsweise ist der Antiligand groß genug, um schnelle Nierenausscheidung zu verhindern, und enthält ausreichend Mehrwertigkeit, um Vernetzung und Aggregation von Targetingeinheit-Ligand-Konjugaten zu erreichen. Einwertige Antiliganden werden ebenfalls von der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogen. Antiliganden der vorliegenden Erfindung können Strukturmerkmale zeigen oder derivatisiert werden, um Strukturmerkmale zu zeigen, die die Aufnahme derselben lenken, z. B. Galactosereste, die die Leberaufnahme lenken. Avidin und Streptavidin werden hierin als prototypische Antiliganden verwendet.

[0030] Avidin: Wie hierin definiert, schließt "Avidin" Avidin, Streptavidin und Derivate und Analoge derselben ein, die in der Lage sind zu mehrwertiger oder einwertiger Bindung von Biotin mit hoher Affinität.

[0031] Ligand: Wie hierin definiert, ist ein "Ligand" ein relativ kleines, lösliches Molekül, das sich mit hoher Affinität an Antiligand bindet und vorzugsweise schnelle Serum-, Blut- und/oder Ganzkörper-Ausscheidung zeigt, wenn er einem Tier oder Menschen intravenös verabreicht wird. Biotin wird als der prototypische Ligand verwendet.

[0032] Ligand mit niedrigerer Affinität oder Antiligand mit niedrigerer Affinität: Ein Ligand oder Antiligand, der sich an sein komplementäres Teil des Ligand/Antiligand-Paares mit einer Affinität bindet, die niedriger ist als die Affinität, mit der sich nativer Ligand oder Antiligand an das komplementäre Teil bindet. Vorzugsweise zeigen Liganden und Antiliganden mit niedrigerer Affinität zwischen von etwa 10^{-6} bis 10^{-10} M Bindungsaffinität für die native Form des komplementären Antiliganden oder Liganden. Für Avidin/Streptavidin und andere Bindungsmoleküle mit extrem hoher Affinität kann niedrigere Affinität jedoch in einem Bereich zwischen 10^{-6} bis 10^{-13} M liegen. Liganden und Antiliganden mit niedrigerer Affinität können in Ausscheidungsmitteln oder in aktives Agens enthaltenden Konjugaten der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden.

[0033] Aktives Agens: Ein diagnostisches oder therapeutisches Agens ("die Beladung"), einschließlich Radionukliden, Arzneimitteln, Antitumormitteln, Toxinen und dergleichen. Radionuklid-Therapeutika werden als prototypische Agentien verwendet.

[0034] N_xS_y-Chelate: Wie hierin definiert, schließt der Begriff "N_xS_y-Chelate" bifunktionelle Chelatbildner ein, die in der Lage sind, (i) ein Metall oder Radiometall koordinativ zu binden und (ii) sich an eine Targetingeinheit, einen Liganden oder Antiliganden kovalent zu binden. Besonders bevorzugte N_xS_y-Chelate haben N_2S_2- und N_3S-Kerne. Beispielhafte N_xS_y-Chelate sind zum Beispiel beschrieben in Fritzberg et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4024–29, 1988; in Weber et al., Bioconj. Chem. 1: 431–37, 1990; und in den darin zitierten Literaturstellen.

[0035] Pretargeting: Wie hierin definiert, umfaßt Pretargeting die Targetstellen-Lokalisierung einer Targetingeinheit, die mit einem Teil eines Ligand/Antiligand-Paares konjugiert ist; nach einem für optimale Target-zu-Nicht-Target-Akkumulation dieses Targetingeinheit-Konjugats ausreichenden Zeitraum wird aktives Agens, konjugiert an das entgegengesetzten Teil des Ligand/Antiligand-Paares verabreicht und (direkt oder indirekt) an das Targetingeinheit-Konjugat an der Targetstelle gebunden (zweistufiges Pretargeting). Dreistufige und andere verwandte Methoden, die hierin beschrieben sind, sind ebenfalls umfaßt.

[0036] Ausscheidungsmittel: Ein Agens, das in der Lage ist, mit einer verabreichten Einheit (z. B. Targetingeinheit-Ligand, Targetingeinheit-Antiligand oder Antiligand allein), die im Kreislauf des Empfängers vorhanden ist, zu binden, zu komplexieren oder in anderer Weise zu assoziieren, wodurch die Kreislaufausscheidung der Einheit aus dem Körper des Empfängers, Entfernung aus dem Blutkreislauf oder Inaktivierung davon im Kreislauf erleichtert wird. Das Ausscheidungsmittel ist vorzugsweise gekennzeichnet durch physikalische Eigenschaften, wie etwa Größe, Ladung, Konfiguration oder eine Kombination davon, die den Zugang des Ausscheidungsmittels zur Population von Targetingzellen beschränken, die von einer Targetingeinheit erkannt werden,

die im selben Behandlungsprotokoll verwendet wird wie das Ausscheidungsmittel.

[0037] Konjugat: Ein Konjugat umfaßt chemische Konjugate (kovalent oder nicht-kovalent gebunden), Fusionsproteine und dergleichen.

[0038] Auf die Leber zielende Verbindungen: Konjugate, die im allgemeinen einen Lenker und einen Effektor einschließen. Ein oder mehrere Effektormoleküle können direkt oder indirekt an einen oder mehrere Lenker gebunden sein.

[0039] Indirekte Bindung: Bindung von Effektormolekül(en) an Lenkermolekül(e) über einen Träger, wie etwa ein Polymer, ein Liposom, eine teilchenförmige Dosierungsform oder dergleichen.

[0040] Direkte Bindung: Direkte chemische Verknüpfung zwischen Komponenten einer auf die Leber zielenden Verbindung oder solche chemischen Verknüpfungen, die ein Spacer-, Verlängerer- oder anderes chemisches Linker-Molekül umfassen, das als ein Linker statt als ein Träger konstruiert ist.

[0041] Lenker: Eine Einheit, die in der Lage ist, die Ausscheidung einer Komponente zu lenken, an die sie bei Verabreichung gebunden wird, oder einer Komponente, an die sie in vivo gebunden wird. Lenkereinheiten der vorliegenden Erfindung lenken die Ausscheidung über den Leberweg.

[0042] Effektor: Eine Einheit, die in der Lage ist, eine gewünschte Wirkung für eine spezifische Anwendung zu erreichen, wie etwa ein aktives Agens; eine Bindungseinheit, die einen Liganden, einen Antiliganden oder dergleichen einschließt; eine Targetingeinheit; oder dergleichen.

[0043] Bindungseinheit: Ein Ligand, ein Antiligand oder eine andere Einheit, der (die) in der Lage ist zu in-vivo-Assoziation mit einem zuvor verabreichten Molekül (das zum Beispiel den komplementären Liganden oder Antiliganden trägt) oder mit einem anderen toxischen oder potentiell toxischen Molekül, das im Kreislauf oder extravaskulären Fluidraum des Empfängers vorhanden ist, über Erkennung durch die Bindungseinheit eines Epitoms, das mit dem toxischen oder potentiell toxischen Molekül assoziiert ist.

[0044] Zucker-Cluster: Eine Lenkereinheit mit mehreren Zuckerresten, die so konfiguriert sind, daß sie von einem Leberrezeptor erkannt werden. Solche Cluster werden vorzugsweise aus Zuckerresten aufgebaut, die in einer verzweigten Konfiguration verbunden sind, und sind gebunden an andere Komponenten eines einen Zucker-Cluster enthaltenden Konjugats über einen einzigen Verknüpfungspunkt. Vorzugsweise besteht das Verzweigungsnetzwerk aus zwei- oder dreiarmigen Zweigen, d. h. besteht aus 2, 4, 8, 16, 22 oder 64 Zuckerresten oder besteht aus 2, 9, 27 oder 81 Zuckerresten. In der Erfindung besteht der essentielle Hexose-Cluster aus zwei- oder dreiarmigen Zweigen und besitzt wenigstens neun Reste.

[0045] Zucker-Cluster-Ausscheidungsmittel: Eine auf die Leber zielende Verbindung, die zur Verwendung als ein Ausscheidungsmittel in einem Pretargeting-Protokoll konstruiert ist, das einen Zucker-Cluster-Lenker umfaßt.

[0046] Galactose-Cluster: Eine Lenkereinheit mit von etwa 2 bis etwa 100 Galactoseresten, die in einer verzweigten Konfiguration verbunden sind, wobei Konstrukte, die weniger als 50 Galactosereste umfassen, bevorzugt sind. Vorzugsweise besteht das Verzweigungsnetzwerk aus zwei- oder dreiarmigen Zweigen, d. h. besteht aus 2, 4, 8, 16, 22 oder 64 Galactoseresten oder besteht aus 2, 9, 27 oder 81 Galactoseresten. In der Erfindung besteht der essentielle Hexose-Cluster aus zwei- oder dreiarmigen Zweigen und besitzt wenigstens 9 Reste.

[0047] Galactose-Cluster-Ausscheidungsmittel: Eine auf die Leber zielende Verbindung, die zur Verwendung als ein Ausscheidungsmittel in einem Pretargeting-Protokoll konstruiert ist, das einen Galactose-Cluster-Lenker umfaßt.

[0048] Lenkerreagenz: Ein Reagenz, das einen Lenker-Abschnitt und eine oder mehrere funktionelle Gruppen zur Bindung an einen Effektor-Abschnitt, um eine auf die Leber zielende Verbindung zu bilden, umfaßt.

[0049] Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft auf die Leber zielende Verbindungen, die zur Zuführung von Wirkstoffeffektoren zu Lebertargets geeignet sind, wobei die auf die Leber zielenden Verbindungen beinhalten: einen einen Cluster aus Zuckerresten einschließenden Lenker, der in der Lage ist, die Leberaufnahme der Verbindung zu lenken; und ein direkt oder indirekt an dem Lenker gebundenes aktives Agens, das für diagnostische oder therapeutische Anwendung im Hinblick auf ein Leberleiden in der Lage ist.

[0050] In dieser Ausführungsform der vorliegenden Erfindung dient der Lenker dazu, das aktive Agens zum Lebertarget zuzuführen. Das aktive Agens stellt einen diagnostischen oder therapeutischen Nutzen am Lebertarget bereit. Weiter erleichtert ein fakultativer Träger für das aktive Agens die Zuführung mehrerer aktiver Agensmoleküle oder mehrerer aktiver Agentien zum Lebertarget.

[0051] Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft auf die Leber zielende Verbindungen, die zur Verringerung von Hintergrund aus aktivem Agens oder Targetinteinheit-Konzentration im Kreislauf oder extravaskulären Fluidraum eines Empfängers geeignet sind, wobei die auf die Leber zielenden Verbindungen beinhalten:

einen einen Cluster von Zuckerresten einschließenden Lenker, der in Lage ist, die Leberaufnahme der Verbindung zu lenken;

eine Targetingeinheit, die sich zu einem interessierenden Target lokalisiert, wobei die Targetingeinheit fakultativ kovalent oder nicht-kovalent an einen Rezeptor gebunden ist; und fakultativ

ein aktives Agens, direkt oder indirekt an den Lenker oder an die Targetingeinheit (vorzugsweise an die Targetingeinheit) gebunden, das in der Lage ist zu diagnostischer oder therapeutischer Anwendung im Hinblick auf das Target.

[0052] In dieser Ausführungsform der vorliegenden Erfindung lokalisiert die Targetingeinheit sich zum Target, wobei sie entweder einen Rezeptor oder ein aktives Agens dorthin zuführt. Der Lenker fördert die Eliminierung der auf die Leber zielenden Einheit über die Leber, um Nicht-Target-Akkumulation des auf die Leber zielenden Moleküls zu verringern. Der fakultative Rezeptor, falls eingesetzt, liefert eine Bindungsstelle für ein anschließend verabreichtes Konstrukt, das aktives Agens enthält. Das fakultative aktive Agens, falls eingesetzt, liefert einen diagnostischen oder therapeutischen Nutzen am Target. Weiter erleichtert ein fakultativer Träger für aktives Agens die Zuführung mehrerer aktiver Agensmoleküle oder mehrerer aktiver Agentien zum Target.

[0053] Weitere Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung betreffen auf die Leber zielende Verbindungen, die geeignet sind zum Lenken des Stoffwechselweges zur Eliminierung von Molekülen, die im Kreislauf oder extravaskulären Fluidraum eines Empfängers vorhanden sind, wobei die auf die Leber zielenden Moleküle beinhalten:

einen einen Cluster von Zuckerresten einschließenden Lenker, der in der Lage ist, die Leberaufnahme der Verbindung zu lenken; und

eine Bindungseinheit, direkt oder indirekt an den Lenker gebunden, die in der Lage ist zu invivo-Komplexierung mit bestimmten Molekülen, die im Kreislauf und extravaskulären Fluidraum des Empfängers vorhanden sind.

[0054] In dieser Ausführungsform der vorliegenden Erfindung dient der Lenker dazu, die Bioverteilung des auf die Leber zielenden Moleküls und der Konstrukte, mit denen es in vivo assoziiert wird, zu lenken. Die Bindungseinheit erleichtert die in-vivo-Assoziation mit zuvor verabreichten Verbindungen oder mit toxischen oder potentiell toxischen Einheiten, die im Kreislauf oder extravaskulären Fluidraum des Empfängers vorhanden sind. Weiter erleichtert ein fakultativer Bindemittelträger den Transport mehrerer Bindemittelmoleküle im Kreislauf oder extravaskulären Fluidraum.

[0055] Wenn Radionuklide als aktive Agentien eingesetzt werden, beinhalten Konstrukte der vorliegenden Erfindung: auf die Leber gerichtete Verbindungen, die Chelate für anschließende Komplexierung von Radionuklid darin umfassen (Konjugation über den Nachbildungsansatz), sowie auf die Leber zielende Verbindungen, die Radionuklide umfassen, die zuvor mit Radionuklid komplexiert sind (Konjugation über den Vorbildungsansatz).

[0056] Hexose-Cluster werden als Lenker in der Praxis der vorliegenden Erfindung eingesetzt. Galactose-Cluster sind die prototypischen Hexose-Cluster, die für die Zwecke dieser Beschreibung eingesetzt werden. Das Design von Hexose-Clustern der vorliegenden Erfindung wird mit den folgenden Kriterien im Hinterkopf durchgeführt, wie angegeben im Zusammenhang des Designs eines Galactose-Clusters:

1) Anzahl von Galactosen in einem Cluster;
2) Abstand zwischen Galactosen im Cluster; und
3) Abstand zwischen Galactose-Cluster und einer Konjugat-Komponente, die sich an zirkulierende Moleküle oder an Target binden muß.

[0057] Im Hinblick auf Kriterium Nummer 1 weist die Literatur darauf hin, daß Galactose-Rezeptoren auf der Oberfläche menschlicher Hepatozyten als Heterotrimere gruppiert sind und möglicherweise Bis-Heterotrimere. Siehe zum Beispiel Hardy et al., Biochemistry, 24: 22–8, 1985. Im allgemeinen gilt, daß die Wahrscheinlichkeit, daß der Cluster von Leberrezeptoren erkannt wird, um so größer ist, je größer die Anzahl von Zuckern in einem Cluster ist.

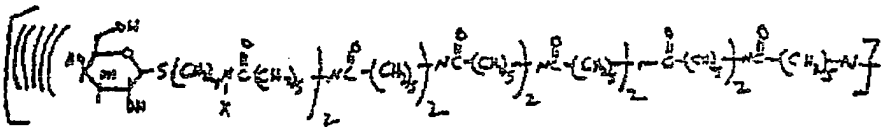
[0058] Erhöhte Zucker-Cluster-Größe kann die Bindung an zirkulierende Moleküle oder an Target beeinträchtigen. Wenn signifikante Beeinträchtigung einer solchen Bindung (z. B. Verringerung auf <20% der nativen Targetingeinheits- oder Bindungseinheits-Bindungsfähigkeit) beobachtet wird, sollte ein längerer Linker zwischen den zwei Einheiten eingesetzt werden oder sollten solche großen Cluster nicht in auf die Leber zielenden Verbindungen der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Die vorliegende Erfindung umfaßt Hexose-Cluster mit jeder Anzahl von Hexoseresten oder jeder Mischung davon, die zu wirkungsvoller Leberausscheidung des resultierenden auf die Leber zielenden Moleküls führt.

[0059] Im Hinblick auf Kriterium Nummer 2 werden die Galactose-Rezeptoren innerhalb jedes Trimers voneinander durch Abstände von 15, 22 und 25 Angstroms getrennt. Folglich glauben die gegenwärtigen Erfinder, daß die Galactosen innerhalb eines Clusters vorzugsweise durch flexible Linker getrennt sein sollten, die eine Trennung von wenigstens 25 Angstroms ermöglichen. Es ist wahrscheinlich, daß der Abstand zwischen Zuckerresten wichtiger ist, wenn die Anzahl von Zuckerresten klein ist. Bei größeren Konstrukten ist es wahrscheinlich, daß ein angemessener Abstand im Hinblick auf Zuckerreste eintritt, die nicht unmittelbare Nachbarn sind (d. h. Zuckerreste, die weiter voneinander entfernt sind als diejenigen, die unmittelbare Nachbarn sind). Unter der Annahme einer durchschnittlichen Bindungslänge von 1,5 Angstroms sind bevorzugte Zucker-Cluster der vorliegenden Erfindung gekennzeichnet durch die Trennung von benachbarten Zuckerresten durch etwa 10 Bindungslängen oder mehr. Andere bevorzugte Konstrukte umfassen Galactose-Cluster, die gekennzeichnet durch die Trennung von benachbarten Zuckerresten durch etwa 25 Bindungslängen oder mehr.

[0060] Im Hinblick auf Kriterium Nummer 3 sollte der Abstand zwischen der Targetingeinheit- und/oder der Bindungseinheits-Komponente und dem Galactose-Cluster ausreichend sein, um jegliche nachteilige sterische Effekte auf die Bindungsfähigkeit dieser Komponenten zu vermeiden, die durch die Größe oder Orientierung des Galactose-Clusters verursacht werden. Dieser Abstand ist vorzugsweise größer als etwa 7 Bindungslängen oder etwa 10 Angstroms. Falls erforderlich, ist zwischen den relevanten Konjugat-Komponenten ein Verlängerermolekül eingebaut, um den erforderlichen Abstand bereitzustellen. Solche Verlängerer können zum Beispiel zwischen dem Galactose-Cluster und einem Linker (der den Galactose-Cluster und die Targeting- oder Bindungs-Komponente verknüpft) oder zwischen der Targeting- oder Bindungs-Komponente und dem Linker angeordnet sein, um den erforderlichen Abstand bereitzustellen.

[0061] Obgleich die vorstehenden Parameter für Galactose optimal zu sein scheinen, sollte angemerkt werden, daß diese Faktoren bei anderen Hexosen oder Mischungen davon, die sich an die selben Rezeptoren binden können oder nicht oder sich unterschiedlich binden können, variieren können. Auf der Grundlage der Lehren in dieser Anmeldung kann ein Fachmann, unter Verwendung geeigneter Synthesetechniken, Konstrukte herstellen, die andere Hexose-Cluster einbeziehen, und diejenigen Konstrukte identifizieren, die optimale Leistung liefern.

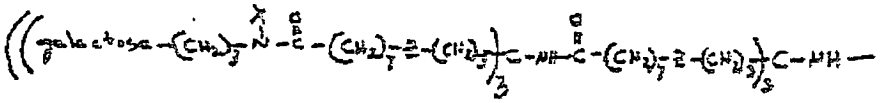
[0062] Alle verzweigten Zuckerstrukturen, die die oben beschriebenen Kriterien erfüllen, können in der Praxis der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden. Bevorzugte Galactose-Cluster der vorliegenden Erfindung besitzen die folgenden Strukturen:

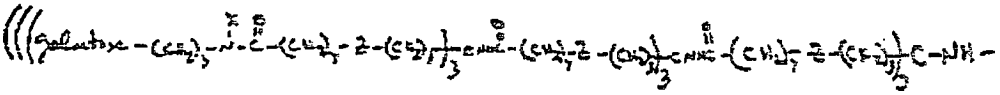


wobei X vorzugsweise H oder Methyl ist, was zu Galactose-Clustern führt, die 16 bzw. 32 Galactosereste tragen. Weitere Iteration im Verzweigungsschema ermöglicht die Ausdehnung des Galactose-Clusters, um 32, 64, etc. Galactosereste einzuschließen. Zusätzlich kann die Linkereinheit zwischen dem Zucker selbst und der Verzweigungsstruktur (dargestellt als $-S(CH_2)_4-NX-$) von variabler Länge sein.

[0063] Alternative Verzweigungsstrukturen können ebenfalls beim Design von Galactose-Clustern gemäß der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden. Andere Konstrukte, in denen die Verzweigung zu einer Verdopplung der Anzahl von Galactoseresten führt, können zum Beispiel eingesetzt werden. Zusätzlich werden von der vorliegenden Erfindung auch Konstrukte in Betracht gezogen, bei denen die Verzweigung zu einer Verdreifachung oder anderen angemessenen Vervielfachung der Anzahl von Galactoseresten führt.

[0064] Eine weitere potentielle Verzweigungskonstruktion beruht auf dem Molekül Bis-Homotris: $(HO-CH_2)_3-C-NH_2$. Das Sulfhydryl-enthaltende Derivat dieses Moleküls kann ebenfalls verwendet werden. In dieser Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist jeder Arm des Bis-Homotris-Moleküls verlängert und mit einer Carbonsäure abgeschlossen: $(HO_2-C-(CH_2)_y-Z-(CH_2)_3)_3-C-NH_2$, wobei Z S oder O ist und y von 1 bis etwa 10 reicht. Für diese Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein bevorzugter Galactose-Cluster gekennzeichnet durch die folgenden Strukturen:



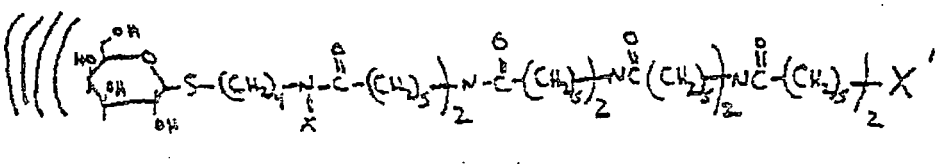


wobei X vorzugsweise H oder Methyl ist; Y von 1 bis etwa 1 reicht; und Z O oder S ist. Die obigen Strukturen tragen 9 bzw. 27 Galactosereste. Weitere Iteration der Verzweigung erlaubt eine Ausdehnung, um 81, etc. Galactosereste einzuschließen.

[0065] Auch kann X eine von Methyl verschiedene Niederalkyleinheit sein, wie etwa Ethyl, t-Butyl und dergleichen. X kann auch eine Niederalkylgruppe sein, die ein Heteroatom trägt, wie etwa eine Niederalkylsäure, -ester, -aldehyd, -keton oder -ether. Der Zweck von X ist, metabolische/katabolische Enzyme, die die Amidbindung spalten können, mit sterischer Hemmung zu versehen. X sollte die Funktion des Agens nicht verändern, an das es gebunden ist, und kann daher geändert werden, um die Löslichkeit, Ladung oder eine andere physikalische Eigenschaft, wie erforderlich für eine gegebene Anwendung, zu erhöhen/zu senken.

[0066] Galactose-Cluster-Lenkermoleküle werden in auf die Leber zielende Verbindungen unter Verwendung von LenkerreAgentien einbezogen. Eine Familie von LenkerreAgentien mit unterschiedlichen funktionellen

Gruppen kann zur Bindung solcher LenkerreAgentien an verschiedene andere Moleküle, um eine Vielzahl von auf die Leber zielenden Verbindungen gemäß der vorliegenden Erfindung zu bilden, eingesetzt werden. Eine bevorzugte Familie von LenkerreAgentien der vorliegenden Erfindung kann dargestellt werden durch die folgende Formel:



wobei X' eine verfügbare funktionelle Gruppe trägt und X H oder Methyl ist, was zu Galactose-Clustern führt, die 16 Galactosereste tragen. Weitere verwandte LenkerreAgentien, die ein alternatives Vielfaches von 4 Galactoseresten tragen, sind analog strukturiert. die verfügbare funktionelle Gruppe von X' ist ausgewählt in Übereinstimmung mit der Natur der anderen Komponente(n) der auf die Leber zielenden Verbindung. Beispiele für nützliche funktionelle X'-Gruppen schließen Amine, aktivierte Ester, Maleimide, Isocyanate, Isothiocyanate, Alkylhalogenid (z. B. Iodacetat), Alpha-Haloketon, Alpha-Halosäuren, Hydrazide, Thiole, Imidate, Aldehyde, photolytische Konjugationsgruppen und dergleichen ein.

[0067] Aktivierte Ester können zum Beispiel eingesetzt werden, um den Galactose-Cluster an Amine (primäre oder sekundäre), Hydroryle, Sulfhydryle und dergleichen zu konjugieren. Maleimide erleichtern die Konjugation an Thiole und dergleichen. Isocyanate und Isothiocyanate können zur Konjugation an Amine und dergleichen eingesetzt werden. Alkylhalogenide sind nützlich zur Konjugation an Thiole, Hydroxyle, Amine und dergleichen. Hydrazidgruppen erleichtern die Konjugation an aktivierte Ester, Aldehyde, Ketone und dergleichen. Thiole können eingesetzt werden, um den Galactose-Cluster an Thiole, Maleimide, Alkylhalogenide, Alpha-Haloketone und dergleichen zu konjugieren. Imidate erleichtern die Konjugation an Amine und dergleichen. Aldehyde können zur Konjugation an Amine, über die Bildung einer Schiff'schen Base mit oder ohne Reduktion, und dergleichen eingesetzt werden.

[0068] Diese selben funktionellen X'-Gruppen können in LenkerreAgentien für jede Lenkerreagenz-Familie der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden. Eine Familie von LenkerreAgentien wird gebildet aus einem einzelnen Molekül, das wie folgt strukturiert ist: Hexose-Cluster-Basisfunktionalität (im strukturellen Sinn) – zugängliche Funktionalität (im sterischen Sinn), wobei die Basisfunktionalität einer Derivatisierung zugänglich ist, um X'-Einheiten zu liefern, die zugängliche funktionelle Gruppen tragen, die mit der Basisfunktionalität identisch oder von ihr verschieden sind. Beispiele für Basisfunktionalitäten sind -NH_2, aktivierter Ester, Maleimid, Sulfhydryl und dergleichen. Für eine -NH_2-Basisfunktionalität schließen geeignete X'-Gruppen die folgenden ein:

Amin;
-NR-CO-$(CH_2)_2$-O-NHS;
-NR-CO-$(CH_2)_2$-O-NHS-SO_3Na;
-NR-CO-$(CH_2)_2$-O-Tetrafluorphenyl;
-Maleimid;
-NR-Verlängerer-Maleimid, wobei der Verlängerer eine Aminocaproatgruppe, -$(CH_2)_n$ oder dergleichen ist, wobei n von 1 bis etwa 10 reicht;
-3(2-Pyridyldithio)propoinamid;
-NR-CO-CH_2-SH;
-NR-CO-CH_2-Halogenid, vorzugsweise I oder Br;
-NR-CO-NH-NH_2;
-NR-CO-$(CH_2)_n$-CO-NH-NH_2, wobei n von 1 bis etwa 10 reicht;
-NR-CO-$(CH_2)_2C=NH_2$+-OCH_3;
-NR-CO-CH_2-p-N_3-Phenyl;
und dergleichen.

[0069] Zusätzlich kann die Amin-Basisfunktionalität zusätzlich N-alkyliert sein, um die Stabilität gegenüber Stoffwechselabbau oder Retention in den Hepatozyten zu erhöhen. Folglich kann R H, CH_3, CH_2COOH oder dergleichen sein.

[0070] Beispiel VII zeigt ein Verfahren zur Herstellung eines verwandten Mitglieds der oben identifizierten Lenkerreagenz-Familie (wobei X' ein Amin ist und der Galactose-Cluster 8 Galactosereste umfaßt). Zusätzlich ist die Herstellung einer Ausführungsform von auf die Leber zielenden Verbindungen aus solchen Galactose-Cluster-LenkerreAgentien in den Beispielen VIII und IX beschrieben.

[0071] Auf die Leber zielenden Moleküle der vorliegenden Erfindung können unter Verwendung geeigneter Linker hergestellt werden. Aus zwei Komponenten bestehende, auf die Leber zielende Moleküle werden hergestellt unter Verwendung eines bifunktionellen Lenkers. Für aus drei Komponenten bestehende, auf die Leber zielende Verbindungen, in denen keine der Komponenten durch mehr als eine für Konjugation an andere Kom-

ponenten geeignete und verfügbare Gruppe gekennzeichnet ist, sind trifunktionelle Linker bevorzugt. Für aus drei Komponenten bestehende, auf die Leber zielende Moleküle, in denen wenigstens eine der Komponenten zwei oder mehr für die Konjugation mit anderen Komponenten verfügbare und geeignete funktionelle Gruppen ausweist, sind zwei bifunktionelle Linker für die Konjugatbildung bevorzugt. Jeder zur Verknüpfung der Komponenten der auf die Leber zielenden Verbindung nützliche Linker oder Linkerkombination kann eingesetzt werden. Geeignete trifunktionelle und bifunktionelle Linker sind unten angegeben.

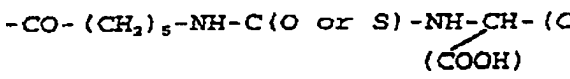
[0072] Funktionelle Gruppen, die für Konjugation "zugänglich" sind, sind diejenigen, die nicht durch sterische Beschränkungen an der Konjugatbildung gehindert werden. Funktionelle Gruppen, die für Konjugation "geeignet" sind, sind diejenigen, die, in einem chemischen Sinne, geeignet sind, mit zugänglichen funktionellen Gruppen zu reagieren, die mit anderen Konjugatkomponenten verknüpft sind. Zusätzlich beeinträchtigt die Konjugation von "geeigneten" funktionellen Gruppen eine notwendige Funktion der Komponente, mit der die funtkionelle Gruppe verknüpft ist, nicht wesentlich. Eine funktionelle Gruppe, die in der die Komplimentarität bestimmenden Region einer Antikörper-Targetingeinheit lokalisiert ist, wird zum Beispiel im allgemeinen für Konjugation nicht "geeignet" sein, weil es wahrscheinlich ist, daß die Targetingfähigkeit des Antikörpers durch eine solche Bindung wesentlich beeinträchtigt wird.

[0073] Die Targetingeinheit, die Bindungseinheit oder das aktive Agens und die Galactose-Cluster-Komponenten einer aus drei Komponenten bestehenden, auf die Leber zielenden Verbindung können über einen trifunktionellen Linker verknüpft werden, vorausgesetzt, daß eine von solchen Komponenten die oben diskutierten Merkmale besitzt. Geeignete trifunktionelle Linker sind einer Bindung mit funktionellen Gruppen zugänglich, die auf den drei Konjugatkomponenten oder jeder Verlängerereinheit, die in der Konjugatkonstruktion eingesetzt wird, zugänglich ist. Ein nützlicher trifunktioneller Linker ist Lysin, wobei die funktionelle Gruppen Alpha-Amino, Epsilon-Amino und Carboxyl verwendet werden. Ein Fachmann ist in der Lage, weitere trifunktionelle Linker zu identifizieren sowie solche Linker zu verwenden, wie hierin angegeben.

[0074] Verlängerermoleküle, die in der vorliegenden Erfindung nützlich sind, sind bifunktionelle Einheiten, die in der Lage sind, sich mit entweder zum Beispiel einer Targetingkomponente und dem Linker oder der Galactose-Cluster-Komponente und dem Linker zu binden. Geeignete Verlängerermoleküle schließen Aminocaproateinheiten, HS-$(CH_2)_n$COOH oder eine aktivierte Esterform davon, wobei n von 1 bis etwa 5 reicht, 4-Aminobutanthiol und dergleichen ein. Ein Fachmann ist in der Lage, weitere geeignete Verlängerermoleküle, wie hierin beschrieben, zu identifizieren und zu verwenden. Alternativ kann die Verlängererfunktion durch einen in geeigneter Weise konstruierten Linker übernommen werden.

[0075] Auch können Bindungserleichterungseinheiten in der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden. Solche Einheiten sind bifunktionell und erleichtern die Bindung der Konjugatkomponenten, z. B. Galactose-Cluster, Targetingeinheit, Bindungseinheit, aktives Agens, Chelat, Linker und Verlängerer. Beispiele für solche Bindungserleichterungseinheiten schließen Harnstoff-Funktionalitäten, Thioharnstoff-Funktionalitäten, Succinat-Brücken, Maleimide und dergleichen ein. Solche Bindungserleichterungseinheiten sind einer Identifizierung und Verwendung durch Fachleute zugänglich.

[0076] Ein Beispiel für ein Linker-Verlängerer-Bindungs-Erleichterungssystem ist unten dargestellt:



wobei das Alpha-Amin des Lysin-Linkers über eine Harnstoff- oder Thioharnstoff-Funktionalität an einen Aminocaproat-Spacer (der sich seinerseits an einen Galactose-Cluster bindet, der nicht dargestellt ist) gebunden ist; das Lysincarboxylat verfügbar ist für Bindung an ein Chelat (nicht dargestellt); und das Epsilon-Amin des Lysin-Linkers verfügbar ist für Bindung eines Lysinrestes der zum Beispiel Targetingkomponente (nicht dargestellt) über eine Succinat-Brücke. Weitere Aminosäurereste der Targetingkomponente, wie etwa Cystein, können ebenfalls für Bindungszwecke eingesetzt werden. Alternativ kann eine Maleimid-S$(CH_2)_n$CO-Bindungserleichterungseinheit-Verlängerer-Kombination eingesetzt werden, um den Zuckerrest mit dem Lysin zu verknüpfen.

[0077] Alternativ kann der Galactose-Cluster mit der Chelatkomponente verknüpft werden, die ihrerseits mit zum Beispiel der Targetingkomponente des Konjugats über zwei oder mehr bifunktionelle Linker verknüpft wird. Vorzugsweise wird die Targetingkomponente, zum Beispiel des Konjugats, als letztes bei der Herstellung eines einen Galactose-Cluster enthaltenden Konjugats gebunden. Geeignete bifunktionelle Linker, wie etwa bis-N,N-(6-(1-hydroxycarbonylhexyl)amin und dergleichen, und Verknüpfungmethodiken können von einem Fachmann identifiziert und eingesetzt werden.

[0078] Vorzugsweise besitzen die auf die Leber zielenden Verbindungen der vorliegenden Erfindung, die konstruiert worden sind, um Stellen im extravaskulären Fluidraum anzuzielen oder im extravaskulären Fluidraum vorhandene Moleküle auszuscheiden, ein ausreichend niedriges Molekulargewicht, um wirkungsvolle Diffusion in den extravaskulären Fluidraum hinein bereitzustellen. Molekulargewichte für solche Einheiten werden vorzugsweise von etwa 1.500 bis etwa 20.000 Daltons reichen.

[0079] Wenn man ein Radionuklid als aktives Agens einsetzt, kann die Herstellung der Komponenten der auf

die Leber zielenden Verbindung über chemische Verfahren entweder vor (Nachbildungsansatz) oder im Anschluß (Vorbildungsansatz) der Komplexierung des Radionuclids mit dem Chelat eintreten. Eine solche Konjugation wird vorzugsweise im Anschluß an Radiometall-Komplexierung durchgeführt, sofern jedoch das im Konjugat eingesetztes Chelat nicht in der Lage ist, das Radionuklid bei Raumtemperatur schnell zu binden.

[0080] Die "Targetingeinheit" der vorliegenden Erfindung bindet sich an eine definierte Target-Zellpopulation, wie etwa Tumorzellen. Bevorzugte Targetingeinheiten, die in dieser Hinsicht nützlich sind, schließen Antikörper oder Antikörperfragmente, Peptide und Hormone ein. Proteine, die bekannten Zelloberflächenrezeptoren entsprechen, (einschließlich low-density-Lipoproteinen, Transferrin und Insulin), fibrinolytische Enzyme, anti-HER2, Thrombozytenbindungsproteine wie etwa Annexine und Modifikatoren der biologischen Reaktion (einschließlich Interleukin, Interferon, Erythropoietin und koloniestimulierenden Faktor) sind ebenfalls bevorzugte Targetingeinheiten. Auch anti-EGF-Rezeptor-Antikörper, die in gewissem Umfang im Anschluß an die Bindung an den Rezeptor und die Wanderung zum Zellkern internalisiert werden, sind bevorzugte Targetingeinheiten zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung, um die Zuführung von Auger-Emittern und Zellkernbindungswirkstoffen zu Target-Zellkernen zu erleichtern. Oligonucleotide, z. B. antisense-oligonucleotide, die komplementär sind zu Abschnitten von Targetzellnucleinsäuren (DNA oder RNA), sind ebenfalls als Targetingeinheiten in der Praxis der vorliegenden Erfindung nützlich. Oligonucleotide, die sich an Zelloberflächen binden, sind ebenfalls nützlich. Analoge der oben aufgelisteten Targetingeinheiten, die die Fähigkeit beibehalten, sind an eine definierte Target-Zellpopulation zu binden, können ebenfalls im Rahmen der beanspruchten Erfindung verwendet werden. Zusätzlich können synthetische Targetingeinheiten konstruiert werden.

[0081] Funktionelle Äquivalente der vorgenannten Moleküle sind ebenfalls als Targetingeinheiten der vorliegenden Erfindung nützlich. Ein funktionelles Äquivalent als Targetingeinheit ist eine "mimetische" Verbindung, ein organisch-chemisches Konstrukt, das konstruiert ist, um die richtige Konfiguration und/oder Orientierung für Targetingeinheit-Target-Zell-Bindung nachzuahmen. Ein weiteres funktionelles Äquivalent als Targetingeinheit ist ein kurzes Polypeptid, das als ein "minimales" Polypeptid konzipiert ist, konstruiert unter Verwendung von computerunterstützter Molekülmodellierung, und Mutanten mit veränderter Bindungsaffinität, wobei diese minimalen Polypeptide die Bindungsaffinität der Targetingeinheit zeigen.

[0082] Bevorzugte Targetingeinheiten der vorliegenden Erfindung sind Antikörper (polyklonal oder monoklonal), Peptide, Oligonucleotide oder dergleichen. Polyklonale Antikörper, die in der Praxis der vorliegenden Erfindung nützlich sind, sind polyklonal (Vial and Callahan, Univ. Mich. Med. Bull., 20: 284–6, 1956), affinitätsgereinigt polyclonal oder Fragmente davon (Chao et al., Res. Comm. in Chem. Path. & Pharm., 9: 749–61, 1974).

[0083] Monoklonale Antikörper, die in der Praxis der vorliegenden Erfindung nützlich sind, schließen vollständige Antikörper und Fragmente davon ein. Solche monoklonalen Antikörper und Fragmente sind herstellbar gemäß herkömmlichen Techniken, wie etwa Hybridoma-Synthese, rekombinanten DNA-Techniken und Proteinsynsthese. Nützliche monoklonale Antikörper und Fragmente können aus jeder Spezies (einschließlich Menschen) gewonnen oder als chimäre Proteine hergestellt werden, die Sequenzen aus mehr als einer Spezies verwenden. Siehe allgemein Kohler and Milstein, Nature, 256: 495–97, 1975; Eur. J. Immunol., 6: 511–19, 1976.

[0084] Menschliche monoklonale Antikörper oder "humanisierte" murine Antikörper sind ebenfalls als Targetingeinheiten gemäß der vorliegenden Erfindung nützlich. Muriner monoklonaler Antikörper kann zum Beispiel durch genetische Rekombination der Nucleotidsequenz "humanisiert" werden, die die murine Fv-Region (d. h. die die Antigen-Bindungsstellen enthält) oder die die Komplementarität bestimmenden Regionen davon kodiert, mit der Nucleotidsequenz, die eine menschliche konstante Domänenregion und eine Fc-Region kodiert, z. B. in einer An und Weise, die ähnlich ist zu derjenigen, die in der europäischen Patentanmeldung Nr. 0 411 893 A 2 offenbart ist. Einige murine Reste können innerhalb der menschlichen Rahmendomänen mit variabler Region auch beibehalten werden, um richtige Targetstellen-Bindungseigenschaften sicherzustellen. Von humanisierten Targetingeinheiten ist anerkannt, daß sie die Immunreaktivität des Antikörpers oder Polypeptids im Wirtsempfänger senken, was einen Anstieg in der Halbwertszeit und eine Verringerung der Möglichkeit nachteiliger Immunreaktionen ermöglicht.

[0085] Typen von aktiven Agentien (diagnostisch oder therapeutisch), die hierin nützlich sind, schließen Toxine, Antitumormittel, Arzneimittel und Radionuklide ein. Mehrere der potenten Toxine, die in der vorliegenden Erfindung nützlich sind, bestehen aus einer A- und einer B-Kette. Die A-Kette ist der zytotoxische Abschnitt und die B-Kette ist der rezeptorbindende Abschnitt des intakten Toxinmoleküls (Holotoxin). Weil die Toxin-B-Kette Nicht-Target-Zellbindung vermitteln könnte, ist es oft vorteilhafter, nur die Toxin-B-Kette an ein Targetingprotein zu konjugieren. Obgleich jedoch die Eliminierung der Toxin-B-Kette nichtspezifische Zytotoxizität verringert, führt sie im allgemeinen auch zu verringerter Potenz des Toxin-A-Ketten-Targeting-Protein-Konjugats, verglichen mit dem entsprechenden Holotoxin-Targeting-Protein-Konjugat.

[0086] Bevorzugte Toxine in dieser Hinsicht schließen Holotoxine, wie etwa Abrin, Ricin, Modeccin, Pseudomonas-Exotoxin A, Diphtheria-Toxin, Husten-Toxin und Shiga-Toxin; und A-Ketten- oder "A-Ketten-ähnliche" Moleküle, wie etwa Ricin-A-Kette, Abrin-A-Kette, Modeccin-A-Kette, den enzymatischen Abschnitt von Pseudomonas-Exotoxin A, Diphtheria-Toxin-A-Kette, den enzymatischen Abschnitt von Husten-Toxin, den enzyma-

tischen Abschnitt von Shiga-Toxin, Gelonin, Kermesbeeren-Antivirus-Protein, Saporin, Tritin, Gersten-Toxin und Schlangengift-Peptide ein. Ribosomale Inaktivierungsproteine (RIPs), natürlich vorkommenden Proteinsyntheseinhibitoren, denen Translokations- und Zellbindungfähigkeit fehlt, sind ebenfalls zur Verwendung hierin geeignet. Extrem hoch toxische Toxine, wie etwa Palytoxin und dergleichen, werden ebenfalls zur Verwendung in der Praxis der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogen.

[0087] Bevorzugte Arzneimittel, die zur Verwendung hierin geeignet sind, schließen herkömmliche Chemotherapeutika, wie etwa Vinblastin, Doxorubicin, Bleomycin, Methotrexat, 5-Fluoruracil, 6-Thioguanin, Cytarabin, Cyclophosphamid und cis-Platinum, sowie andere herkömmliche Chemotherapeutika, wie beschrieben in Cancer: Principles and Practice of Oncology, 2nd ed., V. T. DeVita, Jr., S. Hellman, S. A. Rosenberg, J. B. Lippincott Co., Philadelphia, PA, 1985, Chapter 14 ein. Ein besonders bevorzugtes Arzneimittel in der vorliegenden Erfindung ist ein Trichothecen.

[0088] Trichothecene sind Arzneimittel, die von Bodenpilzen der Klasse Fungi imperfecti erzeugt oder aus Baccharus megapotamica isoliert werden (Bamburg, J. R. Proc. Molec. Subcell. Biol. 8: 41–110, 1983; Jarvis & Mazzola, Acc. Chem. Res. 15: 338–395, 1982). Sie scheinen die toxischsten Moleküle zu sein, die nur Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff enthalten (Tamm, C. Fortschr. Chem. Org. Naturst. 31: 61–117, 1974). Von ihnen allen wird berichtet, daß sie auf dem Niveau des Ribosoms als Inhibitoren der Proteinsynthese in den Inititiations-, Elongations- oder Terminationsphasen wirken.

[0089] Es gibt zwei breite Klassen von Trichothecenen: diejenigen, die nur eine zentrale Sesquiterpenoid-Struktur besitzen, und diejenigen, die einen zusätzlichen makrozyklischen Ring besitzen (einfache bzw. makrozyklische Trichothecene). Die einfachen Trichothecene können in drei Gruppen unterteilt werden (d. h. Gruppe A, B und C), wie beschrieben in U. S.-Patent Nrn. 4,744,981 und 4,906,452 (hierin durch Bezugnahme mit einbezogen). Repräsentative Beispiele für einfache Trichothecene der Gruppe A schließen ein: Scirpen, Roridin C, Dihydrotrichothecen, Scirpen-4,8-Diol, Verrucarol, Scirpentriol, T-2-Tetraol, Pentahydroxyscirpen, 4-Deaceytlneosolaniol, Trichodermin, Deacetylcalonectrin, Calonectrin, Diacetylverrucarol, 4-Monoacetoxyscirpenol, 4,15-Diacetoxyscirpenol, 7-Hydroxydiacetoxyscirpenol (Neosolaniol), 7,8-Dihydroxydiaceatoxyscirpenol, 7-Hydroxy-8-acetyldiacetoxyscirpenol, 8-Acetylneosolaniol, NT-1, NT-2, HT-2, T-2 und Acetyl-T-2-Toxin.

[0090] Repräsentative Beispiele für einfache Trichothecene der Gruppe B schließen ein: Trichothecolon, Trichothecin, Deoxynivalenol, 3-Acetyldeoxynivalenol, 5-Acetyldeoxynivalenol, 3,15-Diacetyldeoxynivalenol, Nivalenol, 4-Acetylnivalenol (Fusarenon-X), 4,15-Diacetylnivalenol, 4,7,15-Triacetylnivalenol und Tetraacetylnivalenol. Repräsentative Beispiele für einfache Trichothecene der Gruppe C schließen ein: Crotocol und Crotocin. Repräsentative makrozyklische Trichothecene schließen Verrucarin A, Verrucarin B, Verrucarin J (Satratoxin C), Roridin A, Roridin D, Roridin E (Satratoxin D), Roridin H, Satratoxin F, Satratoxin G, Satratoxin H, Vertisporin, Mytoxin A, Mytoxin C, Mytoxin B, Myrotoxin A, Myrotoxin B, Myrotoxin C, Myrotoxin D, Roritoxin A, Roritoxin B und Roritoxin D ein. Zusätzlich ist die allgemeine "Trichothecen"-Sesquiterpenoid-Ringstruktur auch in Verbindungen vorhanden, die als "Baccharine" bezeichnet werden, isoliert aus der höheren Pflanze Baccharis megapotamica, und diese sind in der Literatur beschrieben, zum Beispiel wie offenbart von Jarvis et al. (Chemistry of Alleopathy, ACS Symposium Series No. 268: ed. A. C. Thompson, 1984, S. 149–159).

[0091] Experimentielle Arzneimittel, wie etwa Mercaptopurin, N-Methylformamid, 2-Amino-1,3,4-thiadiazol, Melphalan, Hexamethylmelamin, Galliumnitrat, 3% Thymidin, Dichlormethotrexat, Mitoguazon, Suramin, Bromdeoxyuridin, Ioddeoxyuridin, Semustin, 1-(2-Chlorethyl)-3-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1-nitrosoharnstoff, N,N'-Hexamethylenbisacetamid, Azacitidin, Dibromdulcitol, Erwinia-Asparaginase, Ifosfamid, 2-Mercaptoethansulfonat, Teniposid, Taxol, 3-Deazauridin, lösliches Baker-Antifol, Homoharringtonin, Cyclocytidin, Acivicin, ICRF-187, Spiromustin, Levamisol, Chlorozotocin, Aziridinylbenzochinon, Spirogermanium, Aclarubicin, Pentostatin, PALA, Carboplatin, Amsacrin, Caracemid, Iproplatin, Misonidazol, Dihydro-5-azacytidin, 4'-Deoxydoxorubicin, Menogaril, Triciribinphosphat, Fazarabin, Tiazofurin, Teroxiron, Ethiofos, N-(2-Hydroxyethyl)-2-nitro-1H-imidazol-1-acetamid, Mitoxantron, Acodazol, Amonafid, Fludarabinphosphat, Pibenzimol, Didemnin B, Merbaron, Dihydrolenperon, Flavon-8-essigsäure, Oxantrazol, Ipomeanol, Trimetrexat, Deoxyspergualin, Echinomycin und Dideoxycytidin (siehe NCI Investigational Drugs, Pharmaceutical Data 1987, NIH Veröfffentlichungs Nr. 88-2141, Revised November 1987), sind ebenfalls bevorzugt.

[0092] Radionuklide, die in der vorliegenden Erfindung nützlich sind, schließen Gamma-Emitter, Positronen-Emitter, Auger-Elektronen-Emitter, Röntgenstrahlen-Emitter und Fluoreszenz-Emitter ein, wobei Beta- oder Alpha-Emitter für therapeutische Verwendung bevorzugt sind. Radionuklide sind in der Technik gut bekannt und schließen ^{123}I, ^{125}I, ^{130}I, ^{133}I, ^{135}I, ^{47}Sc, ^{72}As, ^{72}Se, ^{90}Y, ^{88}Y, ^{97}Ru, ^{100}Pd, ^{101m}Rh, ^{119}Sb, ^{128}Ba, ^{197}Hg, ^{211}At, ^{212}Bi, ^{153}Sm, ^{169}Eu, ^{212}Pb, ^{109}Pd, ^{111}In, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{75}Br, ^{76}Br, ^{77}Br, ^{99m}Tc, ^{11}C, ^{13}N, ^{15}O, ^{166}Ho Und ^{18}F ein. Bevorzugte therapeutische Radionuklide schließen ^{188}Re, ^{186}Re, ^{203}Pb, ^{212}Pb, ^{212}Bi, ^{109}Pd, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{90}Y, ^{125}I, ^{131}I, ^{77}Br, ^{211}At, ^{97}Ru, ^{105}Rh, ^{198}Au und ^{199}Ag, ^{166}Ho oder ^{177}Lu ein.

[0093] Weitere Antitumormittel, z. B. Mittel, die gegen proliferierende Zellen wirksam sind, sind gemäß der vorliegenden Erfindung verabreichbar. Beispielhafte Antitumormittel schließen Cytokine wie etwa IL-2, Tumornekrosefaktor oder dergleichen, Lectin-Entzündungsreaktionspromotoren (Selectine) wie etwa L-Selectin, E-Selectin, P-Selectin oder dergleichen, und ähnliche Moleküle ein.

[0094] Die Galactose-Cluster-ReAgentien können für die Genzuführung zur Leber nützlich sein. Oligonucleotidsequenzen, die gemäß dieses Aspekts der vorliegenden Erfindung zugeführt werden könnten, schließen transkriptional aktive Gensequenzen und Gensequenzen, die im Antisense-Format als Therapeutika nützlich sind, ein. Die Zuführung von Genen, die transkriptional aktiv sind, ist besonders vorteilhaft, da die Leber sehr metabolisch ist und ein großes Volumen an kardiatischem Blutstromausstoß aufnimmt. Gene, die in der Leber exprimiert werden, transient oder chronisch, und in den Kreislauf sekretiert werden, werden den Körper schnell perfundieren. Folglich kann die Zuführung von Oligonucleotidsequenzen zur Leber dazu dienen, Lebererkrankungen zu lindern, die Vergiftung durch hepatotoxische Agentien in Hepatocyten durch direkte chemische Enttoxifizierung anzugehen oder dazu, als eine Plattform für die Herstellung von Therapeutika dienen, um andere über den Kreislauf zugängliche Leiden zu lindern.

[0095] Bevorzugte aktive Agentien zur Verwendung in der Diagnose oder Behandlung von Leberleiden schließen die folgenden ein: antiparasitische Mittel, Wurmmittel, Anticholesterolmittel, antibakterielle Mittel, Pilzmittel, Gensequenzen, Vitamine, Sulfhydryle (z. B. Cystein, Glutathion), Chelate (z. B. DTPA), Nicotinamid-Co-Faktoren (z. B. NADH, NADPH, NAD und NADP), Glucocorticoide, Alkohol/Aldehyd-Dehydrogenase, Acyclovir, Vidarabin, Interferon-alpha, Corticosteriode und dergleichen. Solche aktiven Agentien können an Hexose-Cluster der vorliegenden Erfindung gemäß Techniken konjugiert werden, die ähnlich sind zu denjenigen, die hierin für alternative Konjugationen solcher Cluster beschrieben sind. Ein Fachmann ist in der Lage, eine solche Konjugation gemäß den Lehren hierin durchzuführen.

[0096] Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfaßt die Herstellung und Verwendung von bispezifischen Agentien zur Verwendung bei der Ausscheidung von zuvor verabreichten Molekülen oder toxischen oder potentiell toxischen Molekülen, die im Kreislauf oder extravaskulären Fluidraum eines Patienten vorhanden sind. Zuvor verabreichte Moleküle können aktives Agens enthaltende Konjugate, Targetingeinheit-Rezeptor-Konjugate (z. B. monoklonalen Antikörper oder Fragment-Ligand oder Antiligand-Konjugate) oder dergleichen einschließen. In diesem Zusammenhang wird das auf die Leber zielende Molekül der vorliegenden Erfindung eingesetzt, um das zuvor verabreichte Molekül von Nicht-Targetstellen zu entfernen.

[0097] Bevorzugte auf die Leber zielende Moleküle der vorliegenden Erfindung sind im Kreislauf vorhanden und sind in der Lage, den extravaskulären Fluidraum zu penetrieren. Folglich sind zuvor verabreichte Verbindungen, die im Kreislauf oder im extravaskulären Fluidraum vorhanden sind, auf die Leber gerichteten Verbindungen der vorliegenden Erfindung zugänglich. Zirkulierende Verbindungen werden über Assoziation mit auf die Leber zielender Verbindung und Entfernung über Leberrezeptoren entfernt. Zuvor verabreichte Verbindungen, die im extravaskulären Fluidraum vorhanden, aber nicht mit einer Targetzelle oder einem Target-Epitop assoziiert sind, werden über Leberrezeptoren entfernt, da solche Verbindungen in Assoziation mit auf die Leber zielenden Verbindungen in den Kreislauf zurückdifundiert werden. Restliche auf die Leber zielende Verbindung, die an ein angezieltes Agens gebunden werden könnte (zum Beispiel Targetingeinheit-Antiligand-Konjugat), sollte über die Zeit dissoziieren, wodurch Zugang zum angezielten Agens für anschließendes verabreichtes Agens, das dazu gedacht ist, daran lokalisiert zu werden, bereitgestellt wird.

[0098] Toxische oder potentiell toxische Moleküle, die aus dem Kreislauf oder extravaskulären Fluidraum eines Empfängers entfernt werden können, schließen ein: Chemotherapeutika (z. B. Alkylatoren), Schwermetalle und dergleichen. Bindungseinheiten, die in der Lage sind, mit toxischen oder potentiell toxischen Molekülen, die im Kreislauf oder extravaskulären Fluidraum eines Empfängers vorhanden sind, zu assoziieren, schließen Antikörper oder Fragmente davon ein, die auf Epitope gerichtet sind, die charakteristisch für ein solches Toxin oder potentielles Toxin sind. Weitere nützliche Bindungseinheiten schließen Oligonucleotide, alle Liganden oder Antiliganden in Pretargeting-Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ein.

[0099] In Pretargeting-Aspekten der vorliegenden Erfindung, bei denen die Bindungseinheit eingesetzt wird, um ein Targetingeinheit-Ligand oder Antiligand-Konjugat aus dem Kreislauf und/oder extravaskulären Fluidraum des Empfängers zu enfernen, werden Charakteristika von nützlichen Bindungseinheiten unten diskutiert. Die Bindung zwischen der Bindungseinheit der auf die Leber zielenden Verbindung und dem aus dem Kreislauf oder extravaskulären Fluidraum auszuscheidenden Moleküle muß nur vorübergehend sein, d. h. für einen ausreichenden Zeitraum, um das Molekül aus Kreislauf oder extravaskulärem Fluidraum in die Leber auszuscheiden. Unter diesen Umständen wird das auf die Leber zielende Molekül der vorliegenden Erfindung eingesetzt, um das toxische oder potentiell toxische Molekül aus dem Kreislauf oder extravaskulären Fluidraum des Patienten zu entfernen.

[0100] Im allgemeinen sollte die Bindungskonstante, die die Wechselwirkung der Bindungseinheit der auf die Leber zielenden Verbindung und des dadurch zu bindenden Moleküls charakterisiert, niedrig genug sein, um die Verweilzeit der auf die Leber zielenden Einheit an Targetstellen kurz zu halten. Auch sollte die Bindungskonstante ausreichend hoch sein, um das zu bindende Molekül einzufangen und dieses Molekül zur Leber zu transportieren. Die Auswahl der idealen Bindungskonstante für die Bindungseinheiten, die in auf die Leber zielenden Verbindungen der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden, hängt von Faktoren ab, welche einschließen:

(i) Ausscheidungsgeschwindigkeit des in-vivo-assoziierten Konstrukts (z. B. monoklonaler Antikörper-Anti-

ligand-Ligand-Galactose-Cluster) durch die Leber; und
(ii) Zeit, bevor ein aktives Agens enthaltendes Konjugat verabreicht wird (in Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung, in denen auf die Leber zielende Verbindungen eingesetzt werden, um zuvor verabreichte Einheiten auszuscheiden).

[0101] Im Hinblick auf Kriterium (i) gilt, daß die Bindungskonstante um so niedriger (schwächer) sein kann, je schneller die Ausscheidungsgeschwindigkeit ist. Im Hinblick auf Kriterium (ii) gilt, daß die Bindungskonstante um so größer (stärker) sein kann, je größer der Zeitraum zwischen der Verabreichung der auf die Leber zielenden Verbindung und des aktives Agens enthaltenden Konjugats ist, damit mehr Zeit für die Dissoziation der Bindungseinheit von angezielten Konstrukten zur Verfügung steht. Für klinische Anwendung sind ein relativ kurzes Zeitintervall und daher eine schwächere Bindungskonstante bevorzugt.
[0102] Bindungseinheiten der vorliegenden Erfindung schließen Liganden, Antiliganden und andere Target-Epitop erkennende Einheiten ein. Ein Fachmann kann annehmbare Einheiten für die Bindungseinheit, die hierin spezifisch diskutiert sind, ersetzen. Bevorzugte Bindungseinheiten sind gekennzeichnet durch ein Molekulargewicht eines Fab-Fragments eines monoklonalen Antikörpers oder niedriger. Solche Bindungseinheiten können auch modifiziert werden, um geeignete funktionelle Gruppen einzuschließen, um Bindung weiterer interessierender Moleküle zu ermöglichen, z. B. Peptide, Proteine, Nucleotide und andere kleine Moleküle.
[0103] Ein anerkannter Nachteil, der mit der in-vivo-Verabreichung von Targetingeinheit-Radioisotop-Konjugaten für Bildgebung oder Therapie verbunden ist, ist die Lokalisierung des gebundenen radioaktiven Agens an sowohl Nicht-Target- als auch Targetstellen. Bis das verabreichte radioaktiv markierte Konjugat aus dem Kreislauf ausgeschieden ist, sind normale Organe und Gewebe vorübergehend dem gebundenen radioaktiven Agens ausgesetzt. Radioaktiv markierte vollständige Antikörper, die in vivo verabreicht werden, zeigen zum Beispiel relativ langsame Blutausscheidung; maximale Targetstellenlokalisierung tritt üblicherweise 1–3 Tage nach Verabreichung ein. Im allgemeinen gilt, daß die radioaktive Einwirkung auf Nicht-Target-Organe um so größer ist, je länger die Ausscheidungszeit des Konjugats aus dem Kreislauf ist. Therapeutische Arzneimittel, allein oder als angezielte Konjugate verabreicht, werden von ähnlichen Nachteilen begleitet.
[0104] Ein Verfahren zur Verringerung der Einwirkung eines diagnostischen oder therapeutischen Agens auf Nicht-Targetgewebe umfaßt ein "Pretargeting" der Targetingeinheit an der Targetstelle und dann anschließend ein Verabreichen eines schnell ausscheidenden Konjugats des diagnostischen oder therapeutischen Agens, das in der Lage ist, sich an die dem "Pretargeting unterzogene" Targetingstelle an der Targetstelle zu binden. Eine Beschreibung einiger Ausführungsformen der Pretargeting-Technik ist zu finden in U.S.-Patent Nr. 4,863,713 (Goodwin et al.).
[0105] "Zweistufige" Pretargeting-Verfahren umfassen die Verabreichung von Targetingeinheit-Ligand oder Targetingeinheit-Antiligand, gefolgt von der Verabreichung von aktivem Agens, konjugiert an das entgegengesetzte Teil des Ligand/Antiligand-Paares. Als ein fakultativer Schritt "1.5" in den zweistufigen Pretargeting-Methoden der vorliegenden Erfindung wird ein Ausscheidungsmittel (vorzugsweise verschieden vom Liganden oder Antiliganden allein) verabreicht, um die Ausscheidung von zirkulierendem, Targetingeinheit-enthaltendem Konjugat zu erleichtern.
[0106] Im zweistufigen Pretargeting-Ansatz wird das Ausscheidungsmittel vorzugsweise nicht an die Target-Zellpopulation gebunden, entweder direkt oder durch das zuvor verabreichte und an die Targetzelle gebundene Targetingeinheit-Antiligand- oder Targetingeinheit-Ligand-Konjugat. Ein Beispiel von zweistufigem Pretargeting umfaßt die Verwendung von biotinyliertem menschlichen Transferrin als einem Ausscheidungsmittel für Avidin-Targetingeinheit-Konjugat, wobei die Größe des Ausscheidungsmittels zu Leberausscheidung von Transferrin-Biotin-zirkulierendem Avidin-Targetingeinheit-Komplexen führt und Assoziation mit den Avidin-Targetingeinheit-Konjugaten, die an Target-Zellstellen gebunden sind, im wesentlichen ausschließt (Siehe Goodwin, D. A., Antibod. Immunoconj. Radiopharm., 4, 427–34, 1991).
[0107] Liganden, die zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, schließen Biotin, Haptene, Lectine, Epitope, dsDNA-Fragmente, Enzyminhibitoren und Analoge und Derivate davon ein. Nützliche komplementäre Antiliganden schließen Avidin (für Biotin), Kohlehydrate (für Lectine) und Antikörper, Fragmente oder Analoge davon, einschließlich Mimetika (für Haptene und Epitope) und Zink-Fingerproteine (für dsDNA-Fragmente) und Enzyme (für Enzyminhibitoren) ein. Bevorzugte Liganden und Antiliganden binden sich aneinander mit einer Affinität von wenigstens etwa k_D 10^9 M. Weitere nützliche Ligand/Antiligand-Systeme schließen S-Protein/S-Peptid, Kopfaktivatorprotein (das sich an sich selbst bindet), Cystatin-C/Cathepsin B und dergleichen ein.
[0108] Ein bevorzugtes Chelatsystem zur Verwendung in der Praxis der vorliegenden Erfindung beruht auf einem 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-N,X',X'',X'''-tetraessigsäure(DOTA)-Konstrukt. Weil DOTA Y-90 und andere Radionuklide stark bindet, ist es vorgeschlagen worden zur Verwendung in Radioimmuntherapie. Für die Therapie ist es sehr wichtig, daß das Radionuklid stabil im DOTA-Chelat gebunden ist und daß das DOTA-Chelat stabil an einen Effektor gebunden ist, wie etwa einen Liganden oder einen Antiliganden.
[0109] Die Strategie für das Design der DOTA-enthaltenden Moleküle und Konjugate zur Verwendung in der

Praxis von Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung, in denen der Effektor Biotin ist, umfaßt drei primäre Überlegungen:

1) in-vivo-Stabilität (einschließlich Biotinidase- und allgemeine Peptidase-Aktivitätsresistenz), mit einem anfänglichen Akzeptanzkriterium von 100% Stabilität für 1 Stunde;
2) Nierenausscheidung; und
3) Einfachheit der Synthese.

[0110] Dieselben oder ähnliche Kriterien sind anwendbar auf alternative Effektoren, wie leicht von einem Fachmann bestätigt werden kann.

[0111] Die DOTA-Biotin-Konjugate, die vorzugsweise in der Praxis der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden, spiegeln die Implementierung einer oder mehrerer der folgenden Strategien wider:

1) Substitution des Kohlenstoffs benachbart zum spaltungsempfindlichen Amid-Stickstoff
2) Alkylierung des spaltungsempfindlichen Amid-Stickstoffs;
3) Substitution des Amid-Carbonyls mit einer Alkylaminogruppe;
4) Einbeziehung von D-Aminosäuren sowie Analogen oder Derivaten davon; oder
5) Einbeziehung von Thioharnstoff-Verknüpfungen.

[0112] DOTA-Biotin-Konjugate gemäß der vorliegenden Erfindung sind beschrieben in der veröffentlichten PCT-Patentanmeldung Nr. PCT/US93/05406. Verfahren zur Herstellung bevorzugter Ausführungenformen von DOTA-Biotin-Konjugaten sind beschrieben in Beispiel III hiervon.

[0113] Die bevorzugten Linker sind nützlich, um DOTA-Konjugate mit Biotin oder anderen kleinen Molekülen herzustellen, mit einem oder mehreren der folgenden Vorteile:

[0114] – binden Avidin oder Streptavidin mit derselben oder im wesentlichen gleichen Affinität wie freies Biotin;

– binden Metall-M^{+3}-Ionen wirkungsvoll und mit hoher kinetischer Stabilität;
– werden primär durch die Nieren in Urin hinein ausgeschieden;
– sind stabil gegenüber endogenem enzymatischen oder chemischen Abbau (z. B. Körperflüssigkeits-Amidasen, -Peptidasen oder dergleichen);
– penetrierten Gewebe rasch und binden sich an einem Pretargeting unterzogenen Avidin oder Streptavidin; und
– werden schnell ausgeschieden, mit einer Ganzkörperverweilhalbwertszeit von weniger als etwa 5 Stunden.

[0115] Eine in einem bevorzugten zweistufigen Pretargeting-Protokoll zu verabreichende Komponente ist ein Targetingeinheit-Antiligand- oder ein Targetingeinheit-Ligand-Konjugat.

[0116] Konjugate aus Streptavidin und proteinhaltiger Targetingeinheit werden vorzugsweise hergestellt, wie beschrieben in Beispiel II unten, wobei die Herstellung die Schritte umfaßt: Herstellung von SMCC-derivatisiertem Streptavidin; Herstellung von DTT-reduzierter proteinhaltiger Targetingeinheit; Konjugation der zwei vorbereiteten Einheiten; und Reinigung des monosubstituierten oder disubstituierten (in Bezug auf Streptavidin) Konjugats von vernetzten (Antikörper-Streptavidin-Antikörper) und aggregierten Spezies und nichtumgesetzten Ausgangsmaterialien. Die gereinigte Fraktion wird vorzugsweise weiter charakterisiert durch eine oder mehrere der folgenden Techniken: HPLC-Größenausschluß, SDS-PAGE, Immunreaktivität, Biotin-Bindungsfähigkeit und in-vivo-Studien.

[0117] Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung stellt Ausscheidungsmittel mit physikalischen Eigenschaften bereit, die die Verwendung für in-vivo-Komplexierung und Blutausscheidung von Antiligand/Ligand(z. B. Avidin/Biotin)-Targetingeinheit(z. B. Anitkörper)-Konjugaten erleichtern. Diese Ausscheidungsmittel sind nützlich zur Verbesserung des Target : Blut-Verhältnisses von Targetingeinheit-Konjugat.

[0118] Weitere Anwendungen dieser Ausscheidungsmittel schließen läsionale Bildgebung oder Therapie, die Blutgerinnsel und dergleichen umfassen, unter Einsatz von Zuführungsmodalitäten für Antikörper oder anderem Targetingvehikle und aktives Agens ein. Wirkungsvolle gerinnungshemmende Mittel liefern zum Beispiel schnelle Targetlokalisierung und hohes Target : Nicht-Target-Targetingverhältnis. In Pretargeting-Protokollen der vorliegenden Erfindung unter Verwendung von Ausscheidungsmitteln verabreichte aktive Agentien werden in der gewünschten Art und Weise angezielt und sind daher nützlich bei Bildgebung/Therapie von Erkrankungen wie etwa Lungenembolie und tiefer Venenthrombose.

[0119] Ausscheidungsmittel, die in der Praxis der vorliegenden Erfindung nützlich sind, zeigen vorzugsweise eines oder mehrere der folgenden Charakteristika:

– schnelle, wirkungsvolle Komplexierung mit Targetingeinheit-Ligand(oder Antiligand)-Konjugat in-vivo;
– schnelle Ausscheidung aus dem Blut von Targetingeinheit-Konjugat, das in der Lage ist, sich an ein anschließend verabreichtes komplementäres Antiligand- oder Ligand-enthaltendes Molekül zu binden;
– hohe Fähigkeit zur Ausscheidung (oder Inaktivierung) großer Mengen von Targetingeinheit-Konjugat; und

– geringe Immungenität.

[0120] In Ausscheidungsmitteln in dieser Erfindung wird der Cluster aus Hexosen (Zuckereinheiten mit sechs Kohlenstoffen) von Ashwell-Rezeptoren oder anderen Rezeptoren, wie etwa dem Mannose/N-Acetylglucosamin-Rezeptor, die mit Endothelzellen und/oder Kupffer-Zellen der Leber assoziiert sind, oder dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor erkannt. Beispielhaft für solche Hexosen sind Galactose, Mannose, Mannose-6-phosphat, N-Acetylglucosamin, Pentamannosylphosphat und dergleichen. Weitere Einheiten, die von Ashwell-Rezeptoren erkannt werden, einschließlich Glucose, N-Galactosamin, N-Acetylgalactosamin, Pentamannosylphosphat, Thioglycosiden von Galactose und allgemein D-Galactosiden und Glucosiden oder dergleichen, können ebenfalls in der Praxis der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Galactose ist das prototypische Ausscheidungsmittel-Hexosederivat für die Zwecke dieser Beschreibung.
[0121] Exponierte Galactosereste des Galactose-Clusters lenken das Ausscheidungsmittel zur schnellen Ausscheidung durch Endozytose in die Leber durch spezifische Rezeptoren dafür (Ashwell-Rezeptoren). Diese Rezeptoren binden das Ausscheidungsmittel und induzieren Endozytose in den Hepatozyten, was zu Fusion mit einem Lysosom und Rückführung des Rezeptors zurück an die Zelloberfläche führt. Dieser Ausscheidungsmechanismus ist gekennzeichnet durch hohe Effizienz, hohe Kapazität und schnelle Kinetiken.
[0122] Bereits entwickelte Ausscheidungsmittel bezogen Humanserumalbumin (HSA) wie folgt ein: $(Hexose)_m$-Humanserumalbumin (HSA)-$(Ligand)_n$, wobei n eine ganze Zahl von 1 bis etwa 10 ist und m eine ganze Zahl von 1 bis etwa 45 ist und wobei die Hexose durch Ashwell-Rezeptoren erkannt wird.
[0123] Die Galactose-Cluster-tragenden Ausscheidungsmittel der vorliegenden Erfindung sind vorzugsweise in der Lage, (1) schnell und effizient mit den relevanten Ligand- oder Antiligand-enthaltenden Konjugaten über Ligand-Antiligand-Affinität zu komplexieren; und (2) solche Komplexe aus dem Blut über den Galactose-Rezeptor, ein leberspezifisches Abbausystem, auszuscheiden, im Gegensatz zur Aggregierung in Komplexe hinein, die vom generalisierten RES-System aufgenommen werden, einschließlich der Lunge und Milz. Zusätzlich ermöglichen die schnellen Kinetiken der Galactose-vermittelten Leberaufnahme, gekoppelt mit der Affinität der Ligand-Antiligand-Wechselwirkung, die Verwendung von zwischengeschalteten Trägern oder sogar Trägern mit niedrigem Molekulargewicht.
[0124] Evaluierungsexperimente für Ausscheidungsmittel, die Galactose- und Biotin-derivatisierte Ausscheidungsmittel umfassen, sind im Detail in Beispiel IV dargestellt. Das in den Experimenten von Beispiel IV untersuchten spezifischen Ausscheidungsmitteln sind Humanserumalbumin, derivatisiert mit Galactose und Biotin, und ein Dextran mit einem Molekulargewicht von 70.000 Dalton, derivatisiert mit sowohl Biotin als auch Galactose. Die Experimente zeigten, daß Proteine und Polymere derivatisierbar sind, um sowohl Galactose als auch Biotin zu enthalten, und daß das resultierende derivatisierte Molekül darin wirksam ist, zirkulierendes Streptavidin-Protein-Konjugat aus dem Serum des Empfängers zu entfernen. Biotin-Beladung wurde variiert, um die Auswirkungen auf sowohl das Ausscheiden von zirkulierendem Avidin-enthaltendem Konjugat aus dem Blutpool als auch die Fähigkeit zu bestimmen, ein anschließend verabreichtes biotinyliertes Isotop zu einer Targetstelle zuzuführen, die vom Streptavidin-enthaltenden Konjugat erkannt wird. Die Wirkung von relativen Dosen der verabreichten Komponenten in Bezug auf die Wirksamkeit des Ausscheidungsmittels wurde ebenfalls untersucht. Experimente, die solche Ausscheidungsmittel mit denjenigen Hexose-Cluster-tragenden Einheiten der vorliegenden Erfindung vergleichen, sind in Beispiel VI unten angegeben.
[0125] Die kleinmolekularen Ausscheidungsmittel sind den proteinhaltigen Ausscheidungsmitteln unter dem Gesichtspunkt der Kosten, Zulassung und Charakterisierung überlegen. Genauer gesagt, sind die kleinmolekularen Ausscheidungsmittel aus verfügbaren oder leicht synthetisierbaren Komponenten herstellbar und sind genauerer Charakterisierung zugänglich. Zusätzlich können, wenn festgestellt wird, daß die Biotinfreisetzung aus dem proteinhaltigen Ausscheidungsmittel problematisch ist, eine solche Freisetzung vermieden oder der Einfluß einer solchen Freisetzung bei Verwendung eines kleinmolekularen Ausscheidungsmittels, das einen hoch stabilen Biotin-Linker umfaßt bzw. ein Biotin-Analog mit niedrigerer Affinität umfaßt, minimiert werden.
[0126] Die vorliegende Erfindung stellt Zucker-Cluster-tragende Ausscheidungsmittel zur Verfügung, die Ligand-Derivate oder Antiligand-Derivate umfassen, wobei solche Derivate eine niedrigere Affinität für das komplementäre Ligand/Antiligand-Paar-Teil zeigen als die native Form der Verbindung (d. h. Liganden oder Antiliganden mit niedrigerer Affinität). In Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung, die ein Biotin-Avidin- oder Biotin-Streptavidin-Ligand/Antiligand-Paar einsetzen, umfassen bevorzugte Zucker-Cluster-tragende Ausscheidungsmittel entweder Biotin mit niedrigerer Affinität (das eine niedrigere Affinität für Avidin oder Streptavidin als natives Biotin zeigt) oder Avidin mit einer niedrigeren Affinität oder ein Streptavidin (das eine niedrigere Affinität für Biotin als natives Avidin oder Streptavidin zeigt).
[0127] Zucker-Cluster-tragende Ausscheidungsmittel, die eine Liganden- oder Antiliganden-Einheit einsetzen, die komplementär zum Ligand/Antiligand-Paar-Teil (das zuvor im Zusammenhang mit der Targetingeinheit verabreicht worden ist) ist, sind nützlich in der Praxis- der vorliegenden Erfindung. Wenn solche Ausscheidungsmittel sich an Hepatozyten lokalisieren, werden sie im allgemeinen schnell abgebaut. Dieser Abbau setzt eine Menge an freien Liganden oder freien Antiliganden in den Kreislauf frei. Diese Bolus-Freisetzung von Li-

gand oder Antiligand kann um Bindungsstellen von Targetingeinheit-Ligand oder Targetingeinheit-Antiligand mit anschließend verabreichtem aktives Agens-Ligand- oder aktives Agens-Antiligand-Konjugat konkurrieren.

[0128] Diese Konkurrenz kann ausgenutzt werden durch Verwendung eines Zucker-Clustertragenden Ausscheidungsmittels, das einen Liganden oder Antiliganden mit niedrigerer Affinität umfaßt. Mit anderen Worten bindet der Ligand oder Antiligand, der in der Struktur des Ausscheidungsmittels eingesetzt wird, sich schwächer an das komplementäre Teil des Ligand/Antiligand-Paares als nativer Ligand oder Antiligand. Folglich können Ligand- oder Antiligand-Derivate mit niedrigerer Affinität, die an Target-lokalisiertes Targetingeinheit-Antiligand- oder Targetingeinheit-Ligand-Konjugat binden, von dem anschließend verabreichten Konjugat aus aktivem Agens und nativem Ligand (oder Ligand mit höherer Bindungsaffinität) oder aktivem Agens und nativem Antiligand (oder Antiligand mit höherer Bindungsaffinität) verdrängt werden.

[0129] In zweistufigen Pretargeting-Protokollen, die das Biotin-Avidin- oder Biotin-Streptavidin-Ligand/Antiligand-Paar einsetzen, können Biotin mit niedrigerer Affinität, Avidin mit niedrigerer Affinität oder Streptavidin mit niedrigerer Affinität eingesetzt werden. Beispielhafte Biotin-Moleküle mit niedrigerer Affinität zeigen zum Beispiel die folgenden Eigenschaften: binden sich an Avidin oder Streptavidin mit einer Affinität von weniger als derjenigen von nativem Biotin (10^{-15}); behalten Spezifität für Bindung an Avidin oder Streptavidin bei; sind nicht-toxisch gegenüber Säuger-Empfängern; und dergleichen. Beispielhafte Avidin- oder Streptavidin-Moleküle mit niedrigerer Affinität zeigen zum Beispiel die folgenden Eigenschaften: binden sich an Biotin mit einer geringeren Affinität als natives Avidin oder Streptavidin; behalten Spezifität für die Bindung an Biotin bei; sind nicht-toxisch gegenüber Säuger-Empfängern; und dergleichen.

[0130] Beispielhafte Biotin-Moleküle mit niedrigerer Affinität schließen 2'-Thiobiotin; 2'-Iminobiotin; 1'-N-Methoxycarbonylbiotin; 3'-N-Methoxycarbonylbiotin; 1-Oxybiotin; 1-Oxy-2'-Thiobiotin; 1-Oxy-2'-Iminobiotin; 1-Sulfoxidbiotin; 1-Sulfoxid-2'-Thiobiotin; 1-Sulfoxid-2'-iminobiotn; 1-Sulfonbiotin; 1-Sulfon-2'-thiobiotin; 1-Sulfon-2'-iminobiotin; Imidazolidon-Derivate wie etwa Desthiobiotin (optische d- und dl-Isomere), dl-Desthiobiotinmethylester, dl-Desthiobiotinol, D-4-n-Hexylimidazolidon, L-4-n-Hexylimidazolidon, dl-4-n-Butylimidazolidon, dl-4-n-Propylimidazolidon, dl-4-Ethylimidazolidon, dl-4-Methylimidazolidon, Imidazolidon, dl-4,5-Dimethylimidazolidon, meso-4,5-Dimethylimidazolidon, dl-Norleucinhydantoin, D-4-n-Hexyl-2-thionoimidazolidin, d-4-n-Hexyl-2-iminoimidazolidin und dergleichen; Oxazolidon-Derivate wie etwa D-4-n-Hexyloxazolidon, D-5-n-Hexyloxazolidon und dergleichen; [5-(3,4-Diaminothiophan-2-yl] pentansäure; Lipoinsäure; 4-Hydroxyazobenzol-2'-carbonsäure und dergleichen, ein. Bevorzugte Biotin-Moleküle mit niedrigerer Affinität zur Verwendung in der Praxis der vorliegenden Erfindung sind 2'-Thiobiotin, Desthiobiotin, 1-Oxybiotin, 1-Oxy-2'-thiobiotin, 1-Sulfoxidbiotin, 1-Sulfoxid-2'-thiobiotin, 1-Sulfonbiotin, 1-Sulfon-2'-thiobiotin, Lipoinsäure und dergleichen. Diese beispielhaften Biotin-Moleküle mit niedrigerer Affinität können im wesentlichen gemäß bekannten Verfahren dafür hergestellt werden. Konjugation der beispielhaften Biotin-Moleküle mit niedrigerer Affinität an Zucker-Cluster-Lenker läuft im wesentlichen in Übereinstimmung mit Verfahren ab, die hierin im Hinblick auf Biotin-Konjugation beschrieben sind.

[0131] Viel ist über die Bindungsaffinität unterschiedlicher Biotin-Analoge an Avidin berichtet worden. Auf der Grundlage dessen, was in der Technik bekannt ist, könnte der Durchschnittsfachmann ohne weiteres bekannte Techniken auswählen oder verwenden, um die entsprechende Bindungsaffinität eines bestimmten Biotin-Analogs an Streptavidin, Avidin oder ein Derivat davon sicherzustellen.

[0132] Die vorliegende Erfindung stellt weiter Methoden zur Erhöhung der Lokalisierung von aktivem Agens an einer Target-Zellstelle eines Säugerempfängers bereit, wobei diese Verfahren einschließen:

Verabreichen eines ersten Konjugats, das eine Targetingeinheit und ein Teil eines Ligand-Antiligand-Bindungspaares umfaßt, an den Empfänger;

danach Verabreichen eines einen Zucker-Cluster tragenden Ausscheidungsmittels, das in der Lage ist, die Ausscheidung von zirkulierendem ersten Konjugat über Hepatozyten-Rezeptoren des Empfängers zu lenken, wobei das Ausscheidungsmittel das komplementäre Teil des Ligand/Antiligand-Bindungspaares mit niedrigerer Affinität umfaßt; und

anschließendes Verabreichen eines zweiten Konjugats an den Empfänger, das ein aktives Agens und ein Teil eines Ligand/Antiligand-Bindungspaares umfaßt, wobei das Teil des Bindungspaares des zweiten Konjugats komplementär zu demjenigen des ersten Konjugats ist und vorzugsweise eine native Form des Teils oder eine Form des Teils mit hoher Affinität darstellt.

[0133] Ausscheidungsmittel der vorliegenden Erfindung können in Einzel- oder Mehrfachdosen oder über kontinuierliche Infusion verabreicht werden. Eine Einzeldosis von biotinyliertem Ausscheidungsmittel erzeugt zum Beispiel eine schnelle Senkung des Spiegels von zirkulierendem Targetingeinheit-Streptavidin, gefolgt von einem kleinen Anstieg dieses Spiegels, vermutlich, zumindest teilweise, verursacht durch erneute Äquilibrierung von Targetingeinheit-Streptavidin in den physiologischen Bereichen des Empfängers. Eine zweite oder zusätzliche Dosis von Ausscheidungsmittel kann dann eingesetzt werden, um ergänzende Ausscheidung von Targetingeinheit-Streptavidin bereitzustellen. Alternativ kann Ausscheidungsmittel intravenös für einen Zeitraum infundiert werden, der ausreichend ist, um Targetingeinheit-Streptavidin in einer kontinuierlichen Art und Weise auszuscheiden.

[0134] Weitere Typen von Ausscheidungsmitteln und Ausscheidungssystemen sind ebenfalls in der Praxis der vorliegenden Erfindung nützlich, um zirkulierendes Konjugat aus Targetingeinheit und Ligand oder Antiligand aus dem Kreislauf des Empfängers zu entfernen.

[0135] Ausscheidungsmittel auf Teilchenbasis werden zum Beispiel in Beispiel I diskutiert. Solche Ausscheidungsmittel auf Teilchenbasis können im Zusammenhang mit Zucker-Clustern eingesetzt werden, um auf die Leber zielende Verbindungen der vorliegenden Erfindung bereitzustellen.

[0136] Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, bei der schnell wirkende Zucker-Cluster-Lenker-tragende Ausscheidungsmittel nützlich sind, ist bei der Zuführung von Auger-Emittern, wie etwa I-125, I-123, Er-165, Sb-119, Hg-197, Ru-97, TI-201 und I-125 und Br-77, oder Zellkern-bindenden Arzneimitteln an Target-Zellkerne nützlich. In diesen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden Targetingeinheiten, die sich an internalisierende Rezeptoren auf Target-Zelloberflächen lokalisieren, eingesetzt, um ein Targetingeinheit-enthaltendes Konjugat (d. h. ein Konjugat aus Targetingeineheit und Antiligand im bevorzugten zweistufigen Protokoll) zur Target-Zellpopulation zuzuführen. Solche internalisierenden Rezeptoren schließen EGF-Rezeptoren, Transferrin-Rezeptoren, HER2-Rezeptoren, IL-2-Rezeptoren, andere Interleukine und Cluster-Differenzierungsrepeztoren, Somatostatin-Rezeptoren, andere Peptid-Bindungsrezeptoren und dergleichen ein.

[0137] Nach Ablauf eines Zeitraums, der ausreichend ist, um die Lokalisierung des Konjugats an Target-Zellen zu erreichen, aber unzureichend, um die Internalisierung solcher zielenden Konjugate durch diese Zellen durch ein Rezeptor-vermitteltes Ereignis zu induzieren, wird ein schnell wirkendes Zucker-Cluster-Lenker-tragendes Ausscheidungsmittel verabreicht. In einem bevorzugten zweistufigen Protokoll wird ein ein aktives Agens enthaltendes Ligandoder Anitligand-Konjugat, wie etwa ein Biotin-Auger-Emitter oder ein Biotinzellkernwirksames Arzneimittel, verabreicht, sobald dem Ausscheidungsmittel die Gelegenheit gegeben worden ist, mit zirkulierenden Targetingeinheit enthaltendem Konjugat zu komplexieren, wobei die Zeitverzögerung zwischen Verabreichung des Ausscheidungsmittels und des aktiven Agens weniger als etwa 24 Stunden beträgt. Auf diese Weise wird aktives Agenz schnell durch Target-Zellrezeptor-vermittelte Internalisierung internalisiert. Obgleich zirkulierende Auger-Emitter als nicht-toxisch angesehen werden, erhöht das schnelle, spezifische Targeting, das durch die Pretargeting-Protokoller der vorliegenden Erfindung erreicht wird, das Potential von Auger-Emittern mit kürzerer Halbwertszeit, wie etwa I-123, das verfügbar und zu stabiler Bindung in der Lage ist.

[0138] Die Erfindung wird weiter durch Präsentation der folgenden Beispiele beschrieben. Diese Beispiele werden zur Veranschaulichung und nicht zur Beschränkung angeboten.

Beispiel I

Teilchenförmige Ausscheidungsmittel

[0139] Die Ausscheidung von chimärem monoklonaler Antikörper-Avidin wird erleichtert durch Verabreichung eines teilchenförmigen Ausscheidungsmittels (z. B. eines polymeren Teilchens mit mehreren daran gebundenen Biotin-Molekülen). Solch ein teilchenförmiges Ausscheidungsmittel stellt vorzugsweise einen biologisch abbaubaren polymeren Träger mit mehreren daran gebundenen Biotin-Molekülen dar. Teilchenförmige Ausscheidungsmittel der vorliegenden Erfindung zeigen die Fähigkeit, sich an zirkulierendes verabreichtes Konjugat zu binden und dieses Konjugat aus dem Empfänger zu entfernen. Teilchenförmige Ausscheidungsmittel dieses Aspektes der vorliegenden Erfindung können jede Konfiguration aufweisen, die für diesen Zweck geeignet ist. Bevorzugte teilchenförmige Ausscheidungsmittel zeigen eines oder mehrere der folgenden Charakteristika:

– Mikroteilchen (z. B. von etwa 0,5 Mikrometer bis etwa 100 Mikrometer im Durchmesser, wobei von etwa 0,5 bis etwa 2 Mikrometer bevorzugter ist), freifließende Pulverstruktur;

– biologisch abbaubare Struktur, die so konstruiert ist, daß sie sich über einen Zeitraum zwischen etwa 3 bis etwa 180 Tagen biologisch abbaut, wobei von etwa 10 bis etwa 21 Tage bevorzugter ist, oder biologisch nicht-abbaubare Struktur;

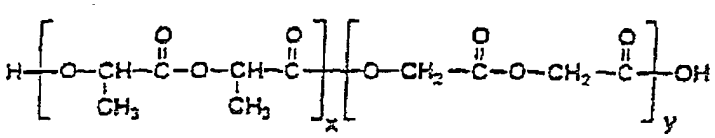
– biologisch kompatibel mit der Physiologie des Empfängers über den Verlauf der Verteilung, des Stoffwechsels und der Ausscheidung des Ausscheidungsmittels, bevorzugter einschließlich biologisch kompatiblen Produkten des biologischen Abbaus;

– und Fähigkeit, sich mit einem oder mehreren zirkulierenden Konjugaten zu binden, um die Eliminierung und Entfernung derselben aus dem Empfänger zu erleichtern, durch eine oder mehrere Bindungseinheiten (vorzugsweise das komplementäre Teil des Ligand/Antiligand-Paares). Die gesamte molare Bindungsfähigkeit der teilchenförmigen Ausscheidungsmittels hängt ab von der ausgewählten Teilchengröße und dem Ligand- oder Antiligand-Substitutionsverhältnis. Die Bindungseinheiten sind in der Lage, sich an die Oberflächenstruktur der teilchenförmigen Dosierungsform durch kovalente oder nicht-kovalente Modalitäten zu koppeln, wie hierin angegeben, um zugänglichen Ligand oder Antiligand zur Bindung an sein zuvor verab-

reichtes zirkulierendes Teil des Bindungspaares bereitzustellen.

[0140] Bevorzugte teilchenförmige Ausscheidungsmittel der vorliegenden Erfindung sind biologisch abbaubare oder biologisch nicht-abbaubare Mikroteilchen. Bevorzugter werden die teilchenförmigen Ausscheidungsmittel hergestellt aus einer polymerhaltigen Matrix, die sich durch statistische, nicht-enzymatische, hydrolytische Aufspaltung biologisch abbaut.

[0141] Aus der Kondensation von Alpha-Hydroxycarbonsäuren und verwandten Lactonen abgeleitete Polymere sind bevorzugter zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung. Eine besonders bevorzugte Einheit wird hergestellt aus einer Mischung von thermoplastischen Polyestern (z. B. Polylactid oder Polyglycolid) oder einem Copolymer von Lactid- und Glycolid-Komponenten, wie etwa Poly(lactid-co-glycolid). Eine beispielhafte Struktur, ein statistisches Poly(DL-lactid-co-glycolid), ist unten dargestellt, wobei die Werte für x und y von einem Fachmann einstellbar sind, um wünschenswerte Mikroteilcheneigenschaften zu erreichen.



[0142] Andere Agentien, die geeignet sind zur Herstellung teilchenförmiger Ausscheidungsmittel der vorliegenden Erfindung, schließen Polyorthoester und Polyacetate (Polymer Letters. 18: 293, 1980) und Polyorthocarbonate (U. S. Patent Nr. 4,093,709) und dergleichen ein.

[0143] Bevorzugte Milchsäure/Glycolsäure-Polymer-enthaltende Matrixteilchen der vorliegenden Erfindung werden hergestellt durch Verfahren auf Emulsionsbasis, die modifizierte Lösemittelextraktionsverfahren darstellen, wie etwa diejenigen, die beschrieben sind von Cowsar et al., "Poly(lactide-co-glycolide) Microcapsules for Controlled Release of Steroids", Methods Enzymology, 112: 101–116, 1985 (Steroid-Einschluß in Mikroteilchen); Eldridge et al., "Biodegradable and Biocompatible Poly(DL-lactide-co-glycolide) Microspheres as an Adjuvant for Staphylococcal Enterotoxin B Toxoid Which Enhances the Level of Toxin-Neutralizing Antibodies", Infection and Immunity, 59: 2978–2986, 1991 (Toxoid-Einschluß); Cohen et al., "Controlled Delivery Systems for Proteins Based on Poly(Lactic/Glycolic Acid} Microspheres", Pharmaceutical Research, 8(6): 713–720, 1991 (Enzym-Einschluß); und Sanders et al. "Controlled Release of a Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Analogue from Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) Microspheres", 7. Pharmaceutical Science, 73(9): 1294-1297, 1984 (Peptid-Einschluß).

[0144] Im allgemeinen umfaßt das Verfahren zur Herstelluug von teilchenförmigen Ausscheidungsmitteln der vorliegenden Erfindung das Auflösen des Polymers in einem halogenierten Kohlenwasserstoff-Lösemittel und das Zugeben eines zusätzlichen Agens, das als ein Lösemittel für das halogenierte Kohlenwasserstoff-Lösemittel wirkt, aber nicht für das Polymer. Das Polymer fällt aus der Lösung von Polymer in halogeniertem Kohlenwasserstoff aus. Im Anschluß an die Teilchenbildung werden diese mit einen organischen Lösemittel gewaschen und gehärtet. Es folgen Waschschritte mit Wasser und wässrigem nicht-ionischen Tensid, vor Trocknen bei Raumtemperatur unter Vakuum.

[0145] Für Zwecke der biologischen Kompatibilität werden teilchenförmige Ausscheidungsmittel vor der Verpackung, Lagerung oder Verabreichung sterilisiert. Sterilisation kann in jeder geeigneten Weise dafür durchgeführt werden. Die Teilchen können zum Beispiel mit Gamma-Strahlung bestrahlt werden, vorausgesetzt, daß die Einwirkung solcher Strahlung die Struktur oder Funktion der daran gebundenen Bindungseinheit nicht nachteilig beeinflußt. Wenn die Bindungseinheit so nachteilig beeinflußt wird, können die teilchenförmigen Ausscheidungsmittel unter sterilen Bedingungen hergestellt werden.

[0146] Die bevorzugte Lactid/Glycolid-Struktur ist mit der physiologischen Umgebung von Säugern biologisch kompatibel. Auch haben diese bevorzugten Dosierungsformen mit verzögerter Freisetzung den Vorteil, daß der biologische Abbau derselben Milchsäure und Glycolsäure erzeugt, beides normale Stoffwechselprodukte von Säugern.

[0147] Funktionelle Gruppen, die für die Bindung zwischen Bindungseinheit und Teilchen erforderlich sind, werden fakultativ in die Teilchenstruktur einbezogen, zusammen mit den nicht-abbaubaren oder biologisch abbaubaren polymeren Einheiten. Funktionelle Gruppen, die für diesen Zweck ausnutzbar sind, schließen diejenigen ein, die mit Liganden oder Antiliganden und Hexose-Cluster-LenkerreAgentien reaktiv sind, wie etwa Carboxylgruppen, Amingruppen, Sulfhydrylgruppen und dergleichen. Bevorzugte Einheiten zur Verstärkung der Bindung schließen die terminalen Carboxylgruppen in der bevorzugten (Lactid-Glycolid)-Polymer-enthaltenden Matrix oder dergleichen ein. Ein Praktiker auf diesem Gebiet ist in der Lage, geeignete funktionelle Gruppen auszuwählen und Konjugationsreaktionen zu überwachen, die diese funktionellen Gruppen einschließen.

[0148] Vorteile, die durch die Verwendung von teilchenförmigen Ausscheidungsmitteln des oben beschriebenen Typs gewonnen werden, sind wie folgt:

– Teilchen im "Mikron"-Größenbereich lokalisieren sich im RES und in der Leber, wobei Galactose-Deriva-

tisierungs- oder Ladungsmodifikations-Verstärkungsverfahren für diese Eigenschaft verfügbar sind, und sind vorzugsweise so konzipiert, daß sie für eine ausreichende Zeit im Kreislauf verbleiben, um die Ausscheidungsfunktion zu erfüllen;
– die Größe der Teilchen erleichtert Retention derselben in zentralen vaskulären Bereichen, wodurch Äquilibration in die peripheren oder extravaskulären Bereiche hinein im wesentlichen ausgeschlossen wird;
– gewünschte Substituenten für Liganden- oder Antiligandenbindung an die Teilchen können in die polymere Struktur einbezogen werden;
– Liganden- oder Antiliganden-Teilchen-Verknüpfungen mit gewünschten Eigenschaften (z. B. Serum-Biotinidase-Resistenz, wodurch die Freisetzung von Biotin-Metabolit aus einem Teilchen-Biotin-Ausscheidungsmittel verringert wird) und
– mehrere Liganden oder Antiliganden können an die Teilchen gebunden werden, um optimale Vernetzung von zirkulierendem Targetingmittel Ligand- oder -Antiligand-Konjugat und effiziente Ausscheidung von vernetzten Spezies zu erreichen. Dieser Vorteil wird am besten erreicht, wenn Sorgfalt darauf verwendet wird, die Teilchenaggregation sowohl bei Lagerung als auch bei in vivo-Verabreichung zu verhindern.

Beispiel II

Targetingeinheit-Antiligand-Konjugat für zweistufiges Pretargeting in vivo

A. Herstellung von SMCC-derivatisiertem Streptavidin.

[0149] 31 mg (0,48 mol) Streptavidin wurden in 9,0 ml PBS gelöst, um eine Endlösung mit 3,5 mg/ml herzustellen. Der pH der Lösung wurde durch Zugabe von 0,9 ml 0,5 M Boratpuffer, pH 8,5, auf 8,5 eingestellt. Eine DMSO-Lösung von SMCC (3,5 mg/ml) wurde hergestellt und 477 ml (4,8 mol) dieser Lösung wurden tropfenweise zur verwirbelten Proteinlösung zugegeben. Nach 30 Minuten Rühren wurde die Lösung mit G-25(PD-10, Pharmacia, Picattaway, New Jersey)-Säulenchromatographie gereinigt, um nicht-umgesetztes oder hydrolysiertes SMCC zu entfernen. Das gereinigte SMCC-derivatisierte Streptavidin wurde isoliert (28 mg, 1,67 mg/ml).

B. Herstellung von DTT-reduziertem NR-LU-10.

[0150] Zu 77 mg NR-LU-10 (0,42 mol) in 15,0 ml PBS wurden 1,5 ml 0,5 M Boratpuffer, pH 8,5, zugegeben. Eine DTT-Lösung, mit 400 mg/ml, (165 ml) wurde zur Proteinlösung zugegeben. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 30 Minuten wurde der reduzierte Antikörper durch G-25-Ausschlußchromatographie gereinigt. Gereinigtes DTT-reduziertes NR-LU-10 wurde erhalten (74 mg, 2,17 mg/ml).

C. Konjugation von SMCC-Streptavidin an DTT-reduziertes NR-LU-10.

[0151] DTT-reduziertes NR-LU-10 (63 mg, 29 ml, 0,42 mol) wurde mit 44,5 ml PBS verdünnt. Die Lösung von SMCC-Streptavidin (28 mg, 17 ml, 0,42 mol) wurde schnell zur rührenden Lösung von NR-LU-10 zugegeben. Die Gesamtproteinkonzentration in der Reaktionsmischung betrug 1,0 mg/ml. Der Fortgang der Reaktion wurde mit HPLC überwacht (Zorbax®GF-250, erhältlich von MacMod). Nach etwa ungefähr 45 Minuten wurde die Reaktion durch Zugeben von festem Natriumtetrathionat bis zu einer Endkonzentration von 5 mM gelöscht.

D. Reinigung des Konjugats.

[0152] Für Reaktionen im kleinen Maßstab wurde monosubstituiertes oder disubstituiertes (im Hinblick auf Streptavidin) Konjugat unter Verwendung von (präparativer) HPLC-Zorbax-Ausschlußchromatographie erhalten. Das gewünschte monosubstituierte oder disubstituierte Konjugatprodukt eluierte bei 14,0–14,5 min (3,0 ml/min Durchflußgeschwindigkeit), während nicht-umgesetztes NR-LU-10 bei 14,5–15 min eluierte und nicht-umgesetztes derivatisiertes Streptavidin bei 19–20 min eluierte.
[0153] Für Konjugationsreaktionen in größerem Maßstab ist monosubstituiertes oder disubstituiertes Addukt unter Verwendung von DEAE-Ionenaustauschchromatographie isolierbar. Nach Konzentration der rohen Konjugatmischung wurde freies Streptavidin daraus durch Eluieren der Säule mit 2,5% Xylitol in Natriumboratpuffer, pH 8,6, entfernt. Der gebundene nichtumgesetzte Antikörper und das gewünschte Konjugat wurden dann sequentiell aus der Säule unter Verwendung eines ansteigenden Salzgradienten in 20 mM Diethanolamin, mit Natriumhydroxid auf pH 8,6 eingestellt, eluiert.

E. Charakterisierung des Konjugats.

1. HPLC-Ausschluß wurde durchgeführt, wie oben im Hinblick auf Reinigung im kleinen Maßstab beschrieben.
2. SDS-PAGE-Analyse wurde durchgeführt unter Verwendung von 5% Polyacrylamidgelen unter nicht-denaturierenden Bedingungen. Zu bewertende Konjugate wurden nicht in Probenpuffer gekocht, der SDS enthielt, um Dissoziation von Streptavidin in seine 15 kD-Untereinheiten zu vermeiden. Zwei Produktbanden wurden auf dem Gel beobachtet, die den mono- und disubstituierten Konjugaten entsprachen.
3. Immunreaktivität wurde bestimmt, zum Beispiel durch kompetitiven Bindungs-ELISA, verglichen mit freiem Antikörper. Die erhaltenen Werte lagen innerhalb 10% derjenigen für den freien Antikörper.
4. Biotin-Bindungsfähigkeit wurde bestimmt, zum Beispiel durch Titrieren einer bekannten Menge Konjugat mit p-[I-125]-Iodbenzoylbiocytin. Sättigung der Biotin-Bindungsstellen wurde bei Zugabe von 4 Äquivalenten des markierten Biocytins beobachtet.
5. In vivo-Studien sind nützlich, um das Reaktionsprodukt zu charakterisieren, wobei diese Studien zum Beispiel Serumausscheidungsprofile, Fähigkeit des Konjugats, antigen-positive Tumore anzuzielen, Tumorretention des Konjugats über die Zeit und die Fähigkeit eines biotinylierten Moleküls, Streptavidin-Konjugat an den Tumor zu binden, einschließen.

[0154] Diese Daten erleichtern die Feststellung, daß die Synthese zur Bildung eines 1 : 1-Streptavidin-NR-LU-10-Vollantikörper-Konjugats führte, das Blutausscheidungseigenschaften zeigt, die ähnlich sind zu nativem NR-LU-10-Vollantikörper, und Tumoraufnahme- und -retentionseigenschaften, die wenigstens gleich sind zu nativem NR-LU-10.
[0155] **Fig.** 1 zeigt zum Beispiel das Tumoraufnahmeprofil des NR-LU-10-Streptavidin-Konjugats (LU-10-StrAv) im Vergleich mit einem Kontrollprofil von nativem NR-LU-10-Vollantikörper. LU-10-StrAv wurde nur auf der Streptavidin-Komponente radioaktiv markiert, was einen klaren Hinweis liefert, daß LU-10-StrAv sich so effizient wie NR-LU-10-Vollantikörper selbst zu Targetzellen lokalisiert.

Beispiel III

Synthese von DOTA-Biotin-Konjugaten

A. Synthese von Nitro-Benzol-DOTA.

[0156] Die Synthese von Aminobenzyl-DOTA wurde im wesentlichen gemäß dem Verfahren von McMurry et al., Bioconjugate Chem., 3: 108–117, 1992, durchgeführt. Der kritische Schritt in der Synthese nach dem Stand der Technik ist die intermolekulare Zyklisierung zwischen Disuccinimidyl-N-(tert-butoxycarbonyl)iminodiacetat und N-(2-Aminoethyl)-4-nitrophenylalaninamid, um 1-(tert-Butoxycarbonyl)-5-(4-nitrobenzyl)-3,6,11-trioxo-1,4,7,10-tetraazacyclododecan herzustellen. Mit anderen Worten ist der kritische Schritt die intermolekulare Zyklisierung zwischen dem Bis-NHS-Ester und dem Diamin, um das zyklisierte Dodecan zu ergeben. McMurry et al. führten den Zyklisierungsschritt in einem Maßstab von 140 mmol durch, wobei jedes der ReAgentien in 100 ml DMF gelöst und über eine Spritzenpumpe über 48 Stunden zu einem Reaktionsgefäß hinzugegeben wurde, das 4 Liter Dioxan enthielt.
[0157] Ein 5-faches Upscaling des Verfahrens von McMurry et al. war nicht praktisch im Hinblick auf Reaktionsvolumen, Zugabegeschwindigkeit und Reaktionszeit. Prozeßchemiestudien zeigten, daß die Reaktionszugabegeschwindigkeit substantiell erhöht werden konnte und daß das Lösemittelvolumen stark verringert werden konnte, während eine ähnliche Ausbeute des gewünschten Zyklisierungsproduktes immer noch erhalten wurde. Folglich wurde, bei einem 30 mmol-Maßstab, jedes der ReAgentien in 500 ml DMF gelöst und über Tropftrichter über 27 Stunden zu einem Reaktionsgefäß zugegeben, das 3 Liter Dioxan enthielt. Die Zugabegeschwindigkeit des eingesetzten Verfahrens umfaßte eine Zugabegeschwindigkeit von 5,18 mmol/Stunde und eine Rekationskonzentration von 0,047 M.

B. Synthese eines N-Methylglycin-verknüpften Konjugats.

[0158] Das N-Methylglycin-verknüpfte DOTA-Biotin-Konjugat wurde mit einem analogen Verfahren zu demjenigen hergestellt, das verwendet wurde, um D-Alanin-verknüpfte DOTA-Biotin-Konjugate herzustellen. N-Methylglycin (Trivialname Sarcosin, erhältlich von Sigma Chemical Co.) wurde mit Biotin-NHS-Ester in DMF und Triethylamin kondensiert, um N-Methylglycylbiotin zu erhalten. N-Methylglycylbiotin wurde anschließend mit EDCI und NHS aktiviert. Der resultierende NHS-Ester wurde nicht isoliert und wurde in situ mit DOTA-Anilin und einem Überschuß Pyridin kondensiert. Die Reaktionslösung wurde bei 60°C für 10 Minuten erhitzt und anschließend eingedampft. Der Rückstand wurde durch präparative HPLC gereinigt, um [(N-Methyl-N-Bioti-

nyl)-N-Glycyl]-Aminobezyl-DOTA zu ergeben.

1. Herstellung von (N-Methyl)glycylbiotin. DMF (8,0 ml) und Triethylamin (0,61 ml, 4,35 mmol) wurden zu festem N-Methylglycin (182 mg, 2,05 mmol) und N-Hydroxysuccinimidylbiotin (500 mg, 1,46 mmol) zugegeben. Die Mischung wurde für 1 Stunde in einem Ölbad bei 85°C erhitzt, wobei sich während dieser Zeit die Feststoffe lösten, wodurch eine klare und farblose Lösung erzeugt wurde. Die Lösemittel wurden anschließend verdampft. Der gelbe Ölrückstand wurde mit Eisessig angesäuert, eingedampft und auf einer 27 mm langen Säule, gepackt mit 50 g Silica unter Elution mit 30% McOH/EtOAc 1% HOAc chromatographiert, um das Produkt als einen weißen Feststoff (383 mg) in 66% Ausbeute zu ergeben.
H-NMR (DMSO): 1,18–1,25 (m, 6H, $(CH_2)_3$), 2,15, 2,35 (2 t's, 2H, CH_2CO), 2,75 (m, 2H, SCH_2), 2,80, 3,00 (2s's, 3H, NCH_3), 3,05–3,15 (m, 1H, SCH), 3,95, 4,05 (2 s's, 2H, CH_2N), 4,15, 4,32 (2m's, 2H, 2CHN's), 6,35 (s, NH), 6,45 (s, NH).

2. Herstellung von [(N-Methyl-N-biotinyl)glycyl]aminobenzyl-DOTA. N-Hydroxysuccinimid (10 mg, 0,08 mmol) und EDCI (15 mg, 6,08 mmol) wurden zu einer Lösung von (N-Methylglycyl)biotin (24 mg, 0,08 mmol) in DMF (1,0 ml) zugegeben. Die Lösung wurde bei 23°C für 64 Stunden gerührt. Pyridin (0,8 ml) und Aminobenzyl-DOTA (20 mg, 0,04 mmol) wurden hinzugegeben. Die Mischung wurde in einem Ölbad bei 63°C für 10 Minuten erhitzt, anschließend bei 23°C für 4 Stunden gerührt. Die Lösung wurde eingedampft. Der Rückstand wurde durch präparative HPLC gereinigt, um das Produkt als einen schmutzig-weißen Feststoff (8 mg, 0,01 mmol) um 27% Ausbeute zu ergeben.
H-NMR (D_2O): 1,30–1,80 (m, 6H), 2,40, 2,55 (2t's, 2H, CH_2CO), 2,70–4,2 (komplexes Multiplett), 4,35 (m, CHN), 4,55 (m, CHN), 7,30 (m, 2H, Benzol-Wasserstoffe), 7,40 (m, 2H, Benzol-Wasserstoffe).

Beispiel IV Ausscheidungsmittel-Bewertungsexperimente

A. Galactose- und Biotin-Derivatisierung von Humanserum albumin (HSA).

[0159] HSA wurde bewertet, weil es die Vorteile zeigt, sowohl preiswert als auch nicht-immunogen zu sein. HSA wurde mit variierenden Mengen Biotin (1 bis etwa 9 Biotine/Molekül) über analoge Chemie zu derjenigen derivatisiert, die zuvor im Hinblick auf AO beschrieben ist. Genauer gesagt, wurde zu einer Lösung von HSA, erhältlich von Sigma Chemical Co., (5–10 mg/ml in PBS) 10% v/v 0,5 M Natriumboratpuffer, pH 8,5, zugegeben, gefolgt von tropfenweiser Zugabe einer DMSO-Lösung von NHS-LC-Biotin (Sigma Chemical Co.) zur gerührten Lösung mit dem gewünschten molaren Angebot (relative molare Äquivalente der Reaktanten). Der endgültige Prozentanteil DMSO in der Reaktionsmischung sollte 5% nicht übersteigen. Nach Rühren für 1 Stunde bei Raumtemperatur war die Reaktion abgeschlossen. Eine 90%-ige Einbaueffizienz für Biotin auf HSA wurde im allgemeinen beobachtet. Als ein Ergebnis wurden, wenn 3-molare Äquivalente des NHS-Esters von LC-Biotin eingebracht wurden, etwa 2,7 Biotine pro HSA-Molekül erhalten. Nicht-umgesetztes Biotin-Reagenz wurde aus dem Biotin-derivatisierten HSA unter Verwendung von G-25-Ausschlußchromatographie entfernt. Alternativ kann das Rohmaterial direkt galactosyliert werden. Dieselbe Chemie ist anwendbar auf die Biotinylierung von zuvor nicht biotinyliertem Dextran.

[0160] HSA-Biotin wurde anschließend mit von 12 bis 45 Galactosen/Molekül derivatisiert. Galactose-Derivatisierung des biotinylierten HSA wurde gemäß dem Verfahren von Lee et al., Biochemistry, 15: 3956, 1976 durchgeführt. Genauer gesagt, wurde eine 0,1 M methanolische Lösung von Cyanomethyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio-D-galactopyranosid hergestellt und mit einer 10% v/v 0,1 M NaOMe in Methanol für 12 Stunden umgesetzt, um das reaktive Galactosylthioimidat zu erzeugen. Die Galactosylierung von biotinyliertem HSA begann mit anfänglicher Verdampfung des wasserfreien Methanols aus einem 300-fachen molaren Überschuß von reaktivem Thioimidat. Biotinyliertes HSA in PBS, gepuffert mit 10% v/v 0,5M Natriumborat, wurde zum öligen Rückstand zugegeben. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 2 Stunden wurde die Mischung bei 4°C für 12 Stunden aufbewahrt. Das galactosylierte HSA-Biotin wurde dann durch G-25-Ausschlußchromatographie oder durch Pufferaustausch gereinigt, um das gewünschte Produkt zu liefern. Dieselbe Chemie ist ausnutzbar für die Galactolysierung von Dextran. Die Einbaueffizienz von Galactose auf HSA ist ungefähr 10%.

[0161] 70 Mikrogramm Galactose-HSA-Biotin (G-HSA-B), mit 12–45 Galactoseresten und 9 Biotinen, wurde Mäusen verabreicht, denen 200 Mikrogramm StrAv-MAb oder 200 Mikroliter PBS 24 Stunden zuvor verabreicht worden waren. Die Ergebnisse zeigten, daß G-HSA-B wirksam darin ist, StrAv-MAb aus dem Kreislauf zu entfernen. Auch waren die Pharmakokinetiken von G-HSA-B ungestört und schnell bei Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von zirkulierendem MAb-StrAv.

B. Nicht-Protein-Ausscheidungsmittel.

[0162] Eine kommerziell erhältliche Form von Dextran, Molekulargewicht 70.000 Daltons, vorderivatisiert mit ungefähr 18 Biotinen/Molekül und mit einer äquivalenten Anzahl von freien primären Aminen, wurde untersucht. Die primären Amineinheiten wurde mit einem Galactosylierungsreagenz derivatisiert, im wesentlichen

gemäß dem Verfahren dafür, das bei der Diskussion von Ausscheidungsmitteln auf HSA-Basis beschrieben ist, auf einem Niveau von etwa 9 Galactosen/Molekül. Das molare Äquivalenz-Angebotsverhältnis von Galactose zu HSA war etwa 300 : 1, wobei etwa ein Drittel der Galactose in die aktive Form umgewandelt wurde. 40 Mikrogramm Galactose-Dextran-Biotin (GAL-DEX-BT) wurden anschließend i. v. einer Gruppe von Mäusen injiziert, die 24 Stunden zuvor 200 Mikrogramm MAb-StrAv-Konjugat intravenös erhalten hatten, während 80 Mikrogramm GAL-DEX-BT weiteren derartigen Mäusen injiziert wurden. GAL-DEX-BT war schnell und effizient darin, StrAv-MAb-Konjugat auszuscheiden, wobei über 66% des zirkulierenden Konjugats in weniger als 4 Stunden nach Verabreichung des Ausscheidungsmittels entfernt waren. Ein äquivalenter Effekt war zu sehen bei beiden Ausscheidungsmitteldosen, die dem 1,6(40 Mikrogramm)- und 3,2(80 Mikrogramm)-fachen der stöchiometrischen Menge von vorhandenem zirkulierenden StrAv-Konjugat entsprachen.

C. Dosisbereiche für G-HSA-B-Ausscheidungsmittel:

[0163] Dosisbereichstudien folgten dem folgenden grundlegenden Format:
200 Mikrogramm MAb-StrAv-Konjugat verabreicht;
24 Stunden später Ausscheidungsmittel verabreicht; und
2 Stunden später 5,7 Mikrogramm PIP-Biocytin verabreicht.

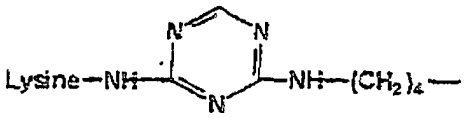
[0164] Dosisbereichsstudien wurden durchgeführt mit dem G-HSA-B-Ausscheidungsmittel, ausgehend von einer Beladung mit 9 Biotinen pro Molekül und 12–45 Galactoseresten pro Molekül. Dosen von 20, 40, 70 und 120 Mikrogramm wurden 24 Stunden nach einer 200-Mikrogramm-Dosis MAb-StrAv-Konjugat verabreicht. Auf die Gaben des Ausscheidungsmittels folgte 2 Stunden später die Verabreichung von 5,7 Mikrogramm I-131-PIP-Biocytin. Tumoraufnahme und Blutretention von PIP-Biocytin wurde 44 Stunden nach Verabreichung desselben (46 Stunden nach Verabreichung des Ausscheidungsmittels) untersucht. Die Ergebnisse zeigten, daß ein Nadir der Blutretention von PIP-Biocytin mit allen Dosen erreicht wurde, die größer als oder gleich 40 Mikrogramm G-HSA-B waren. Eine klare, dosisabhängige Abnahme der Tumorbindung von PIP-Biocytin bei jeder ansteigenden Dosis von G-HSA-B lag jedoch vor. Da keine dosisabhängige Auswirkung auf die Lokalisierung von MAb-StrAv-Konjugat am Tumor beobachtet wurde, wurden diesen Daten so interpretiert, daß sie auf relativ höhere Blockade von Tumor-assoziiertem MAb-StrAv-Konjugat durch die Freisetzung von Biotin aus katabolisiertem Ausscheidungsmittel hinwiesen. Ähnliche Ergebnisse zu denjenigen, die bereits für das Asialoorosomucoid-Ausscheidungsmittel im Hinblick auf Diagramme des Tumor/Blut-Verhältnisses beschrieben worden sind, wurden in Bezug auf G-HSA-B insofern gefunden, als ein optimales Gleichgewicht zwischen Blutausscheidung und Tumorretention bei einer Dosis um die 40 Microgramm auftrat.

[0165] Wegen der relativ großen molaren Mengen Biotin, die von diesem Ausscheidungsmittel bei höheren Dosen freigesetzt werden konnten, wurden Studien durchgeführt, um die Auswirkung von niedrigeren Niveaus der Biotinylierung auf die Wirksamkeit des Ausscheidungsmittels zu bewerten. G-HSA-B, derivatisiert mit entweder 9, 5 oder 2 Biotinen/Molekül, war in der Lage, MAb-StrAv-Konjugat aus Blut bei gleichen Proteindosen von Ausscheidungsmittel auszuscheiden. Alle Niveaus der Biotinylierung lieferten effektive, schnelle Ausscheidung von MAb-StrAv aus Blut.

[0166] Ein Vergleich dieser mit 9, 5 und 2 Biotinen derivatisierten Ausscheidungsmittel mit einem G-HSA-B-Ausscheidungsmittel mit einem einzigen Biotin wurde in tumorbefallenen Mäusen durchgeführt, wobei eine Dosis von 60 Mikrogramm von jedem Ausscheidungsmittel eingesetzt wurde. Dieses Experiment zeigte, daß jedes Ausscheidungsmittel im wesentlichen gleich effektiv bei der Blutausscheidung und Tumorretention von MAb-StrAv-Konjugat 2 Stunden nach Verabreichung des Ausscheidungsmittels war. Das G-HSA-B mit einem einzigem Biotin wurde auf die Fähigkeit untersucht, die Bindung eines anschließend verabreichten biotinylierten kleinen Moleküls (PIP-Biocytin) in Blut zu verringern, während die Tumorbindung von PIP-Biocytin an vorlokalisiertes MAb-StrAv-Konjugat erhalten wurde. Gemessen 44 Stunden nach Verabreichung von PIP-Biocytin, war die Tumorlokalisierung sowohl des MAb-StrAv-Konjugats als auch des PIP-Biocytins gut erhalten über einen breiten Dosisbereich von G-HSA-B mit einem Biotin/Molekül (90 bis 180 Mikrogramm). Eine progressive Abnahme der Blutretention von PIP-Biocytin wurde (lurch ansteigende Dosen des G-HSA-B-Ausscheidungsmittels mit einem einzigen Biocytin erreicht, während die Tumorlokalisierung im wesentlichen konstant blieb, was darauf hinweist, daß dieses Ausscheidungsmittel, mit einem niedrigeren Biotinylisierungsgrad, bevorzugt ist. Diese Bevorzugung entsteht, weil das G-HSA-B-Ausscheidungsmittel mit einem einzigen Biotin sowohl darin wirksam ist, MAb-StrAv über einen breiten Bereich von Dosen auszuscheiden (wobei potentiell die Notwendigkeit einer Patient-zu-Patient-Titration der optimalen Dosis eliminiert wird) und weniger konkurrierendes Biotin in den systemischen Kreislauf freizusetzen scheint als dasselbe Agens mit einer höheren Biotinbeladung.

[0167] Ein weiterer Weg, um die Auswirkung von aus Ausscheidungsmitteln freigesetztem Biotin auf die Bindung von Konjugat aus aktivem Agens und Biotin an vorlokalisiertes Targetingeinheit-Streptavidin-Konjugat zu verringern, ist, das Protein oder Polymer oder die andere primäre Ausscheidungsmittel-Komponente unter Verwendung eines Retentionslinkers an Biotin zu binden. Ein Retentionslinker besitzt eine chemische Struktur, die

gegenüber Agentien beständig ist, die Peptidbindungen spalten, und wird fakultativ protoniert, wenn er zu einem katabolisierenden Raum lokalisiert wird, wie etwa ein Lysosom. Bevorzugte Retentionslinker der vorliegenden Erfindung sind kurze Stränge von D-Aminosäuren oder kleine Moleküle, die beide der oben angegebenen Charakteristika haben. Ein beispielhafter Retentionslinker der vorliegender Erfindung ist Cyanurchlorid, das zwischen eine Epsilon-Aminogruppe eines Lysins einer proteinhaltigen primären Ausscheidungsmittel-Komponente und einer Amineinheit einer reduzierten und chemisch veränderten Biotin-Carboxyeinheit (die oben diskutiert worden ist) eingebaut ist, um eine Verbindung der unten angegebenen Struktur zu bilden:



[0168] Wenn die oben dargestellte Verbindung in einem katabolisierenden Raum katabolisiert wird, wird der heterozyklische Ring protoniert. Die Ringprotonierung verhindert, daß der Katabolit aus dem Lysosom austritt. Auf diese Weise werden Biotin-Katabolite, die den heterozyklischen Ring enthalten, auf die Stelle(n) des Katabolismus beschränkt und konkurrieren daher nicht mit einem Konjugat aus aktivem Agens und Biotin um vorlokalisierte Targetingeinheit-Streptavidin-Targetstellen.

[0169] Vergleiche der Tumor/Blut-Lokalisierung von radioaktiv markiertem PIP-Biocytin, beobachtet in den G-HSA-B-Dosisbereichsstudien, zeigten, daß optimales Targeting von Tumor zu Hintergrund über einen breiten Dosisbereich (90 – 180 Mikrogramm) erreicht wurde, wobei die Ergebnisse die Erwartung lieferten, daß selbst noch größere Ausscheidungsmitteldosen auch wirksam wären. Ein weiteres Schlüsselergebnis der Dosisbereichexperimente ist, daß G-HSA-B mit durchschnittlich nur 1 Biotin pro Molekül vermutlich nur das MAb-StrAv-Konjugat über ausschließlich den Ashwell-Rezeptor-Mechanismus ausscheidet, weil zu wenige Biotine vorhanden sind, um Vernetzung und Aggregation von MAb-StrAv-Konjugaten zu bewirken, und wobei Ausscheidungsmittel mit solchen Aggregaten durch das Retikuloendothelial-System ausgeschieden würden.

D. Tumortargetingbewertung unter Verwendung von G-HSA-B.

[0170] Das Protokoll für dieses Experiment war wie folgt:
Zeit 0: Verabreichung von 400 Mikrogramm MAb-StrAv-Konjugat;
Zeit 24 Stunden: Verabreichung von 240 Mikrogramm G-HSA-B mit einem Biotin und 12–45 Galactosen und
Zeit 26 Stunden: Verabreichung von 6 Mikrogramm
Lu-177 ist mit dem DOTA-Chelat unter Verwendung bekannter Techniken dafür kompexliert.

[0171] Effiziente Zuführung des kleinen Moleküls Lu-177-DOTA-Biotin wurde beobachtet, 20–25% injizierte Dosis/Gramm Tumor. Diese Werte sind äquivalent mit der Effizienz der Zuführung des MAb-StrAv-Konjugats. Der AUC Tumor/AUC Blut, der für diese nicht optimierte Ausscheidungsmitteldosis erhalten wurde, war 300% größer als derjenige der durch vergleichbare direkte Verabreichung von MAb-radioaktive Markierung erreichbar war. Anschließende Experimente haben zu einem AUC Tumor/AUC Blut über 1000% größer als demjenigen geführt, der durch vergleichbare herkömmliche Verabreichung von MABradioaktive Markierung erreichbar war. Zusätzlich wird erwartet, daß das Ausscheidungsmittel auf HSA-Basis einen niedrigeren Grad an Immunogenität in Menschen zeigt.

Beispiel V

Herstellung der kleinmolekularen Ausscheidungsmittel

[0172] Dieses Verfahren ist schematisch in **Fig.** 2 dargestellt.

[0173] Methyl-6-bromhexanoat. In einen 1 l-Rundkolben, beschickt mit 20 g (102,5 mmol) 6-Bromhexansäure und 500 ml Methanol, wurde Chlorwasserstoffgas für 2–3 Minuten eingeleitet. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 4 Stunden gerührt und konzentriert, um 21,0 g des Produktes als ein gelbes Öl (99%) zu liefern: ^{1}H-NMR (200 MHz, d_6-DMSO); 3,57 (s, 3H), 3,51 (t, 2H), 2,30 (t, 2H), 1,78 (Pentett, 2H) und 1,62–1,27 (m, 4H) ppm.

[0174] Methyl-6-aminohexanoat-Hydrochlorid. Zu einem 11-Rundkolben, beschickt mit 40,0 g Aminocapronsäure, wurden 500 ml Methanol zugegeben. Chlorwasserstoffgas wurde für 5 Minuten durch die Mischung geleitetet und die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 5 Stunden gerührt. Die Mischung wurde anschließend über Rotationsverdampfung und dann unter vollem Vakuumpumpendruck (<0,1 mm Hg) konzentriert, um 55 g des Produktes als einen weißen Feststoff (99%) zu liefern: ^{1}H-NMR (200 MHz, CD_3OD); 3,67 (s, 3H), 3,02 (t, 2H), 2,68 (s, 3H), 2,48 (t, 2H), und 2,03–1,87 (Pentett, 2H) ppm.

[0175] Methyl-6-(trifluoracetamido)-hexanoat: Zu einem 11-Rundkolben, beschickt mit 25,0 g (138 mmol) Methyl-6-aminohexanoat-Hydrochlorid und 500 ml Methylenchlorid, wurden 24 ml (170 mmol) Trifluoressigsäure-

anhydrid zugegeben. Die Mischung wurde in einem Eisbad abgekühlt und 42 ml (301 mmol) Triethylamin wurden über einen Zeitraum von 25–30 Minuten zugegeben. Die Mischung wurde bei 0°C bis Raumtemperatur für 2 Stunden gerührt und anschließend konzentriert. Der Rückstand wurde mit 150 ml Diethylether und 150 ml Petrolether verdünnt und die resultierende Lösung wurde zunächst mit 1 N wässriger HCl (3 × 150 ml) und dann mit gesättigtem wässrigen Natriumbicarbonat (3 × 150 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und konzentriert, um 32,9 g des Produktes als ein hellgelbes Öl (99%) zu ergeben: ^{1}H-NMR (200 MHz, d_6-DMSO); 9,39 (m, 1H), 3,57 (s, 3H), 3,14 (q, 2H), 2,29 (t, 2H), 1,60–1,38 (m, 4H) und 1,32–1,10 (m, 2H) ppm.

[0176] N,N'-Bis(6-methoxycarbonylhexyl)amin-Hydrochlorid. Zu einem trocknen 500 ml-Rundkolben, beschickt mit 12,0 g (50,0 mmol) des sekundären Amids, Methyl-6-(Trifluoracetamido)-hexanoat, und 250 ml trocknem Tetrahydrofuran, wurden 2,2 g (55 mmol, 1,1 Äquiv..) 60% Natriumhydrid zugegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 30 Minuten gerührt und anschließend wurden 10,25 g (49,0 mmol, 0,98 Äquiv.) des Alkylbromids, Methyl-6-bromhexanoat, zugegeben. Die Mischung wurde bei Rückfluß für 3 Stunden gerührt, zusätzliche 5,80 g (27,7 mmol, 0,55 Äquiv.) Methyl-6-bromhexanoat wurden zugegeben und die Mischung wurde bei Rückfluß für 70 Stunden gerührt. Die Mischung wurde abgekühlt, mit 150 ml 1 N wässriger HCl verdünnt und dann mit Ethylacetat extrahiert (3 × 100 ml). Die organischen Extrakte wurden vereinigt; über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und konzentriert. Der Rückstand wurde mit 200 ml Methanol verdünnt und dann mit 30 ml 10 N wässrigem Natriumhydroxid behandelt. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 18 Stunden gerührt und anschließend konzentriert. Der Rückstand wurde mit 200 ml entionisiertem Wasser verdünnt und mit 37%-iger konzentrierter HCl auf pH 1–2 angesäuert. Die Lösung wurde mit Diethylether gewaschen (3 x 100 ml). Die wässrige Phase wurde konzentriert. Der Rückstand wurde mit 200 ml Methanol verdünnt und erneut konzentriert. Der anschließende Rückstand wurde mit 250 ml Methanol verdünnt und HCl-Gas wurde für 2–3 Minuten hindurchgeleitet, gefolgt von Rühren bei Raumtemperatur für 3 Stunden. Die Mischung wurde konzentriert. Der Rückstand wurde mit 300 ml Methanol verdünnt und filtriert, um anorganische Salze zu entfernen. Das Filtrat wurde mit 3 g Aktivkohle behandelt, durch Celite (hergestellt von J. T. Baker) filtriert und konzentriert. Der Rückstand, ein schmutzig-weißer Feststoff, wurde aus 100 ml 2-Propanol umkristallisiert, um 7,0 g des Produktes als einen weißen Feststoff zu liefern. Konzentration des Filtrats und weitere Umkristallisation des Rückstands lieferte zusätzliche 1,65 g des Produktes für insgesamt 8,65 g (56%): ^{1}H-NMR (200 MHz, d_6-DMSO); 3,57 (s, 3H), 2,90-2,73 (m, 4H), 2,30 (t, 4H), 1,67–1,44 (m, 8H) und 1,37–1,20 (m, 4H) ppm.

[0177] Methyl-4-methylaminobutyrat-Hydrochlorid. In einen 1 l-Rundkolben, beschickt mit 30,0 g (195 mmol) 4-Methylaminobuttersäure und 500 ml Methanol, wurde HCl-Gas für 1–2 Minuten eingeleitet. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 3–4 Stunden gerührt und anschließend konzentriert, um 32,5 g des Produktes als einen schaumigen, schmutzig-weißen Feststoff (99%) zu liefern: ^{1}H-NMR (200 MHz, CD_3OD); 3,67 (s, 3H), 3,03 (t, 2H), 2,68 (s, 3H), 2,48 (t, 2H) und 2,03–1,87 (Pentett, 2 H) ppm.

[0178] 4-Methylaminobutanol. Zu einem 1 l-Rundkolben, beschickt mit 32,5 g (194 mmol) des Esters, Methyl-4-methylaminobutyrat-hydrochlorid, wurden 500 ml 1 M Boran in Tetrahydrofuran über einen Zeitraum von 1 Stunde bei 0°C zugegeben. Nachdem die Zugabe abgeschlossen war, wurde die Mischung für 20 Stunden unter Rückfluß gekocht, auf 0°C abgekühlt und das überschüssige Boran wurde durch vorsichtige Zugabe von 100 ml Methanol zerstört. Nachdem das gesamte Methanol zugegeben war, wurde die Mischung bei Raumtemperatur für 1 Stunde gerührt und anschließend konzentriert. Der Rückstand wurde mit 400 ml Methanol verdünnt und dann wurde HCl-Gas für 5 Minuten in die Lösung eingeleitet. Die Mischung wurde für 16 Stunden unter Rückfluß gekocht. Die Mischung wurde abgekühlt, konzentriert und dann mit 250 ml entionisiertem Wasser verdünnt. Das Produkt wurde zunächst durch Zugabe von 10 N wässrigem Natriumhydroxid, auf einen pH von 9–9,5, und dann durch Zugabe von 70 g AG-1-X-8-Anionenaustauschharz (Hydroxid-Form) (kommerziell erhältlich von BioRad) und durch Rühren der Lösung für zwei Stunden in die freie Base überführt. Das Harz wurde abfiltriert und mit 150 ml entionisiertem Wasser gewaschen. Die wässrigen Filtrate wurden vereinigt und konzentriert. Der Rückstand wurde mit 200 ml 2-Propanol verdünnt und filtriert. Die gesammelten Feststoffe wurden mit 100 ml 2-Propanol gespült. Die organischen Filtrate wurden vereinigt und konzentriert. Der Rückstand wurde unter verringertem Druck destilliert, um 12,85 g des Produktes als ein farbloses Öl zu liefern (bp 68°C bei 0,1–0,2 mm Hg; 64%): ^{1}H-NMR (200 MHz, D_2O); 3,52 (t, 2H), 2,56 (t, 2H), 2,31 (s, 3H) und 1,65–1,43 (m, 4H) ppm.

[0179] 4-(N-Methyltrifluoracetamido)-1-butanol. Zu einem 250 ml-Rundkolben, beschickt mit 10,0 g (96,9 mmol) des Amins, 4-Methylaminobutanol, in 100 ml trockenem Methanol, wurden 17,5 ml (147 mmol) Ethyltrifluoracetat zugegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt und anschließend konzentriert, um 18,55 g des Produktes als ein nahezu farbloses Öl (96%) zu liefern: ^{1}H-NMR (200 MHz, D_2O); 3,63 und 3,50 (2t's, 4H), 3,20 und 3,05 (d und s, 3H) und 1,82–1,47 (m, 4H) ppm.

[0180] 1-(p-Toluolsulfonyloxy)-4-(N-methyltrifluoracetamido)butan. Zu einem trockenen 1 1-Rundkolben, beschickt mit 17,0 g (85,4 mmol) des Alkohols, 4-(N-Methyltrifluoracetamido)-1-butanol, in 400 ml Methylenchlorid, wurden 17,1 g (89,7 mmol, 1,05 Äquiv.) Toluolsulfonylchlorid zugegeben, gefolgt von 30 ml (213 mmol, 2,5

Äquiv.) Triethylamin bei 0°C über einen 10-minütigen Zeitraum. Die Mischung wurde bei 0°C bis Raumtemperatur für 15 Stunden gerührt und dann mit 5% v/v wässriger HCl gewaschen (3 × 200 ml). Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und konzentriert. Der Rückstand wurde auf Silicagel chromatographiert, unter Elution mit 50 : 50 Hexan/Methylenchlorid und anschließend mit Methylenchlorid, um 25,1 g des Produktes als ein hellgelbes Öl (83%) zu ergeben: ^{1}H-NMR (200 MHz, $CDCl_3$); 7,80 (d, 2H), 7,37 (d, 2H), 4,07 (m, 2H), 3,41 (m, 3H), 3,09 und 2,98 (q und s, 3H) und 1,68 (m, 4H) ppm: TLC (Methylenchlorid) R_f = 0,31.

[0181] 1-S-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-beta-D-galactopyranosyl)-2-thiopseudoharnstoff-Hydrobromid. Zu einem 250 ml-Rundkolben, beschickt mit 5,08 g (60,8 mmol, 1,09 Äquiv.) Thioharnstoff und 36 ml Aceton, wurden 25,0 g (66,7 mmol) Tetraacetyl-alpha-D-galactopyranosylbromid zugegeben. Die Mischung wurde bei Rückfluß für 15–20 Minuten gerührt und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Mischung wurde in einen Büchner-Trichter filtriert und mit 25 ml eiskaltem Aceton gespült. Die Feststoffe wurden mit 50 ml Aceton behandelt, für 15 Minuten unter Rückfluß gekocht, auf Eis abgekühlt und filtriert. Die Feststoffe wurden mit 25 ml kaltem Aceton gespült, luftgetrocknet und anschließend unter Vakuum getrocknet, um 22,6 g des Produktes als einen weißen Feststoff (76%) zu ergeben: ^{1}H-NMR (200 MHz, d_6-DMSO); 9,4–9,0 (breites d, 4H), 5,63 (d, 1H), 5,38 (d, 1H), 5,23 (dd, 1H), 5,09 (t, 1H), 4,40 (t, 1H), 4,04 (dd, 1H), 2,13 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,00 (s, 3H), 1,93 (s, 3H) ppm.

[0182] 4-(N-Methylaminobutyl)-1-thio-beta-D-galactopyranosid. Zu einem 500 ml-Rundkolben, beschickt mit 20,7 g (42,5 mmol, 1,07 Äquiv.) des Thiopseudoharnstoff-Hydrobromids, hergestellt wie oben beschrieben, in 70 ml entionisiertem Wasser, wurden 6,4 g (46,3 mmol, 1,16 Äquiv.) Kaliumcarbonat und 4,7 g (45,2 mmol, 1,13 Äquiv.) Natriumbisulfit zugegeben, unmittelbar gefolgt von 14,1 g (39,9 mmol, 1,0 Äquiv.) des Tosylats, 1-(p-Toluolsulfonyloxy)-4-(N-methyltrifluoracetamido)butan, in 70 ml Aceton. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 16 Stunden gerührt. Die Mischung wurde mit 50 ml Salzlösung verdünnt und mit Ethylacetat extrahiert (3 × 200 ml). Die organischen Extrakte wurden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und konzentriert. Der Rückstand wurde auf Silicagel chromatographiert, unter Elution mit zunächst 75% Methylenchlorid/Hexan, gefolgt von Methylenchlorid, dann mit 2% Methanol/Methylenchlorid und schließlich mit 10% Methanol/Methylenchlorid. Fraktionen, die Alkylierungsprodukt mit unterschiedlichen Acetylierungsgraden enthielten, wurden vereinigt und konzentriert. Der Rückstand wurde mit 250 ml Methanol und 150 ml entionisiertem Wasser verdünnt und mit 110 g AG-1-X-8-Harz (Hydroxidform; 2,6 m Äquiv./g-Trockengewicht) kommerziell erhältlich von BioRad, behandelt. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 18 Stunden gerührt. Die Mischung wurde filtriert und das Harz wurde mit Methanol gespült (2 × 150 ml). Die Filtrate wurden vereinigt und konzentriert, um 6,1 g Produkt (54%) zu liefern: ^{1}H-NMR (200 MHz, D_2O); 4,38 (d, 1H), 3,88 (d, 1H), 3,69–3,41 (m, 5H), 2,82–2,64 (m, 4H), 2,43 (s, 3H) und 1,68–1,57 (, 4H) ppm.

[0183] Biotin-bismethylester: Zu einem 50 ml-Rundkolben, beschickt mit 1,00 g (3,23 mmol, 1,13 Äquiv.) Amin-Hydrochlorid, N,N'-Bis-(6-methoxycarbonylhexyl)amin-Hydrochlorid, und 1,30 g (2,86 mmol) Caproamidobiotin-NHS-ester (herstellbar mit Standardverfahren oder kommerziell erhältlich von Sigma Chemical Company) und 10 ml trockenem Dimethylformamid, wurden 1,5 ml (10,6 mmol) Triethylamin zugegeben. Die Mischung wurde bei 85°C für 2 Stunden gerührt und anschießend über Rotationsverdampfung unter verringertem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde auf Silicagel chromatographiert, unter Elution mit 75 : 25 : 0,05 Ethylacetat/Methanol/Essigsäure, um 1,63 g des Produktes als einen weißen schaumigen Feststoff (93%) zu liefern: ^{1}NMR (200 MHz, d_6-DMSO); 7,72 (t, 1H), 6,41 (s, 1H), 6,34 (s, 1H), 4,29 (m, 1H), 4,11 (m, 1H), 3,57 (s, 6H), 3,23–2,91 (m, 7H), 2,81 (dd, 1H), 2,55 (d, 1H), 2,35–2,13 (m, 6H), 2,03 (t, 2H), 1,65–1,10 (m, 24H) ppm: TLC; Rf = 0,58 (75 : 25 : 0,01 Ethylacetat/Methanol/Essigsäure).

[0184] Biotin-bissäure: Zu einem 200 ml-Rundkolben, beschickt mit 1,61 g (2,63 mmol) Biotinbismethylester und 50 ml Methanol, wurden 5 ml 3 N wässriges Natriumhydroxid zugegeben. Die Mischung wurde bei 40°C für 3 Stunden gerührt und anschließend über Rotationsverdampfung unter verringertem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde mit 50 ml entionisiertem Wasser verdünnt und dann wurde 3 N wässrige HCl zugegeben, bis ein pH von 1–2 erreicht war. Die Mischung wurde erneut konzentriert. Der Rückstand wurde auf C-18-Umkehrphasen-Silicagel chromatographiert, unter Elution mit zunächst 20 : 80 : –0,1 Acetonitril/Wasser/Trifluoressigsäure und dann mit 50 : 50 : 0,1 Acetonitril/Wasser/Trifluoressigsäure. Die Fraktionen, die Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert. Der Rückstand wurde mit 40 ml Wasser und 20 ml Acetonitril verdünnt. Die Lösung wurde eingefroren (–70°C) und lyophilisiert, um 1,42 g des Produktes als einen flaumigen weißen Feststoff (92%) zu liefern: ^{1}H-NMR (200 MHz d_6-DMSO); 7,72 (t, 1H), 6,61 (breites s, 2H), 4,29 (m, 1H), 4,11 (m, 1H), 3,35–2,53 (m, 7H), 2,81 (dd, 1H), 2,55 (d, 1H), 2,28–2,12 (m, 6H), 2,03 (t, 2H), 1,68–1,10 (m, 24H) ppm: TLC; Rf = 0,30 (50 : 50 : 0,01 Acetonitril/Wasser/Trifluoressigsäure).

[0185] Biotin-tetramethylester: Zu einem 50 ml-Rundkolben, beschickt mit 350 mg (0,599 mmol) der Biotin-bissäure, 402 mg (1,30 mmol, 2,16 Äquiv.) Amin-Hydrochlorid, (N,N'-Bis-(6-methoxycarbonylhexyl)amin-Hydrochlorid), und 10 ml trockenem Dimethylformamid, wurden 556 mg (1,26 mmol, 2,10 Äquiv.) BOP und 500 Mikroliter (3,54 mmol, 5,91 Äquiv.) Triethylamin zugegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 2 Stunden gerührt und anschließend über Rotationsverdampfung unter verringertem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde auf C-18-Umkehrphasen-Silicagel chromatographiert, unter Elution mit zunächst 50 : 50 Methanol/Wasser und dann mit 85 : 15 Methanol/Wasser, um 618 mg des Produktes als einen schau-

migen weißen Feststoff (95%) zu liefern: ^{1}H-NMR (200 MHz, d_6-DMSO); 7,71 (t, 1H), 6,1 (breites s, 2H), 4,29 (m, 1H), 4,11 (m, 1H), 3,57 (s, 12H), 3,25-2,91 (m, 15H), 2,81 (dd, 1H), 2,55 (d, 1H), 2,35–2,12 (m, 14H), 2,02 (t, 2H), 1,65–1,10 (m, 48 H) ppm: TLC; Rf = 0,48 (85 : 15 Methanol/Wasser).

[0186] Biotin-tetrasäure: Zu einem 50 ml-Rundkolben, beschickt mit 350 mg (0,319 mmol) Biotintetramethylester und 15 ml Methanol, wurden 5 ml 1 N wässriges Natriumhydroxid und 5 ml entionisiertes Wasser zugegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 14 Stunden gerührt und anschließend über Rotationsverdampfung unter verringertem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde mit 15 ml entionisiertem Wasser verdünnt, durch Zugabe von 6 N wässriger HCl auf pH 1–2 angesäuert und dann erneut konzentriert. Der Rückstand wurde auf C-18-Umkehrphasensilicagel chromatographiert, unter Elution mit zunächst 50 : 50 Methanol/Wasser und anschließend mit 70 : 30 Methanol/Wasser. Die Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert. Der Rückstand wurde mit 10 ml Wasser und 8 ml Acetonitril verdünnt. Die Lösung wurde eingefroren (–70°C) und lyophilisiert, um 262 mg des Produktes als einen flaumigen weißen Feststoff (79%) zu liefern: ^{1}H-NMR (200 MHz, d_6-DMSO); 7,71 (t, 1H), 6,41 (s, 1H), 6,34 (s, 1H), 4,29 (m, 1H), 4,11 (m, 1H), 3,25–2,93 (m, 15H) 2,81 (dd, 1H), 2,55 (d, 1H), 2,31–2,10 (m, 14H), 2,02 (t, 2H), 1,63–1,09 (m, 48H) ppm: TLC; Rf = 0,45 (70 : 30 Methanol/Wasser).

[0187] Biotin-octamethylester: Zu einem 25 ml-Rundkolben, beschickt mit 220 mg (0,710 mmol, 4,93 Äquiv.) Amin-Hydrochlorid, N,N'-Bis-(6-methoxycarbonylhexyl)amin-Hydrochlorid, 150 mg (0,144 mmol) der Biotin-tetrasäure und 5 ml trockenem Dimethylformamid, wurden 300 mg (0,678 mmol, 4,71 Äquiv.) BOP zugegeben, gefolgt von 500 Mikrolitern (3,54 mmol, 24,0 Äquiv.) Triethylamin. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 3 Stunden gerührt und anschließend über Rotationsverdampfung unter verringertem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde auf C-18-Umkehrphasen-Silicagel chomatographiert, unter Elution mit zunächst 60 : 40 Methanol/Wasser und dann mit 90 : 10 Methanol/Wasser, um 246 mg des Produktes als einen schaumigen weißen Feststoff (83%) zu liefern: ^{1}H-NMR (200 MHz, d_6-DMSO); 7,71 (t, 1H), 6,41 (s, 1H), 6,34 (s, 1H), 4,29 (m, 1H), 4,11 (m, 1H), 3,57 (s, 24H), 3,25-2,91 (m, 31H), 2,81 (dd, 1H), 2,55 (d, 1H), 2,32–2,12 (m, 30H), 2,02 (t, 2H), 1,65–1,08 (m, 96H) ppm: TLC; R_f = 0,42 (90 : 10 Methanol/Wasser).

[0188] Biotin-octasäure: Zu einem 50 ml-Rundkolben, beschickt mit 235 mg (0,114 mmol) Biotinoctamethylester und 10 ml Methanol, wurden 5 ml 1 N wässriges Natriumhydroxid und 5 ml entionisiertes Wasser zugegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 14 Stunden gerührt und anschließend über Rotationsverdampfung unter verringertem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde mit 10 ml entionisiertem Wasser verdünnt, durch Zugabe von 6 N wässriger HCl auf pH 1–2 angesäuert und anschließend erneut konzentriert. Der Rückstand wurde auf C-18-Umkehrphasen-Silicagel chromatographiert, unter Elution mit zunächst 50 : 50 Methanol/Wasser und dann mit 75 : 25 Methanol/Wasser. Die Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert. Der Rückstand wurde mit 20 ml 1 : 1 (Volumenverhältnis) Acetonitril/Wasser verdünnt. Die Lösung wurde eingefroren (–70°C) und lyophilisiert, um 202 mg des Produktes als einen flaumigen weißen Feststoff (91%) zu liefern: ^{1}H-NMR (200 MHz, d_6-DMSO); 7,71 (t, 1H), 6,41 (s, 1H), 6,34 (s, 1H), 4,29 (m; 1H), 4,11 (m, 1H), 3,29–2,91 (m, 31H), 2,81 (dd, 1H), 2,55 (d, 1H), 2,31–2,10 (m, 30H), 2,03 (t, 2H), 1,65–1,09 (m, 96H) ppm: TLC; R_f = 0,51 (75 : 25 Methanol/Wasser).

[0189] Biotin-hexadecamethylester: Zu einem 25 ml-Rundkolben, beschickt mit 154 mg (0,497 mmol, 10,0 Äquiv.) Amin-Hydrochlorid, (N,N'-Bis-(6-methoxycarbonylhexyl)amin-Hydrochlorid), 97 mg (0,0497 mmol) der Biotin-octasäure und 5 ml trockenem Dimethylformamid, wurden 202 mg (0,457 mmol, 9,2 Äquiv.) BOP zugegeben, gefolgt von 500 Mikrolitern (3,54 mmol, 71,2 Äquiv.) Triethylamin. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 8 Stunden gerührt und anschließend über Rotationsverdampfung unter verringertem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde auf Silicagel chromatographiert, unter Elution mit zunächst 70 : 30 Methanol/Wasser und dann mit 95 : 5 Methanol/Wasser, um 149 mg des Produktes als einen schaumigen weißen Feststoff (75%) zu liefern: ^{1}H-NMR (200 MHz, d_6-DMSO); 7,71 (t, 1H), 6,41 (s, 1H), 6,34 (s, 1H), 4,29 (m, 1H), 4,11 (m, 1H), 3,57 (s, 48H) 3,25–2,92 (m, 63H), 2,81 (dd, 1H), 2,55 (d, 1H), 2,35–2,11 (m, 62H), 2,01 (t, 2H), 1,65-1,08 (m, 192H), ppm: TLC; Rf = 0,31 (95 : 5 Methanol/Wasser)

[0190] Biotin-hexadecylsäure: Zu einem 50 ml-Rundkolben, beschickt mit 141 mg (0,0353 mmol) Biotin-Hexadecamethylester und 15 ml Methanol, wurden 8 ml 1 N wässeriges Natriumhydroxid und 5 ml entionisiertes Wasser zugegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 14 Stunden gerührt und anschließend über Rotationsverdampfung unter verringertem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde mit 15 ml entionisiertem Wasser verdünnt, durch Zugabe von 6 N wässeriger HCl auf pH 1–2 angesäuert und anschließend erneut konzentriert. Der Rückstand wurde auf C-18-Umkehrphasen-Silicagel chromatographiert, unter Elution mit zunächst 60 : 40 Methanol/Wasser und dann mit 85 : 15 Methanol/Wasser. Die Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert. Der Rückstand wurde mit 20 ml 1 : 1 Acetonitril/Wasser verdünnt. Die Lösung wurde eingefroren (–70°C) und lyophilisiert, um 130 mg des Produktes als einen flaumigen weißen Feststoff (75%) zu liefern: ^{1}H-NMR (200 MHz, d_6-DMSO); 7,71 (t, 1H), 6,41 (s, 1H), 6,34 (s, 1H), 4,29 (m, 1H), 4,11 (m, 1H), 3,26–2,92 (m, 63H), 2,81 (dd, 1H), 2,55 (d, 1H), 2,35–2,10 (m, 62H), 2,01 (t, 2H), 1,65–1,09 (m, 192H) ppm: TLC; Rf = 0,64 (85 : 15 Methanol/Wasser).

[0191] Hexadecagalactosylbiotin: Zu einem 25 ml-Rundkolben, beschickt mit 125 mg (0,0332 mmol) Bio-

tin-hexadecasäure, 179 mg (0,636 mmol, 19,2 Äquiv.) Galactoseamin, 4-(N-Methylaminobutyl)-1-thio-beta-D-galactopyranosid, und 4 ml trockenem Methylformamid, wurden 264 mg (0,597 mmol, 18,0 Äquiv.) BOP zugegeben, gefolgt von 400 Mikrolitern (2,87 mmol, 86,5 Äquiv.) trockenem Triethylamin. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 17 Stunden gerührt und anschließend über Rotationsverdampfung unter verringertem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde auf C-18-Umkehrphasen-Silicagel chromatographiert, unter Elution mit zunächst 60 : 40 Methanol/Wasser und dann mit 75 : 25 Methanol/Wasser. Die Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert und erneut auf C-18-Umkehrphasen-Silicagel chromatographiert, unter Elution mit zunächt 40 : 60 : 0,1 Acetonitril/Wasser/Trifluoressigsäure und dann mit 50 : 50 : 0,1 Acetonitril/Wasser/Trifluoressigsäure. Die Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden erneut vereinigt und konzentriert. Der Rückstand wurde in 20 ml Wasser gelöst. Die Lösung wurde eingefroren (–70°C) und lyophilisiert, um 173 mg des Produktes als einen flaumigen weißen Feststoff (75%) zu liefern: ^{1}H-NMR (200 MHz, D_2O); 4,52 (m, 1H), 4,37 (d, 15H), 3,90 (d, 16H), 3,70–3,42 (m, 80H), 3,41–3,05 (m, 97H), 2,98–2,82 (2s und 2m, 49H), 2,80-2,49 (m, 33H), 2,44–2,11 (m, 62H), 1,75–1,10 (m, 256H) ppm: TLC; Rf = 0,53 (75 : 25 Methanol/Wasser).

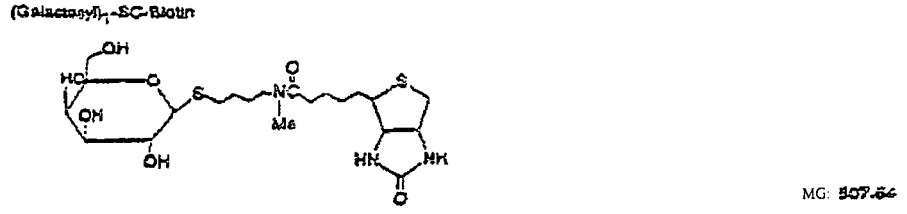
[0192] Das obige Verfahren ist konzipiert für die Herstellung eines Galactose-Clusters von 16 Galactoseresten. Die Versionen mit vier oder acht Galactosen können gemäß diesem Verfahren hergestellt werden, indem mit der Tetrasäure oder der Octasäure in den Galactose-Derivatisierungsschritt gegangen wird, der oben für den 16-Galactose-Cluster beschrieben wurde. In ähnlicher Weise können Clusterkonstrukte mit 32 etc. Galactosen gemäß der vorliegenden Erfindung durch Einführen von mehr Iterationen der Methylester- und Säure-Herstellungsschritte hergestellt werden. Wenn die gewünschte Anzahl von Säureresten gebildet ist, wird der Galactose-Derivatisierungsschritt eingesetzt, wobei die Anteile der Komponenten so eingestellt werden, daß sie mit der Anzahl der Säurereste zusammenpassen.

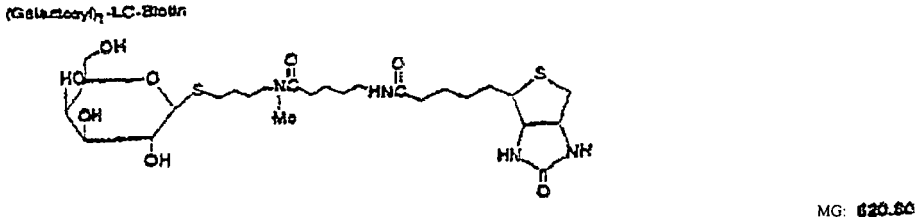
BEISPIEL VI

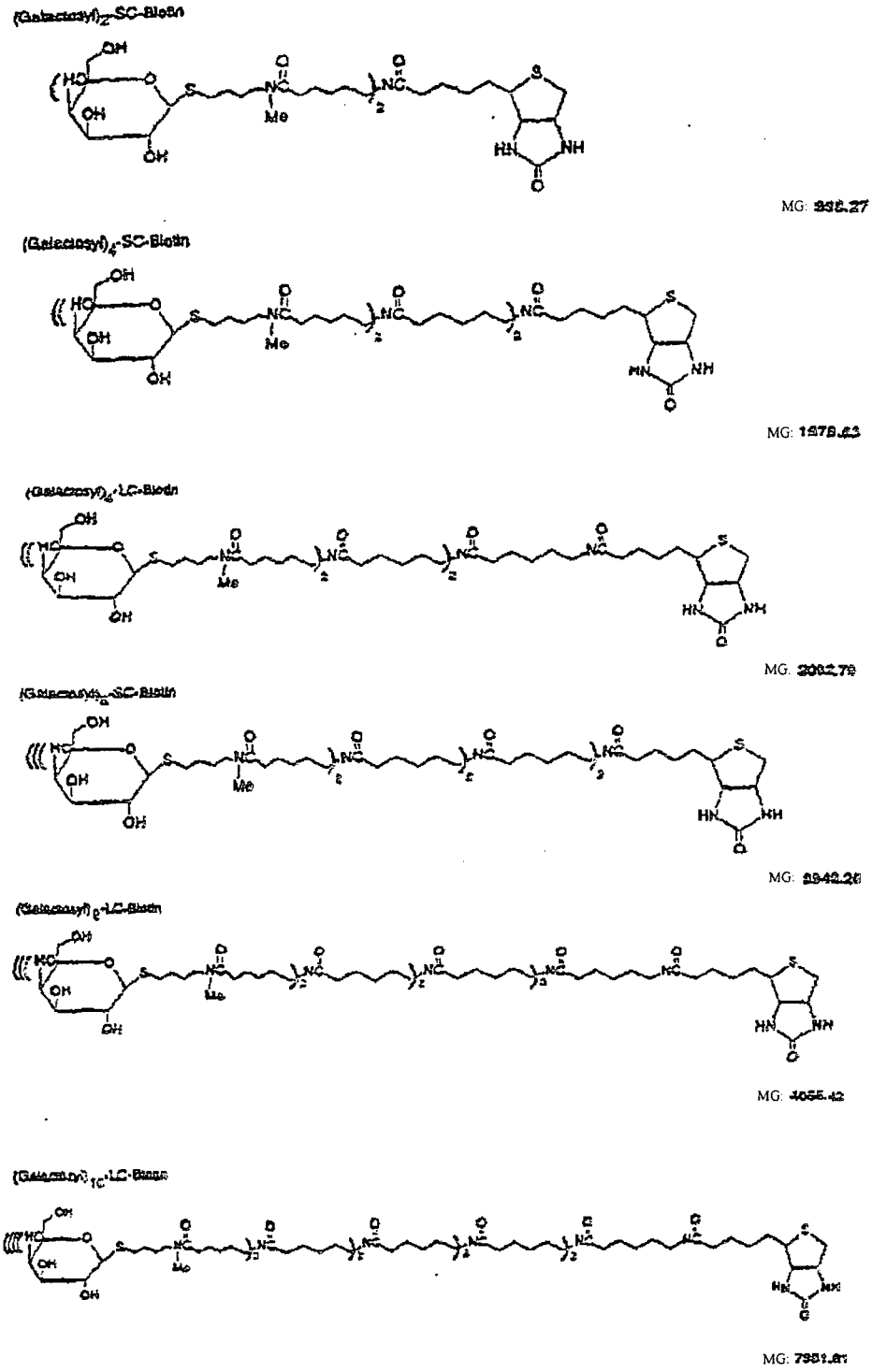
Bewertung der kleinmolekularen Ausscheidungsmittel

[0193] Um die Wirksamkeit der oben beschriebenen kleinmolekularen Ausscheidungsmittel zu zeigen, wurde eine Reihe solcher Konjugate unter Verwendung einer Biotin-Bindungseinheit und Galactoserest-Cluster-Lenkern synthetisiert. Diese Konjugate wurden unter Verwendung verschiedener Anzahlen von gebundenen Galactoseresten synthetisiert. Zusätzlich enthielten diese Konjugate entweder den langkettigen Linker (LC = enthält einen Aminocaproyl-Spacer zwischen dem mit Galactose verbundenen Amin und der mit dem Biotin verbundenen Carboxyleinheit) oder den kurzkettigen Linker (SC = direkte Verknüpfung zwischen dem mit Galactose verbundenen Amin und der mit dein Biotin verbundenen Carboxyleinheit), wie unten angegeben.

[0194] Die in den Tests involvierten Konjugate sind unten dargestellt:







[0195] Einige oder alle von diesen Verbindungen wurden auf ihre die Ausscheidung lenkende Aktivität in zwei Sätzen von Experimenten untersucht. Der erste Satz von Experimenten umfaßte die ex-vivo-Herstellung eines vorkomplexierten Konjugats aus monoklonalem Antikörper, Streptavidin, Biotin und Galactose-Cluster, markiert mit I-125, intravenöse Verabreichung des Konjugats in ein Mäusemodell und Messen der Serumspiegel des Konjugats über die Zeit. Der zweite Satz von Experimenten umfaßte intravenöse Verabreichung von MAb-Streptavidin-Konjugat, gefolgt von Verabreichung von Biotin-Galactose-Cluster-Konjugat.

[0196] NR-LU-10-Antikörper (MG 150 kD) wurde an Streptavidin (MG 66 kD) konjugiert (wie beschrieben in Beispiel II oben) und mit ^{125}I/PIP-NHS radioaktiv markiert, wie unten beschrieben. Die Antikörper-Komponente des Konjugats wurde unter Verwendung von p-Arylzinnphenylat-NHS-ester (PIP-NHS) und ^{125}I-Natriumiodid radioiodiert. Im allgemeinen wurden die Experimente, die Konstrukte aus 2, 4 und 8 Galactosen und Biotin umfaßten, in einer analogen Art und Weise zu derjenigen für das Konstrukt aus Biotin und 16 Galactosen durchgeführt, wie unten beschrieben.

[0197] Die Daten aus diesen Experimenten zeigen, daß kein signifikanter Anstieg der Serumausscheidung (im Vergleich mit dem MAb-Streptavidin-Konjugat selbst) auftritt, bis wenigstens 4 Galactosereste an das Bio-

tinmolekül gebunden sind. Zusätzlich zeigen die Daten, daß der längere Linker, der den Galactose-Cluster vom Biotinmolekül trennt, zu besseren Ausscheidungsraten führte. Dies ist konsistent mit der Überzeugung der Erfinder, daß der Galactose-Cluster mit der Bindung an das auszuscheidende Konjugat interferiert, wenn kein Spacer mit geeigneter Länge verwendet wird, um sterische Wechselwirkungen zu minimieren, oder die Zucker-Hepatocyten-Wechselwirkung sterisch ausgeschlossen ist.

[0198] In einem dritten Satz von Experimenten, in vivo in einem Pretargeting-Format durchgeführt (z. B. Verabreichung von radioaktiv markiertem MAb-Streptavidin-Konjugat, gefolgt von der Verabreichung von Ausscheidungsmittel), wurde das $(Galactosyl)_8$-LC-Biotin-Konjugat auch mit Galactose-HSA-Biotin verglichen, wie oben beschrieben. Dieser Vergleich wurde in einem Balb/c-Mäusemodell durchgeführt und war für die Fähigkeit, ein mit I-125 markiertes Konjugat aus monoklonalem Antikörper und Streptavidin (I-125-LU-10-Streptavidin) als eine Funktion der Zeit aus dem Kreislauf auszuscheiden. Die Ergebnisse dieses Experiments zeigen, daß das $(Galactosyl)_8$-LC-Biotin-Konjugat mit galactosyliertem HSA-Biotin in seiner Fähigkeit vergleichbar ist, das Streptavidin enthaltende Konjugat aus dem Kreislauf auszuscheiden. Anschließende Experimente haben weiter gezeigt, daß auf die Leber zielende Verbindungen, die 16 Galactosereste enthalten, sogar noch bessere Ausscheidung liefern als diejenigen, die 8 Galactosereste enthalten.

[0199] Experimente wurden konzipiert und durchgeführt, um ein 16-Galactose-Cluster-Biotin-Konstrukt ohne die stabilisierende tertiäre Amin-Struktur des Stickstoffs des dem Biotin nächsten Amids zu bewerten, wobei die Herstellung eines solchen stabilisierten Konstrukts oben in Beispiel V beschrieben ist. Weiblichen Balb/c-Mäusen (20–25 g) wurden i. v. 120 Mikrogramm NR-LU-10-Streptavidin-Konjugat, radioaktiv markiert mit I-125, injiziert, und Blut wurde seriell von n = 3 Mäusen gesammelt. Die Ausscheidung des Konjugats aus dem Blut wurde von diesen Kontrollmäusen gemessen. Separaten Gruppen von Mäusen wurden entweder 120 oder 12 Mikrogramm radioaktiv markiertes Konjugat aus monoklonalem Antikörper und Streptavidin injiziert, das mit dem 16-Galactose-Biotin-Konstrukt vorkomplexiert worden war, indem das Biotin-Analog mit einem 20-fachen molaren Überschuß mit dem Antikörper-Konjugat vermischt und das überschüssige kleine Molekül vom Protein durch Ausschlußchromatographie gereinigt wurde. Beide Dosen von vorkomplexiertem Konjugat zeigten extrem schnelle Ausscheidung aus dem Blut, relativ zur Antikörper-Konjugat-Kontrollsubstanz.

[0200] Nachdem gezeigt worden war, daß vorkomplexiertes Material schnell und effizient aus dem Blut ausgeschieden werden konnte, wurden Experimente durchgeführt, um die Wirksamkeit verschiedener Dosen des 16-Galactose-Biotin-Konstrukts zu messen, in vivo schnell ausscheidende Komplexe zu bilden. Mäuse erhielten 400 Mikrogramm I-125-Nr-LU-10-Streptavidin-Konjugat intravenös und erhielten ungefähr 22 Stunden später das 16-Galactose-Biotin-Konstrukt in Dosen von 100, 50 oder 10 : 1 (456, 228 bzw. 45 Mikrogranen) molarer Überschuß zu zirkulierendem Konjugat aus monoklonalem Antikörpern und Streptavidin. Obgleich jede Dosis für die Ausscheidung von Konjugat wirksam war, war die wirksamste Dosis (sowohl kinetisch als auch absolut) die 10 : 1-Dosis. Für die höheren Dosen schien eine gewisse Sättigung des Leberrezeptors vorzuliegen, da beide höheren Dosen ein Plateau der Konjugat-Ausscheidung für etwa 1 Stunde nach Verabreichung des 16-Galactose-Biotin-Konstrukts zeigen. Die höheren Dosen könnten ausreichend hoch sein, um Konkurrenz zwischen komplexiertem und nicht-komplexiertem 16-Galactose-Biotin um Leberrezeptoren zu erreichen, wodurch das gesamte komplexierte MAb-Streptavidin-Konjugat bis auf eine kleine Fraktion zu Beginn von der Ausscheidung über die Leber ausgeschlossen ist. Im Anschluß an die Plateauperiode blieb die Ausscheidung des Konjugats langsam und war letztendlich weniger vollständig als diejenige, die mit der niedrigeren Dosis erhalten wurde (ungefähr 10% des Konjugats blieben im Kreislauf bei den höheren Dosen, im Vergleich zu 2% für die niedrigere Dosis). Eine alternative Erklärung für diesen Befund liegt in der Tatsache, daß das 16-Galactose-Biotin-Konstrukt nicht stabilisiert war gegenüber potentieller Biotinidase-vermittelter Spaltung (z. B. die chemische Synthese baute keinen Methyl-, Niederalkyl-, Carbonsäure-, Niederalkylcarbonsäure- oder ähnliche Gruppe ein gebunden an den Amid-Stickstoff, der am nächstliegendsten zum Biotin angeordnet ist, statt Wasserstoff ein). Wenn das 16-Galactose-Biotin-Konstrukt instabil ist, kann ausreichend Biotin bei höheren Dosen freigesetzt werden, so daß ein signifikanter Anteil von zirkulierendem Konjugat dadurch blockiert wird und folglich über lebervermittelte Aufnahme nicht ausgeschieden wurde.

[0201] In allen Gruppen evident ist der Mangel eines "wiedergebundenen" oder allmählichen Anstiegs der Blutspiegel von zirkulierendem Konjugat im Anschluß an das Aufbrechen des Gleichgewichts zwischen vaskulären und extravaskulären Konzentrationen von Konjugat. Dies stellt bisher den besten Beweis dar, daß Galactose-Cluster-Biotin-Konstrukte in extravaskuläres Fluid austreten und das Konjugat, das extravaskulär komplexiert wird, sehr schnell ausgeschieden wird, wenn es zurück in den vaskulären Raum geht.

[0202] Weitere Experimente im selben Tiermodell verglichen $(Galactose)_{35}$-HSA-$(Biotin)_2$-Ausscheidungsmittel, hergestellt wie oben beschrieben, und sinkende Dosen von 16-Galactose-Biotin-Konstrukt als in-vivo-Ausscheidungsmittel. Eine Dosis von 46 Mikrogramm 16-Galactose-Biotin erwies sich als optimal und wirksamer als die zuvor optimierte Dosis von $(Galactose)_{35}$-HSA-$(Biotin)_2$, Niedrigere (12 und 23 Mikrogramm) und höhere (228 Mikrogramm) Dosen von 16-Galactose-Biotin waren weniger effizient in der Entfernung von zirkulierendem Konjugat, und die niedrigeren Dosen zeigten einen signifikaten Rückbindungseffekt, was darauf hinweist, daß unvollständige Komplexierung mit zirkulierendem Konjugat aufgetreten sein könnte.

[0203] Nachdem man gezeigt hat, daß effektive Ausscheidung mit der geeigneten Dosis von 16-Galactose-Biotin-Konstrukt erreicht werden kann, wurden Studien an tumorbefallenen Nacktmäusen durchgeführt, um die potentielle Blockade von Tumor-assoziiertem Konjugat durch das kleine 16-Galactose-Biotin zu bewerten. Mäuse, die entweder SW-1222-Colontumor-Transplantate oder SHT-1-Kleinzell-Lungenkrebs(SCLC)-Tumor-Transplantate trugen, wurden einem Pretargeting mit NR-LU-10-Streptavidin-Konjugat unterzogen und erhielten 22 Stunden später 46 Mikrogramm 16-Galactose-Biotin. Nach zwei Stunden wurde Y-90-DOTA-Biotin, hergestellt wie oben beschrieben, verabreicht und seine Aufnahme und Retention in Tumor- und Nicht-Target-Geweben wurde durch Opfern und Gewebezählung auf Radioaktivität 2 Stunden nach Verabreichung bewertet.

[0204] Im Vergleich zu historischen Kontrollen, die $(Galactose)_{35}$-HSA-$(Biotin)_2$ einsetzten, war das Tumor-Targeting etwas niedriger beim in hohem Maße Antigen exprimierenden Colon-Transplantat und war leicht höher im in geringem Maße Antigen exprimierenden SCLC-Transplantat. Unter Voraussetzung der normalen Variabilität in solchen Experimenten wurde die Tumoraufnahme von Radioaktivität als grob äquivalent bewertet, ein überraschendes Ergebnis vor dem Hintergrund des Potentials für Targetaufnahme von 16-Galactose-Biotin. Nicht-Target-Organaufnahme war vergleichbar in allen Geweben mit Ausnahme der Leber, wobei Tiere, die 16-Galactose-Biotin erhielten, leicht höhere Spiegel zeigten. Die historischen Kontrollen wurden mit einem dreistündigen Zeitraum zwischen Verabreichung von Ausscheidungsmittel und Radioaktivität durchgeführt. Wenn ein solcher dreistündiger Zeitraum zwischen Verabreichung von 16-Galactose-Biotin und Radioaktivität zugelassen wurde, waren die Leberspiegel niedriger und vergleichbar zu demjenigen des HSA enthaltenden Agens (ungefähr 1% injizierte Dosis/Gramm).

[0205] Experimente wurden auch durchgeführt unter Verwendung von mit I-125 markiertem MAb-Streptavidin-Konjugat und mit In-111 markiertem DOTA-Biotin, um die relative Stöchiometrie dieser Materialien an der Tumor-Targetstelle zu bestimmen, unter Verwendung von 16-Galactose-Biotin als einem Ausscheidungsmittel. Vorherige Studien mit $(Galactose)_{35}$-HSA-$(Biotin)_2$ hatten gezeigt, daß ein erwartetes 4 : 1-Verhältnis von DOTA-Biotin zu MAb-Streptavidin (Streptavidin hat 4 Biotin-Bindungsstellen) am Tumor mit einer optimierten Dosis dieses Ausscheidungsmittels erreicht werden konnte. Wenn ein ähnliches Protokoll mit dem 16-Galactose-Biotin-Konstrukt eingesetzt wurde, war das Verhältnis von DOTA-Biotin zu MAb-Streptavidin nur 2,65. Dies wies darauf hin, daß ein gewisses Auffüllen von Tumor-assoziiertem Streptavidin aufgetreten sein könnte, obgleich die Natur einer solchen Blockade (16-Galactose-Biotin oder daraus freigesetztes Biotin) nicht bestimmt wurde. Experimente, um die Natur dieser Blockade zu bestimmen, sind in Arbeit.

[0206] Zusammenfassend zeigten Galactose-Cluster-Konjugate die Fähigkeit, zirkulierendes Konjugat auszuscheiden, vorausgesetzt, daß der Galactose-Cluster eine ausreichende Zahl von mit geeignetem Abstand angeordneten Galactosylresten enthält. 16-Galactose-Biotin hat sich als ein effektives Konstrukt zum Ausscheiden von MAb-Streptavidin aus dem Kreislauf (sowohl aus vaskulären als auch extravaskulären Räume) erwiesen. Trotz einer offensichtlichen Blockade einiger, einem Pretargeting unterzogene Biotin-Bindungstellen am Tumor konnte ein effizientes Tumor-Targeting unter Verwendung dieses Agens immer noch erreicht werden. Die Stabilisierung der Verknüpfung zwischen Biotin und dem Galactose-Cluster kann jede Tumor-assoziierte Biotin-Bindungsstelle-Störung durch das Galactose-Cluster-Biotin-Konstrukt minimieren.

BEISPIEL VII

Lenkerreagenz-Herstellung

[0207] Dieses Verfahren ist schematisch in **Fig.** 3 dargestellt.

[0208] N-BOC-bismethylester. Zu 1,00 g (3,23 mmol) des Amin-Hydrochlorids, N,N'-Bis-(6-methoxycarbonylhexyl)amin-Hydrochlorid, hergestellt wie oben beschrieben, wurden 1,5 ml (10,6 mmol) Triethylamin zugegeben, gefolgt von 875 mg (3,55 mmol, 1,1 Äquiv.) BOC-ON, 2-(tert-Butoxycarbonyloxyimino)-2-phenylacetonitril. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 18 Stunden gerührt und anschließend konzentriert. Der Rückstand wurde mit 100 ml Ethylacetat verdünnt und mit 1 N wässriger Salzsäure gewaschen (3 × 50 ml), gefolgt von gesättigtem wässrigen Natriumbicarbonat (2 × 50 ml). Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und konzentriert. Der Rückstand wurde auf Silicagel chromatographiert, unter Elution mit 15% (Prozentanteil bezogen auf das Volumen) Ethylacetat/Hexan. Chromatographische Fraktionen, die Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert, um 990 mg Produkt als ein nahezu farbloses Öl (83%) zu liefern.

[0209] N-BOC-Bissäure. Zu 980 mg (2,62 mmol) des Diesters, hergestellt im vorherigen Schritt, in 10 ml Methanol wurden 5,8 ml 1 N wässriges Natriumhydroxid (5,8 mmol) zugegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 16 Stunden gerührt und anschließend konzentriert. Der Rückstand wurde mit 30 ml entionisiertem Wasser verdünnt und auf pH 1,5–2 angesäuert. Die Mischung wurde mit Ethylacetat extrahiert (6 × 50 ml). Die organischen Extrakte wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und konzentriert. Der Rückstand wurde auf Umkehrphasen-C-18-Silicagel, kommerziell erhältlich von J. T. Baker, chromatographiert, unter Elu-

tion mit 63% Methanol/Wasser. Chromatographische Fraktionen, die Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert, um 851 mg Produkt als ein nahezu farbloses Öl (94%) zu liefern.

[0210] N-BOC-tetramethylester. Zu 825 mg (2,39 mmol) der Bissäure, hergestellt wie oben beschrieben, in 35 ml trockenem Dimethylformaid wurden 1,75 g (5,65 mmol, 2,36 Äquiv.) Amin-Hydrochlorid, N,N'-Bis-(6-methoxycarbonlyhexyl)amin-Hydrochlorid, und 3,0 ml Triethylamin zugegeben, gefolgt von 2,4 g (5,4 mmol, 2,3 Äquiv.) BOP. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 17 Stunden gerührt und anschließend konzentriert. Der Rückstand wurde mit 100 ml Ethylacetat verdünnt und mit 1 N Salzsäure gewaschen (3 × 50 ml), gefolgt von Waschen mit wässrigem Natriumbicarbonat (2 × 50 ml). Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und konzentriert. Der Rückstand wurde auf Silicagel chromatographiert, unter Elution mit Ethylacetat. Chromatographische Fraktionen, die Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert, um 1,63 g des Produktes als ein nahezu farbloses Öl (80%) zu liefern.

[0211] N-BOC-tetrasäure. Zu einer Lösung von 1,41 g (1,65 mmol) Tetramethylester, hergestellt wie oben beschrieben, in 25 ml Methanol wurden 7,41 ml (7,4 mmol) 1 N wässriges Natriumhydroxid zugegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 22 Stunden gerührt und anschließend konzentriert. Der Rückstand wurde mit 30 ml entionisiertem Wasser verdünnt und mit 1 N wässriger Salzsäure auf pH 2 angesäuert. Die Mischung wurde mit 3 : 1 (Volumverhältnis) Ethylacetat/Isopropanol extrahiert (3 × 100 ml). Die organischen Extrakte wurden konzentriert. Der Rückstand wurde auf Umkehrphasen-C-18-Silicagel chromatographiert, unter anfänglicher Elution mit 50 : 50 (Volumenverhältnis) Methanol/Wasser und schließlich mit 75 : 25 Methanol/Wasser. Chromatographische Fraktionen, die Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert, um 1,19 g des Produktes als ein farbloses Öl (90%) zu liefern.

[0212] N-BOC-octamethylester. Zu einer Mischung von 501 mg (0,626 mmol) Tetrasäure, hergestellt wie oben beschrieben, und 50 ml trockenem Dimethylformamid wurden 968 mg (3,12 mmol, 5,0 Äquiv.) Amin-Hydrochlorid, N,N'-Bis-(6-methoxycarboxyhexyl)amin-Hydrochlorid, und 2,0 ml (14,2 mmol) Triethylamin, zugegeben, gefolgt von 1,22 g (2,76 mmol, 4,6 Äquiv.) BOP. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 19 Stunden gerührt und anschließend konzentriert. Der Rückstand wurde mit 75 ml Ethylacetat verdünnt und mit 1 N wässriger Salzsäure gewaschen (2 × 50 ml). Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und konzentriert. Der Rückstand wurde auf Umkehrphasen-C-18-Silicagel chromatographiert, unter anfänglicher Elution mit 60 : 40 Methanol/Wasser und schließlich mit 90 : 10 Methanol/Wasser. Die chromatographischen Fraktionen, die Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert, um 715 mg des Produktes als ein farbloses Öl (63%) zu liefern.

[0213] N-BOC-octasäure. Zu einer Lösung von 715 mg (0,393 mmol) Octamethylester, hergestellt wie oben beschrieben, in 20 ml Methanol wurden 6 ml 1 N wässriges Natriumhydroxid (6 mmol) und 5 ml entionisiertes Wasser zugegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 16 Stunden gerührt und anschließend konzentriert. Der Rückstand wurde mit 20 ml entionisiertem Wasser verdünnt und die Lösung auf pH 1,5–2,0 angesäuert. Die Mischung wurde konzentriert und der Rückstand wurde auf Umkehrphasen-C-18-Silicagel chromatographiert, unter anfänglicher Elution mit 50 : 50 Methanol/Wasser und schließlich mit 80 : 20 Methanol/Wasser. Die chromatographischen Fraktionen, die Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert, um 647 mg des Produktes als ein nahezu farbloses Öl (96%) zu liefern.

[0214] Das obige Verfahren ist konzipiert für die Herstellung eines Galactose-Clusters von 8 Galactoseresten. Die Version mit vier Galactosen könnte gemäß diesem Verfahren hergestellt werden, indem man von der Tetrasäure zum Galactose-Derivatisierungsschritt voranschreitet, der unten für den 8-Galactose-Cluster beschrieben ist. In ähnlicher Weise können Cluster-Konstrukte mit 16, 32, etc. Galactosen gemäß der vorliegenden Erfindung durch Einführen von zwei oder mehr Iterationen der Methylester- und Säure-Herstellungsschritte hergestellt werden. Genauer gesagt, würden das 16-Methylester-Konstrukt, die 16-Säure, der 32-Methylester usw. im wesentlichen so hergestellt werden, wie oben für die Tetra- und Octa-Formen beschrieben. Wenn die gewünschte Anzahl von Säureresten gebildet sind, wird der Galactose-Derivatisierungsschritt eingesetzt, wobei die Anteile der Komponenten so eingestellt werden, daß sie mit der Anzahl der Säurereste zusammenpassen.

[0215] n-BOC-octagalactosyl-Konstrukt. Zu einer Mischung von 161 mg (94 mmol) Octasäure, hergestellt wie oben beschrieben, und 225 mg (906 Mikromol, 9,64 Äquiv.) Galactoseamin, 4-N-Methylaminobutyl-1-thio-beta-D-galactopyranosid, in 8 ml trockenem Dimethylformamid wurden 0,5 ml (3,54 mmol) Triethylamin zugegeben, gefolgt von 371 mg (839 Mikromol, 8,4 Äquiv.) BOP. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 17 Stunden gerührt und anschließend konzentriert. Der Rückstand wurde auf Umkehrphasen-C-18-Silicagel chromatographiert, unter anfänglicher Eluation mit 40 : 60 Methanol/Wasser und schließlich mit 70 : 30 Methanol/Wasser. Die chromatographischen Fraktionen, die Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert, um 170 mg des Produktes als ein nahezu farbloses Öl (47%) zu liefern.

[0216] Octagalactosylamin. Zu 170 mg des N-BOC-octagalactosyl-Konstrukts, hergestellt wie oben beschrieben, wurden 5 ml Trifluoressigsäure zugegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 10 Minuten gerührt und anschließend konzentriert. Der Rückstand wurde mit 10 ml Methanol verdünnt und erneut konzentriert. Der Rückstand wird ohne weitere Reinigung verwendet.

[0217] Weitere Lenkerreagenz-Familien, die andere funktionelle Gruppen als die Amingruppe des oben hergestellten Konstrukts tragen, können aus dem Amin-Konstrukt unter Verwendung von standardmäßigen chemischen Techniken zur Umwandlung von Aminen in andere funktionelle Gruppen hergestellt werden.

BEISPIEL VIII

Herstellung verlängerter Lenkerreagentien

Herstellung von Galactose-Cluster mit Verlängerer

[0218] Dieses Verfahren ist schematisch dargestellt in **Fig.** 4. Dieses Verfahren wird vorgenommen, falls erforderlich, um die Lenkerreagenz-Konjugation zu erleichtern. Das Verlängerungsverfahren, das in diesem Beispiel eine funktionelle Amingruppe erhält, kann auch verwendet werden, um eine alternative funktionelle Gruppe einzuführen, wie hierin diskutiert.

[0219] Methyl-6-(N-BOC)-aminocaproat. Zu einer Mischung von Amin-Hydrochlorid, Methyl-6-aminohexanoat-Hydrochlorid, hergestellt wie oben beschrieben, werden 1,1 äquivalente BOC-ON zugegeben, gefolgt von 2–3 äquivalenten Triethylaminen. Die Mischung wird bei 15–30°C für 16–24 Stunden gerührt und anschließend konzentriert. Der Rückstand wird in Ethylacetat gelöst und mit 1 N wässriger Salzsäure und anschließend mit gesättigtem wässrigen Natriumbicarbonat gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und über Rotationsverdampfung unter verringertem Druck konzentriert. Der Rückstand wird auf Silicagel chromatographiert, unter Elution mit 25% Ethylacetat/Hexan. Die chromatographischen Fraktionen, die das Produkt enthalten, werden vereinigt und konzentriert, um das Produkt zu liefern.

[0220] 6-(N-BOC)-aminocapronsäure. Zu einer Lösung des Methylesters, Methyl-6-(N-BOC)aminocaproat, in Methanol werden 1,5 äquivalente 1 N wässriges Natriumhydroxid zugegeben. Die Mischung wird bei 15–30°C für 16–24 Stunden gerührt und anschließend konzentriert. Der Rückstand wird mit entionisiertem Wasser verdünnt und mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Extrakte werden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und konzentriert. Der Rückstand wird auf Silicagel chromatographiert, unter anfänglicher Elution mit 25% Ethylacetat/Hexan und schließlich mit 100% Ethylacetat. Die chromatographischen Fraktionen, die das Produkt enthalten, werden vereinigt und konzentriert, um das Produkt zu liefern.

[0221] N-BOC-verlängertes Octagalactosyl-Konstrukt. Zu einer Lösung des Octagalactosylamins, hergestellt wie oben beschrieben, in Dimethylformamid und 1,5–3 äquivalenten 6-(N-BOC)aminocapronsäure werden 4–6 äquivalente Triethylamin zugegeben, gefolgt von 1,1–1,5 äquivalenten BOP. Die Mischung wird bei 15–30°C für 4–24 Stunden gerührt und anschließend konzentriert. Der Rückstand wird mit entionisiertem Wasser verdünnt und der pH durch Zugabe von 1 N wässriger Salzsäure auf 1,5 bis 2,0 eingestellt. Die Mischung wird mit Ethylacetat gewaschen. Die wässrige Phase wird konzentriert und der Rückstand auf Umkehrphasen-C-18-Silicagel chromatographiert, unter anfänglicher Elution mit 50 : 50 Methanol/Wasser und schließlich mit 65 : 35 Methanol/Wasser. Die chromatographischen Fraktionen, die Produkt enthalten, werden vereinigt und konzentriert, um das Produkt zu liefern.

[0222] Amin-verlängertes Octagalactosyl-Konstrukt. Zum N-BOC-geschützten Amin, hergestellt im vorherigen Schritt, wird Trifluoressigsäure zugegeben. Die Mischung wird bei 15–30°C für 10 Minuten gerührt und anschließend konzentriert. Der Rückstand wird mit Methanol verdünnt und erneut konzentriert, um das Produkt zu liefern, das ohne weitere Reinigung verwendet wird.

BEISPIEL IX

Radioaktiv markierte Annexin-Galactose-Cluster-Konjugate, Ansatz mit trifunktionellem Linker

A. Chelat-Herstellung Die Herstellung von Chelat N,N'-Bis(2-disulfidyl-4-methylphenyl)gamma,gamma'-diamino-isovalerat-N-hydroxysuccinimid, wie schematisch dargestellt in **Fig.** 5.

[0223] 3-Iodmethyl-4-iodbuttersäure: Zu einer Lösung von 1,61 g (10 mmol) 3-Hydroxymethyl-4-butanolid (hergestellt mit dem Verfahren von Kinoshita und Hirano, J. Hetrocyclic Chem., 29: 1025, 1992) in 100 ml Tetrachlorkohlenstoff werden 8 g (40 mmol) Iodtrimethylsilan zugegeben. Die Reaktionsmischung wird bei 50°C für 12 Stunden unter Stickstoff erhitzt. Die Mischung wird mit Chloroform verdünnt und mit Wasser (3 × 100 ml), 5%-igem wässrigen Natriumthiosulfat (100 ml), 10%-igem wässrigen Natriumbicarbonat und Salzlösung gewaschen. Die organische Schicht wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingedampft, um das gewünschte Rohprodukt zu ergeben. Das Rohprodukt wird durch Silicagel-Chromatographie gereinigt (Ethylacetat-Hexan = 3 : 7 als das Elutionslösemittel), um 3-Iodmethyl-4-iodbuttersäure zu ergeben.

[0224] Ethyl-3-iodmethyl-4-iodbutyrat: Eine Lösung von 2,831 g (8 mmol) 3-Iodmethyl-4-Iodbuttersäure in 80 ml Ethanol wird mit HCl-Gas bei 0°C gesättigt. Nach Rühren der Lösung bei Raumtemperatur für zwei Tage

wird das Lösemittel unter Vakuum abgezogen und der Rückstand wird in Dichlormethan gelöst. Die Dichlormethan-Schicht wird mit 10%-igem wässrigen Natriumbicarbonat (3 × 100 ml), Wasser (1 × 100 ml) und Salzlösung gewaschen. Die abgetrennte Dichlormethan-Schicht wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingedampft, um Ethyl-3-iodmethyl-4-iodbutyrat zu ergeben.

[0225] Ethyl-gamma,gamma'-di(4-methylanilino)isovalerat: Eine gerührte Lösung von 7,5 g (70 mmol) 4-Toluidin, 2,764 g (7 mmol) Ethyl-3-iodmethyl-4-iodbutyrat und 0,588 g (7 mmol) Natriumbicarbonat in 30 ml trockenem Dimethylsulfoxid wird bei 100°C für 3 Stunden unter Stickstoff erhitzt. Die abgekühlte Mischung wird unter Rühren auf 400 ml Eiswasser gegossen. Der resultierende Niederschlag wird durch Filtration gesammelt. Das restliche 4-Toluidin im Niederschlag wird durch mehrmaliges Waschen mit wässriger Essigsäure entfernt. Das Produkt wird durch Umkristallisation des gewaschenen Niederschlags in Heptan erhalten.

[0226] Ethyl-gamma,gamma'-[1,3-di(2-imino-6-methylbenzthiazolyl-3)]isovalerat: Zu einer magnetisch gerührten Suspension von 2,0 g (6,5 mmol) Ethyl-gamma,gamma'-di(4-methylanilino)isovalerat in 250 ml Eisessig wird Ammoniumthiocyanat (3,5 g, 0,046 mmol) zugegeben, gefolgt von der tropfenweise Zugabe einer Lösung von Brom (7,27 g, 0,046 mmol) in 50 ml Eisessig. Nachdem die Zugabe abgeschlossen ist, wird das Rühren über Nacht fortgesetzt. Der gelbe Niederschlag aus Dihydrobromidsalz wird abfiltriert und getrocknet. Der getrocknete Feststoff wird anschließend in heißem Wasser gelöst und das Benzothiazol als freie Base wird mit gesättigter Natriumbicarbonat-Lösung freigesetzt. Der weiße Feststoff wird abfiltriert und getrocknet, um Rohprodukt zu ergeben, das ohne weitere Reinigung verwendet wird.

[0227] N,N'-Bis(2-disulfidyl-4-methyphenyl)-gamma,gamma'-diaminoisovaleriansäure: Zu einer Suspension von Ethyl-gamma,gamma'-[1,3-di(2-imino-6-methylbenzthiazolyl-3)]isovalerat in 40 ml destilliertem Wasser werden feste Kaliumhydroxid-Pellets (20,0 g, 0,037 mol) zugegeben und die resultierende Lösung wird bei 120°C für 15–24 Stunden erhitzt. Nach mehreren Stunden Erhitzen wird die Suspension eine klare Lösung. Die Reaktionsmischung wird in einem Eisbad abgekühlt und mit 5,0 N Essigsäure auf pH 5,0 angesäuert, und die wässrige Lösung wird mit 3 100m-Portionen Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetat-Extrakte werden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Lösemittel aus dem Filtrat wird unter verringertem Druck abgezogen, um Rohprodukt zu ergeben. Dieses Rohprodukt wird auf Silicagel-Säule unter Verwendung einer 20 : 80-Mischung von Ethylacetat : Hexan mit 1% Essigsäure als Elutionslösemittel chromatographiert, um das Produkt als einen kristallinen gelben Feststoff zu ergeben.

[0228] N,N'-Bis(2-disulfidyl-4-methylphenyl)-gamma,gamma'-diaminoisovalerat-N-hydroxysuccinimid:
N,N'-Bis(2-disulfidyl-4-methylphenyl)-gamma,gamma'-diaminoisovaleriansäure wird umgesetzt mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in entweder Tetrahydrofuran (THF) oder Dimethylformamid (DMF) bei Raumtemperatur. Nach Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wird das Lösemittel entfernt und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie auf Silicagel gereinigt.

B. Konjugat-Bildung.

[0229] Dieses Chelat ist verfügbar für die Verwendung mit einem geeigneten trifunktionellen Linker, um ein Konjugat aus radioaktiv markiertem Annexin und Galactose-Cluster der vorliegenden Erfindung zu bilden, wie unten beschrieben.

[0230] Kommerziell erhältliches N-epsilon-t-BOC-Lysin (Sigma Chemical Company) wird unter Verwendung von Trifluoressigsäureanhydrid in sein N-alpha-Trifluoracetamid-Addukt umgewandelt. Aktivierung der Carbonsäure-Funktionalität mit zum Beispiel BOP (Benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethyl-amino)-phosphoniumhexafluorphosphat), kommerziell erhältlich von Aldrich Chemical Company, und Reaktion der aktivierten Einheit mit dem einzigen zugänglichen Amin auf einem Galactose-Cluster, z. B. gebildet wie oben beschrieben, liefert eine Spezies aus Galactose-Cluster und trifunktionellem Linker. Das Alpha-Amin des Lysins der trifunktionellen Linker-Komponente der Spezies aus Galactose-Cluster und trifunktionellem Linker wird unter Verwendung von methanolischem Natriumhydroxid von der Schutzgruppe befreit. Die Reaktion mit dem N-Hydroxysuccinimidester des Chelatmoleküls, gebildet wie angegeben in Teil A dieses Beispiels, liefert eine Spezies aus Galactose-Cluster, Chelat und trifunktionellem Linker. Abspalten der Schutzgruppe des Epsilon-Amins des Lysins der trifunktionellen Linker-Komponente unter Verwendung von Trifluoressigsäure, gefolgt von der Reaktion mit Bernsteinsäureanhydrid, liefert eine zugängliche Carbonsäure-Funktionalität, durch die das Annexin im Anschluß an die Aktivierung der Carbonsäure (z. B. mit BOP) konjugiert werden kann.

[0231] Kits, die eine oder mehrere der oben beschriebenen Komponenten enthalten, werden ebenfalls in Betracht gezogen. Galactose-Cluster-Biotin-Konjugat kann zum Beispiel in einem sterilen Behälter zur Verwendung im Pretargeting-Verfahren bereitgestellt werden. Alternativ kann solch ein Galactose-Cluster-Biotin-Konjugat in einem nicht-sterilen Zustand zur Verwendung als ein Forschungsreagenz in einer Ampulle abgefüllt werden.

Patentansprüche

1. Reagenz, welches beinhaltet:
einen Hexose-Cluster, gekennzeichnet durch mindestens 9 Hexosereste, die in einer verzweigten Konfiguration verbunden sind, die aus zwei- oder dreiarmigen Zweigen besteht, und
eine chemisch reaktive Gruppe, die in der Lage ist, mit einem Element von einem Ligand/Antiligand-Paar, einer Gruppe, die an eine bestimmte Target-Zellpopulation bindet, oder einem diagnostischen oder therapeutischen Mittel zu reagieren, wobei die Reaktion eine notwendige Funktion der Komponente, mit der die chemisch reaktive Gruppe reagiert, nicht beeinträchtigt.

2. Reagenz nach Anspruch 1, worin der Hexose-Cluster aus zweiarmigen Zweigen und aus 16, 32 oder 64 Hexoseresten besteht.

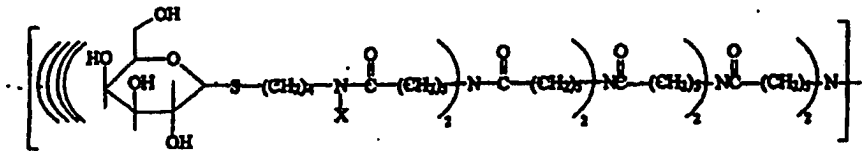
3. Reagenz nach Anspruch 1, worin der Hexose-Cluster aus dreiarmigen Zweigen und aus 9, 27 oder 81 Hexoseresten besteht.

4. Reagenz nach Anspruch 1, worin der Hexose-Cluster aus Galactoseresten gebildet ist.

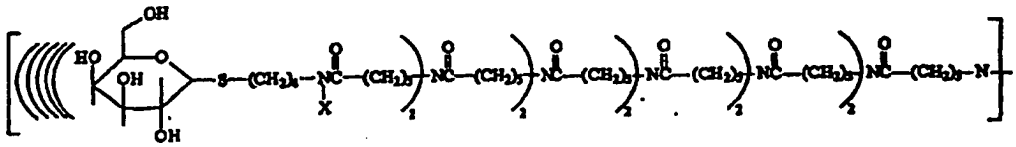
5. Reagenz nach Anspruch 1, worin der Hexose-Cluster aus N-Acetylgalactosaminresten gebildet ist.

6. Reagenz nach Anspruch 1, worin der Hexose-Cluster 16 bis 64 Galactosereste enthält und vorzugsweise aus 16 oder 32 Galactoseresten, vorzugsweise 16 Resten gebildet ist.

7. Reagenz nach Anspruch 1, worin der Hexose-Cluster eine der folgenden Formeln aufweist:



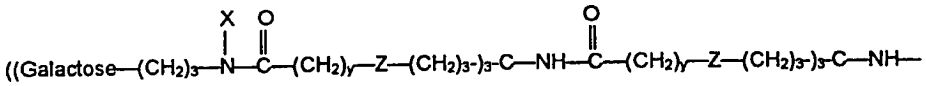
worin X N oder Methyl ist, und



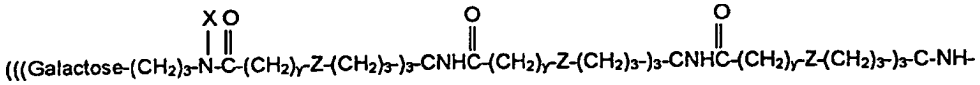
worin X H oder Methyl ist.

8. Reagenz nach Anspruch 1, in dem der Hexose-Cluster dadurch gekennzeichnet ist, dass er mindestens 9 Hexosereste umfasst, die in einer iterativ verzweigten Konfiguration verbunden sind, wobei jeder Zweig der Konfiguration drei Arme aufweist.

9. Reagenz nach Anspruch 8, worin der Hexose-Cluster eine der folgenden Formeln aufweist:



worin X N oder Methyl ist, y 1 bis 10 ist und Z O oder S ist, und



worin X N oder Methyl ist, y 1 bis 10 ist und Z O oder S ist.

10. Reagenz nach Anspruch 1, worin die funktionelle Gruppe ausgewählt ist aus einem aktivierten Ester, einem Maleinimid, einem Isocyanat, einem Alkylhalogenid, einem Nydrazid, einem Thio, einem Imidat und einem Aldehyd.

11. Auf die Leber gerichtete Verbindung, welche beinhaltet:

einen Hexose-Cluster, gekennzeichnet durch mindestens 9 Hexosereste, die in einer verzweigten Konfiguration verbunden sind, die aus zweioder dreiarmigen Zweigen besteht, und
ein Element aus einem Ligand/Antiligand-Paar, eine Gruppe, die an eine bestimmte Target-Zellpopulation bindet, und/oder ein diagnostisches oder therapeutisches Mittel.

12. Auf die Leber gerichtete Verbindung nach Anspruch 11, in der der Hexose-Cluster wie in irgendeinem der Ansprüche 1 bis 8 definiert ist.

13. Reagenz nach Anspruch 1 oder auf die Leber gerichtete Verbindung nach Anspruch 11, worin das diagnostische oder therapeutische Mittel ein Radionuklid beinhaltet.

14. Reagenz nach Anspruch 1 oder auf die Leber gerichtete Verbindung nach Anspruch 11, worin das Element von dem Ligand/Antiligand-Paar Biotin ist.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

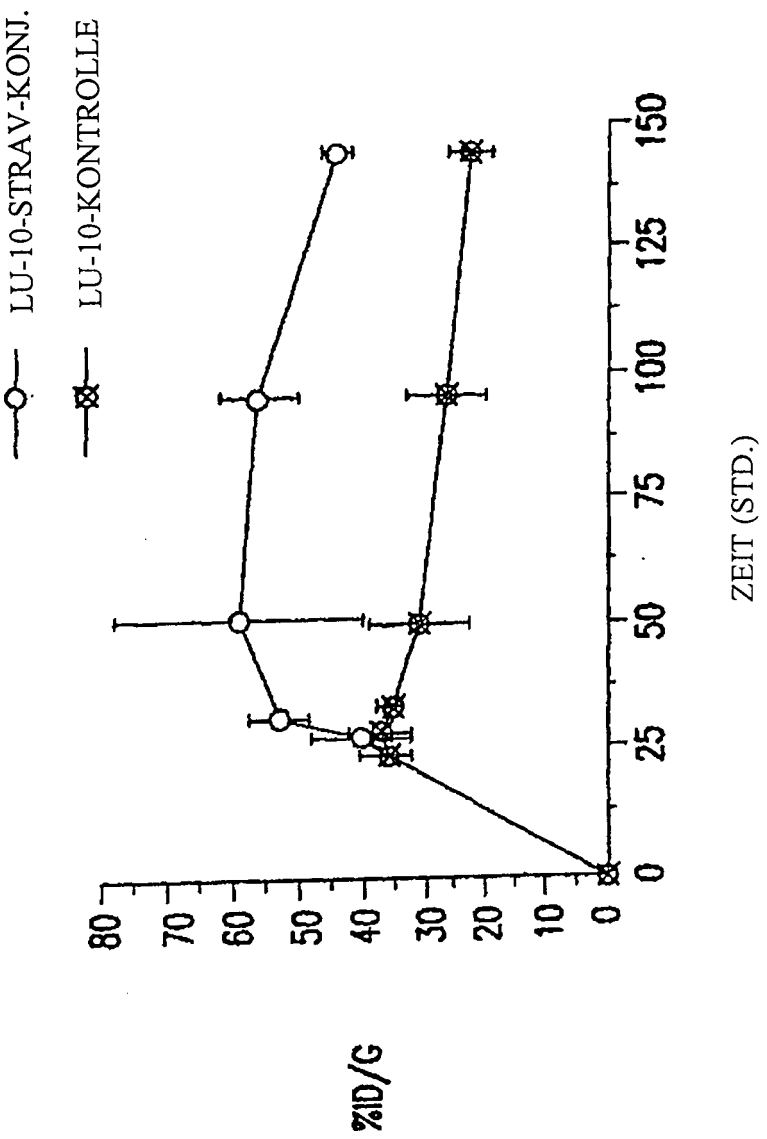


FIG.1

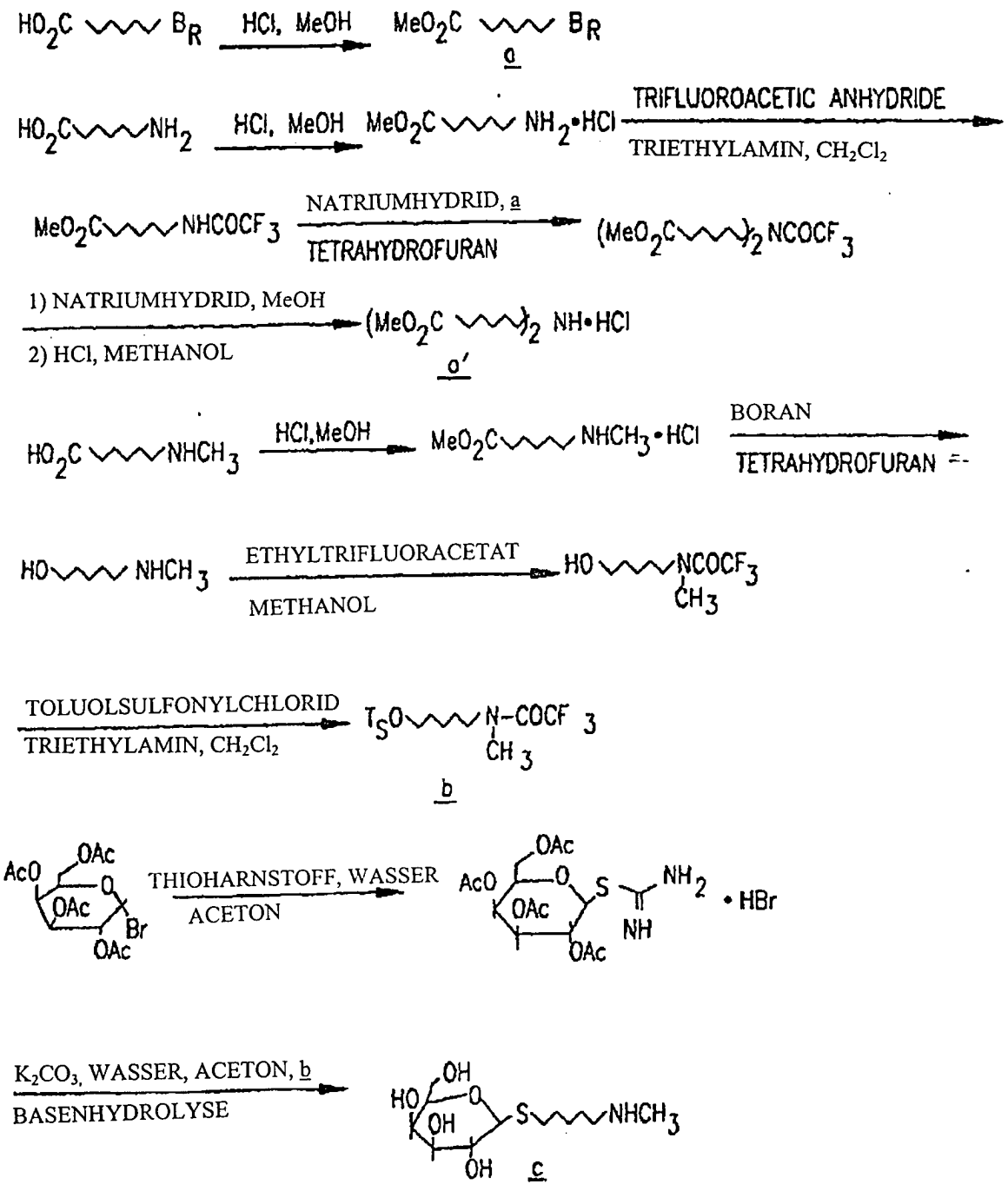

HO2C BR
HCl, MeOH
MeO2C BR
a
HO2C NH2
HCl, MeOH
MeO2C NH2•HCl
TRIFLUOROACETIC ANHYDRIDE
TRIETHYLAMIN, CH2Cl2
MeO2C NHCOCF3
NATRIUMHYDRID, a
TETRAHYDROFURAN
(MeO2C)2 NCOCF3
1) NATRIUMHYDRID, MeOH
2) HCl, METHANOL
(MeO2C)2 NH•HCl
a'
HO2C NHCH3
HCl,MeOH
MeO2C NHCH3•HCl
BORAN
TETRAHYDROFURAN
HO NHCH3
ETHYLTRIFLUORACETAT
METHANOL
HO NCOCF3
CH3
TOLUOLSULFONYLCHLORID
TRIETHYLAMIN, CH2Cl2
TsO N-COCF3
CH3
b
AcO OAc Br
THIOHARNSTOFF, WASSER
ACETON
AcO S NH2 • HBr
NH
K2CO3, WASSER, ACETON, b
BASENHYDROLYSE
HO OH S NHCH3
c

FIG.2A

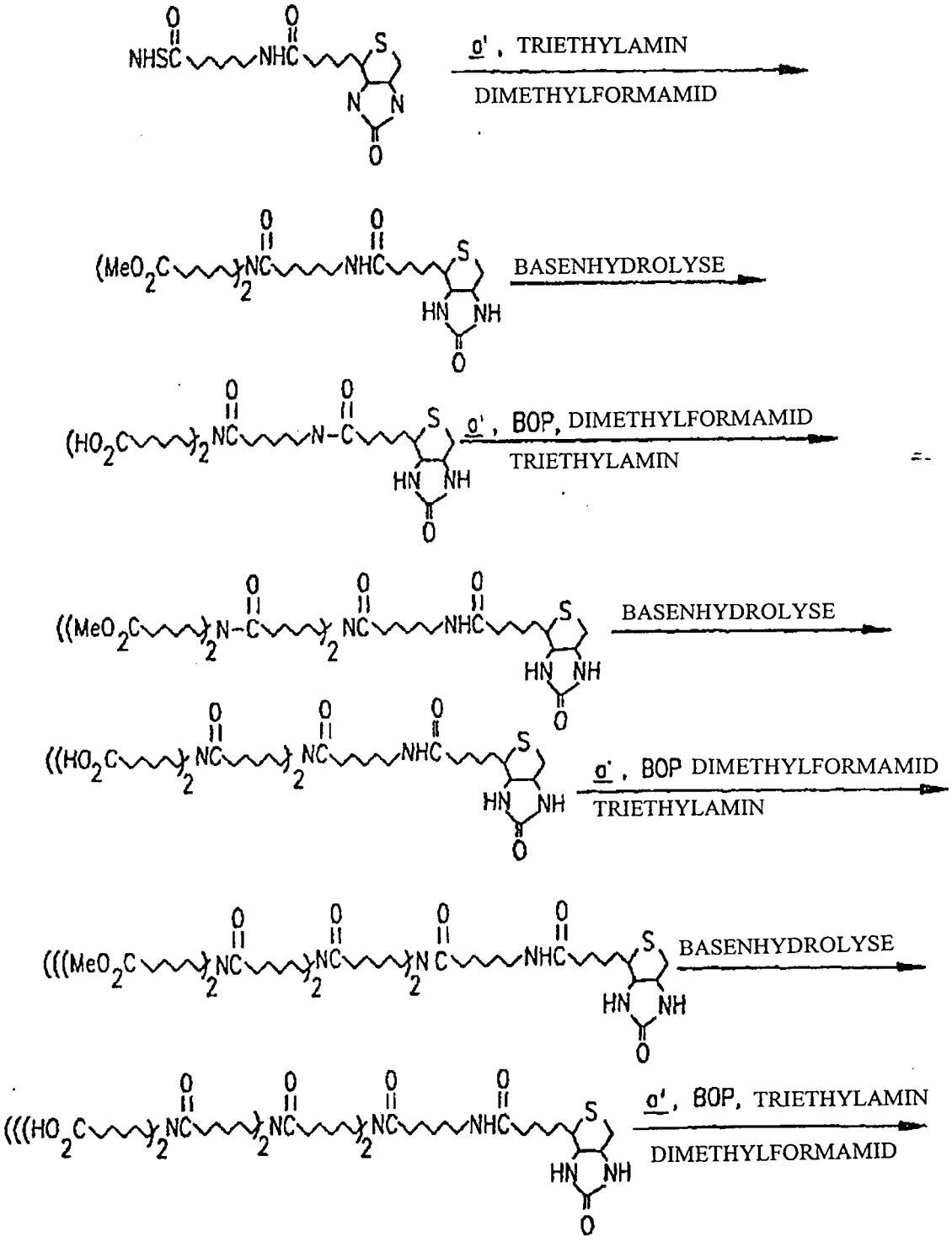

a', TRIETHYLAMIN
DIMETHYLFORMAMID
BASENHYDROLYSE
a', BOP, DIMETHYLFORMAMID
TRIETHYLAMIN
BASENHYDROLYSE
a', BOP DIMETHYLFORMAMID
TRIETHYLAMIN
BASENHYDROLYSE
a', BOP, TRIETHYLAMIN
DIMETHYLFORMAMID

FIG.2B

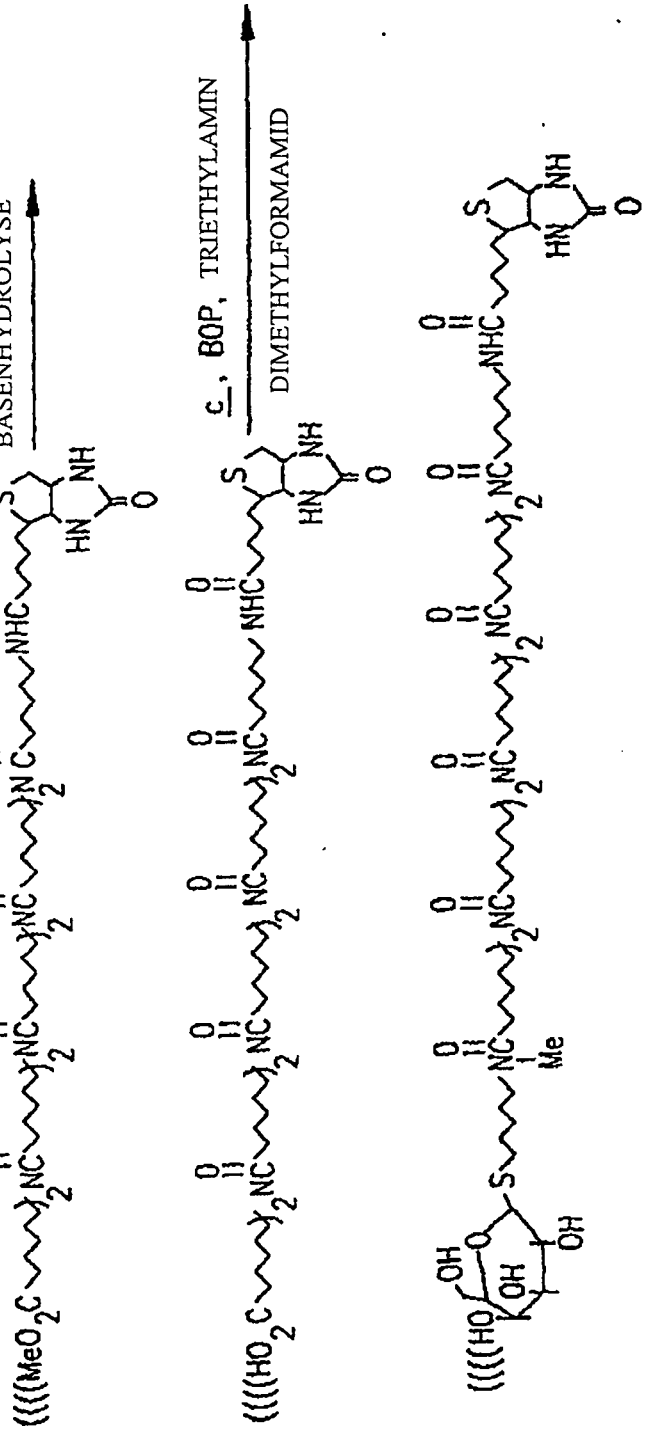


FIG.2C

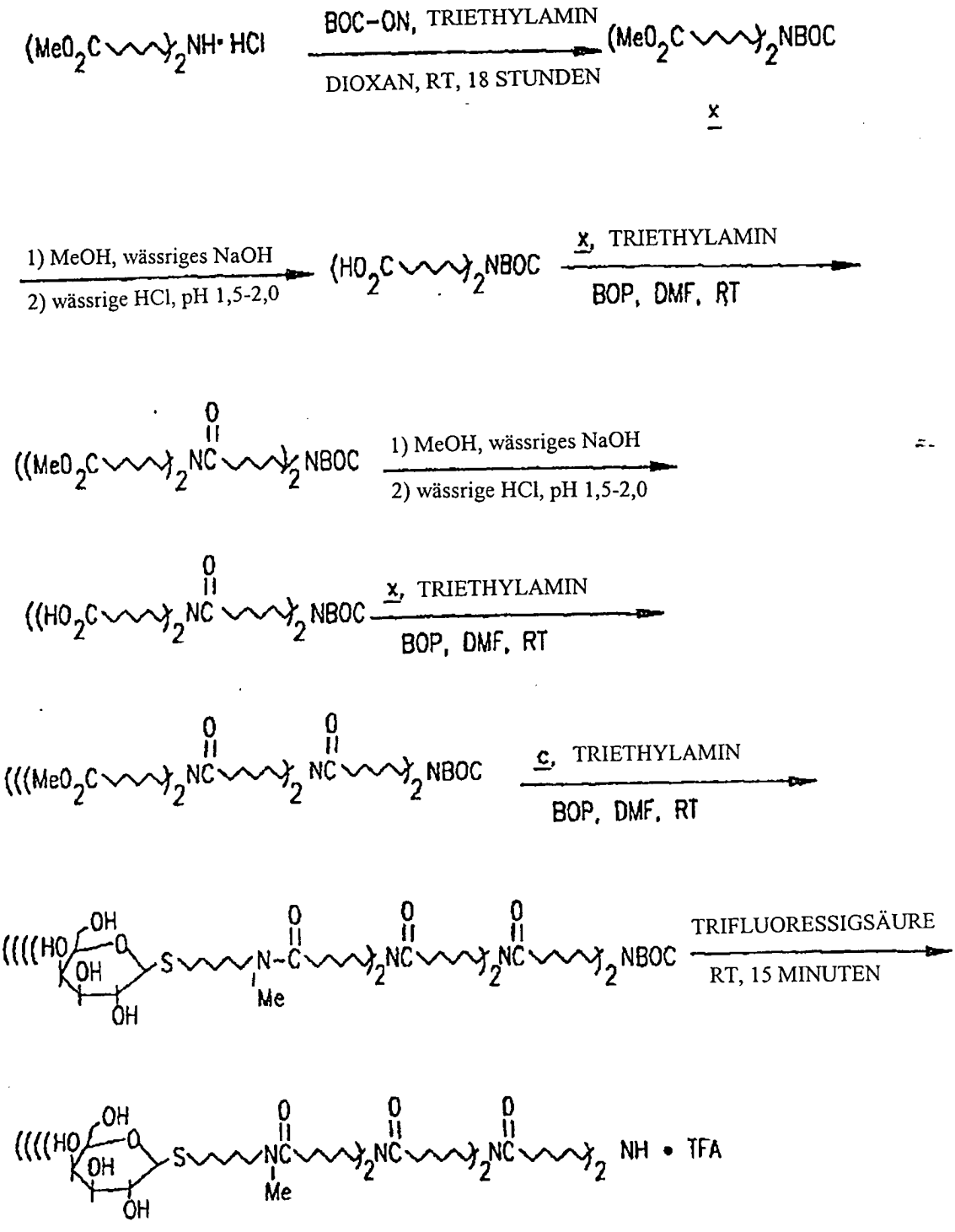

BOC-ON, TRIETHYLAMIN
DIOXAN, RT, 18 STUNDEN
x
1) MeOH, wässriges NaOH
2) wässrige HCl, pH 1,5-2,0
x, TRIETHYLAMIN
BOP, DMF, RT
1) MeOH, wässriges NaOH
2) wässrige HCl, pH 1,5-2,0
x, TRIETHYLAMIN
BOP, DMF, RT
c, TRIETHYLAMIN
BOP, DMF, RT
TRIFLUORESSIGSÄURE
RT, 15 MINUTEN
NH • TFA

FIG.3

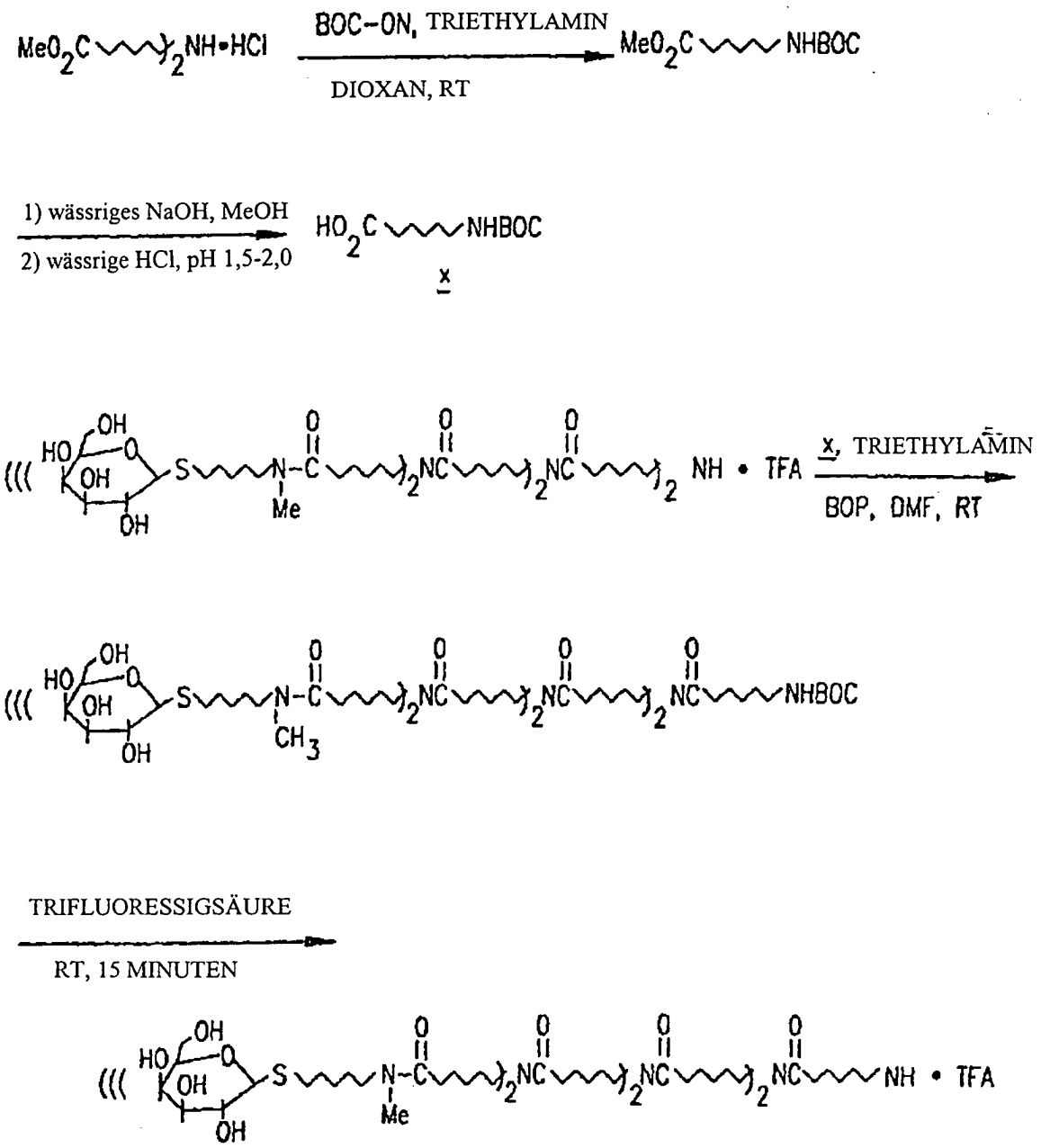

BOC-ON, TRIETHYLAMIN
DIOXAN, RT
1) wässriges NaOH, MeOH
2) wässrige HCl, pH 1,5-2,0
x, TRIETHYLAMIN
BOP, DMF, RT
TRIFLUORESSIGSÄURE
RT, 15 MINUTEN

FIG.4

N,N'-BIS(2-DISULFIDYL-4-METHYLPHENYL)-γ,γ'-DIAMINOISOVALERAT-N-HYDROXYSUCCINIMID

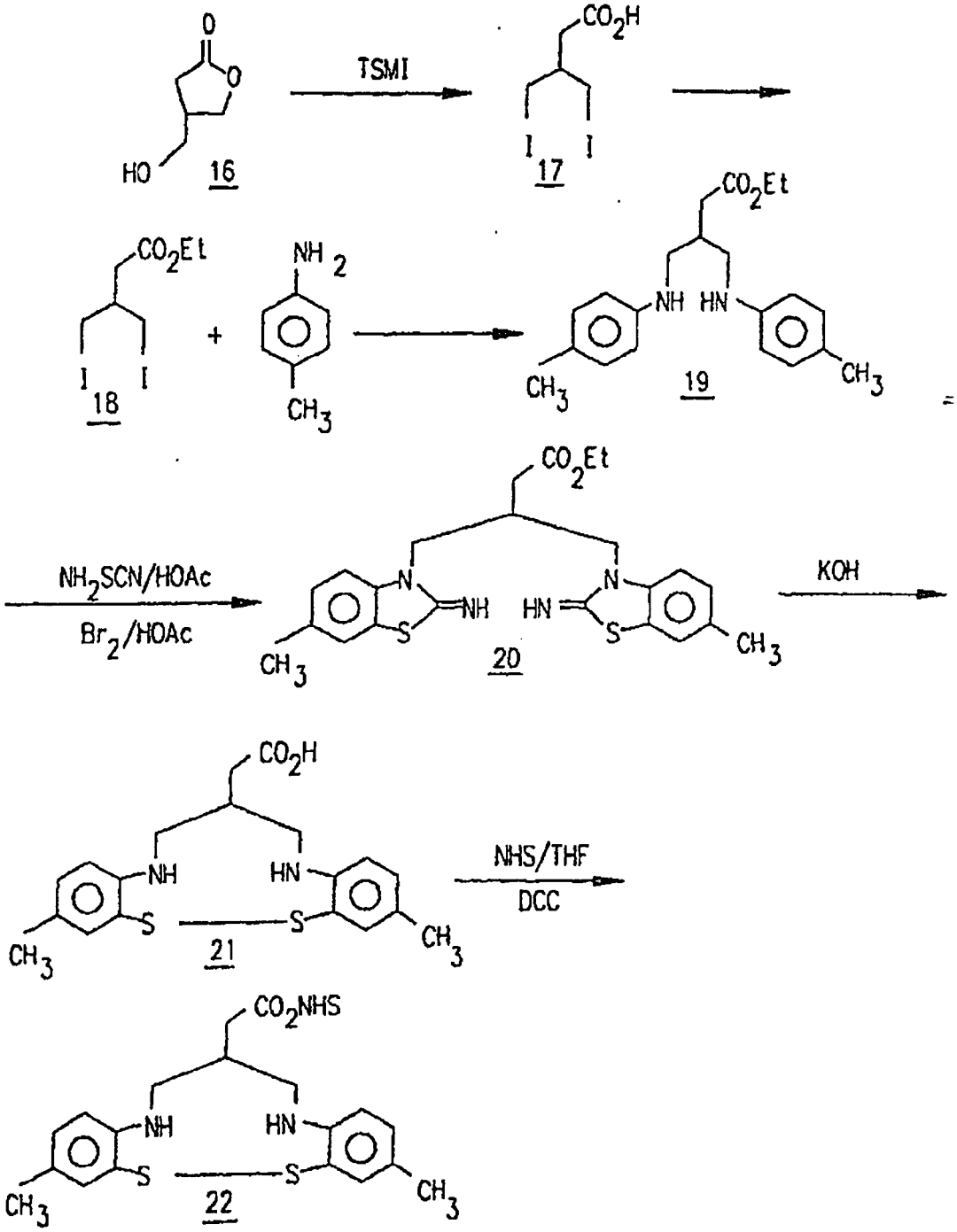


FIG.5