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

(10) **DE 600 14 359 T2** 2006.02.23

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 178 838 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 14 359.7**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/13300**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 937 555.1**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/69473**
(86) PCT-Anmeldetag: **12.05.2000**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **23.11.2000**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **13.02.2002**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **29.09.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.02.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***A61K 49/12*** (2006.01)
A61K 51/06 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
134329 P **14.05.1999** **US**

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

(73) Patentinhaber:
The Regents of the University of California, Oakland, Calif., US

(72) Erfinder:
VERA, R., David, San Diego, US

(74) Vertreter:
WINTER, BRANDL, FÜRNISS, HÜBNER, RÖSS, KAISER, POLTE, Partnerschaft, 85354 Freising

(54) Bezeichnung: **MAKROMOLEKULAR TRÄGER AUF BASIS VON DEXTRAN FÜR ARZNEIMITTEL UND DIAGNOSTICUM ABGABE**

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

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0001] Das Gebiet der Erfindung betrifft Therapeutika und Diagnostika, die Makromoleküle als Transportmittel nutzen.

[0002] Die Verwendung oder die hypothetische Verwendung bestimmter Makromoleküle als Transportmittel zum Targeting von daran gebundenen Wirkstoffen und diagnostischen Mitteln ist bekannt, zur Zeit aber nicht ohne schwerwiegende Einschränkungen. Versuche mit Therapeutika waren mangels preiswerter und nichttoxischer molekularer Grundgerüste, an die sich Wirkstoffe und Targetsubstrate in ausreichender Beladung binden lassen, klinisch nur begrenzt erfolgreich. Ähnliche Problemen treten bei den aktuellen Verfahren zur kardiovaskulären Darstellung und zur Tumordarstellung auf, die gebundene Stoffe für Kernspintomographie (Magnetresonanztomographie, MRI) und Computertomographie (CT) gebundene Stoffe verwenden.

[0003] Daher hat sich das Interesse auf das molekulare Grundgerüst des Trägermittels konzentriert, dessen Funktion es ist, Wirkstoffe, Substrate und Moleküle zur Bilddarstellung und andere diagnostische Moleküle zu tragen, um sie zu spezifischen Zellgeweben zu transportieren. Die zur Zeit am häufigsten eingesetzten Grundgerüste sind Dextran, Polylysin, synthetische Copolymere, Starburst-Dendrimere und humanes Serumalbumin.

[0004] Für Dextran, ein verzweigtes Glucosepolymer, gibt es umfangreiche Erfahrungen mit der Verwendung am Menschen, und Dextran bietet das höchste Verhältnis von Bindungsstellen pro Molmasse. Es ist ferner sehr hydrophil, was ein geringes Injektionsvolumen ermöglicht. Dextran ist zwar relativ preiswert, es hat aber den Nachteil, daß seine üblichen Bindungsstellen chemisch nicht genügend flexibel sind und daß es als Folge der zur Bindung üblicherweise eingesetzten Mittel sehr häufig zu unerwünschten Vernetzungen kommt.

[0005] Auf der anderen Seite ist Polylysin ausgesprochen teuer und es gibt nur sehr begrenzte Erfahrungen mit der Verwendung am Menschen. Ungeachtet dessen hat Polylysin einerseits den Vorteil, daß es in verschiedenen Kettenlängen zur Verfügung steht, und andererseits hat es den weiteren Vorteil, daß seine Seitenketten für die chemische Bindung von Wirkstoffen und Rezeptorsubstraten leicht zugänglich sind. Daher wird Polylysin häufig verwendet, um aussichtsreiche Wirkstofftransportsysteme an Tieren zu testen.

[0006] Synthetische Copolymere, wie sie z.B. von Krinick et al., Makromol. Chem. 191:839–856 (1990) beschrieben werden, bieten Linearität und eine neutrale Nettoladung, die die Diffusion verbessert. Synthetische Copolymere bieten insoweit einen weiteren Vorteil, als sie in Masse synthetisiert werden können. Ihre Synthese erfordert jedoch zahlreiche Schritte, die, selbst wenn sie nicht komplex sind, doch zeitaufwendig, teuer und daher ineffizient sind. Ferner gibt es für synthetische Copolymere nur begrenzte Erfahrungen mit der Verwendung am Menschen.

[0007] Starburst-Dendrimere (siehe Tomalia et al. (1985) Polymer J. 17:117–132) sind insoweit vorteilhaft, als ihr Molekulargewicht weniger heterogen ist und sie daher leichter reproduzierbar und vorhersagbar sind. Sie haben jedoch den Nachteil, daß sie (1) nur eine geringe, unzureichende Zahl von Bindungsstellen pro Grundgerüst bieten und es (2) nur begrenzte Erfahrungen mit der Verwendung am Menschen gibt. Ähnliche Nachteile gibt es bei der Verwendung von humanem Serumalbumin.

[0008] Angesichts dessen wird dringend ein preiswertes und nichttoxisches molekulares Grundgerüst als Transportvehikel benötigt, das in hoher Dichte Stellen besitzt, die in der Lage sind, Moleküle zu binden.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0009] Eine Aufgabe der Erfindung besteht darin, ein oder mehrere der oben genannten Probleme auf diesem Gebiet zu lösen oder leichter zu machen und brauchbare Alternativen zu schaffen.

[0010] Im einzelnen besteht eine Aufgabe der Erfindung darin, ein neues oder verbessertes makromolekulares Transportsystem für Stoffe aller Art bereitzustellen, seien sie diagnostischer, therapeutischer oder sonstiger Art.

[0011] Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, ein relativ untoxisches Makromolekül bereitzustellen, das gegenüber dem, was bislang im Stand der Technik beschriebenen wurde, eine hohe Dichte von Bindungsstellen aufweist.

[0012] Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, bei Methoden, bei denen makromolekulare Grundgerüste als Transportvehikel verwendet werden, den Erfolg beim Transport zu verbessern und die Verabreichungsvolumina zu verringern.

[0013] Noch eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, ein Makromolekül bereitzustellen, das leicht erhältlich, relativ preiswert und von nachweisbarem Wert bei der wissenschaftlichen Forschung und in der Medizin ist.

[0014] Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, die chemische Synthese und die Produktion

neuer chemischer Seitenketten mit geeigneter Flexibilität für die Bindung zu beschreiben.

[0015] Entsprechend einer oder mehreren dieser Aufgaben ist ein erster Gegenstand der Erfindung ein Trägermolekül, das ein Grundgerüst umfaßt, wobei an das Grundgerüst eine Vielzahl von Seitenkettengruppen mit der Struktur $-O(CH_2)_3S(CH_2)_2NH_2$ gebunden sind.

[0016] Bei bevorzugten Ausführungsformen leitet sich das Grundgerüst von einem Polysaccharid ab, vorzugsweise Dextran, und die Seitenkettenstrukturen stammen aus der Reaktion einer Allylgruppe mit Aminoethanthiol. Wenn Dextran verwendet wird, kann dieses aus jedem beliebigen Molekulargewicht ausgewählt sein, das sich für die letztendliche Verwendung des Moleküls, seine Seitenketten und seine Konjugate eignet. Für verschiedene diagnostische und therapeutische Anwendungen benötigt man, wie dem Durchschnittsfachmann bewußt ist, Dextrane mit unterschiedlichem MG.

[0017] Bei den vorteilhaftesten Ausführungsformen ist bevorzugt, daß wenigstens eine chemische Gruppe über die Aminogruppen der Seitenketten an das Grundgerüst konjugiert ist. Diese chemischen Gruppen können aus vielen verschiedenen Verbindungen ausgewählt werden, die eine geeignete therapeutische oder diagnostische Verwendungsmöglichkeit besitzen, einschließlich und ohne darauf beschränkt zu sein: Chelatoren, Rezeptorliganden, Lectinen, Enzymsubstraten, Nucleinsäuren, Peptiden, Polysacchariden, Monosacchariden, Radiosensibilisatoren, Radioprotektoren und Farbstoffen. Die Gruppen müssen nicht direkten Nutzen bringen, sondern sie können auch indirekt nutzbringend sein, indem sie ein Targeting zu einem gegebenen Zell- oder Gewebetyp ermöglichen, so daß eine andere funktionelle Einheit, die an das Grundgerüst gebunden ist, die gewünschte positive oder negative Funktion ausüben kann.

[0018] Die hohe Beladung mit und die hohe Dichte von Seitenketten pro nichttoxischem Grundgerüst ist wegen der signifikanten kinetischen Vorteile bei Bindung und Transport ein wichtiger Aspekt der Erfindung. Es können entsprechend mehr therapeutische oder diagnostische Moleküle transportiert werden, um ihren Zweck zu erfüllen. Dies kann den sehr allgemeinen Fall umfassen, daß Liganden in hoher Dichte einfach an das Molekül des Grundgerüsts gebunden werden können, damit sie bestimmte Rezeptoren effektiver blockieren, wenn sie ihnen zugeführt oder mit ihnen in Kontakt gebracht werden. Rezeptoren spielen bei zellulären biochemischen Funktionen eine Rolle. Die Blockade dieser Funktion kann bei einer gegebenen Indikation und im gegebenem Kontext therapeutisch wertvoll sein. Daher kommen Antagonisten in Betracht, die zu einer kompetitiven oder nichtkompetitiven Hemmung mit normalen oder anomalen biologischen Stoffen in der Lage sind.

[0019] Auch Agonisten können verwendet werden, um die gewünschte Wirkung zu erzielen, soweit sie die Endozytose der Grundgerüsteinheit und der Stoffe, an die sie gebunden sind, signalisieren oder stimulieren können oder eine intrazelluläre Kaskade auslösen können. Der Fachmann erkennt das breite Gebiet von Anwendungsmöglichkeiten der zahlreichen Ausführungsformen der Erfindung und welchen Nutzen dies bringt:

[0020] Bei besonders bevorzugten Ausführungsformen trägt das Grundgerüst sowohl einen Liganden mit einer spezifischen Affinität für einen gegebenen Gewebe- oder Zelltyp als auch ein Chelatormolekül. Der Chelator hat normalerweise Stickstoffgruppen mit freien Elektronen, die fest an positiv geladene Metallatome und Ionen binden. Bevorzugte Chelatoren, die bei der Erfindung verwendet werden können, umfassen DOTA, MAG3 und DTPA. DOTA ist besonders bevorzugt, weil seine Geometrie passend für das Gadoliniumatom ist, das sowohl zur Computertomographie (CT) als auch zur Kernspintomographie (Magnetresonanztomographie, MRI) verwendet werden kann, und dieses fest aufnimmt. Der MAG3-Chelator wird bei einer Komplexbildung mit dem Radioelement Technetium-99m (Tc-99m) bevorzugt, das eine relativ kurze Halbwertszeit von 6 Stunden hat. Diese Halbwertszeit ist mit biologischen Prozessen und klinischen Protokollen kompatibel, was zur Detektion von Wächterlymphknoten ausreichend lang ist und es einem Chirurgen ermöglicht, den genauen Ort und das Ausmaß von beispielsweise Tumorwachstum oder Metastasen zu bestimmen und diese zu entfernen. Diese besondere Kombination läßt sich daher ausgezeichnet in der Nuklearmedizin anwenden.

[0021] In anderen, sich nicht notwendigerweise gegenseitig ausschließenden Ausführungsformen kann der Chelator mit einem Nicht-Radioisotop oder -element, z.B. einem absorbierenden Element (hohe Dichte), oder einem paramagnetischen Atom kombiniert werden, für die jeweils spezielle Anwendungsmöglichkeiten bei den Methoden der Computertomographie bzw. der Kernspin- oder Magnetresonanztomographie existieren. Hierbei handelt es sich um diagnostische Methoden, die es ermöglichen, unterschiedliche physiologische oder anatomische Strukturen mittels der charakteristischen Eigenschaften der eingeführten hochdichten oder paramagnetischen Atome bildlich darzustellen. Solche diagnostischen Methoden können therapeutische Methoden einleiten, müssen es aber nicht.

[0022] Mit Hilfe der Ausführungsformen der Erfindung lassen sich außerdem gleichzeitig sowohl diagnostische als auch therapeutische Methoden durch-

führen, z. B. wenn man einige der Seitengruppen des Grundgerüsts mit einem diagnostischen Mittel konjugiert und andere mit einem therapeutischen Mittel konjugiert.

[0023] Für die Detektion von Wächterlymphknoten macht sich diese besondere diagnostische Methode die von der Erfindung gebotene hohe Stabilität, die Nichttoxizität und die hohe Beladung und Affinität zunutze, um die Differenzierung, die Isolierung und die Exzision zu verbessern. Bei dieser Methode wird üblicherweise ein an eine erfindungsgemäße Seitenkette gebundener Chelator eingesetzt, an den außerdem ein Radioatom wie Technetium-99m gebunden sein kann. Weitere Möglichkeiten für die Erfindung umfassen die Verwendung von Gadolinium, Dysprosium, Ytterbium, Indium und anderen Elementen mit nützlichen Eigenschaften.

[0024] Das Targeting der obigen macht es erforderlich, daß zusätzlich ein Rezeptorsubstrat verwendet und eingesetzt wird, z.B. Mannose, Galactose, Peptide usw. Der Begriff Substrat weist nicht zwingend darauf hin, daß ein Enzym angreifen kann, er kann sich auch, und tut dies vorzugsweise, auf eine einfache Bindung von Ligand:Rezeptor beziehen. Der Begriff "Ligand" kann somit viele Formen und Konstitutionen annehmen und kann synonym mit dem Begriff "Rezeptorsubstrat", wie er hier verwendet wird, gebraucht werden. Die Wahl eines gewünschten Liganden oder Rezeptorsubstrats zum Targeting eines gegebenen Rezeptors ist allgemeines Fachwissen. Für eine gegebene Anwendung sind buchstäblich tausende von Wechselwirkungen bekannt, die man sich zunutze machen kann. Ferner kann sich der gezielt angesteuerte Rezeptor auch von Viren, Bakterien, Protozoen, Pilzen, Pflanzen und Insekten und nicht notwendig nur von Tieren oder Säugern ableiten.

[0025] Was den Grad der Allylierung, der Bindung der Seitenketten und der Konjugation betrifft, so kann dieser irgendwo zwischen 1 und 100 liegen, wobei 100 bevorzugt ist. Wenn jedoch nicht alle Seitenketten vollständig konjugiert sind, so kann bei weiteren Ausführungsformen das Anhängen eines ungeladenen "Blockierungs"-Moleküls in Betracht kommen, z.B. einer Methyl-, Alkyl- oder Arylgruppe an den oder die freien Aminoterminus bzw. -termini, so daß das Gesamtmolekül weniger geladen ist. Wie dem Fachmann bewußt, ist die geringere Ladung für viele Anwendungen besser.

[0026] Ein zweiter Gegenstand der Erfindung neben den Produkten und Anwendungsmöglichkeiten des ersten Gegenstandes sind Verfahren zur Herstellung von im wesentlichen vernetzungsfreien Trägermolekülen, die eine Vielzahl aminoterminierter Seitenketten aufweisen. Unter "im wesentlichen vernetzungsfrei" versteht man künstlich eingebrachte Vernetzungen zwischen Molekülen des gleichen Typs, z.B. Glucoseeinheiten im gleichen Dextranmolekül. Der Begriff soll nicht die hier beschriebene spezifische, beabsichtigte Konjugation von Heteromolekülen an die Seitenketten des Grundgerüsts umfassen. Es wird ferner anerkannt, daß Grundgerüste, z.B. Polysaccharide, von Anfang an natürlich vernetzt sein können; der Begriff "im wesentlichen vernetzungsfrei" nimmt speziell solche Phänomene aus.

[0027] Der Begriff "im wesentlichen" wird in dem Wissen verwendet, daß doch geringfügig noch unerwünschte Vernetzungen auftreten können, z.B. durch die Anwesenheit von Verunreinigungen oder die Anwendung suboptimaler Bedingungen für die Bindung, daß eine solch begrenzte Vernetzung jedoch tolerabel ist. Im Hinblick darauf wird der Begriff verwendet, um darauf hinzuweisen, daß eine große Aufgabe der Erfindung (nämlich die, künstliche Vernetzungsphänomene, die mit der Einführung üblicher Seitenketten in ein Grundgerüst zusammenhängen, zu vermeiden, zu kontrollieren oder zu minimieren) nicht signifikant beeinträchtigt wird. Wie ausgeführt haben herkömmliche Verfahren in dieser Hinsicht versagt und die Erfindung korrigiert dies signifikant, indem beispielsweise bifunktionellen Gruppen werwendet werden, wie in der bevorzugten Ausführungsform, bei der Aminoethanthiol verwendet wird. Bis zu dieser Erfindung war es schwierig, wenn nicht sogar unmöglich, solche unbeabsichtigten "Nebenreaktionen" zu kontrollieren, deren Ergebnis es war, daß das Molekulargewicht über tolerierbare und geeignete Grenzen erhöht und die Löslichkeit unter solche Grenzen gesenkt wurde.

[0028] Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens umfaßt vorzugsweise das Bereitstellen eines Grundgerüstmoleküls mit einer Vielzahl von Hydroxygruppen, Allylieren wenigstens eines Teils dieser Hydroxygruppen an dem Grundgerüstmolekül unter Herstellung eines Allylderivats des Grundgerüsts, Umsetzen dieser Allylgruppen des Allylderivats mit einer Verbindung, die einen Aminoterminus und einen zweiten Terminus umfaßt, wobei dieser zweite Terminus spezifisch mit den Allylgruppen des Allylderivats reagieren kann; und Umsetzen des Allylderivats mit der Verbindung unter Herstellung eines im wesentlichen vernetzungsfreien Trägermoleküls, das eine Vielzahl aminoterminierter Seitenketten aufweist.

[0029] In bevorzugten Ausführungsformen ist das Grundgerüst wiederum ein Polysaccharid, vorzugsweise Dextran. Vorzugsweise, aber nicht zwingend, ist die Verbindung, die verwendet wird, um die Seitenketten an dem allylderivatisierten Grundgerüstmolekül zu erzeugen und zu binden, Aminoethanthiol.

[0030] Bei weiteren Ausführungsformen des Verfahrens kommt eine Konjugation in Betracht, wie sie für den ersten Gegenstand beschrieben wurde, z.B. un-

ter Verwendung wenigstens eines Mitglieds, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Chelatoren, Rezeptorliganden; Enzymsubstraten, Nucleinsäuren, Peptiden, Polysacchariden, Monosacchariden, Radiosensibilisatoren, Radioprotektoren und Farbstoffen. Die Farbstoffe können fluoreszierend oder in anderer Weise mit Hilfe von auf diesem Gebiet üblichen Licht- und/oder Hilfsmitteln unterschieden werden.

[0031] Andere Ausführungsformen des Verfahrens entsprechen denjenigen, die bereits im Zusammenhang mit dem ersten Gegenstand angegeben wurden.

[0032] Weitere Aspekte der Erfindung betreffen speziellere Produkte und "Product-by-Processes". Beispielsweise wird ein aus dem Molekül des ersten Gegenstandes synthetisiertes MRI-Mittel beansprucht sowie ein gemäß den Verfahren des zweiten Gegenstandes hergestelltes MRI-Mittel. Ferner wird ein aus oder gemäß irgendeinem der ersten beiden Gegenstände synthetisiertes CT-Mittel beansprucht. Schließlich werden Kontrastmittel für Wächterlymphknoten beansprucht, die den ersten oder zweiten Gegenstand wiedergeben oder einsetzen, und jede denkbare Kombination spezieller Ausführungsformen jener Gegenstände.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0033] Fig. 1 zeigt eine Ausführungsform mit einer Folge von Reaktionsschritten zur kovalenten Kopplung von Bindungsstellen an ein makromolekulares Grundgerüst.

[0034] Fig. 2 zeigt eine Ausführungsform der Erfindung, bei der es sich um ein Mittel zur Blutpool-CT handelt, das ein Grundgerüst (Dextran), einen Chelator (DPTA) und ein paramagnetisches Atom (Dysprosium) umfaßt.

[0035] Fig. 3 zeigt eine Ausführungsform mit einer Folge von Reaktionsschritten zur Kopplung von DTPA an Bindungsstellen.

[0036] Fig. 4 zeigt eine Ausführungsform mit einer Folge von Reaktionsschritten zur Kopplung von DOTA an Bindungsstellen.

[0037] Fig. 5 zeigt eine Ausführungsform mit einer Folge von Reaktionsschritten zur Kopplung von MAG3 an Bindungsstellen.

[0038] Fig. 6 zeigt eine Ausführungsform für ein Mittel zur Lymphknoten-MRI, das ein Rezeptorsubstrat (Mannose), ein Grundgerüst (Dextran), einen Chelator (DOTA) und einen MRI-Reporter (Gadolinium) umfaßt.

[0039] Fig. 7 zeigt die Formel für eine Ausführungsform eines Mittels zur Detektion von Wächterlymphknoten, das ein Rezeptorsubstrat (Mannose), ein Grundgerüst (Dextran), einen Chelator (DTPA) und ein radioaktives Atom (Tc-99) umfaßt.

[0040] Fig. 8 zeigt eine Ausführungsform eines Verfahrens zur Kopplung von Mannose an die Bindungsstellen.

[0041] Fig. 9 zeigt die Formel für eine Ausführungsform eines Mittels zur Detektion von Wächterlymphknoten, das ein Rezeptorsubstrat (Mannose), ein Grundgerüst (Dextran), einen Chelator (MAG3) und ein radioaktives Atom (Tc-99m) umfaßt.

[0042] Fig. 10 ist ein Diagramm des Prozentsatzes der injizierten. Dosis gegen die Zeit, das die Aufnahme von TcMAG3-Mannosyl-Dextran (gefüllte Symbole) und Tc-Schwefel-Kolloid (offene Symbole) durch Wächterlymphknoten zeigt.

[0043] Fig. 11 ist ein Diagramm des Prozentsatzes der injizierten Dosis in logarithmischer Auftragung gegen die Zeit, das die Clearance der Injektionsstelle von TcMAG3-Mannosyl-Dextran (gefüllte Symbole) und Tc-Schwefel-Kolloid (offene Symbole) zeigt.

[0044] Fig. 12 zeigt axilläre Lymphknoten von Kaninchen (angezeigt durch Pfeile), die 15 Minuten nach subkutaner Verabreichung von TcMAG3-Mannosyl-Dextran (rechter Fußballen) und TcSC (linker Fußballen) tomographiert wurden. Die Injektionsstellen liegen oben auf der Aufnahme. Auf jeder Seite des Kaninchens befindet sich ein Paar von Standards. Neben den bilateralen Wächterlymphknoten könnte ein Aktivitätsfokus medial benachbart zum linken Wächterlymphknoten TcSC-Aktivität in einem distalen Knoten darstellen.

[0045] Fig. 13a zeigt die Formel für eine Ausführungsform eines MR-Kontrastmittels zum Hepatocyten-Targeting, das ein Rezeptorsubstrat (Galactose), ein Grundgerüst (Dextran), einen Chelator (DOTA) und ein paramagnetisches Atom (Gd) umfaßt.

[0046] Fig. 13b zeigt die Formel für eine Ausführungsform eines Mittels für ein Hepatocyten-Targeting beim Nuclear Imaging, das ein Rezeptorsubstrat (Galactose), ein Grundgerüst (Dextran), einen Chelator (MAG3) und ein radioaktives Atom (Tc-99m) umfaßt.

[0047] Fig. 14a zeigt den zeitlichen Verlauf bei Kontrastmittelverstärkung in der inferioren Vena cava, der Leber und dem Tumor nach einer Injektion eines CT-Blutpool-Kontrastmittels unter Verwendung einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen DyDTPA-Dextrans.

[0048] Fig. 14b zeigt den zeitlichen Verlauf bei Kontrastmittelverstärkung in Nierenrinde, Nierenmark und Milz nach einer Injektion eines CT-Blutpool-Kotrastmittels unter Verwendung einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen DyDTPA-Dextrans.

[0049] Fig. 14c zeigt den zeitlichen Verlauf bei Kontrastmittelverstärkung in der inferioren Vena cava und der Leber nach einer Injektion eines handelsüblichen CT-Kontrastmittels, Optiray-320.

[0050] Fig. 14d zeigt den zeitlichen Verlauf in der Nierenrinde und im Nierenmark nach einer Injektion eines handelsüblichen CT-Kontrastmittels, Optiray-320.

[0051] Fig. 15a zeigt die Größenverteilung von humanem Serumalbumin, gemessen mittels FPLC. Das Hohlraumvolumen (Vo) und das Gesamtvolumen (Vt) der Säule sind angegeben.

[0052] Fig. 15b zeigt die Größenverteilung einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Dy-DTPA-Dextrans, gemessen mittels FPLC. Das Hohlraumvolumen (Vo) und das Gesamtvolumen (Vt) der Säule sind angegeben.

[0053] Fig. 16a und Fig. 16b sind Beispiele für Blutpool-MRIs, die Aufnahmen eines tumortragenden Kaninchens vor (Fig. 16a) und eine Stunde nach (Fig. 16b) GdDTPA-Dextran-Injektion zeigen.

[0054] Fig. 17a–Fig. e sind Beispiele für CT-Aufnahmen von Blutpools eines tumortragenden Kaninchens, aufgenommen vor Injektion und 2, 5, 30 bzw. 37 Minuten nach [Dy]DTPA-T40-Injektion.

[0055] Fig. 18a, Fig. 18b, Fig. 18c und Fig. 18d sind CT-Aufnahmen von Blutpools, die eine zeitliche Reihe von Leberquerschnitten vor (Fig. 18a) sowie 2 Minuten (Fig. 18b), 5 Minuten (Fig. 18c) und 10 Minuten (Fig. 18d) nach einer Injektion von Optiray-320 in ein gesundes Kaninchen zeigen.

[0056] Fig. 19a–Fig. b sind Beispiele für eine Blutpool-MRI unter Verwendung einer Ausführungsform der Erfindung, wobei Fig. 19a eine Projektionsaufnahme eines gesunden Kaninchens mit maximaler Intensität ist, die 15 Minuten nach Injektion von GdDTPA-Dextran (MG = 398.000 g/mol, 515 Gd pro Dextran) erhalten wurde, und Fig. 19b eine ähnliche Aufnahme desselben Tiers ist, die drei Stunden nach Injektion erhalten wurde.

[0057] Die vorliegende Erfindung wird mit Hilfe der nachfolgenden ausführlichen Beschreibung beispielhafter Ausführungsformen der Erfindung besser verständlich.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG

[0058] Die Erfindung betrifft das gewebespezifische Targeting von Wirkstoffen und diagnostischen Mitteln unter Verwendung eines makromolekularen Transportvehikels. Bislang hatte man mit solchen Vehikeln mangels preiswerter und nichttoxischer molekularer Grundgerüste, an die Wirkstoffe und Targetsubstrate gebunden werden können, nur begrenzten Erfolg. Die Erfindung ändert dies, indem sie neue Makromoleküle bereitstellt, die nach neuen Verfahren hergestellt wurden, die eine unerwünschte Vernetzung unter gleichzeitiger Wahrung der Nichttoxizität unterdrücken und die Seitenketten- und Beladungskapazität bezogen auf die Größe des Grundgerüsts optimieren.

[0059] Obwohl auch bei Kombination oder Konjugation mit therapeutischen Mitteln nützlich, ist die Erfindung besonders zur kardiovaskulären Darstellung und/oder zur Tumordarstellung geeignet. Ein erfolgreiches kardiovaskuläres und Tumorkontrastmittel für die Kernspintomographie (MRI) oder Computertomographie (CT) sollte ein preiswertes und nichttoxisches molekulares Grundgerüst besitzen, das in der Lage ist, eine große Zahl von Kontrastsubstraten zu tragen. Vor der Erfindung war dies nicht der Fall.

[0060] Eine Ausführungsform der Erfindung ist durch ein chemisches Schema gekennzeichnet, das ein preiswertes Makromolekül mit einer großen Zahl von Bindungsstellen, Seitenketten ("Leashes") genannt, liefert. Eine große Zahl (hunderte) von Seitenketten pro Grundgerüstmolekül erlaubt die Bindung von Substraten, Wirkstoffen und/oder anderen Moleküleinheiten in hoher Dichte.

[0061] Ein weiteres nützliches Merkmal findet sich in einer bevorzugten Ausführungsform, bei der das Grundgerüst des Makromoleküls Dextran ist. Dextran besitzt ausgezeichnete Sicherheitswerte als kardiovaskulärer Volumenexpander. Die umfangreiche Verwendung von Dextran am Menschen erhöht die Wahrscheinlichkeit, daß der transportierte Wirkstoff oder das transportierte diagnostische Mittel ebenfalls nichttoxisch sind.

[0062] Es gibt viele potentielle Verwendungsmöglichkeiten für die Erfindung, z.B. als Pharmazeutika (z.B. Therapeutika) und als Diagnostika (z.B. Sonden). Obwohl theoretisch nahezu jeder Wirkstoff für die Erfindung verwendet werden kann, sind besonders die folgenden Verwendungsmöglichkeiten vorgesehen: Bindung von Radioprotektoren wie WR2721 (Rasey JS et al. Specific protection of different normal tissues. Pharmac Ther 39:33–43, 1988), Chemoprotektoren wie Amifostin (Ethyol) (Capizzi RL. Protection of normal tissues from the cytotoxic effects of chemotherapy by amifostine (ethyol): clinical experiences. Semin Oncol 21(S11):8–15 (1994)) und

Radiosensibilisatoren wie Misonidazol (Phillips TL. Sensitizers and protectors in clinical oncology. Semin Oncol 8:67–82, 1881) und geeignete Rezeptorsubstrate zum gewebespezifischen Schutz oder zur gewebespezifische Sensibilisierung; Bindung antiviraler Wirkstoffe und geeigneter Rezeptorsubstrate zur gewebespezifischen antiviralen Therapie, z.B. zur Behandlung von Hepatitis; Bindung von Immunmodulatoren und geeigneten Rezeptorsubstraten oder Liganden zur gewebespezifischen Immuntherapie; Bindung von DNA und geeigneten Rezeptorsubstraten zur gewebespezifischen Gentherapie, z.B. zum Targeting von p52 oder Suizidgenen in Krebszellen zur Apoptoseinduktion, zum Immuntargeting usw.; und Bindung von Peptiden und Mono- oder Polysacchariden zum Targeting spezifischer Rezeptoren. Siehe z.B. Molteni L (1979), Dextrans as drug carriers. In: Gregoriadis G, Hrsg. Drug Carriers in Biology and Medicine. San Diego, Academic Press; 107–125.

[0063] Was Diagnostika betrifft, so kommen besonders die folgenden Anwendungsmöglichkeiten in Betracht: Bindung von Gadoliniumkomplexen zur Kernspintomographie (MRI) des kardiovaskulären Systems und/oder von Tumoren; Bindung iodierter Moleküle zur computertomographischen (CT) Darstellung des kardiovaskulären Systems und/oder von Tumoren; Bindung von Ytterbium, Dysprosium oder anderen Schwermetallkomplexen zur computertomographischen (CT) Darstellung des kardiovaskulären Systems und/oder von Tumoren; Bindung von Technetium-99m-Komplexen zur szintigraphischen Darstellung des kardiovaskulären Systems und/oder von Tumoren; Bindung von Gadoliniumkomplexen und geeigneten Rezeptorsubstraten zur gewebespezifischen Darstellung der Leber, der Lymphknoten, des Knochenmarks und/oder anderer Gewebe; Bindung iodierter Moleküle und geeigneter Rezeptorsubstrate zur gewebespezifischen CT-Darstellung; Bindung von Ytterbium, Dysprosium oder anderen Schwermetallkomplexen und geeigneten Rezeptorsubstraten zur gewebespezifischen CT-Darstellung; Bindung von Technetium-99m-Komplexen und geeigneten Rezeptorsubstraten zur gewebespezifischen Szintigraphie; und Bindung von Farbstoffen und fluoreszierenden Stoffen zur optischen Darstellung.

[0064] Wiederum dienen die vorangehenden Verwendungsmöglichkeiten lediglich der Veranschaulichung der zahlreichen möglichen Anwendungsformen, bei denen die Erfindung eingesetzt werden kann. Es folgen spezielle Beispiele für einige dieser Anwendungsmöglichkeiten; andere Anwendungsmöglichkeiten sind ohne weiteres ersichtlich und können von einem Durchschnittsfachmann, der sich mit der Anmeldung befaßt, durchgeführt werden.

Beispiel 1:

Bindung von Seitenketten an ein molekulares Grundgerüst

[0065] Dextran, eine bevorzugte Ausführungsform des molekularen Grundgerüsts der Erfindung, besitzt wie viele Polysaccharide und verzweigte Polysaccharide eine Vielzahl reaktiver Hydroxygruppen, an denen eine chemische Bindung erfolgen kann. Dextran ist ein natürliches Produkt, das aus Bakterien stammt. Es wird in hochmolekularer Form isoliert und kann auf kontrollierte Weise zu verschiedenen niedermolekulareren Gebrauchsformen, z.B. vom Molekulargewicht ("MG") 1000, 10.000, 40.000, 70.000, 110.000, 150.000 und 500.000 (Amersham Pharmacia Biotech, USA), hydrolysiert und aufgereinigt werden. Jede der aufgeführten MG-Spezies kann für die Erfindung verwendet werden und jede kann bei einer gegebenen Verwendung eine mehr oder weniger geeignete Wirkung besitzen. Beispielsweise würde man zur Tumordarstellung ein Dextran mit einer Größe wählen, das nach Konjugation von Seitenketten und Reportergruppen ein Endmolekulargewicht im Bereich von 50–70 Kilodalton (kD) liefert. Dies würde die selektive Diffusion in Tumoren erlauben, die eine größere Permeabilität als normales Gewebe besitzen (siehe Seymour LW. Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates. Critical Reviews of Therapeutic Drug Carrier Systems 9:135–187 (1992)). Die Bilddarstellung kardiovaskulärer Strukturen erfordert Konjugate mit Molekulargewichten im Bereich von 70–100 kD. Die untere Grenze ergibt sich aus dem Wunsch, die Renalfiltration zu minimieren. Die obere Grenze ergibt sich aus der erhöhten Viskosität hochmolekularer Makromoleküle, die zu Problemen bei der Verabreichung führt.

[0066] Wie zuvor ausgeführt, stehen für Dextran als Folge seiner weitreichenden Verwendung als Plasmavolumenexpander, bei der gezeigt wurde, daß es mehrere Wochen nach Infusion in Patienten persistiert und während dieser Zeit allmählich zu kleineren Formen oxidiert und über die Nieren geklärt wird, viel pharmakologische Daten zur Verfügung. Siehe Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, B. Auflage, S. 690–91, Pergamon Press, New York, (1990).

[0067] Das Anbinden von Seitenketten war ein zweistufiges Verfahren, wie es in **Fig. 1** gezeigt ist. Der erste Schritt ist die Aktivierung der Hydroxyeinheiten des Dextrans mit Allylbromid (Holmberg, 1993; Gedda, 1996). Diese Aktivierung mit Allylbromid und die nachfolgende Reaktion mit Cysteamin ist den Reaktionen ähnlich, die zur Bildung von Sepharoseharzen für chromatographische Trennungen verwendet werden (siehe beispielsweise WO 97/25139). Diese Reaktion, bei der 10 g PM10 in 75 ml deionisiertem Wasser eingesetzt werden, und wird bei

50°C und pH 11 (durch Zutropfen von 2,5 N NaOH eingehalten) in Gegenwart von Natriumhydroxid (2,5 g) und Natriumborhydrid (0,2 g) durchgeführt. Nach 3 Stunden wird die Lösung mit Essigsäure (2,5 M) neutralisiert, der Reaktionsansatz wird 2 Stunden bei 5°C in einen Kühlschrank gestellt und die obere organische Phase wird dekantiert. Nach Zugabe von 100 ml deionisiertem Wasser wird die resultierende Lösung in eine Ultrafiltrationszelle (MWCO = 3000) filtriert (5 mm) und mit 10 Austauschvolumina deionisiertem Wasser dialysiert. Das Produkt, Allyldextran, wird konzentriert, lyophilisiert und bei –80°C aufbewahrt. Der mittlere Moleküldurchmesser wird durch Laserlichtstreuung gemessen (Honeywell MicroTrac UPA150).

[0068] Die durchschnittliche Anzahl von Allylgruppen pro Dextran wird auf folgende Weise berechnet. Das lyophilisierte Allyldextran wird in Kochsalzlösung gelöst und die Glucosekonzentration der Probe wird nach der Schwefelsäuremethode (Dubios, 1956) unter Verwendung von lyophilisiertem Dextran als Standard gemessen. Die Allyldichte wird berechnet, indem man die Glucosemenge in der Probe vom Gesamtgewicht der Probe abzieht. Das Ergebnis wird als die Menge Allylkohlenwasserstoff in der Probe angenommen. Die Allylkonzentration wird dann durch die Glucosekonzentration geteilt und anschließend mit der durchschnittlichen Anahl der Glucoseeinheiten pro Dextran multipliziert.

[0069] Im zweiten Schritt wurden die Allylgruppen mit 7,5 g Aminoethanthiol (Cysteamin) in DMSO (30 ml) umgesetzt, um die aminoterminierten Seitenketten zu bilden. Diese Reaktion wird mit Ammoniumpersulfat (99,99%, 1,0 g) initiiert und unter einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Nach 3 Stunden wird das Reaktionsvolumen mit deionisiertem Wasser verdoppelt und die Lösung wird mit Natriumhydroxid (2,5 N) auf pH 4 eingestellt. Nach Zugabe von 140 ml Natriumacetatpuffer (0,02 M, pH 4) wird das Produkt in eine Ultrafiltrationszelle filtriert (5 mm) und mit fünf Austauschvolumina Acetatpuffer (0,02 M, pH 4) und anschließend fünf Austauschvolumina deionisiertem Wasser dialysiert. Nach Einengen wird das aminoterminierte Dextran lyophilisiert. Dann wird eine Probe auf die durchschnittliche Anzahl von Aminogruppen pro Dextran getestet, die als Amindichte definiert wird. Dieses lyophilisierte Produkt wird bei –80°C aufbewahrt. Der mittlere Moleküldurchmesser wird durch Laserlichtstreuung gemessen.

[0070] Mit diesen Methoden wurden für Aminodextran T70, das durchschnittlich 388 Glucosereste enthält, die über α-1,6- und -1,4-glycosidische Bindungen verknüpft sind, Substitutionsgrade von 516 Aminogruppen pro Molekül festgestellt. Der mittlere Durchmesser dieses Präparats von Aminodextran T70 in 0,9%iger Kochsalzlösung war 10,8 nm; der mittlere Durchmesser von Dextran T70 in Kochsalzlösung war 10,6 nm. Bei T500, das durchschnittlich 2881 Glucoseeinheiten enthält, wurden im Durchschnitt 2900 Aminoseitenketten als Substituenten gefunden.

[0071] Die durchschnittliche Anzahl von Aminogruppen pro Dextran wird auf folgende Weise berechnet. Das lyophilisierte Dextrankonjugat wird in Kochsalzlösung gelöst und die Aminkonzentration wird mittels des TNBS-Tests (Fields, 1972) mit Hexylamin als Standard gemessen. Die Glucosekonzentration der gleichen Probe wird mit der Schwefelsäuremethode (Dubios, 1956) ebenfalls gemessen. Die Amindichte wird berechnet, indem man die Aminkonzentration durch die Glucosekonzentration teilt und anschließend mit der durchschnittlichen Anzahl der Glucoseeinheiten pro Dextran multipliziert. Es folgen Beispiele, wie man Aminodextran, so wie es oben formuliert wurde, mit anderen Verbindungen konjugieren kann, um verschiedene diagnostische Mittel zu synthetisieren.

Beispiel 2: Bindung eines Chelators (DTPA) zur Blutpool-Darstellung mittels Kernspin- oder Computertomographie

[0072] Bindung von Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) an Aminodextran liefert DTPA-Aminodextran, das wiederum mit Gadolinium oder Dysprosium markiert werden kann (siehe Figur 2A), um ein Blutpool-Kontrastmittel zur Kernspintomographie oder Computertomographie herzustellen. Es wird die Mischanhydrid-Methode von Krejcarek et al. (1977), Biochem. Biophys. Res. Commun. 77:581–583 angewandt. Dies erfolgt neben der neuen Chemie, die verwendet wird, um zuerst die Seitenketten zu etablieren. Dieses Verfahren fördert die Vernetzung des Dextrans nicht, wenn DTPA (im Vergleich mit dem Aktivierungsreagens, IBCF) im Überschuß eingesetzt wird.

[0073] Die Mischanhydrid-Methode (Krejcarek, 1977) wurde verwendet, um DTPA an das Dextrangerüst zu konjugieren. Die Synthese beginnt mit der Aktivierung von DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure) (20 g) mit Isobutylchlorformiat (IBCF) (3,1 ml). Sie wird bei –30°C in Acetonitril (83 ml) durchgeführt. Die aktivierte DTPA wird bei 4°C langsam zu dem aminoterminierten Dextran (2 g) in Bicarbonatpuffer (0,1 M, pH 9) gegeben (siehe **Fig. 3**). Diese Lösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach ausgiebiger Diafiltration des Produkts mit fünf Austauschvolumina Bicarbonatpuffer (0,1 M, pH 9) und anschließend fünf Austauschvolumina deionisiertem Wasser wird das Retentat eingeengt und gefriergetrocknet. Dann wird eine Probe auf DTPA- und Amindichte getestet. Dieses lyophilisierte Produkt wird bei –80°C aufbewahrt. Der mittlere Moleküldurchmesser wird durch Laserlichtstreuung gemessen.

[0074] Die durchschnittliche Anzahl von DTPA-Einheiten pro Dextran wird auf folgende Weise berechnet. Lyophilisiertes DTPA-Dextran wird in 0,1 mmol/l Triethanolamin-HCl (pH = 6,0) gelöst. Wir gaben einen 1,5-fachen (mol/mol, bezogen auf DTPA) Überschuß von Gadolinium in einer 66 mM Lösung (filtriert, 0,2 µ) in 0,1 N HCl zu und stellten dann den pH mit 2,5 N NaOH auf 6 ein. Nach 24 Stunden Rühren bei 37°C wird die Lösung auf ein AMICON-Ultrafiltrationssystem zur Diafiltration mit einem Molekulargewichtsausschluß von 3000 Da überführt. Nach 10 Austauschvolumina deionisiertem Wasser und anschließend weiteren 10 Austauschvolumina Acetatpuffer (0,2 M, pH 4) wird das Retentat eingeengt und die Gadoliniumkonzentration wird mittels ICP-Spektrometrie (Vera, 1995) getestet. Die Glucosekonzentration der gleichen Probe wird mit der Schwefelsäuremethode (Dubios, 1856) ebenfalls gemessen. Die DTPA-Dichte wird berechnet, indem man die Gadoliniumkonzentration durch die Glucosekonzentration teilt und anschließend mit der durchschnittlichen Anzahl der Glucoseeinheiten pro Dextran multipliziert.

[0075] Verfahren zur Kopplung anderer Chelatoren, einschließlich DOTA und MAG3, an Bindungsstellen sind in den Fig. 4 bzw. 5 gezeigt.

Beispiel 3:

Bindung von Mannose zur Lymphknoten- und Leberdarstellung

[0076] Die Gegenwart von Mannose, die an dem Dextrangerüst hängt, lenkt die Verbindung, abhängig von der Verabreichungsart, gezielt zu einem Rezeptor (Mannose-bindendes Protein), der sich auf der Leber, der Milz, der Lunge, dem Knochenmark und den Lymphknoten befindet. Steer CJ, Ashwell G (1990). Receptormediated endocytosis: Mechanisms, biologic function, and molecular properties. In: Hepatology. A Textbook of Liver Disease. (2. Aufl.) Zakim D, Boyer TD, Hrsg. W.B. Saunders, Philadelphia. Wenn die Verbindung subkutan verabreicht wird, tritt das mannoseterminierte Dextran in das Lymphsystem ein und bindet an Rezeptoren in Lymphknoten; bei intravenöser Verabreichung erfolgt eine Bindung an die Leber, die Milz, die Lunge und das Knochenmark. Es ist ferner bekannt, daß Mannosebindendes Protein eine erhöhte Affinität gegenüber Glycoclustern, z.B. Mannose und Mannose-derivatisierten Verbindungen, zeigt.

[0077] Wenn das Dextrangerüst außerdem so gemacht ist, daß es einen Chelatbildner wie DTPA oder DOTA trägt (Sieving et al. (1990), Bioconj. Chem. 1:65–71), kann die resultierende Kombination außerdem mit Gadolinium, Technetium-99m oder Ytterbium markiert werden. Gadolinium (siehe z.B. Fig. 6) erlaubt den Nachweis von Leber- oder Lymphknotentumoren mittels Kernspintomographie. Der Radiomarker Technetium-99m (siehe z.B. Fig. 7) erlaubt Leber- oder Lymphknotendarstellung mittels Szintigraphie. Ytterbium erlaubt wie Gadolinium und Dysprosium eine Darstellung mittels Computertomographie.

[0078] Die chemische Bindung von Mannose an Aminodextran kann mit einer Reihe von Verfahren erfolgen, z.B. der, die zur Bindung an humanes Serumalbumin beschrieben wurde (Vera et al. (1985) J. Nucl. Med. 26:1157–1167) und der, die zur Bindung an Polylysin beschrieben wurde (Vera et al. (1995) Acad. Radiol. 2:497–596). Siehe z.B. Fig. 8. Diese Bindung kann wie oben für Galactose beschrieben erfolgen.

[0079] Konjugation von DTPA-Dextran mit Mannose efolgt durch reduktive Alkylierung (Vera, 1997). Das Mannosyl-Kopplungsreagens, Cyanmethyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio-β-D-mannosid (CNM-Thiomannose), wird auf folgendem Wege synthetisiert. Tetra-O-acetyl-α-D-mannopyranosylbromid (dieses Kohlenhydrat ist nicht im Handel erhältlich) wird durch eine zweistufige Reaktion in Chloroform hergestellt (Lee, 1994). Nach Eindampfen zu einem Sirup am Rotationsverdampfer wird das Produkt sofort mit Thioharnstoff zu 2-S-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-mannopyranosyl)-2-pseudothioharnstoffhydrobromid (Chipowsky, 1973) umgesetzt, welches aus Aceton umkristallisiert wird.

[0080] Unmittelbar vor der Mannosylkonjugation wird dieses Produkt mit Natriummethoxid (0,05 mg/ml) in trockenem, frisch destilliertem Methanol (250 ml) bei einer CNM-Thiomannose-Konzentration von 0,04 g pro ml Methanol deacetyliert. Nach Entfernung des Methanols am Rotationsverdampfer wird die Kopplungsreaktion durch Zugabe einer passenden Menge DTPA-Dextran (0,5 g) in einer 20 mg/ml-Bicarbonatpufferlösung (0,2 M, pH 9,0) durchgeführt. Die Umsetzung erfolgt 2 Stunden bei Raumtemperatur (Fig. 8). Nach Diafiltration des Produkts mit fünf Austauschvolumina Bicarbonatpuffer (0,1 M, pH 9) und anschließend weiteren fünf Austauschvolumina deionisiertem Wasser wird das Retentat eingeengt und gefriergetrocknet. Dann wird eine Probe auf Mannose-, DTPA- und Amindichte getestet. Dieses lyophilisierte Produkt wird bei –80°C aufbewahrt. Der mittlere Moleküldurchmesser, gemessen durch Laserlichtstreuung, beträgt 7,6 nm.

[0081] Die durchschnittliche Anzahl von Mannosegruppen pro Dextran wird auf folgende Weise berechnet. Das lyophilisierte Dextrankonjugat wird in Triethanolamin gelöst und wie oben beschrieben mit Gadolinium markiert. Nach Diafiltration und Messung der DTPA-Konzentration wird auch die Mannosekonzentration der gleichen Probe nach der Schwefelsäuremethode (Dubios, 1956) gemessen. Die Mannosedichte wird berechnet, indem man die Mannosekon-

zentration durch die Dextrankonzentration teilt, die auf Basis der bekannten DTPA-Dichte des DTPA-Dextrankonjugats berechnet wird.

[0082] Ein Mittel zur Wächterlymphknotendarstellung, DTPA-Mannosyldextran, wurde mit Dextran pharmazeutischen Grades, PM10, synthetisiert. Siehe z.B. Fig. 7. Dieses Präparat besaß einen mittleren Durchmesser von 7,6 nm, eine Mannosedichte von 44 Einheiten pro Dextran, eine Amindichte von 23 Einheiten pro Dextran und eine DTPA-Dichte von 8 Einheiten pro Dextran. Das Molekulargewicht betrug 36,288 g/mol.

Beispiel 4: Bindung von Galactose zur Leberdarstellung

[0083] Die Anwesenheit des Substrats Galactose kann das Dextran zu einem Rezeptor führen, der sich ausschließlich in der Leber befindet. Wenn das Dextran außerdem DTPA trägt, kann es mit Gadolinium oder Technetium-99m markiert werden. Die Verwendung von Gadolinium erlaubt den Nachweis von Leberkrebs mittels Kernspintomographie. Der radioaktive Marker Technetium-99m erlaubt eine Leberdarstellung mittels Szintigraphie.

[0084] Die chemische Bindung von Galactose an Aminodextran kann mit Hilfe einer Reihe von Verfahren erfolgen, beispielsweise wie für die Bindung an humanes Serumalbumin (Vera et al. (1985) J. Nucl. Med. 26:1157–1167) und an Polylysin (Vera et al. (1995) Acad. Radiol. 2:497–596) beschrieben. Die Kopplungsreaktion für die Bindung von Galactose an aminoterminiertes Dextran ist die gleiche wie für die Bindung (siehe unten) von Mannose. Die Fig. 13A und Fig. 13B sind Beispiele für ein MR-Leber-Kontrastmittel und ein nuklearmedizinisches Kontrastmittel, die beide eine Ausführungsform der Erfindung verwenden.

Beispiel 5: Bindung des MAG3-Chelators zum Nuclear Imaging

[0085] Die Konjugation von aminoterminiertem Dextran beginnt mit der Aktivierung von Mercaptoacetylglycylglycylglycin (MAG3) (Fritzberg, 1986) durch Tetrafluorphenol (TFP). Sie erfolgt mit einer äquivalenten Menge von 1,3-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in N,N-Dimethylformamid (DMF) bei Raumtemperatur. Diese Lösung wird am Rotationsverdampfer eingedampft, in Chloroform gelöst und filtriert. Die resultierende Lösung wird am Rotationsverdampfer eingedampft und das Lösungsprodukt, TFP-MAG3, im Gefrierschrank aufbewahrt. Schließlich wird das aminoterminierte Dextran in einer DMSO/Wasser-Lösung (1:10) mit TFP-MAG3 in einer ähnlichen Lösung vereinigt. Diese Lösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach ausgiebiger Diafiltration mit Wasser wird das Produkt eingeengt und gefriergetrocknet.

Darstellung von Wächterlymphknoten: Aussichten für eine verbesserte Diagnose und Behandlung von Krebs, z.B. Brustkrebs, Melanom und Kolorektalkrebs.

[0086] In einem Versuch, die Morbidität und die Nachweiskosten für Lymphknotenmetastasen zu verringern, haben chirurgische Onkologen ein Verfahren entwickelt, durch das der Wächterlymphknoten (der erste drainierende Lymphknoten) intraoperativ identifiziert und entfernt wird (Morton et al. (1992) Arch. Surg. 127:292–299). Diese Methode, die als Wächterlymphknotenbiopsie bezeichnet wird, hat extrem hohe negative Vorhersagewerte für Melanom- und Brustkrebsmetastasen (Giuliano et al. (1994) Arch. Surg. 220:391–401); die falschnegativen Raten reichen von 0–9% für beide Krebsarten. Außerdem gibt es zunehmend Hinweise, daß Wächterlymphknotenbiopsie das Management von Kolorektalkrebs signifikant beeinflußt (Saha et al. (1998) J. Surg. Oncol. 69:183).

[0087] Wie ausgeführt, ist die Wächterlymphknotendarstellung eine nuklearmedizinische Prüfung, die für den Chirurgen den ersten Lymphknoten identifiziert, der Lymphfluß von der Stelle des Primärtumors erhält. Dieser Knoten wird entfernt und zum Nachweis maligner Zellen zur Gefrierschnittanalyse geschickt. Durch Identifizierung des Wächterlymphknotens vor der Operation genügt ein kleiner Schnitt zur Entfernung des Knotens und es muß weniger herausgeschnitten werden. Der extrem hohe negative Vorhersagewert der Methode scheint ein genaues Staging zu liefern und kann Patienten, die Wächterlymphknoten-negativ sind, die Morbidität einer vollständigen Lymphknotendissektion ersparen. Folglich kann ein Staging des Krebses durch Lymphknotendarstellung äquivalent zu einer axillären Lymphknotendissektion ohne die begleitende postchirurgische Morbidität sein.

[0088] Bei Durchführung einer Wächterlymphknotenbiopsie wird das Kontrastmittel um die Tumorstelle injiziert und um den Wächterlymphknoten aufzufinden und zu entfernen wird eine Hand-Gammasonde verwendet. Häufig schwappt die nukleare Aktivität jedoch entweder in die Drainageregion der Knoten über, was eine Differenzierung zwischen Lymphknoten und Tumor schwierig macht, oder sie verteilt sich auf zahlreiche Lymphknoten, was dazu führt, daß mehr Lymphknoten als nötig entfernt werden.

[0089] Ein ideales Kontrastmittel für Wächterlymphknoten sollte rasche Clearance von der Injektionsstelle, hohe Retention im Lymphkanal, rasche, vollständige und langanhaltende Aufnahme durch den Wächterlymphknoten und wenig Aufnahme durch die übrigen Lymphknoten zeigen. Bei Brustkrebsfällen

findet man den Wächterlymphknoten manchmal nicht, weil der Tumor so nahe am Wächterlymphknoten liegt und die Radioaktivität zwischen den beiden Stellen nicht zu unterscheiden ist. Ferner gelten die üblichen Kriterien von geringer Strahlungsabsorption, hoher biologischer Sicherheit, einfacher, rascher und stabiler Markierung mit Technetium-99m und biochemischer Reinheit.

[0090] Filtrierte Kolloide zeigen eine schlechte Clearance von der Injektionsstelle. Die Halbwertszeiten für filtriertes Tc-Albumin-Kolloid und Tc-Schwefel-Kolloid betragen 5,5 h bzw. 10,5 h (Glass, 1995). Dies entspricht etwa 65% und 85% der Dosis an der Injektionsstelle 3 Stunden nach Injektion, der optimalen Zeit für die intraoperative Suche nach dem Wächterlymphknoten (Uren, 1995). Dagegen zeigen die markierten Makromoleküle wie Tc-Dextran und TC-HSA ($T_{1/2}$ = 2,8 h) die schnellste Clearance (Henze, 1982; Glass, 1995).

[0091] Die für die vorliegende Erfindung beschriebenen Verfahrensweisen verbessern die Kombination von Technetium-99m-markiertem MAG3-Mannosyldextran. Dieses Mittel hat sich bereits als wirksam erwiesen, selbst wenn es mit den suboptimalen, für Vernetzungen anfälligen Verfahren des Standes der Technik hergestellt wurde. Technetium-99m-markiertes MAG3-Mannosyldextran ist, wie bereits beschrieben, ein 10 kD-Dextranmolekül, an das zahlreiche Mannose- und MAG3-Einheiten gebunden sind. Dieses Molekül besitzt einen mittleren Durchmesser von 5,5 Nanometer (nm), was deutlich kleiner als Tc-99m-Antimontrisulfid (10 nm), filtriertes Tc-99m-Schwefel-Kolloid (50 nm) und unfiltriertes Tc-99m-Schwefel-Kolloid (650 nm) ist, die früher die vorherrschenden Standards waren. Die eingesetzte Mannose fungiert als Substrat für den Rezeptor des Mannose-bindenden Proteins und das MAG3 dient als Chelatbildner für die Markierung mit Technetium-99m (Fig. 9). Das resultierende radiomarkierte Konjugat verschwindet rasch von der Injektionsstelle und bindet an den Wächterlymphknoten. Diese frühere Untersuchung wird nachfolgend reproduziert; die Verwendung der hier beschriebenen verbesserten Chemie verspricht nur eine Verbesserung des schon erhaltenen Erfolgs.

Beispiel 6:

Demonstration der Wächterlymphknotendarstellung in Kaninchen

[0092] Nach Betäubung durch eine intramuskuläre Injektion von Ketamin und Xylazin wurden 0,5 ml TcMAG3-Mannosyldextran (19.000 g/mol) in den rechten vorderen (0,42 mCi) und den rechten hinteren (0,43 mCi) Fußballen und 0,5 ml filtriertes Tc-Schwefel-Kolloid in den linken vorderen (0,41 mCi) und den linken hinteren (0,42 mCi) Fußballen injiziert. Das Kaninchen wurde mit 10 cm^3 Kochsalzlösung hydratisiert, die alle 60 Minuten in den Hals infundiert wurde. Nach Injektion eines jeden Radiopharmazeutikums wurden die Fußballen 5 Minuten massiert. Periodische statische Aufnahmen (1000 kcts, 256 × 256 × 16) wurden auf einer Großfeld-Gammakamera (hohe Auflösung, Niederenergiekollimator) nach 15, 45, 100 und 135 Minuten mit den vorderen Gliedmaßen und den axillären Lymphknoten in der Ansicht und nach 21, 53, 109 und 154 Minuten mit den hinteren Gliedmaßen und den poplitealen Gliedmaßen in der Ansicht erhalten. Die Gliedmaßen wurden vor jeder Aufnahme 15 Minuten lang bewegt. Imaging-Standards (10× Verdünnung) sowohl von TcMAG3-Mannosyldextran als auch von TcSC wurden ebenfalls im Gesichtsfeld positioniert. Etwa 150 Minuten nach der Injektion wurde das Kaninchen euthanasiert. Alle Wächterlymphknoten wurden exzidiert und mit verdünnten (zweifach) Proben der TcMAG3-Mannosyldextran- und TcSC-Dosen auf Radioaktivität getestet. Diese Werte wurden mit jedem Imaging-Standard normiert, um die %ID des Wächterlymphknotens zu erhalten, die dann als Funktion der Zeit aufgetragen wurden (Fig. 10). Für jede Aufnahmereihe wurden Regions-of-Interest (ROIs) um die Injektionsstelle, den Wächterlymphknoten und die Imaging-Standards gezogen. Dann wurden die gesamten Counts innerhalb jeder ROI mit einer üblichen Software für die Nuklearmedizin berechnet. Anschließend wurden die absoluten Counts in den ROIs der Injektionsstelle durch die Counts des Standards geteilt und es wurde der Bruchteil der injizierten Dosis berechnet. Diese Werte wurden dann, wie in Fig. 11 gezeigt, logarithmisch aufgetragen.

[0093] Die erhaltenen Daten zeigen, daß die bildgebenden Eigenschaften von Tc99m-MAG3-Mannosyldextran denen des filtrierten Tc99m-Schwefel-Kolloids überlegen sind. Der Prozentsatz der injizierten Dosis, aufgetragen in Fig. 10, zeigte sowohl in axillären als auch in poplitealen Wächterlymphknoten über eine Dauer von 150 Minuten eine größere Aufnahme von TcMAG3-Mannoxyldextran durch die Lymphknoten. Daneben zeigte TcMAG3-Mannosyldextran eine signifikant schnellere Clearance von der Injektionsstelle, was durch die untere Kurve von Fig. 11 gezeigt wird.

[0094] Axilläre Lymphknoten, die 15 Minuten nach Verabreichung von TcMAG3-Mannosyldextran und TcSC dargestellt wurden, hatten das in Fig. 12 gezeigte Aussehen. Die Injektionsstellen sind oben auf der Aufnahme (TcMAG3-Mannosyldextran auf der linken und filtriertes TcSC auf der rechten Seite). Auf jeder Seite des Kaninchens befindet sich ein Paar von Standards. neben den bilateralen Wächterlymphknoten könnte ein Aktivitätsfokus medial benachbart zum linken Wächterlymphknoten TcSC-Aktivität in einem distalen Knoten darstellen, was dem häufig beobachteten Verhalten von TcSC entspricht,

mit dem gewöhnlich distale Lymphknoten in Spätaufnahmen beobachtet werden. Diese Aktivität hier könnte jedoch einen mediastinalen Lymphknoten darstellen, der von beiden Seiten der axillären Lymphknotenkette geteilt wird, und für diesen Fall ist diese Beobachtung nicht von großer Bedeutung.

[0095] Die rasche Clearance der Injektionsstelle von TcMAG3-Mannosyldextran kann durch die geringe Größe der Partikel (5,5 nm) erklärt werden, die es ihnen erlaubt, auch in die Blutkapillaren einzudringen.

[0096] Die Aufnahme von TcMG3-Mannoxyldextran durch die Lymphknoten für die drei Kaninchenuntersuchungen lag zwischen 1,2 und 2,5% der injizierten Dosis. Der Bereich für filtriertes Tc-Schwefel-Kolloid war 1,5 – 4,9%.

Beispiel 7:

Demonstration einer Blutpool-Kernspintomographie in Kaninchen

[0097] Die Kernspintomographie mit GdDTPA-Dextran erfolgte sowohl mit einem gesunden als auch mit einem tumortragenden Kaninchen, die 3,0 bzw. 2,7 kg wogen. Jedes Kaninchen wurde mit einer Mischung aus 50 mg/kg Ketamin und 8,8 mg/kg Xylazin betäubt. Nach der Betäubung wurde jedes Kaninchen mit einem 3 mm-Trachealtubus intubiert und im Scanfeld positioniert. Jedes Kaninchen wurde bei 60 Schlägen/min (bpm) mit einem Schlagvolumen von 25 cm^3 ventiliert, was ein "Respiratory Gating" erlaubte. Beide Kaninchen erhielten eine Dosis von 0,17 mmol Gadolinium/kg (0,13 g GdDTPA-Dx/kg) von GdDTPA-Dextran (MG = 398.000 g/mol, 515 Gd pro Dextran). Aufnahmen wurden mit einer GE Signa™ 1.5 T-Kernspintomographie-Einheit (Softwareversion 4.83) (GE Medical Systems, Milwaukee, WI) erhalten, wobei jedes Kaninchen in einer Kniespule plaziert war. Wir untersuchten eine Reihe von Akquisitionsparametern; am erfolgreichsten war eine 3D-Flugzeit (Time of Flight, TOF) Fast Spoiled-Gradientenechosequenz (FSPGR): TR = 15,1 ms, TE = 4,2 ms, Kippwinkel = 30°, 256 × 192-Matrix, 16 cm FOV, 80 Schnitte von 1,5 mm Dicke. Aufnahmen des gesunden Kaninchens (3 kg) wurden vor Injektion (2,0 ml) und 15, 28, 33, 46 Minuten und 3 Stunden nach Injektion erhalten. Mit Ausnahme des 28-Minuten-Scans, der in der Koronarebene erfolgte, wurden alle Scans in der Axialprojektion erhalten. Die nicht korrigierten Signalintensitäten in der Aorta auf Höhe der rechten Niere waren: vor Injektion, 193; 28 Minuten, 552; 33 Minuten, 516; und 46 Minuten, 472. Fig. 19a ist eine Projektionsaufnahme maximaler Intensität des gesunden Kaninchens, die 15 Minuten nach Injektion erhalten wurde. Fig. 19b ist eine ähnliche Aufnahme desselben Tiers, die drei Stunden nach Injektion erhalten wurde.

[0098] Die Fig. 16a und Fig. 16b sind Kernspintomographien des tumortragenden Kaninchens (2,7 kg). Der Tumor ist ein VX2-Karzinom im rechten Hinterbein. Die Tumorgefäße sind in Fig. 16a nicht sichtbar, die vor der GdDTPA-Dextran-Injektion (1,8 ml, 0,17 mmol Gd/kg) erhalten wurde. Eine Stunde nach Verabreichung von GdDTPA-Dextran sind die Tumorgefäße leicht sichtbar (Fig. 16b). Auf Basis axialer 3D-FSPGR-Aufnahmen (TR = 15,1 ms, TE = 4,2 ms) berechneten wir das Kontrast-Rausch-Verhältnis CNR durch Messen der mittleren Signalintensität in der Region-of-Interest (ROI) des Tumors, Subtrahieren der mittleren Signalintensität aus Muskel und Dividieren des Ergebnisses durch die Standardabweichung einer ROI, die von einer Region außerhalb des Körpers genommen wurde. Das CNR für eine Region im Zentrum des Tumors war 0,63 vor der Injektion und 9,6 54 Minuten nach Verabreichung von GdDTPA-Dextran. Das CNR für Blutgefäße im Tumor war –21,4 vor der Injektion und 120 nach Verabreichung. Die negative Zahl ist das Ergebnis eines höheren Signals für Muskel als für das nicht kontrastmittelverstärkte Tumorgefäß.

[0099] Unser 54-Minuten-CNR von 120 ist etwa dreimal höher als die typischen Werte (CNR = 42), die in der humanen Aorta mit MS-325, dem Albumin-targetierten Mittel, nach einer ähnlichen Zeit nach der Injektion beschrieben wurden (Grist TM et al. Radiology 207:539–544).

Beispiel 8:

Demonstration einer Blutpool-Computertomographie in Kaninchen

[0100] Zwei Kaninchen wurden auf einem G.E. 9800 Quick™ CT-Scanner gescannt. Ein Kaninchen (2,6 kg), das einen großen VX2-Tumor trug, wurde mit DyDTPA-T40 (MG = 101,537 g/mol, 95 Dy pro T40) tomographiert und ein zweites gesundes Kaninchen (3 kg) wurde mit Optiray-320 (MG = 807 g/mol) tomographiert. Jedes Kaninchen wurde mit einer Mischung aus 50 mg/kg Ketamin und 8,8 mg/kg Xylazin betäubt. Nach der Betäubung wurde jedes Kaninchen mit einem 3 mm-Trachealtubus intubiert und im Scanfeld positioniert. Jedes Kaninchen wurde bei 60 bpm mit einem Schlagvolumen von 25 cm^3 ventiliert, um ein Atemanhalten während jeder Aufnahme zu ermöglichen. Dann wurde eine Lokalisationsaufnahme erhalten, um die Lage des Herzens, des Tumors, des rechten Leberlappens, der Niere und der Milz zu unterscheiden. Alle anschließenden Aufnahmen wurden mit 120 KV, 200 mA, 3 mm-Schnittdicke, 2 s Scanzeit, 512 Matrix und FOV 16 cm erhalten. Serienaufnahmen, im Abstand von 3 mm, wurden von der Mitte des Herzens bis zur Mitte der linken Niere aufgenommen. Aus dieser Aufnahmeserie wurden axiale Positionen für das Herz, die Leber, den Tumor, die Niere und die Milz ausgewählt. Nach drei Aufnahmen

in jeder Position injizierten wir [Dy]DTPA-T40 (5 ml, 190 mg Dy/kg, 37 mmol Dy/kg) über eine Dauer von 120 Sekunden und erhielten Aufnahmen 2, 5, 7, 15, 30 und 37 Minuten nach Injektion. Aufnahmen des tumortragenden Kaninchens, die vor der Injektion und 2, 5, 30 und 37 Minuten nach Injektion aufgenommen wurden, sind in den Fig. 17a–Fig. e gezeigt. Wir injizierten das Optiray-320 (640 mg I/kg, 5,0 mmol I/kg) über eine Dauer von 60 Sekunden und tomographierten von 2 bis 10 Minuten in Abständen von einer Minute sowie 20 Minuten nach Injektion.

[0101] Die Fig. 18a, Fig. 18b, Fig. 18c und Fig. 18d sind eine zeitliche Reihe von Leberquerschnitten vor und 2, 5 und 10 Minuten nach einer Injektion von Optiray-320 in ein gesundes Kaninchen. Nur die Fünfminutenaufnahme zeigt die Aorta, die IVC und die Pfortader mit einer größeren Intensität als die Leber. Die Zwei- und Fünfminutenaufnahmen (Fig. 18b bzw. Fig. 18c) in der zeitlichen Reihe mit DyDTPA-T40 zeigen diese Gefäße sowie intrahepatische Gefäße mit einer größeren Intensität als die umgebende Leber. Die um das Grundrauschen der IVC und der Leber korrigierten Kurven (Fig. 14a–Fig. d) sind für beide Mittel mit den Aufnahmen konsistent. Am wichtigsten ist, daß die IVC-Kurve für DyDPTA-T40 wenigstens 10 Minuten beständig ist, während die IVC-Kurve mit Optiray-320 mit einer Halbwertszeit von etwa zwei Minuten rasch abfiel. Die y-Achse der Kurven in den Fig. 14a–Fig. d wurde berechnet, indem die CT# der IVC-ROI von der Leber-CT# abgezogen wurde. Unser Ziel war es, das Grundrauschen zu beseitigen und die Differenz zwischen Gefäß- und Lebersignalen beizubehalten. Signifikant ist auch die fehlende Aufnahme von DyDTPA-Dx durch die Milz und die Nierenrinde, wie in Fig. 14b gezeigt ist. Die Intensität des Nierenmarks zeigt Filtration entweder von intaktem Makromolekül, von aus dem Chelat dissoziiertem Dy oder von einem Dy-Abbauprodukt an.

[0102] Um auf Anzeichen zu testen, ob aufgrund unserer Chemie zur Anbindung von Seitenketten Dextranvernetzung erfolgt war, chromatographierten wir ein aminoterminiertes T10-Konjugat (NT 10) mit Sephacryl S-300HR (27 × 1 cm) und 0,9%iger Kochsalzlösung als mobiler Phase (30 ml/h). Wir verfolgten die Elution bei 226 nm. Pharmacia gibt den geeigneten Fraktionierungsbereich für Dextran mit 2 × 103 bis 1 × 105 Da an. Fig. 15a ist ein Chromatogramm von humanem Serumalbumin; das Hohlraumvolumen ist bei Vo und das Gesamtvolumen bei Vt. Fig. 15b ist ein Chromatogramm des aminoterminierten T10-Konjugats, das 105 Seitenketten besitzt; dies ist eine Seitenkettendichte von 1,8 Aminogruppen pro Glucoseeinheit. Ein Hinweis auf Vernetzung sollte beim Hohlraumvolumen auftreten, wo das Extinktionsprofil in Reaktion auf die Anwesenheit von hochmolekularem Dextran sofort ansteigen sollte. Der mittlere Durchmesser dieses Konjugats, gemessen mittels dynamischer Laserlichtstreuung (Honeywell Microtrac™ UPA150), betrug 0,043 µ bei einer Standardabweichung von 0,0010 µ. Das Albumin wurde bei 0,0092 ± 0,0011 µ gemessen, was etwas höher ist als der veröffentlichte Durchmesser von 0,0072 µ.

Diskussion

[0103] Die Vorteile und nützlichen Beiträge des hier beschriebenen zweistufigen Schemas für die Anbindung der Seitenketten sind: hohe Ausbeute bei der Bindung, geringe Vernetzung und fehlende Ladung an der Bindungsstelle. Das Dextrangerüst bietet ferner geringe Kosten und umfangreiche Erfahrungen bei der Verwendung am Menschen. Die Existenz einer großen Anzahl Seitenketten (d.h. Aminogruppen) pro Dextranmolekül erlaubt auch die Bindung einer hohen Dichte von Substraten und/oder Wirkstoffen an jedes Dextrangerüst.

[0104] Verfahren vor der Erfindung führten zu einer unerwünschten Vernetzung des molekularen Grundgerüsts. Siehe z.B. Rebizak et al. (1997), Bioconj. Chem. 8:605–610; Rebizak et al. (1998), Bioconj, Chem. 9:94–99 (die die Umsetzung von Ethylendiamin mit Dextrancarbonsäure in Gegenwart von 2-Ethoxy-1-(ethoxycarbonyl)-1,2-dihydrochinolin (EEDQ) beschreiben). Vernetzung ist ein ernsthaftes Problem, weil sie das Molekulargewicht des Grundgerüsts erhöht und folglich die Löslichkeit des Produkts verringert. Außerdem kann sie Toxizität induzieren, indem sie die Komplexbildungskonstante zwischen dem hochtoxischen Radiotracer (z.B. Gd^{3+}) und der chelatbildenden Gruppe in solchen makromolekularen Strukturen destabilisiert. Folglich können diese herkömmlichen Reaktionsschemata nur verwendet werden, um eine geringere Dichte von Seitenketten pro Dextranmolekül zu binden; dementsprechend kann das Dextranmolekül bei herkömmlichen Verfahren nur ein paar wenige Substrate und/oder Wirkstoffe tragen, weshalb höhere Dextrandosen benötigt werden, um den gewünschten diagnostischen Effekt oder Wirkstoffeffekt zu erreichen. Dies erhöht die Kosten, verringert die Sicherheit und führt auch zu Löslichkeitsproblemen (eine höhere Vernetzung verringert die Löslichkeit). Die Menge an Geweberezeptor limitiert auch die Anzahl von Dextranmolekülen, die an den Rezeptor binden und in die Zellen eindringen können. Die resultierende geringe Dichte an Wirkstoff oder an diagnostischem Mittel kann nicht die zum Erzielen des gewünschten Effekts adäquate Menge liefern.

[0105] Die Erfindung löst diese Probleme, indem sie ein Trägermolekül mit einer ausreichend hohen Dichte von Seitenketten ("Leashes") mit Bindungsstellen bereitstellt.

[0106] Die Erfindung beseitigt ferner den Nachteil

geringer Bindungsflexibilität bei anderen Schemata, z.B. Gedda et al. (1996), Bioconj. Chem. 7:584–591 und Holmberg et al. (1993), Bioconj. Chem. 4:570–573, die nicht-aminoterminierte Seitenkettensysteme beschreiben. Die fehlende Flexibilität bei den Methoden des Standes der Technik beschränkt den möglichen Anwendungsbereich. Die Erfindung vermeidet solche Beschränkungen und sorgt so für einen breiteren Anwendungsbereich.

Literaturstellen

Albertini JJ, Lyman GH, Cox C, Yeatman T, Balducci L, Ku N, Shivers S, Berman C, Well K, Rapaport D, Shons A, Horton J, Greenberg H, Nicosia S, Clark R, Cantor A, Reintgen DS. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patient with breast cancer. JAMA 276:1818–1822 (1996).

Armitage FE, Richardson DE, Li KCP. Polymeric contrast agents for magnetic resonance imaging: Synthesis and characterization of gadolinium diethylenetriamine-pentaacetic acid conjugated to polysaccharides. Bioconj. Chem. 1:365–374 (1990).

Capizzi RL. Protection of normal tissues from the cytotoxic effects of chemotherapy by amifostine (ethyol): clinical experiences. Semin. Oncol. 21(S11):8-1), 5 (1994).

De Cicco C, Cremonesi M, Luini A, Bartolmei M, Grana C, Gennaro P, Galimberti V, Calza P, Viale G, Veronesi U, Paganelli G. Lymphoscintigraphy and radioguided biopsy of the sentinel axillary node in breast cancer. J. Nucl. Med. 39-2080-2084 (1998).

Douay L, Hu C, Giarratana C, Gorin N-C. Comparative effects of amifostine (ethyol) on normal hematopoietic stem cells versus human leukemic cells during ex vivo purging in autologous bone marrow transplants. Semin. Oncol. 21(S11):16–20 (1994).

Dubois M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28:350–356 (1956).

Fields RC. The rapid determination of amino groups with TNBS, Meth. Enzymol. 25;464–468 (1972).

Glass EC, Essner R, Giuliano A, Morton DL. Comparative efficacy of three lymphoscintigraphic agents. J. Nucl. Med. 36:199P (1995).

Guiliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. Ann. Surg. 220:391–401 (1994).

Guiliano A-E. Axillary node mapping for breast cancer. Presented at the 48th Annual Symposium of the Society of Surgical Oncology, March 23–25, Boston, MA (1995).

Gedda L, Olsson P, Ponten J, Carlsson J. Development and in vitro studies of epidermal growth factor-dextran conjugates for neutron capture therapy. Bioconj. Chem. 7:584–591 (1996).

Grist TM, Korosec FR, Peters DC, Witte S, Walovitch RC, Dolan RP, Bridson WE, Yucel EK, Mistretta CA. Steady-state and dynamic MR angiography with MS-35: initial experience in humans. Radiology 207:539–544.

Henze E, Schelbert HR, Collins JD, Najafi A, Barrio JR, Bennett LR. Lymphoscintigraphy with Tc-99m-labeled dextran. J. Nucl. Med. 23:923–929 (1982).

Holmberg A, Meurling L. Preparation of sulfhydrylborane-dextran conjugates for boron neutron capture therapy. Bioconjugate Chem. 4:570–573 (1993).

Krag DN, Weaver JC, Alex JC, Fairbank JT. Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe. J. Surg. Oncol. 2:335–340 (1993).

Krag, DN. Gamma-probe-guided resection of axillary sentinel nodes. Presented at the 48th annual symposium of the Society of Surgical Oncology, March 23–25, Boston, MA (1995).

Krag, DN, Weaver D, Ashikaga T, Moffat F, Klimberg VS, Shriver C, Feldman S, Kusminsky R, Gadd M, Kuhn J, Harlow S, Beitsch P. The sentinel node in breast cancer-a multicenter validation study. N. Eng. J. Med. 339:941–946 (1998).

Krejcarek GE, Tucker KL. Covalent attachment of chelating groups to macromolecules. Biochem. Biophys. Res. Commun. 77:581–583(1977).

Krinick NL, Rihova B, Lnbrich K, Strohalm J, Kopecek J, Synthesis of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer-anti-Thy 1.2 antibody-chlorin e6 conjugates and a preliminary study of their photodynamic effect on mouse splenocytes in vitro. Makromol. Chem. 191:839–856 (1990).

Lee YC. Neoglycoconjugates: General Considerations, In: Neoglycoconjugates: Preparation and applications. Lee YC and Lee RT Eds. Academic Press, San Diego (1994).

Molteni L, Dextrans as drug carriers. In: Gregoriadis G, ed. Drug carriers in biology and medicine. San Diego, Academic Press; 107–125 (1979).

Morton DL, Wen D-R, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm K, Foshag LJ, Cochran AJ. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. Arch. Surg. 127:392–299 (1992).

Phillips TL. Sensitizers and protectors in clinical oncology. Semin. Oncol. 8:67–82 (1881).

Rasey JS, Spence AM, Badger CC, Krohn KA, Vera DR, Livesey JC. Specific protection of different normal tissues. Pharmac. Ther. 39:33–43 (1988).

Rebizak R, Schaefer M, Dellacherie T., Polymeric conjugates of Gd 31 Diethylenetriaminepentaactic acid and dextran. 1. Synthesis, characterization, and paramagnetic properties. Bioconj. Chem. 8:605–610.

Rebizak R (1998), Schaefer M, Dellacherie P. Polymeric conjugates of Gd-Diethylenetriaminepentaactic acid and dextran. 2. Influence of spacer arm length and conjugate molecular mass on the paramagnetic properties and some biological parameters. Bioconj. Chem. 9:94–99 (1997).

Saha S (1998), Nora D, Espinosa M, Gauthier J, Morrison A, Rohatgi C, Dorman S, Jones T, Singh T, Arora M, Ganatra BK, Desa D. Diagnostic and therapeutic implications of sentinel node mapping in colorectal cancer: a Prospective study. J. Surg. Oncol. 69:183.

Seymour LW. Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates. Critical Reviews of Therapeutic Drug Carrier Systems 9:135–187 (1992).
Sieving PF, Watson AD, Rocklage SM. Preparation and characterization of paramagnetic polychelates and their conjugates. Bioconj. Chem. 1:65–71 (1990).
Slingluff CL, Stidham KR, Ricci WM, Stanley WE, Seigler HF. Surgical management of regional lymph nodes in patients with melanoma: experience with 4682 patients. Ann. Surg. 219:120–130 (1994).
Snyder WS (1975), Ford MR, Warner GG et al. 'S' Absorbed Dose per Unit Cumulative Activity for Selected Radionuclides and Organs, MIRD Pamphlet No. 11. New York Society of Nuclear Medicine, 1975.
Stadalnik RC, Vera DR, Woodle ES, Trudeau WL, Porter BA, Ward RE, Krohn KA, O'Grady LF. Technet-99m NGA functional imaging: preliminary clinical experience. J. Nucl. Med. 26:1233–1242 (1985).
Steer CJ, Ashwell G. Receptor-mediated endocytosis: Mechanisms, biologic function, and molecular properties. In: Hepatology. A Textbook of liver Disease. (2nd Ed.) Zakim D, Boyer TD, eds. W.B. Saunders, Philadelphia (1990).
Tomalia DR, Baker H, Deward J, et al. A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules. Polymer J. 17:117–132 (1985).
Uren RF, Howman-Giles RB, Thompson JF, Malouf D, Ramsey-Stewart G, Niesche FW, Renwick, SB. Mammary lymphoscintigraphy in breast cancer. J. Nucl. Med. 1995 36:1775–1780 (1995).
Vera DR, Stadalnik RC, Krohn KA. Technetium-99m galactosylneoglycoalbumin: preparation and preclinical studies. J. Nucl. Med. 26:1157–1167 (1985).
Vera DR, Buonocore MIH, Wisner ER, Katzberg RW, Stadalnik RC. A molecular receptor-binding contrast agent for magnetic resonance imaging of the liver. Acad. Radiol. 2:497–596 (1995).
Vera DR , Wisner ER, Stadalnik RC. Sentinel node imaging via a nonparticulate receptor-binding radiotracer. J. Nucl. Med. 38:530–535 (1997).
Veronesi U, Paganelli G, Galimberti V, Viale G, Zurrida S, Bedoni M, Costa A, de Cicco C, Geraghty JG, Luini A, Sacchini V, Veronesi P. Sentinel-node biopsy to avoid axillary dissection in breast with clinically negative lymph-nodes. Lancet 349:1864–1867 (1997).

[0107] Sämtliche vorhergehenden Referenzen bilden vollinhaltlich Bestandteil der vorliegenden Offenbarung.

Patentansprüche

1. Trägermolekül, umfassend:
ein Grundgerüst, wobei das Grundgerüst Dextran ist; wobei an dieses Grundgerüst eine Vielzahl von Gruppen mit der Struktur $-O(CH_2)_3S(CH_2)_2NH_2$ gebunden sind.

2. Molekül nach Anspruch 1, hergestellt durch die Reaktion einer Allylgruppe mit Aminoethanthiol.

3. Molekül nach Anspruch 1, welches ferner wenigstens eine weitere chemische Gruppe umfaßt, die an die Aminogruppe wenigstens einer der Gruppen mit der Struktur $-O(CH_2)_3S(CH_2)_2NH_2$ konjugiert ist.

4. Molekül nach Anspruch 3, wobei die wenigstens eine weitere chemische Gruppe ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Chelatoren, Rezeptorliganden, Enzymsubstraten, Nucleinsäuren, Peptiden, Polysacchariden, Radiosensibilisatoren, Radioprotektoren und Farbstoffen.

5. Molekül nach Anspruch 4, wobei die wenigstens eine weitere Gruppe ein Chelator ist, der in der Lage ist, ein Atom zu binden, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus radioaktiven Atomen, absorbierenden Elementen und paramagnetischen Atomen.

6. Molekül nach Anspruch 4, wobei die wenigstens eine weitere Gruppe ein Chelator ist, der ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus DOTA, MAG3 und DTPA.

7. Molekül nach Anspruch 5, wobei sich das Molekül zur Darstellung von Wächterlymphknoten eignet.

8. Molekül nach Anspruch 5, wobei der Chelator an Gadolinium gebunden ist.

9. Molekül nach Anspruch 5, wobei der Chelator an Ytterbium gebunden ist.

10. Molekül nach Anspruch 5, wobei der Chelator an Tc-99m gebunden ist.

11. Molekül nach Anspruch 5, wobei der Chelator an Indium gebunden ist.

12. Molekül nach Anspruch 4, wobei die wenigstens eine weitere Gruppe ein Substrat für einen Rezeptor ist, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Mannose, Galactose, Monosacchariden und Peptiden.

13. Mittel zur MRI, hergestellt aus dem Molekül nach Anspruch 1.

14. Mittel zur CT, hergestellt aus dem Molekül nach Anspruch 1.

15. Verfahren zur Herstellung eines im wesentlichen vernetzungsfreien Trägermoleküls mit einer Vielzahl aminoterminierter Seitengruppen, umfassend:
Bereitstellen eines Grundgerüstmoleküls, wobei das Grundgerüst Dextran mit einer Vielzahl Hydroxygrup-

pen ist,
Allylierung wenigstens eines Teils der Hydroxygruppen an diesem Grundgerüstmolekül zur Herstellung eines Allylderivats dieses Grundgerüsts; und
Umsetzen der Allylgruppen dieses Allylderivats mit einer Verbindung, die einen Aminoterminus und einen zweiten Terminus umfaßt, wobei dieser zweite Terminus mit den Allylgruppen des Allylderivats reagieren kann;
zur Herstellung eines im wesentlichen vernetzungsfreien Trägermoleküls mit einer Vielzahl aminoterminierter Seitengruppen.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Verbindung Aminoethanthiol ist.

17. Verfahren nach Anspruch 16, ferner umfassend die Konjugation der aminoterminierten Seitengruppen mit wenigstens einem Element, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Chelatoren, Rezeptorliganden, Enzymsubstraten, Nucleinsäuren, Peptiden, Polysacchariden, Monosacchariden, Radiosensibilisatoren, Radioprotektoren und Farbstoffen.

18. Verfahren nach Anspruch 17, ferner umfassend das Zusetzen eines Atoms mit Affinität für Chelatoren, wobei das Atom ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus radioaktiven Atomen, absorbierenden Elementen und paramagnetischen Atomen.

19. Verfahren nach Anspruch 17, wobei das wenigstens eine Element ein Chelator ist, der ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus DOTA, MAG3 und DTPA, und wobei das Substrat für einen Rezeptor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Mannose, Galactose und Peptiden.

20. Verwendung des mit dem Verfahren nach Anspruch 19 hergestellten Moleküls, umfassend die Verwendung des konjugierten, im wesentlichen vernetzungsfreien Trägermoleküls zur Herstellung eines Mittels zur Verwendung bei einem diagnostischen Verfahren.

21. Verwendung des mit dem Verfahren nach Anspruch 20 hergestellten Moleküls, wobei das diagnostische Verfahren die Darstellung von Wächterlymphknoten ist.

22. Verwendung des mit dem Verfahren nach Anspruch 17 hergestellten Moleküls, umfassend die Verwendung des konjugierten, im wesentlichen vernetzungsfreien Trägermoleküls bei einer therapeutischen Anwendung.

23. Mittel zur MRI, hergestellt mit dem Verfahren nach Anspruch 15.

24. Mittel zur CT, hergestellt mit dem Verfahren nach Anspruch 15.

25. Mittel zur Detektion von Wächterlymphknoten, hergestellt gemäß dem Verfahren nach Anspruch 15 und ferner umfassend ein Rezeptorsubstrat, einen Chelator und ein radioaktives Atom.

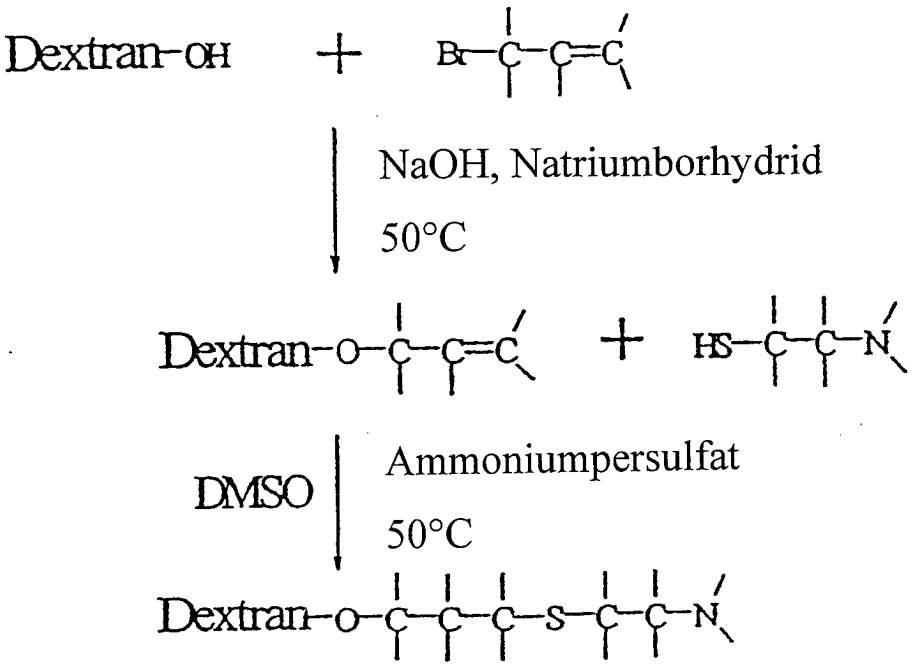
26. Mittel zur Detektion von Wächterlymphknoten nach Anspruch 25, wobei der Chelator MAG3 ist.

27. Mittel zur Detektion von Wächterlymphknoten nach Anspruch 25, wobei das Rezeptorsubstrat Mannose ist.

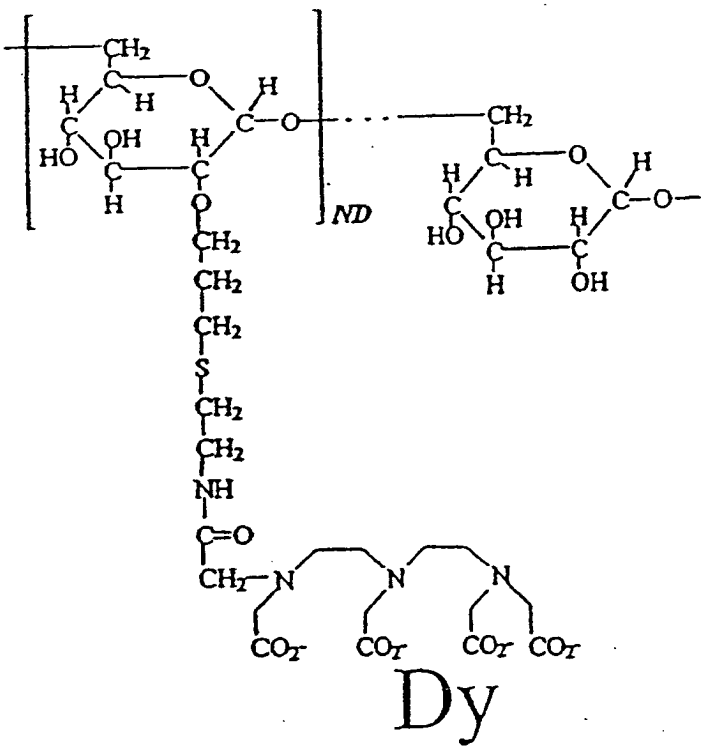
28. Mittel zur Detektion von Wächterlymphknoten nach Anspruch 27, wobei das radioaktive Atom Tc-99m ist und der Chelator DOTA ist.

Es folgen 13 Blatt Zeichnungen

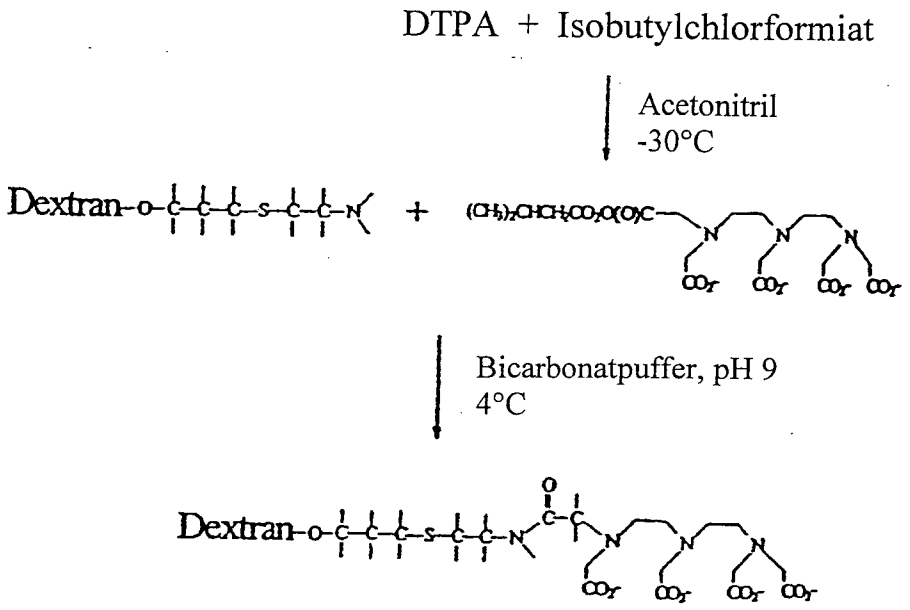
Anhängende Zeichnungen



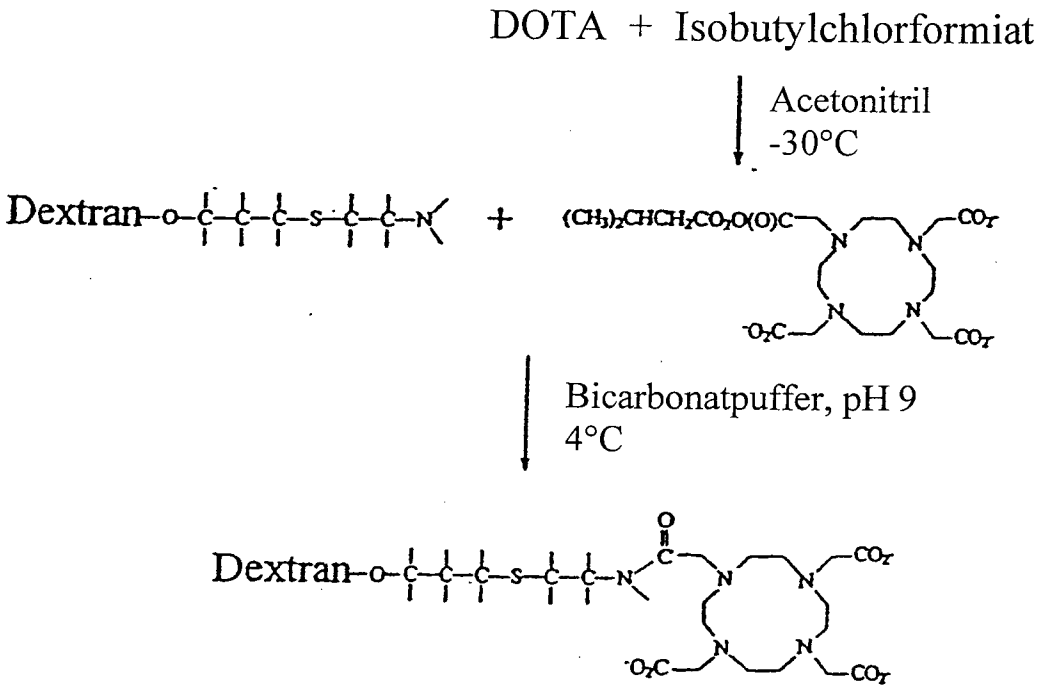
Figur 1



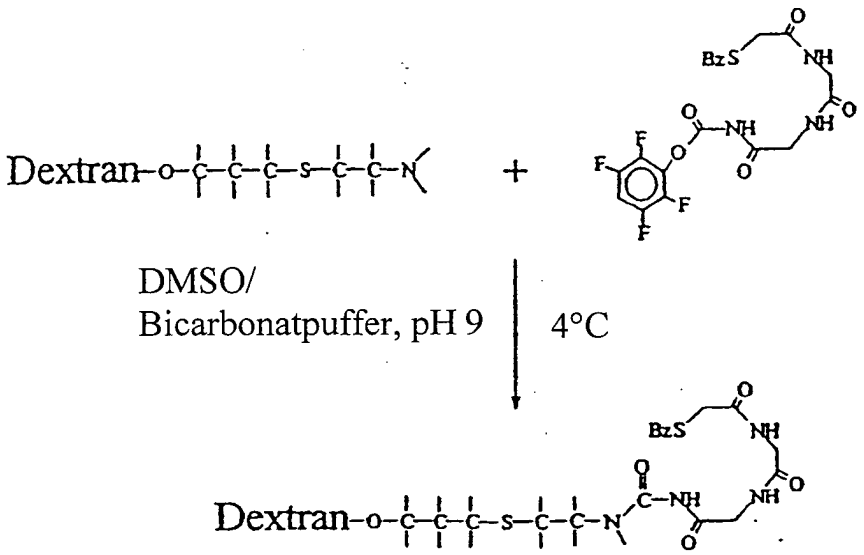
Figur 2



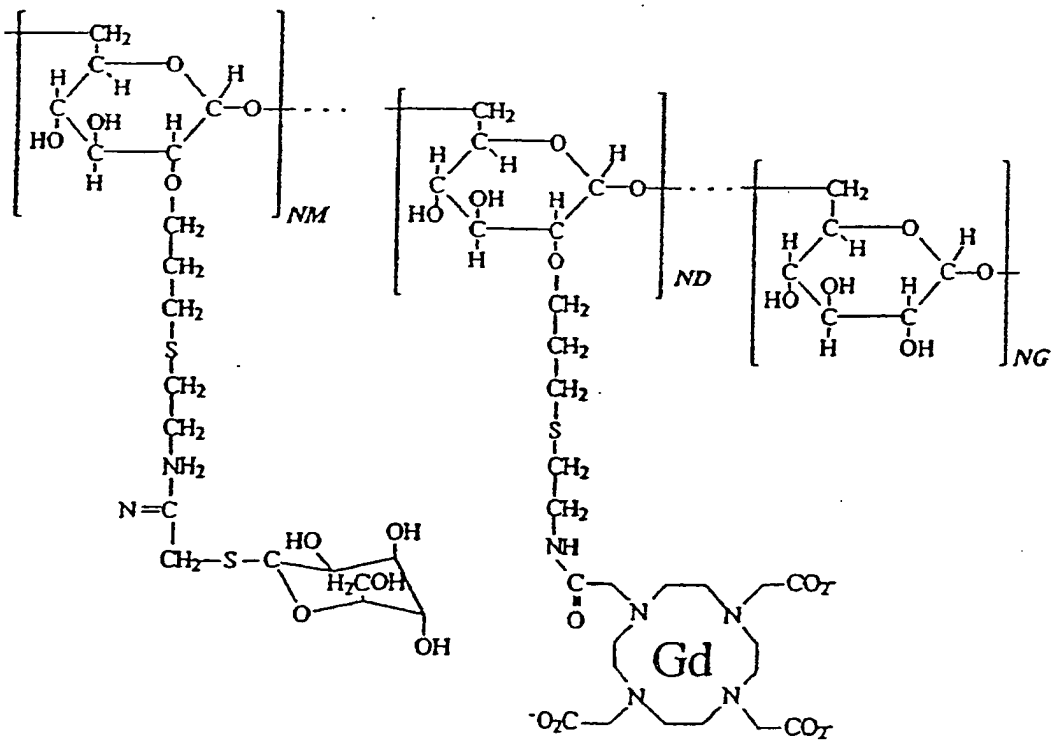
Figur 3



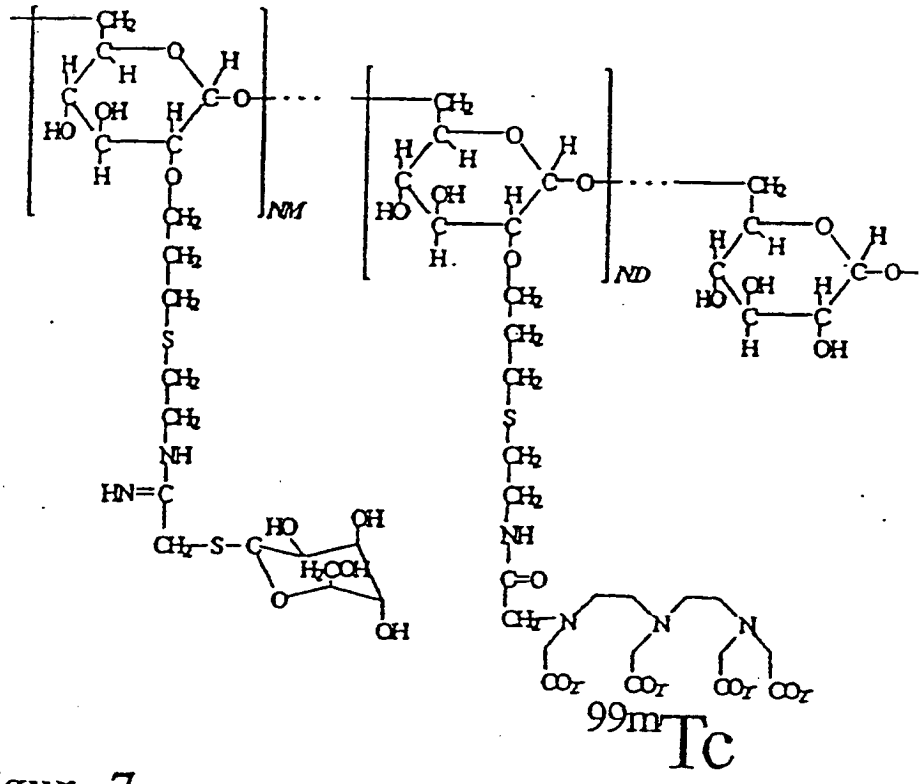
Figur 4



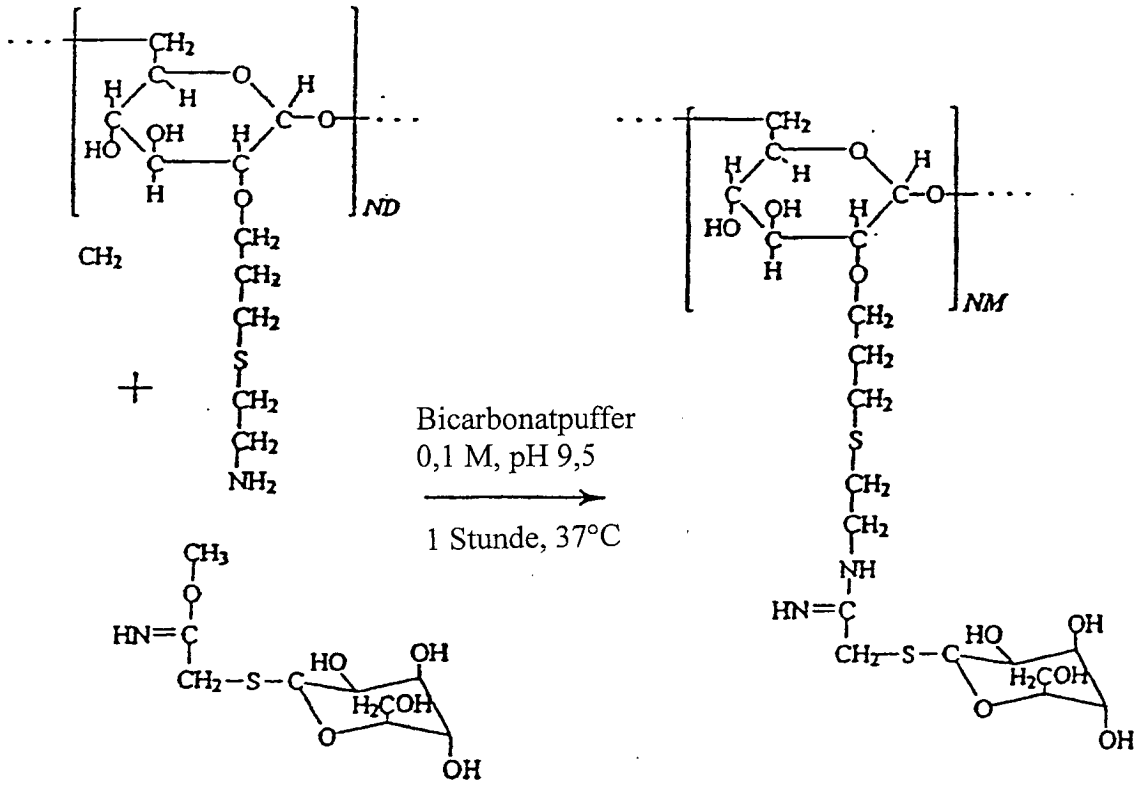
Figur 5



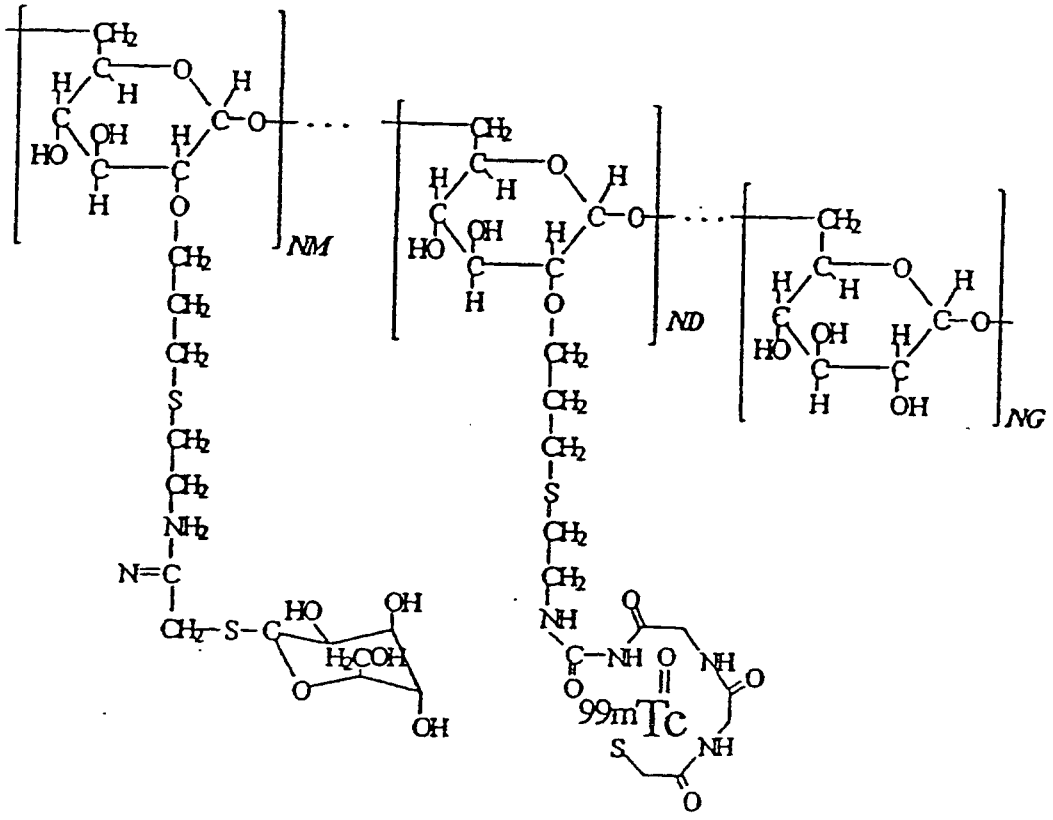
Figur 6



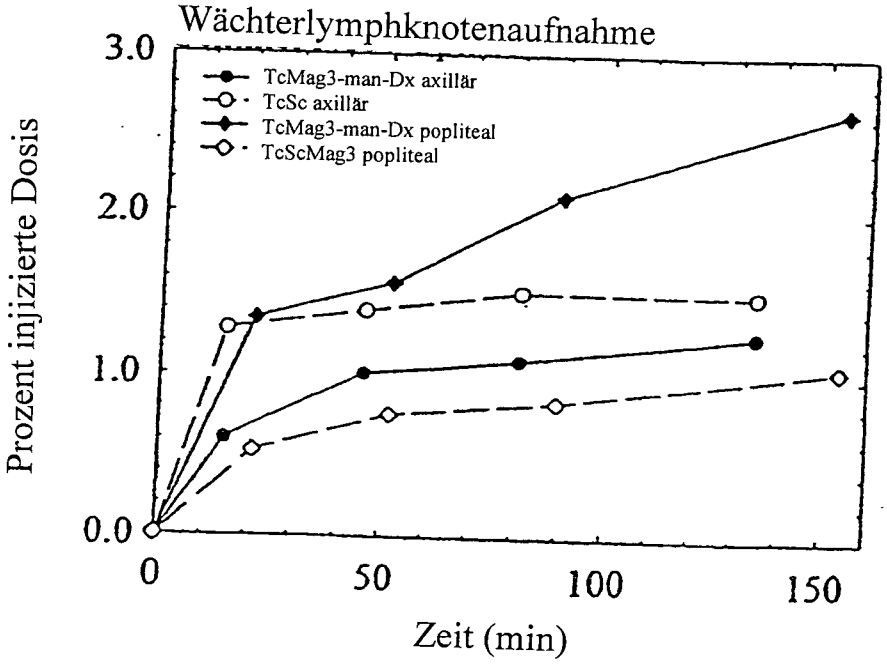
Figur 7



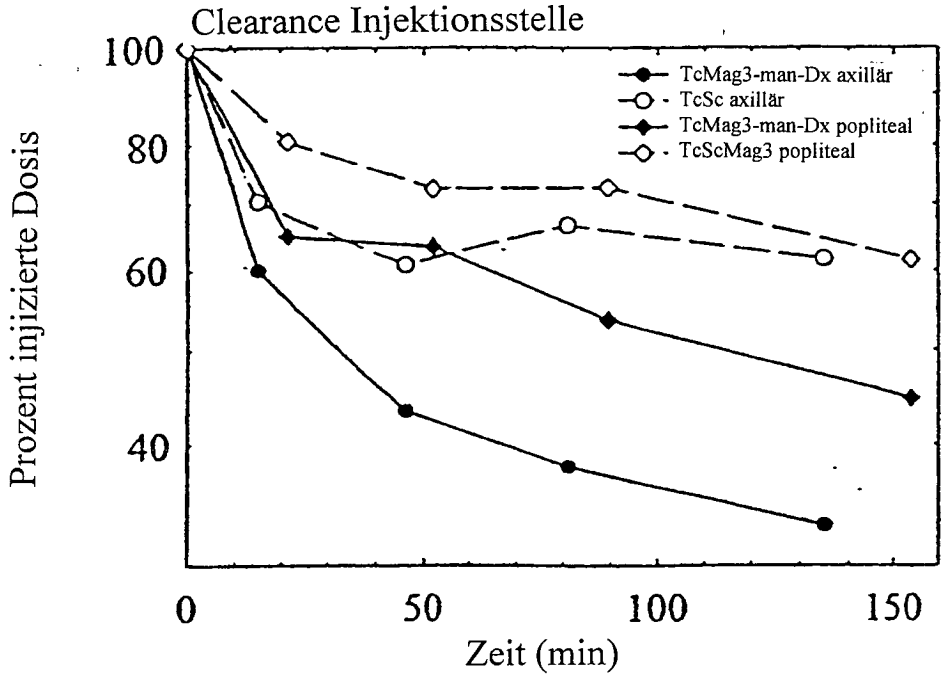
Figur 8



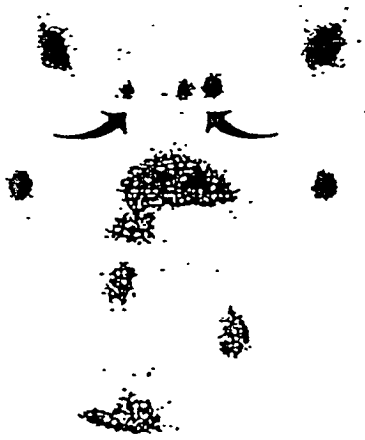
Figur 9



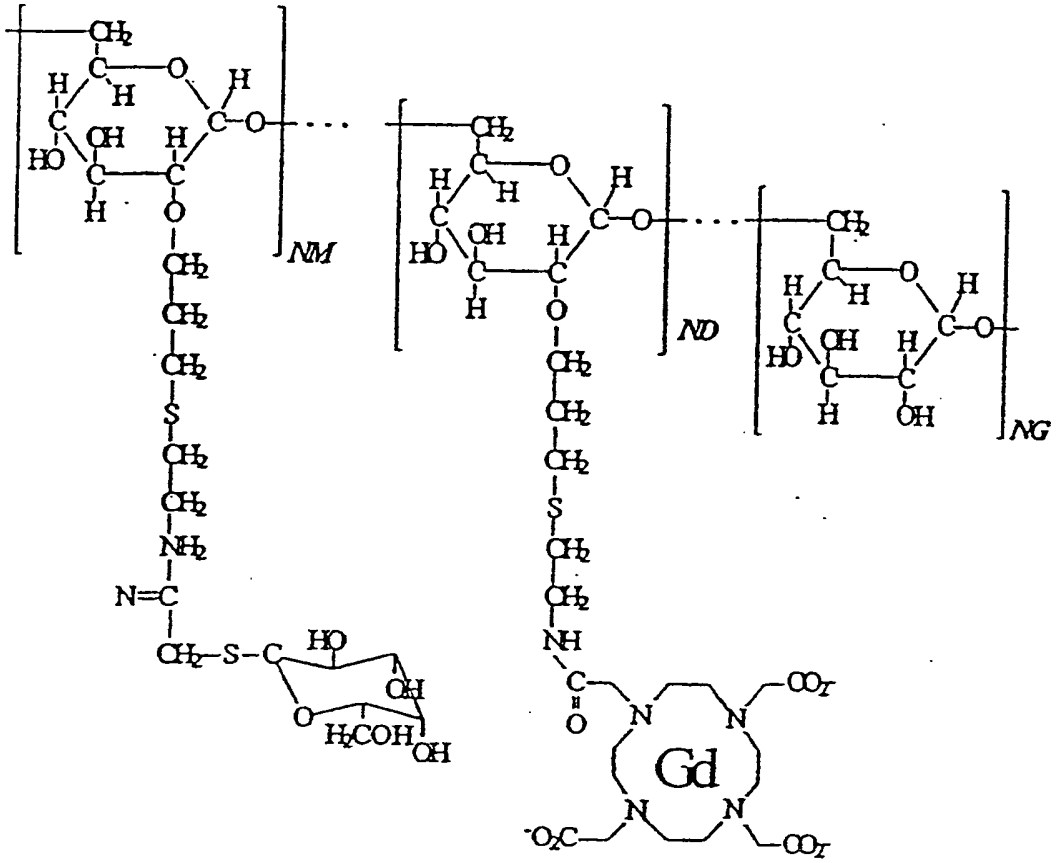
Figur 10



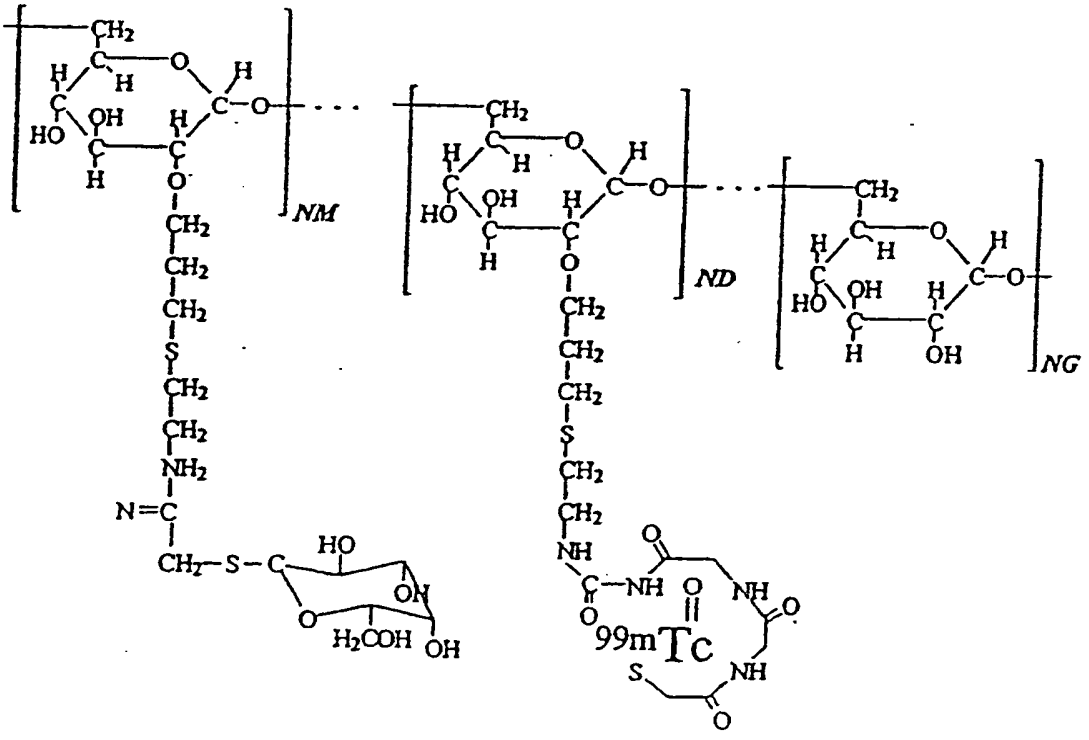
Figur 11



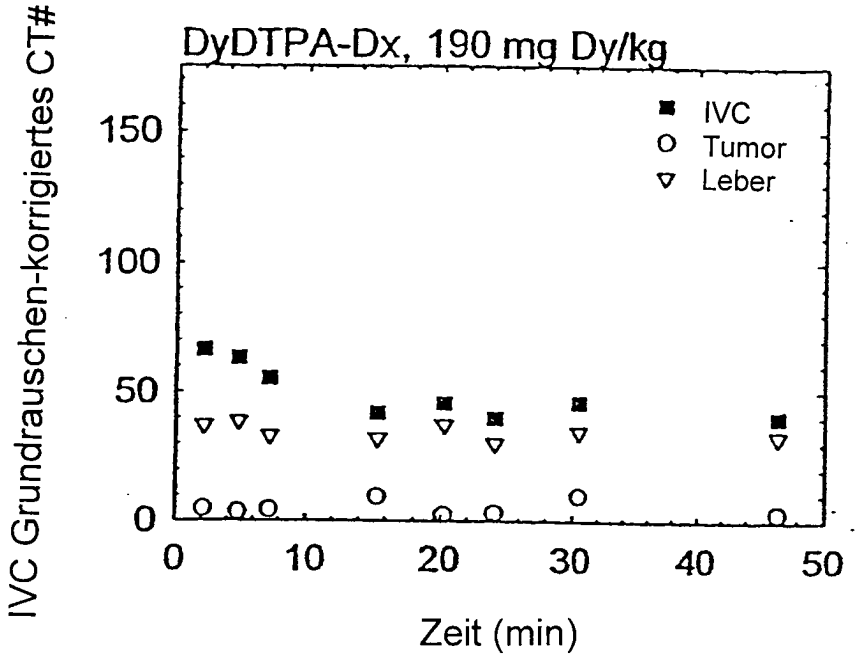
Figur 12



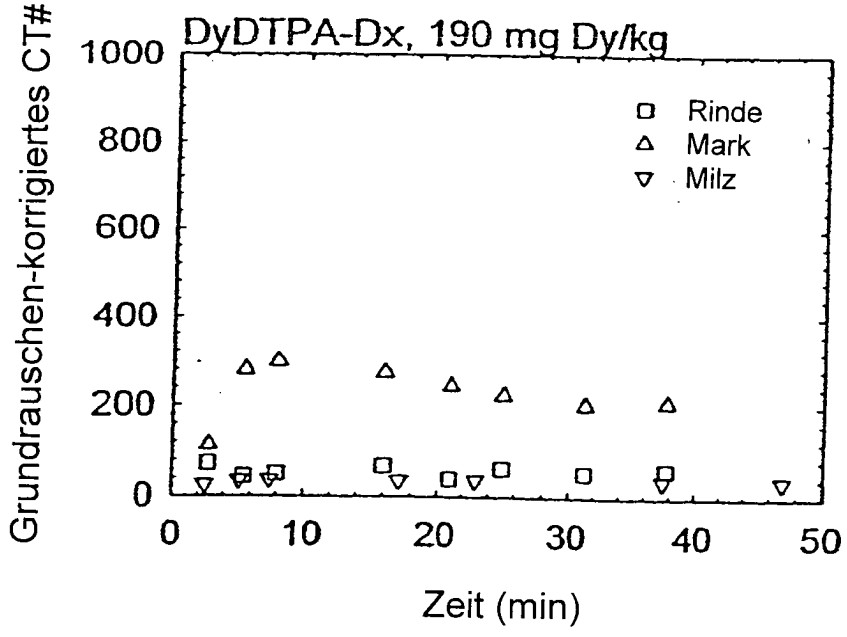
Figur 13a



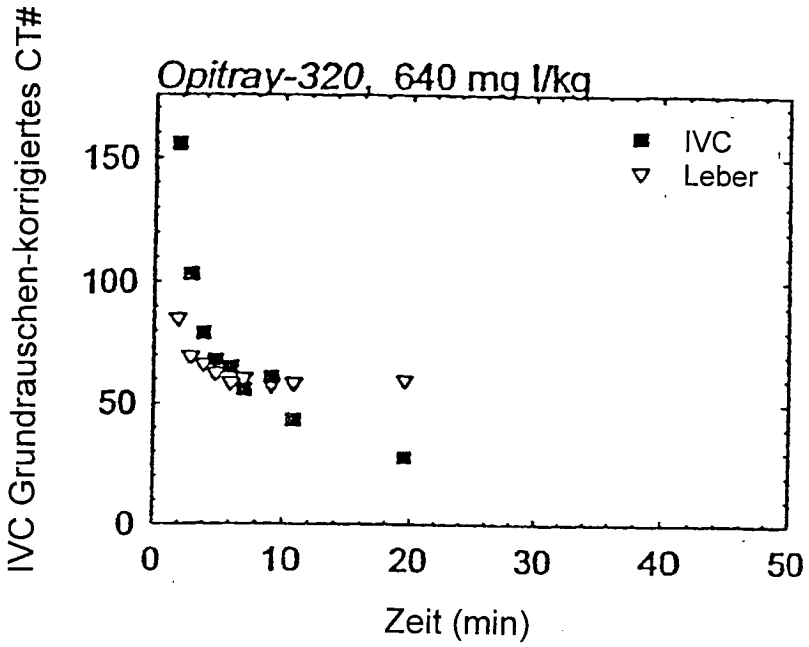
Figur 13b



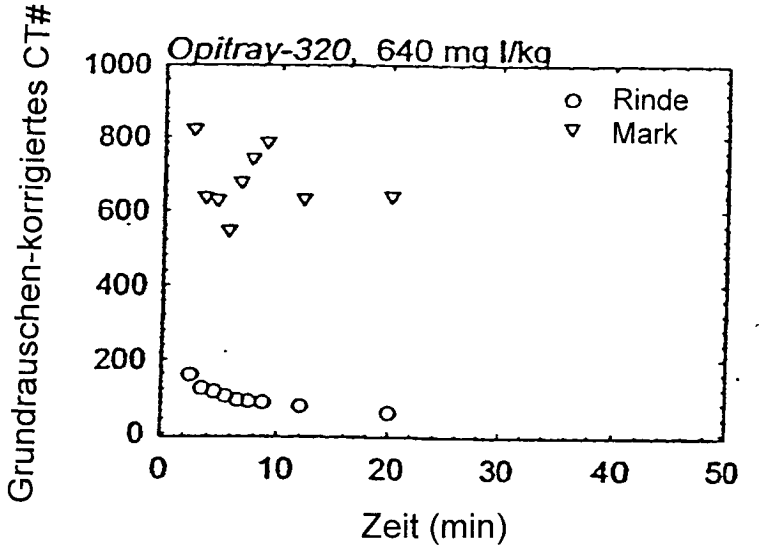
Figur 14a



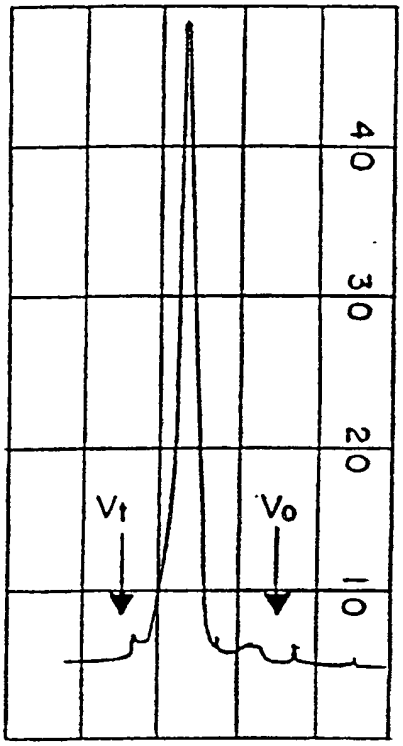
Figur 14b



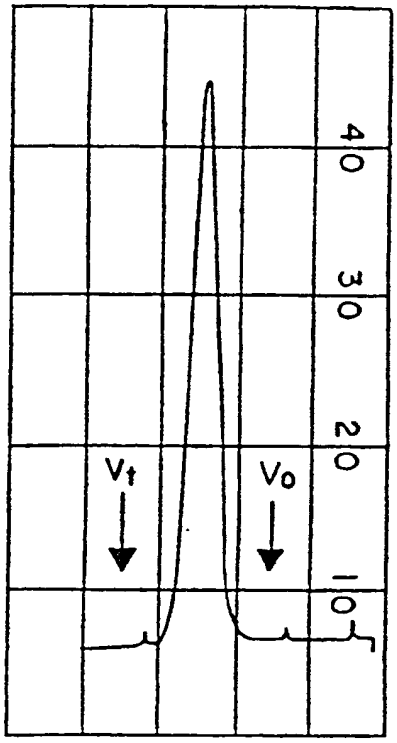
Figur 14c



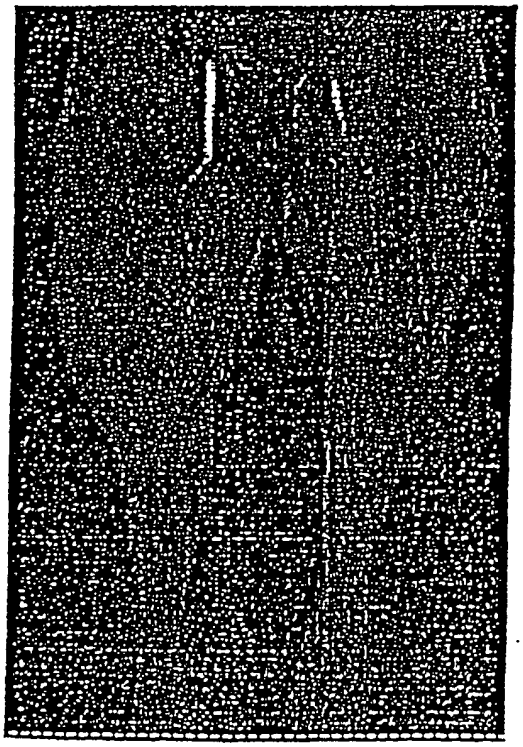
Figur 14d



Figur 15a



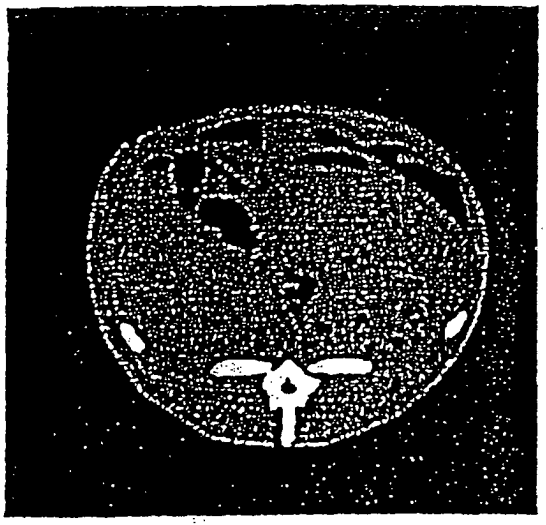
Figur 15b



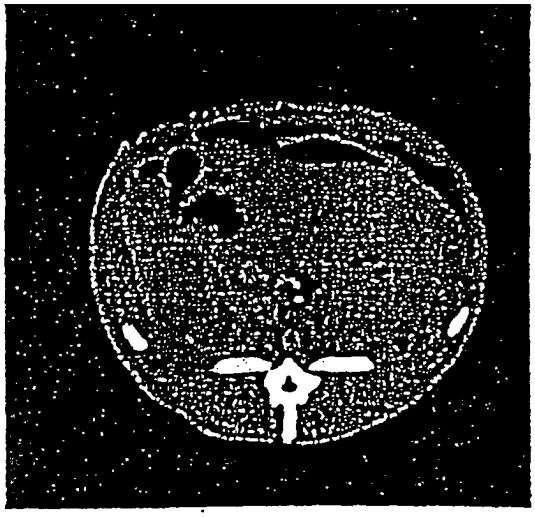
Figur 16a



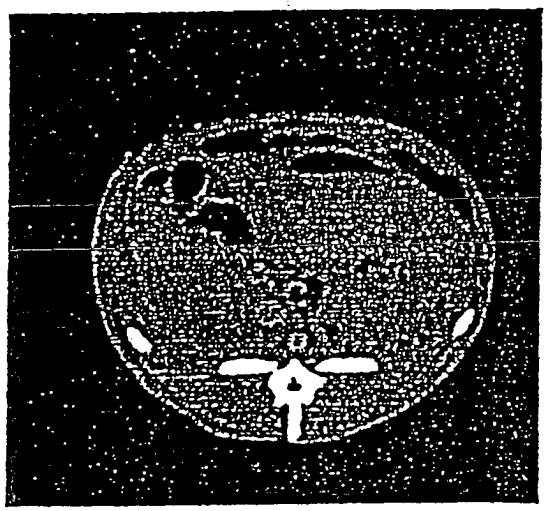
Figur 16b



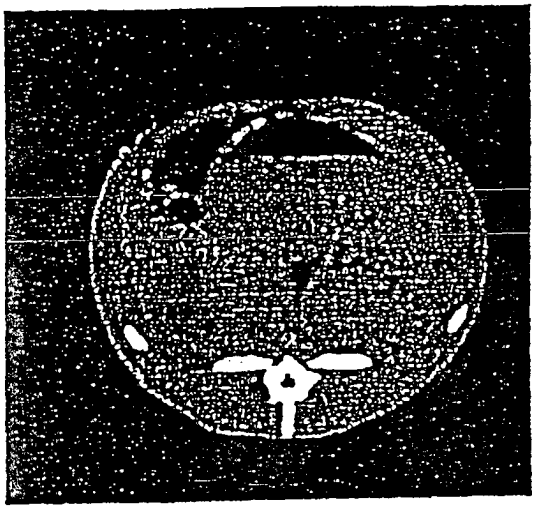
Figur 17a



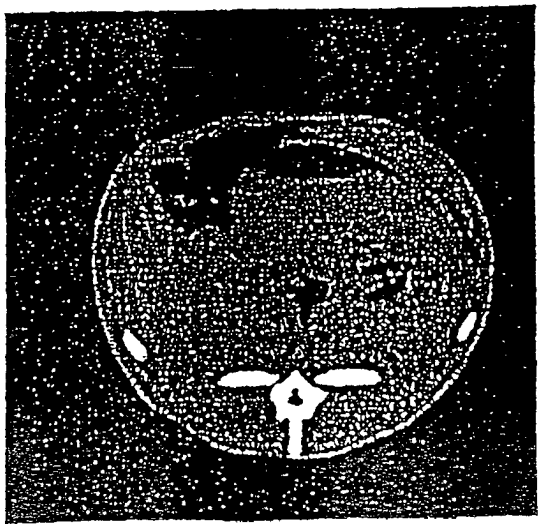
Figur 17b



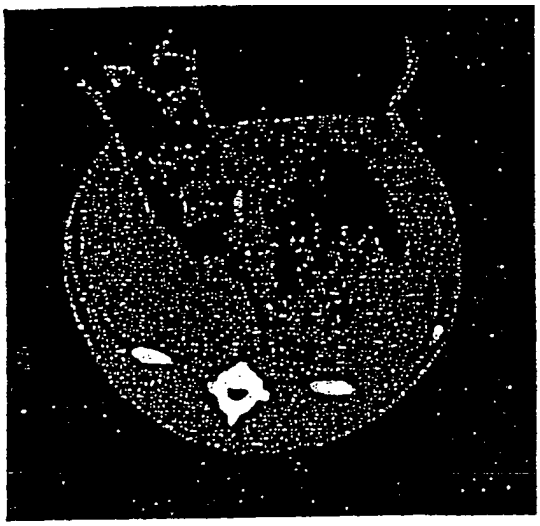
Figur 17c



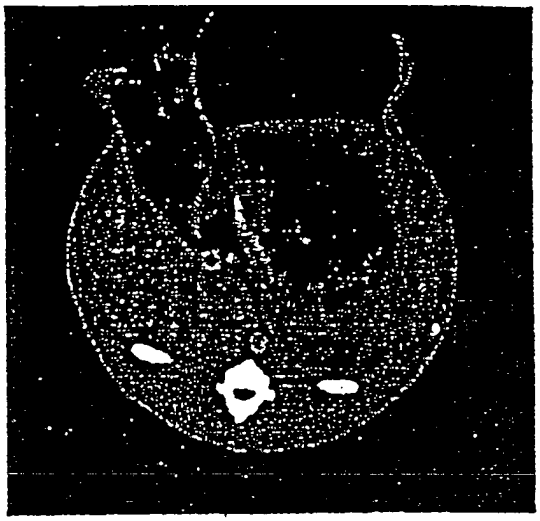
Figur 17d



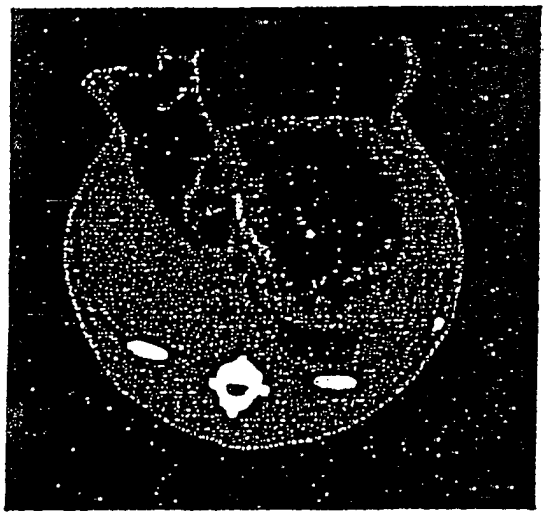
Figur 17e



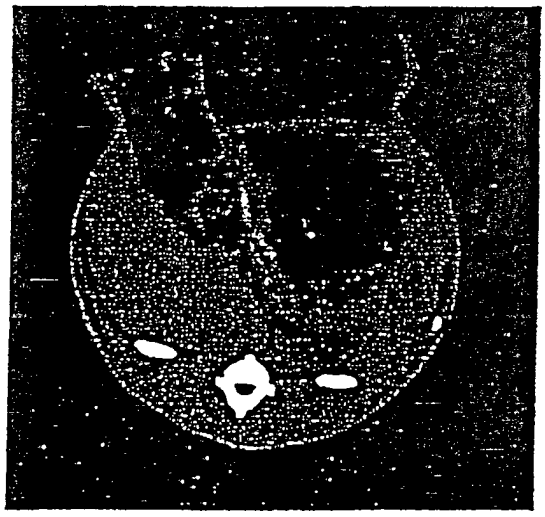
Figur 18a



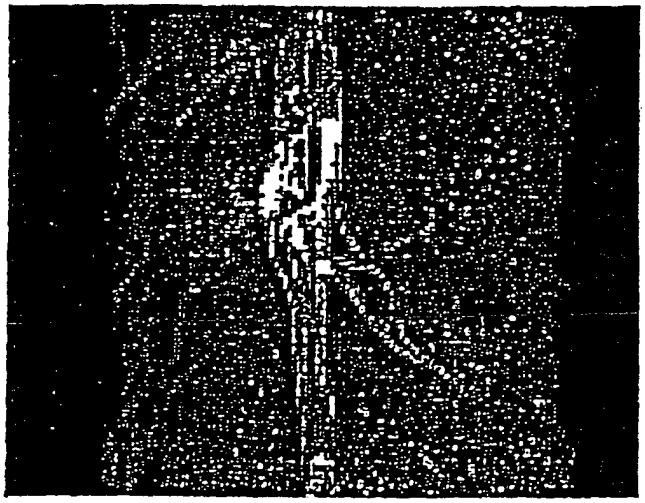
Figur 18b



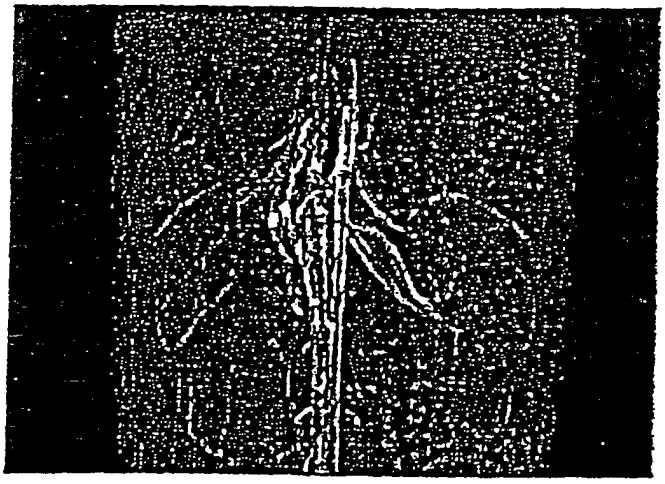
Figur 18c



Figur 18d



Figur 19a



Figur 19b