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

(10) **DE 693 33 929 T2** 2006.08.10

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 662 002 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 33 929.2**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB93/01999**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 920 995.3**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1994/007536**
(86) PCT-Anmeldetag: **23.09.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **14.04.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.07.1995**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **07.12.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.08.2006**

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

(30) Unionspriorität:
9220294 **25.09.1992** **GB**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
CH, DE, FR, IT, LI, NL

(73) Patentinhaber:
Keele University, Staffordshire, GB

(74) Vertreter:
Zeitler, Volpert, Kandlbinder, 80539 München

(72) Erfinder:
AL-SHAMKHANI, Aymen, Oxford OX1 3RE, GB;
DUNCAN, Ruth, I-20159 Milano, IT

(54) Bezeichnung: **KONJUGATE VON ALGINAT UND BIOAKTIVEN MITTELN**

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

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

Beschreibung

[0001] Einer der signifikanten Nachteile von Antitumormitteln oder antineoplastischen Mitteln ist deren Unvermögen, zwischen sich normal teilenden Zellen und Tumorzellen zu unterscheiden. Wenn diese Mittel auf sich normal teilende Zellen einwirken, verursachen sie unerwünschte Nebenwirkungen, einschließlich Übelkeit, Haarausfall und Knochenmarkstoxizität. Deren Kardiotoxizität ist ein Hauptgrund für die Dosisbeschränkung.

[0002] Kopecek et al., US-Patent 5,037,883, beschreiben ein Arzneistoffkonjugat, das inerte synthetische N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid-Polymerträger umfasst, die durch Peptidspacer mit einem biologisch aktiven Molekül, mit einem Zielsteuerungsrest und einer optionalen Vernetzung kombiniert sind. Die Peptidspacer enthalten zwischen 2 und 6 natürlich vorkommende Aminosäuren.

[0003] Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Band 85, Seiten 1189–1193 (1988), beschreiben Doxorubicin, das mit einem monoklonalen Antikörper konjugiert ist, der auf ein mit menschlichem Melanom zusammenhängendes Proteoglykan gerichtet ist. Das Konjugat unterdrückt das Wachsteum etablierter Tumor-Xenotransplantate in Nacktmäusen.

[0004] Dillman et al., Cancer Research, Band 48, Seiten 6097–6102 (1988), beschreiben die Überlegenheit eines säurelabilen Daunorubicin-monoklonaler Antikörper-Immunkonjugats im Vergleich zu einer freien Säure.

[0005] Shen et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, Band 102, Nr. 3, Seiten 1048–1054 (1981), beschreiben einen cis-Aconityl-Spacer zwischen Daunomycin und makromolekularen Trägern.

[0006] Coin et al., FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiology Immunology, Band 76, Nr. 4, Seiten 185–192 (1991), und Hoiby et al., 17th Annual Meeting of the European Working Group for Cystic Fibrosis, Seiten 159–163 (1992), beschreiben beide die Herstellung von Konjugaten des toxischen Proteins Exotoxin A (oder Toxin A) mit bakteriellen Alginaten, einschließlich die Verwendung eines Adipinsäuredihydrazid-Spacers, wobei diese Konjugate in vivo als Antigene wirken können, so dass die Produktion von Antikörpern induziert wird, die gegen das toxische Protein aktiv sind.

[0007] Mill et al., US-Patent 4,003,792, veröffentlicht 1977, beschreiben die Herstellung und Verwendungen von Konjugaten, die durch Säure-Polysaccharide mit biochemisch aktiven organischen Komplexmolekülen gebildet werden. Diese Konjugate können lösliche Natriumsalze und unlösliche Calciumsalze bilden, und bei deren Herstellung werden basische Aminogruppen oder phenolische Hydroxylgruppen der aktiven organischen Moleküle direkt mit Säuregruppen des Polysaccharids umgesetzt, ohne dazwischen angeordnete biologisch abbaubare Spacerverknüpfungen zu verwenden. Alginsäure ist als ein Beispiel mehrerer geeigneter Säure-Polysaccharide genannt und es ist eine Anzahl von Konjugaten beschrieben, in denen Alginsäure direkt an immunologisch aktive proteinartige Substanzen gekoppelt ist.

[0008] Mann et al., Bioconjugate Chemistry, Band 3, Nr. 2, Seiten 154–159 (1992) beschreiben die Verwendung von Dextran als makromolekularen Träger für Moleküle von Daunomycin, die damit über säurelabile Verknüpfungen konjugiert sind, wobei das Dextran endmodifiziert ist, um eine Bindung eines Zielsteuerungsrests zu ermöglichen.

[0009] Diener et al., Science, Band 231, Nr. 4734, Seiten 148–150 (1986), beschreiben Konjugate von Daunomycin mit Zielsteuerungsproteinträgern unter Verwendung einer cis-Aconitylgruppe als säureempfindlicher Spacer, der es ermöglicht, dass der Arzneistoff durch die intralysosomale Säureumgebung nach der Aufnahme durch eine Zielzelle gespalten wird.

[0010] Lavie et al., Cancer Immunology Immunotherapie, Band 33, Nr. 4, Seiten 223–230 (1991), beschreiben Konjugate, in denen Moleküle eines Aconitderivats von Daunomycin an Polylysin gekoppelt sind, das einen auf einen Tumor gerichteten monoklonalen Antikörper trägt, um den freien Arzneistoff bei dem niedrigeren pH-Wert des Tumorgewebes freizusetzen.

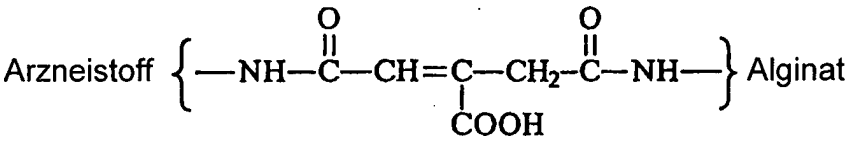
[0011] Gaudreault et al., Anticancer Research, Band 9, Nr. 4, Seiten 1201–1206 (1989), beschreiben Konjugate, die durch kovalentes Verknüpfen von Daunorubicin mit Erythrozytenmembranen mittels Glutaraldehyd- oder cis-Aconitsäure-Verknüpfungsarmen gebildet werden.

[0012] Im US-Patent 4,631,190 beschreiben Shen et al. ein Grundverfahren zur Herstellung von cis-Aconi-

tyl-Spacerderivaten von Arzneistoffen und deren in vitro-Verwendung zur gesteuerten bzw. kontrollierten Freisetzung der Arzneistoffe von makromolekularen Arzneistoffträgern. Die Herstellung von Konjugaten von Daunomycin mit Polylysin unter Verwendung eines cis-Aconityl-Spacers findet gemäß der Beschreibung in der Biochemical and Biophysical Research Communications-Literaturstelle, die vorstehend genannt worden ist, statt.

[0013] Die Erfindung stellt ein therapeutisch geeignetes Alginat-biologisch aktives Mittel-Konjugat bereit, das
(a) ein Alginat, und
(b) ein therapeutisch aktives biologisch aktives Mittel, wobei es sich um den cytotoxischen Anthracyclin-Antitumorarzneistoff Daunorubicin (Daunomycin) handelt, umfasst,

wobei das Alginat und das biologisch aktive Mittel mit einer Spacer-Verknüpfung, die zwischen dem Alginat und dem biologisch aktiven Mittel angeordnet ist und die biologisch abbaubar ist, kovalent verbunden sind, um eine progressive Freisetzung des biologisch aktiven Mittels unter sauren Umgebungsbedingungen nach der Verabreichung an einen Säuger im Verlauf einer Therapie bereitzustellen. Die Verknüpfung ist eine säurelabile Verknüpfung, bei der es sich um eine cis-Aconitylgruppe der folgenden Formel handelt:



[0014] Die vorliegende Erfindung umfasst auch pharmazeutische Zusammensetzungen, die mindestens ein Konjugat der Erfindung und einen inerten, physiologisch verträglichen Träger umfassen. Die Zusammensetzungen können oral oder mittels Injektion, wie z.B. durch eine intraperitoneale, intravenöse oder intramuskuläre Injektion, verabreicht werden.

[0015] Fig. 1 zeigt die prozentuale in vitro-Freisetzung von Daunomycin im Zeitverlauf.

[0016] Fig. 2 zeigt die in vitro-Freisetzung von Daunomycin in µg/ml im Zeitverlauf.

[0017] Fig. 3 zeigt den Effekt der Daunomycin-Freisetzung auf das Tumorzellenwachstum.

[0018] Die Erfindung ermöglicht eine Kombination einer gesteuerten bzw. kontrollierten Freisetzung eines biologisch aktiven Materials mit den vorteilhaften biologischen Eigenschaften von Alginaten. Nicht-toxische Alginate zeigen inhärente Eigenschaften, die eine vorteilhafte pharmakologische Aktivität hervorrufen, und wenn diese kovalent an ein biologisch aktives Material (einschließlich Arzneistoffe und Prodrugs) gebunden werden, können Alginate zur Steuerung bzw. Kontrolle der Geschwindigkeit der Freisetzung des Materials verwendet werden.

[0019] Der Begriff Alginat, wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf Natriumalginat, Alginsäure-Natriumsalz, Algin (vgl. Seite 41, The Merck Index, 11. Auflage (1989), Merck & Co., Inc.) oder Alginat-Tyrosinamid. Alginate sind gelierende Polysaccharide, die aus Riesenbrauntang (Macrocystis pyrifera) oder Fingertang (Laminaria digitata) oder aus Zuckertang (Laminaria saccharina) extrahiert werden. In Tang liegen Polysaccharide als gemischtes Natrium- und/oder Kalium-, Calcium- und Magnesiumsalz vor. Alginate können von Kelco, a Division of Merck & Co., Inc. (San Diego, CA) erworben werden.

[0020] Verschiedene Alginate, die in dieser Erfindung geeignet sind, sind detailliert von I. W. Cottrell und P. Kovacs in „Alginates", Kapitel 2, von Davidson, Hrsg., Handbook of Water-Soluble Gums and Resins (1980), beschrieben worden. Am meisten bevorzugt sind hier natürlich abgeleitete Algen-Natriumalginate (auch als „Algin" oder „Alginsäure-Natriumsalz" bezeichnet), wie z.B. diejenigen, die unter den Marken KELTEX®, KELGIN® und KELTONE™ von Kelco Division of Merck & Co., Inc. verkauft werden.

[0021] Alginate umfassen auch „Bioalgin", wobei es sich um mikrobiell erzeugte Polysaccharide handelt, die sowohl von Pseudomonas- als auch von Azotobacter-Stämmen erzeugt werden, wie es z.B. in Jarman et al., US-Patent 4,235,966, beschrieben ist. Diese Alginate sind Polysaccharide, die aus einem partiell acetylierten, variablen Blockcopolymer aus D-Mannuron- und L-Guluronsäureresten bestehen. Jarman et al. geben an, dass das erzeugte Polysaccharid demjenigen ähnlich ist, das aus Tang erzeugt wird, mit der Ausnahme, dass das Molekül partiell acetyliert ist.

[0022] Alginate enthalten sowohl Mannuronsäure als auch Guluronsäure. Die Gegenwart von drei Arten von Polymersegmenten in Alginsäure verschiedener Braunalgen wurde gezeigt. Ein Segment besteht im Wesentlichen aus D-Mannuronsäureeinheiten, ein zweites Segment besteht im Wesentlichen aus L-Guluronsäureeinheiten und das dritte Segment besteht aus abwechselnden D-Mannuronsäure- und L-Guluronsäureresten.

[0023] Aus dem Text der vorliegenden Beschreibung wird deutlich, dass der Begriff „Alginat" auch verwendet wird, um Derivate eines Materials zu bezeichnen, das selbst zweckmäßig als Alginat beschrieben wird, d.h. ein Salz von Alginsäure, wobei ein Beispiel eines solchen Derivats ein Alginat-Tyrosinamid oder ein Alginat mit gebundenen Aminogruppen ist, wie es nachstehend beschrieben ist.

[0024] Die Anteile der drei Polymersegmente in Alginsäureproben von verschiedenen Quellen wurden unter Verwendung einer partiellen Säurehydrolyse, um die Alginsäure in homopolymere und abwechselnde Segmente zu hydrolysieren, bestimmt.

[0025] Eine der wichtigsten und nützlichsten Eigenschaften von Alginaten ist das Vermögen zur Bildung von Gelen durch eine Reaktion mit Calciumsalzen. Diese Gele, die darin, dass sie ihre Form bewahren und einer Belastung widerstehen, einem Festkörper ähneln, bestehen aus nahezu 100% Wasser (normalerweise 99,0 bis 99,5% Wasser und 0,5 bis 1,0% Alginat).

[0026] Ein Gel ist in der klassischen Kolloidterminologie als System definiert, dessen charakteristische Eigenschaften auf ein vernetztes Netzwerk von Polymerketten zurückzuführen sind, die sich an dem Gelpunkt bilden.

[0027] Alginate haben die Fähigkeit, die Erzeugung von Cytokinen, wie z.B. von Tumornekrosefaktor-alpha, Interleukin-6 und Interleukin-1 zu stimulieren. In einer Ausführungsform der Erfindung sind Alginate mit Antitumormitteln konjugiert. Die Konjugation des Antitumormittels an Alginat verbessert den therapeutischen Index des Arzneistoffs durch eine Steuerung bzw. Kontrolle der Freisetzung effektiv, während der Alginatträger eine zelluläre Antitumor-Immunreaktion stimuliert.

[0028] Die Konjugate können an Organismen, einschließlich Säuger, vorzugsweise in einer Kombination mit pharmazeutisch verträglichen Trägern oder Verdünnungsmitteln, gegebenenfalls mit bekannten Zusätzen, wie z.B. Alaun, in einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die nicht-toxisch ist, und in einer therapeutisch wirksamen Menge gemäß der pharmazeutischen Standardpraxis verabreicht werden. Die Verbindungen können oral, parenteral (z.B. durch eine intravenöse, subkutane, intramuskuläre oder intramedulläre Injektion), topisch oder perkutan (z.B. durch perkutane, transkutane oder transdermische Verfahren) verabreicht werden.

[0029] Zur oralen Verwendung können die Konjugate z.B. in der Form von Tabletten oder Kapseln oder als wässrige Lösung oder Suspension verabreicht werden. In dem Fall von Tabletten zur oralen Verwendung umfassen Träger, die gebräuchlich verwendet werden, Lactose und Maisstärke. Gleitmittel, wie z.B. Magnesiumstearat, werden ebenfalls gewöhnlich verwendet. Zur oralen Verabreichung in Kapselform umfassen geeignete Verdünnungsmittel Lactose und getrocknete Maisstärke. Wenn wässrige Suspensionen zur oralen Verwendung erforderlich sind, wird der Wirkstoff mit Emulgatoren und Suspendiermitteln kombiniert. Gegebenenfalls können bestimmte Süßungsmittel und/oder Aromastoffe zugesetzt werden. Alginat-biologisch aktives Mittel-Konjugate können z.B. mit Alginat gemischt und anschließend durch die Zugabe von $CaCl_2$ zur Bildung von Alginatkügelchen geliert werden. Alginate verhalten sich bei unterschiedlichen pH-Werten (zwischen 2 und 7) unterschiedlich, was eine weitere Steuerung bzw. Kontrolle der Arzneistofffreisetzung ermöglicht.

[0030] Für eine intramuskuläre, intraperitoneale, subkutane und intravenöse Verwendung werden üblicherweise sterile Lösungen des Wirkstoffs hergestellt und der pH-Wert der Lösungen sollte in geeigneter Weise eingestellt und gepuffert werden. Für eine intravenöse Anwendung sollte die Gesamtkonzentration der gelösten Stoffe eingestellt werden, um das Präparat isotonisch zu machen.

[0031] Vorzugsweise umfasst das Alginat ein erstes Segment, das im Wesentlichen aus D-Mannuronsäureresten besteht, ein zweites Segment, das im Wesentlichen aus L-Guluronsäureresten besteht, und ein drittes Segment, das im Wesentlichen aus abwechselnden D-Mannuronsäure- und L-Guluronsäureresten besteht.

[0032] Das Molekulargewicht des Alginats muss hoch genug sein, um einen schnellen Durchgang durch die Niere des Patienten zu verhindern, und dennoch niedrig genug, um einen Durchgang innerhalb einer vernünftigen Zeit sicherzustellen. Das Molekulargewicht des Alginats beträgt vorzugsweise zwischen 2000 und 1000000. Mehr bevorzugte Molekulargewichte hängen von dem Verfahren der Verabreichung des biologisch

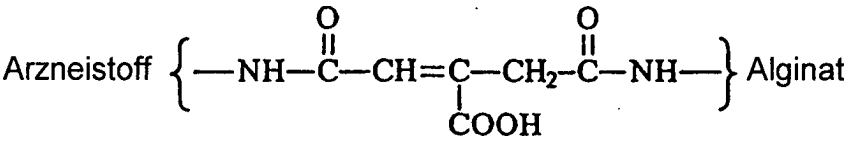
aktiven Materials ab. Für biologisch aktive Materialien, die parenteral verabreicht werden, sind Alginate mit Molekulargewichten zwischen 5000 und 100000 bevorzugt. In manchen Ausführungsformen kann das Molekulargewicht des Alginats zwischen 65000 und 75000 liegen. Für biologisch aktive Materialien, die oral verabreicht werden, wie z.B. in einer Kapsel oder einer Tablette, sind Alginate mit höherem Molekulargewicht zwischen 200000 und 1000000 bevorzugt. In manchen Ausführungsformen kann das Molekulargewicht zwischen 600000 und 800000 liegen.

[0033] Das Alginat weist vorzugsweise daran gebundene Aminogruppen auf, an welche die Konjugatverknüpfung gebunden ist.

[0034] Das biologisch aktive Mittel ist das Anthracyclin Daunorubicin (auch als Daunomycin oder Dnm bezeichnet).

[0035] Die säurelabile cis-Aconitylverknüpfung ist in einer physiologischen Umgebung bei vaskulärem pH von etwa 7,4 stabil, wird jedoch unter sauren Bedingungen hydrolytisch gespalten. Die Freisetzung des Arzneistoffs, an den das Alginat konjugiert ist, findet in jedweder sauren Umgebung statt, wie z.B. dem Gastrointestinaltrakt eines Säugers, an einer Entzündungsstelle, innerhalb einer Tumormasse oder intrazellulär.

[0036] Die säurelabile Verknüpfung zwischen dem Arzneistoff und Alginat ist eine cis-Aconitylgruppe der Formel



wobei die Gruppe vorzugsweise über eine Peptidbindung an den Arzneistoff und über eine Peptidbindung an das Alginat gebunden ist.

[0037] Das biologisch aktive Material ist ein cytotoxischer Arzneistoff. Vorzugsweise bewahren die erfindungsgemäßen Konjugate die cytotoxische pharmakologische Aktivität und ermöglichen eine pH-abhängige Freisetzung. Das Konjugat setzt das cytotoxische Mittel in dem sauren Milieu des Endosoms/Lysosoms und in der sauren Umgebung oder dem sauren Umfeld eines Tumors frei. Die Toxizität des cytotoxischen Mittels wird vermindert, da das Konjugat im Plasma bei neutralem pH-Wert nicht hydrolysiert wird.

[0038] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung stellt die Verwendung eines Konjugats, wie es vorstehend beschrieben worden ist, zur Herstellung eines medizinischen Präparats zur Behandlung eines neoplastischen Zustands in Säugern bereit.

[0039] Die Behandlung eines neoplastischen Zustands in einem Patienten mit einem Tumor kann umfassen:

(a) Einbringen eines Alginat-cytotoxischer Arzneistoff-Konjugats, das (i) ein Alginat und (ii) einen cytotoxischen Arzneistoff umfasst, wobei der cytotoxische Arzneistoff Daunomycin ist und das Alginat und der cytotoxische Arzneistoff über eine säurelabile Verknüpfung verbunden sind, wobei es sich um die vorstehend beschriebene cis-Aconitylgruppe handelt, in einen Patienten mit einem neoplastischen Zustand; und

(b) Hydrolysieren der Alginat-cytotoxischer Arzneistoff-Konjugatverknüpfung im Umfeld der Tumoroberfläche, das einen niedrigen pH-Wert aufweist, um den cytotoxischen Arzneistoff an das Umfeld des Tumors freizusetzen und den cytotoxischen Arzneistoff durch die Zellmembran zu absorbieren.

[0040] Ferner kann die Behandlung eines neoplastischen Zustands in einem Patienten, der einen Tumor hat, umfassen:

(a) Einbringen des Alginat-cytotoxischer Arzneistoff-Konjugats zu der Tumorzellenoberfläche,

(b) Aufnehmen des Konjugats durch Endocytose in den Tumor, und

(c) Hydrolysieren der Alginat-cytotoxischer Arzneistoff-Konjugatverknüpfung in der Umgebung des Tumorinneren, die einen niedrigen pH-Wert aufweist, um das Cytotoxin innerhalb des Tumors freizusetzen.

[0041] Die allgemeine Strategie zur Herstellung des Konjugats

Alginat-S'-B'

wobei S' eine pH-empfindliche, biologisch abbaubare Verknüpfungsgruppe und B das biologisch aktive Mittel ist, ist wie folgt:

a)

S' + B'-NH_2 → HOOC-S'-B'

b)

Alginat $\xrightarrow{EDC}$ "Alginat"

c)

"Alginat" + Ethylendiamin → Alginat-NH_2

d)

HOOC-S´-B´ $\xrightarrow{EDC}$ "S´-B´"

e)

Alginat-NH_2 + "S'-B'" → Alginat-S'-B'

[0042] "Alginat" ist aktiviertes Alginat und "S'-B'" ist aktiviertes S'-B'. EDC ist 1-Ethyl-3-(-3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid.

[0043] Im Allgemeinen umfasst das Verfahren zur Herstellung des Alginat-cytotoxischer Arzneistoff-Konjugats die Schritte:

(a) Kombinieren der Verknüpfungsgruppe mit dem cytotoxischen Arzneistoff zur Bildung eines Verknüpfungsgruppen-modifizierten Arzneistoffs,
(b) Aktivieren des Alginats mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid,
(c) Kombinieren des aktivierten Alginats mit Ethylendiamin zur Bildung von Alginaten mit freien primären Amingruppen (Alginat-NH_2),
(d) Aktivieren des Verknüpfungsgruppen-modifizierten cytotoxischen Arzneistoffs mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid, und
(e) Kombinieren des aktivierten Verknüpfungsgruppen-modifizierten cytotoxischen Arzneistoffs mit dem Alginat-NH_2 zur Bildung des Alginat-cytotoxischer Arzneistoff-Konjugats.

Alginate

[0044] Alginate mit verschiedenen Molekulargewichten sind von Kelco erhältlich. Die Molekulargewichte können auch gemäß dem folgenden Verfahren modifiziert werden.

Herstellung von Alginaten mit niedrigem Molekulargewicht

[0045] Nachstehend ist ein Verfahren zur Herstellung von Alginaten mit einem Molekulargewicht von etwa 100 kDa beschrieben. Alginate mit niedrigem Molekulargewicht (nachstehend mit F1, F2 und F3 bezeichnet) wurden durch einen kontrollierten Abbau von Alginat (56) (Alginat mit einem Molekulargewicht von etwa 427 kDa) wie folgt hergestellt: Proben eines Alginats (56), die in Essigsäure (1% v/v) gelöst waren, wurden den folgenden Bedingungen unterworfen:

(a) Erhitzen auf 121°C für 15 min, oder
(b) Erhitzen auf 105°C für 5 min, oder
(c) Erhitzen auf 100°C für 5 min.

[0046] Die resultierenden Lösungen wurden neutralisiert und dann ausgiebig gegen destilliertes Wasser dialysiert, worauf gefriergetrocknet und dann mittels SE-HPLC analysiert wurde. Die geeigneten Alginate (etwa 131 kDa) wurden durch Erhitzen auf 100°C für 5 min erhalten.

[0047] Die nachstehende Tabelle beschreibt verschiedene Alginate, die zur Herstellung von erfindungsgemäßen Konjugaten verwendet wurden.

Alginatproben

Bezeichnung	M/G	Tangart	Mw	Mw/Mn
56	hoch	Macrocystis pyrifera	427000	3,1
55	niedrig	Gemisch von Tangen mit hohem „G“-Anteil	763000	2,9
58	hoch	Macrocystis pyrifera	689000	2,7
Asco	hoch	Ascophyllum nodosum	690000	3,5
Flavi	niedrig	Lessonia flavicans	797000	2,9
F1	-	von Alginat (56)	131000	2,8
F2	-	von Alginat (56)	56000	2,9
F3	-	von Alginat (56)	10000	1,9

[0048] M/G ist das Mannuronsäure:Guluronsäure-Verhältnis. Mw ist das durch eine Größenausschluss-HPLC unter Verwendung von Pullulan-Standards bestimmte mittlere Molekulargewicht. Mw/Mn ist die Polydispersität. Tange mit hohem „G"-Anteil umfassen Lessonia flavicans und Laminara hyperborea. Alginat (58) ist Propylenglykolalginat.

Bewertung der biologischen Verträglichkeit verschiedener Alginate mit dem MTT-Test

[0049] Der Test, der zur Bewertung von Polymeren und Arzneistoffen verwendet wurde, basiert auf dem Vermögen lebensfähiger Zellen, einen löslichen Tetrazoliumfarbstoff, MTT, zu gefärbten wasserunlöslichen Formazankristallen zu reduzieren. Der Test wurde in 96 Well-Mikrotiterplatten (mit flachem Boden) durchgeführt.

[0050] Bei der Konfluenz wurden B16F10-Zellen wie folgt abgelöst: Nach der Entfernung des Mediums wurden den Zellen zweimal mit steriler PBS gewaschen, um überschüssiges Medium zu entfernen. Eine Trypsin-EDTA-Lösung (2 ml) wurde zugesetzt und die Kolben wurden 30 s vorsichtig geschüttelt. Die Trypsin-EDTA-Lösung wurde dann unter Verwendung einer Pasteurpipette, die mit einer Vakuumleitung verbunden war, entfernt, und die Zellen wurden 1 min bei 37°C inkubiert, um ein Ablösen zu ermöglichen. Die Zellen wurden in Medium (5 ml/Kolben) suspendiert und entsprechend verdünnt, so dass eine Konzentration von 10^4 Zellen/ml erhalten wurde.

[0051] Medium, das Zellen enthielt (200 µl), wurde mit einer Mehrkanalpipette in jeden mit Ausnahme der Wells der ersten Reihe, die nur mit Medium (200 µl) gefüllt wurden und als „blinde" Wells (zur Nullpunktseinstellung mit dem Mikrotiterplattenlesegerät verwendet) bezeichnet wurden, verteilt. Eine Beimpfungsdichte von 10^4 Zellen/ml wurde im Vorhinein als optimaler Wert für B16F10-Zellen ermittelt, da Polymere/Arzneistoffe 24 Stunden nach dem Zellausplattieren zugesetzt werden konnten, und zwar unmittelbar nachdem die Zellen damit begannen, in ihre exponentielle Phase einzutreten, und der 72 Stunden später durchgeführte MTT-Test einen Mittelwert für die Formazan-Extinktion von etwa 1,5 für die unbehandelten Kontrollen ergab. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37°C (5% CO_2) wurde das Medium durch Absaugen entfernt und in einigen Wells durch Medium ersetzt, das Polymere/Arzneistoffe in verschiedenen Konzentrationen (200 µl, 6 Wiederholungen) enthielt. In die restlichen Wells wurde als Ersatz nur Medium (200 µl) eingebracht und diese wurden als unbehandelte Kontrollen bezeichnet. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von Alginaten in dem Wachstumsmedium-MEM (aufgrund der Gegenwart einer hohen Konzentration von zweiwertigen Metallen) wurden alle Alginat-Vorratslösungen (10 mg/ml) in Ham's F10-Medium, das mit fetalem Kälberserum (10 v/v) und L-Glutamin (1% v/v) ergänzt worden ist, hergestellt. Die Vorratslösungen wurden dann durch Filtration (Flowpore D, 0,2 µm-Filter) sterilisiert und vor der Zugabe zu Zellen mit MEM verdünnt. Jedwede schädliche Effekte auf die Zellen aufgrund von Ham's F10-Medium wurden durch Kontroll-Wells berücksichtigt, in denen Ham's F10-Medium in dem gleichen Verhältnis mit MEM verdünnt und dann Zellen zugesetzt wurde.

[0052] Nach einer 67-stündigen Inkubation (37°C, 5% CO_2) wurde jedem Well eine sterile Lösung von MTT (20 µl, 5 mg/ml in PBS) zugesetzt und die Platten wurden für einen weiteren 5 Stunden-Zeitraum in dem Inkubator angeordnet (insgesamt 72 Stunden). In dem gleichen Zeitraum wurde das Medium mit Hilfe einer Hypodermalnadel, die mit einer Vakuumleitung verbunden war, entfernt. Die Formazankristalle wurden durch die Zugabe von DMSO in spektrophotometrischer Qualität (200 µl) zu jedem Well gelöst und die Extinktion wurde unter Verwendung eines Mikrotiterplattenlesegeräts bei 550 nm bestimmt.

[0053] Die Ergebnisse jeder Behandlung wurden als Prozentsatz der geeigneten Kontrollen (unbehandelte Zellen) ausgedrückt.

[0054] Die folgenden Alginate wurden gegen die Maus-Melanomzelllinie B16F10 getestet:

Alginat	Konzentrationsbereich (mg/ml)
56	0,1 bis 5,0
55	0,1 bis 5,0
58	0,1 bis 5,0
Asco	0,1 bis 2,5*
Flavi	0,1 bis 1,0*
Alginat 427 kDa	0,05 bis 1,0
Alginat 90 kDa	0,05 bis 1,0
Alginat 35 kDa	0,05 bis 1,0
F3	0,05 bis 1,0

*Höhere Konzentrationen konnten nicht verwendet werden, da sie für eine Filtration durch 0,2 µm-Filter zu viskos waren.

[0055] Alle getesteten Alginate waren bei den in diesen Experimenten verwendeten Konzentrationen nicht toxisch, mit Ausnahme von Propylenglykolalginat (PGA), das bei 5 mg/ml toxisch war. Wie erwartet war Poly-L-lysin selbst bei sehr niedrigen Konzentrationen toxisch. Die Toxizität von PGA ist möglicherweise auf die kovalente Kopplung von Zelloberflächenmembranproteinen aufgrund der Reaktion der primären Aminogruppen von Proteinen mit den reaktiven Estergruppen des Polymers zurückzuführen. Dies könnte zu einer Membranstörung und schließlich zum Zelltod führen. Die Toxizität kann auch aufgrund von Propylenglykol resultieren, bei dem es wahrscheinlich ist, dass es von den Alginaten bei der Inkubation in einer Gewebekultur freigesetzt wird.

Beispiel 1

Herstellung von Alginat-NH_2

[0056] Alginat (56) (500 mg) wurde in Wasser (50 ml) gelöst und der pH-Wert wurde mit HCl (0,1 M) auf 4,75 eingestellt. Festes 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (ECD) (60 mg) wurde zugesetzt und der pH-Wert wurde durch Zugabe von HCl (0,1 M) konstant gehalten. Nach 1 Stunde wurde die Lösung tropfenweise einer Lösung zugesetzt, die einen 40-fachen Überschuss von Ethylendiamin enthielt. Der pH-Wert wurde mit NaOH (0,1 M) auf 4,75 eingestellt und die Lösung wurde bei Raumtemperatur gerührt. Eine Stunde später wurde der pH-Wert auf 6 erhöht und das Gemisch wurde 1 weitere Stunde gerührt. Der pH-Wert wurde dann mit NaOH (5 M) auf 12 erhöht und NaCl (4,5 g) wurde zugesetzt. Dies war erforderlich, um elektrostatisch gebundenes Diamin zu dissoziieren. Die fertige Lösung wurde dann ausgiebig dialysiert, und zwar zunächst gegen einen Carbonatpuffer (pH 11,3) und dann gegen destilliertes Wasser.

[0057] Es wurde auch eine Kontrolle durchgeführt, bei der Alginat mit Ethylendiamin ohne vorherige Aktivierung mit EDC gemischt wurde. Unter Verwendung der identischen Vorschrift wurde Alginat-Tyrosinamid, das Amingruppen enthielt, erzeugt.

[0058] Der Amingehalt der Polymere wurde mit dem o-Phthalaldehydverfahren abgeschätzt.

Herstellung biologisch aktiver Mittel zur Konjugation an Alginat-NH_2 N-cis-Aconityl-Daunomycin (N-cis-Aconityl-Dnm)

[0059] Dnm (6 mg) wurde in 1 ml Na_2HPO_4-Puffer (pH 9,0) gelöst und auf Eis aufbewahrt. cis-Aconitsäureanhydrid (10 mg) wurde dann langsam unter Rühren zugesetzt und der pH-Wert wurde durch die Zugabe von NaOH (0,5 M) bei 9 gehalten. Die Lösung wurde 10 min bei 0°C gemischt und dann 15 min bei Raumtemperatur. Das Reaktionsgemisch wurde dann mit 3 ml Wasser gemischt und auf Eis aufbewahrt.

[0060] N-cis-Aconityl-Dnm wurde mit HCl (1,0 M) ausgefällt und 0,5 Stunden auf Eis aufbewahrt. Nach der Zentrifugation wurde der Niederschlag unter Zugabe geringer Na-OH-Mengen (0,1 M) in Wasser gelöst.

[0061] Das Reinigungsverfahren wurde wiederholt und der schließlich erhaltene Niederschlag wurde unter Zugabe geringer NaOH-Mengen (0,1 M) in Wasser (0,5 ml) gelöst. Die Konzentration des Produkts wurde

durch Messen der Extinktion bei 475 nm bestimmt. Das Produkt wurde mit DC (Lösungsmittel: Dichlormethan/Methanol/Essigsäure/Wasser – 30:4:1:0,5) geprüft.

Synthese von Alginat-Daunomycin-Konjugaten

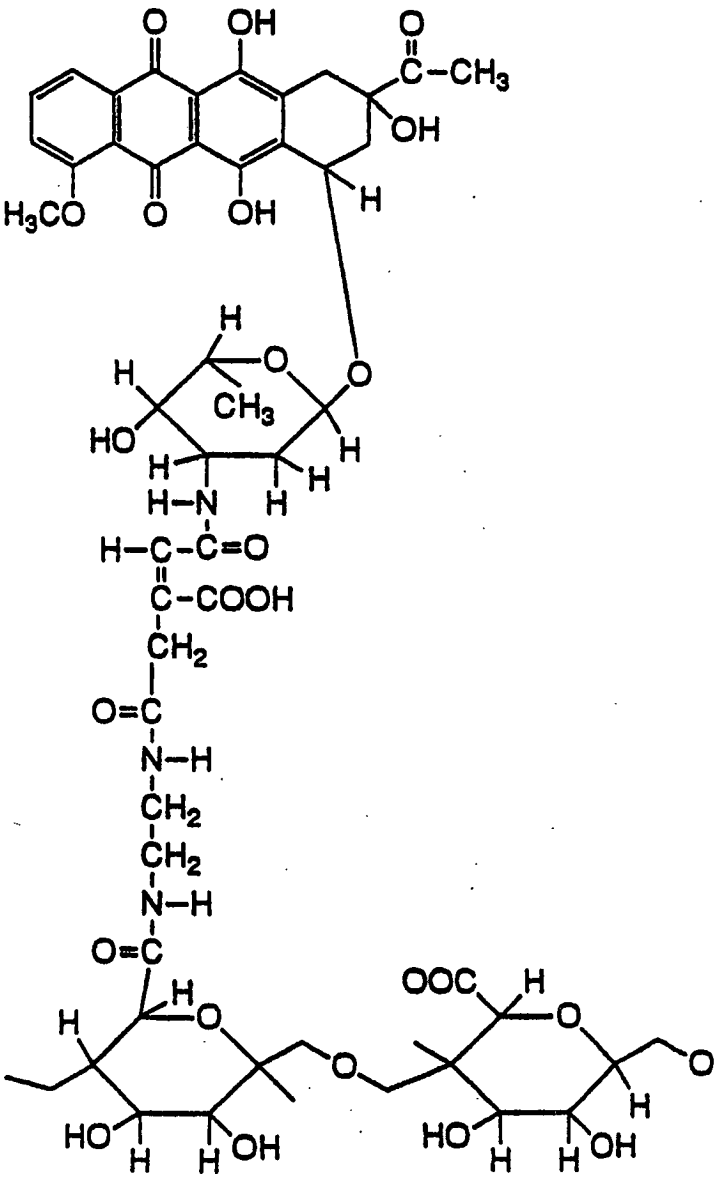
[0062] Die Anthracyclin-Antibiotika sind die am häufigsten verwendeten Antitumormittel. Daunomycin wird vorwiegend bei der Behandlung von Leukämiefällen verwendet, jedoch unterscheidet Daunomycin, wie dies bei allen antineoplastischen Mitteln der Fall ist, nicht zwischen sich normal teilenden Zellen und Tumorzellen und es sind Nebenwirkungen wie z.B. Übelkeit, Haarausfall und Knochenmarkstoxizität damit verbunden. Darüber hinaus zeigt Daunomycin eine Kardiotoxizität, die häufig dosisbeschränkend ist.

[0063] Alginat-Dnm-Konjugate stellen bezüglich der vorhandenen Konjugate Vorteile bereit. Erstens wird Daunomycin mit einer säureempfindlichen Verknüpfungsgruppe, d.h. cis-Aconitsäureanhydrid, die bei dem vaskulären pH-Wert von 7,4 stabil ist, an Alginat gekoppelt. Sobald das makromolekulare Konjugat durch die Zielzelle mittels Endozytose aufgenommen worden ist, wird der Arzneistoff in der stärker sauren Umgebung der Endosomen und Lysosomen über einen hydrolytischen Spaltungsmechanismus gespalten. Zweitens ist der Alginatträger in vivo biologisch abbaubar und der Träger wird daher einfacher aus dem Organismus entfernt.

[0064] Für diese Synthese wurden zwei Alginattypen verwendet: Alginat (56) mit hohem „M"-Anteil und Alginat-Tyrosinamid. Der letztgenannte Alginattyp wurde verwendet, um das Konjugat mit ^{125}I radioaktiv zu markieren, um dessen Pharmakokinetik zu studieren.

[0065] Einer Lösung von N-cis-Acontityl-Dnm (pH 7,0) wurde eine äquivalente Menge an festem EDC zugesetzt. Die Lösung wurde 20 min bei Raumtemperatur gerührt und dann wurde eine Alginat-NH_2-Lösung (1%, w/v) tropfenweise unter kontinuierlichem Rühren zugesetzt. Das Gemisch wurde 5 Stunden (Alginat-Tyrosinamid-NH_2) oder 24 Stunden (Alginat(56)-NH_2) reagieren gelassen.

[0066] Freies Daunomycin wurde von dem Polymer, das an eine Sephadex G50-Säule (2,6 × 60 cm) gebunden wurde, getrennt. Die Menge des gebundenen Daunomycins wurde durch Messen der Extinktion bei 475 nm bestimmt und mittels DC wurde gefunden, dass freies Daunomycin nicht vorlag. Die Produktstruktur ist nachstehend gezeigt:



Struktur des Alginat-Daunomycin-Konjugats

[0067] Alginate, die freie primäre Amingruppen enthielten, wurden erfolgreich synthetisiert. Die Menge an ionisch gebundenem Diamin war nahezu vernachlässigbar.

Polymer	Amingehalt (mol-%)
Alginat(56)	3,7
Alginat(56)-Kontrolle	0,09
Alginat-Tyrosinamid	4,5

[0068] Wenn eine Probe von Alginat-Tyrosinamid-NH_2 mittels SE-HPLC analysiert wurde, eluierte sie etwa bei der gleichen Retentionszeit wie das nicht-modifizierte Alginat, was zeigt, dass keine Vernetzung oder Zersetzung vorlag.

[0069] Die Synthese von N-cis-Acontityl-Dnm wurde mittels DC (Rf_{Dnm} = 0,09, $Rf_{cis\text{-}Acontityl\text{-}Dnm}$ = 0,3) bestätigt. Die Menge des an das Alginat gebundenen Daunomycins ist nachstehend gezeigt.

Polymer	Dnm (% w/w)
Alginat-Tyrosinamid-Dnm	2
Alginat(56)-Dnm	1

[0070] Bei keinem Präparat wurde mittels DC freies Daunomycin nachgewiesen ($Rf_{Alginat\text{-}Dnm}$ = 0). Der Daunomycingehalt beider Polymere ist niedrig und nur ein kleiner Teil der freien Amingruppen an den Alginaten rea-

gierte mit dem N-cis-Acontityl-Dnm. Es ist wahrscheinlich, dass dies mindestens zum Teil auf eine sterische Hinderung zurückzuführen ist. Ein höherer Arzneistoffgehalt kann durch Herstellen eines Alginats mit einem höheren Gehalt an Amingruppen (> 10 mol-%) erreicht werden, das dann mit N-cis-Acontityl-Dnm gekoppelt werden kann. Gegebenenfalls können Alginate mit einem niedrigeren Molekulargewicht verwendet werden.

Beispiel 2

Cytotoxizität von Alginat-Dnm-Konjugaten

[0071] Der Effekt von Alginat, Alginat-Dnm-Konjugaten, Daunomycin und Poly-L-lysin auf die Lebensfähigkeit der Maus-Melanomzelllinie B16F10 in vitro wurde mit dem MTT-Test bewertet. Unmodifizierte Alginate waren selbst bei hohen Konzentrationen von 5 mg/ml nicht toxisch. Alginat-Dnm-Konjugate zeigten eine cytotoxische Aktivität, was anzeigt, dass die Arzneistoffaktivität während der gesamten Konjugationsreaktion bewahrt wurde. Die Konjugate waren etwa 500-fach weniger toxisch als der freie Arzneistoff. Dies wird erwartet, da der zelluläre Eintritt der Konjugate auf die Endozytose beschränkt ist, wobei es sich um einen Prozess handelt, der langsamer ist als der Eintrittsmechanismus des freien Arzneistoffs (Diffusion). Ferner war die Toxizität, die in vitro festgestellt wurde, vorwiegend auf den freien Arzneistoff in dem Präparat zurückzuführen. Die Menge des freien Arzneistoffs wurde mittels RP-HPLC abgeschätzt und betrug 0,61 Gew.-% des gesamten, an die Alginate gebundenen Daunomycins.

Beispiel 3

Gesteuerte bzw. kontrollierte Freisetzung von Daunomycin aus Alginat-Dnm-Konjugaten

[0072] Proben von Alginat(56)-Dnm-Konjugaten wurden bei 37°C in Citrat/Phosphat-Puffern bei pH 5, 6 und 7 inkubiert und die Freisetzung von Dnm wurde durch eine RP-HPLC-Analyse verfolgt. Die Ergebnisse zeigten, dass während 48 Stunden bei pH 7 nur wenig Dnm freigesetzt wurde. Die Geschwindigkeit der Freisetzung erhöhte sich mit sinkendem pH-Wert. Nach 48 Stunden waren etwa 8% (5,95 mg) bzw. 23% (15,79 mg) des gesamten Daunomycins bei pH 6 bzw. 5 freigesetzt. Die **Fig. 1** zeigt das prozentuale Freisetzungsprofil von Daunomycin aus dem Alginat-Daunomycin-Konjugat unter verschiedenen Bedingungen während 48 Stunden. Die **Fig. 2** zeigt das µg/ml-Freisetzungsprofil von Daunomycin aus dem Alginat-Daunomycin-Konjugat unter verschiedenen Bedingungen während 48 Stunden.

Beispiel 4

In vivo-Antitumoraktivität von Alginat-cis-Acontityl-Daunomycin

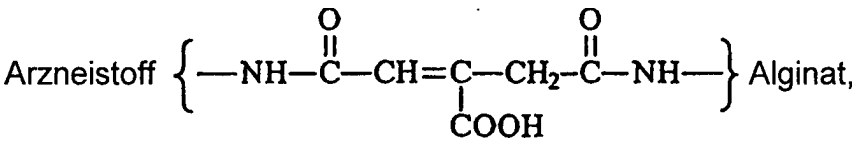
[0073] Männlichen C57BL/6J-Mäusen wurden subkutan 10^5 lebensfähige B16f10-Melanomzellen injiziert. Tumore wurden etablieren gelassen (Fläche von etwa 70 mm^2) und durch eine einzelne intraperitoneale Injektion mit einer Dosis von jeweils 5 mg von freiem Daunomycin, Alginat-cis-Acontityl-Dnm oder einem Gemisch von Alginat und Daunomycin pro kg Maus behandelt. Das Tumorwachstum und die Überlebenszeit wurden überwacht.

[0074] Alginat-cis-Acontityl-Dnm verursachte eine signifikante Abnahme der Geschwindigkeit des Tumorwachstums. Die **Fig. 3** zeigt das Tumorflächenwachstum über mehrere Tage.

[0075] Alginat-cis-Acontityl-Dnm verursachte eine Zunahme der Lebenszeit (14,1%). Freies Daunomycin erhöhte die Lebenszeit um 6,25% und ein Gemisch aus Alginat und Daunomycin erhöhte die Lebenszeit um 4,25%. Einige Tiere, die freies Daunomycin erhielten, zeigten Anzeichen einer Toxizität. Keines der Tiere, die Alginat-cis-Acontityl-Dnm erhielten, zeigte Anzeichen einer Toxizität. Es ist daher möglich, größere Konjugatdosen zu verabreichen, als dies in dem Beispiel beispielhaft dargestellt ist.

Patentansprüche

1. Ein therapeutisch geeignetes Konjugat, wobei das Konjugat einen polymeren Träger und ein therapeutisches, biologisch aktives Mittel umfasst, die mittels einer biologisch abbaubaren Spacer-Verknüpfung, die dazwischen angeordnet ist, kovalent verbunden sind, gekennzeichnet durch die folgende Kombination von Merkmalen:
(a) der polymere Träger ist ein Alginat,
(b) die biologisch abbaubare Spacer-Verknüpfung ist eine cis-Acontitylgruppe der Formel:



und
(c) das biologisch aktive Mittel ist der cytotoxische Anthracyclin-Antitumorarzneistoff Daunorubicin (Daunomycin).

2. Konjugat nach Anspruch 1, bei dem das Alginat ein Molekulargewicht zwischen 2000 und 1000000 aufweist.

3. Konjugat nach Anspruch 2, bei dem das Alginat ein Molekulargewicht zwischen 5000 und 100000 aufweist.

4. Konjugat nach Anspruch 2, bei dem das Alginat ein Molekulargewicht zwischen 200000 und 1000000 aufweist.

5. Konjugat nach Anspruch 3, bei dem das Alginat ein Molekulargewicht zwischen 65000 und 75000 aufweist.

6. Konjugat nach Anspruch 4, bei dem das Alginat ein Molekulargewicht zwischen 600000 und 800000 aufweist.

7. Konjugat nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem die Toxizität des Konjugats, die mit einem in vitro-Test bestimmt worden ist, wesentlich geringer ist als diejenige des freien Daunorubicin-Arzneistoffs (Daunomycin-Arzneistoffs).

8. Konjugat nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem der Alginatgehalt in Gewichtsprozent die Hauptkomponente des Konjugats darstellt.

9. Konjugat nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem das Alginat ein erstes Segment, das im Wesentlichen aus D-Mannuronsäureresten besteht, ein zweites Segment, das im Wesentlichen aus L-Guluronsäureresten besteht, und ein drittes Segment, das im Wesentlichen aus abwechselnden D-Mannuronsäure- und L-Guluronsäureresten besteht, umfasst.

10. Eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine therapeutisch wirksame, nicht-toxische Menge mindestens eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zusammen mit einem inerten, physiologisch verträglichen Träger umfasst.

11. Ein medizinisches Präparat, das aus einer therapeutisch wirksamen, nicht-toxischen Menge eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 9 und einem pharmazeutischen Vehikel besteht.

12. Pharmazeutische Zusammensetzung oder medizinisches Präparat nach Anspruch 10 oder 11, bei dem die Konjugatkomponente derart gereinigt ist, dass das freie biologisch aktive Mittel nicht vorliegt, und zwar bestimmt mittels Dünnschichtchromatographie.

13. Verwendung eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Herstellung eines medizinischen Präparats zur Behandlung eines neoplastischen Zustands in Säugern.

14. Ein Verfahren zur Herstellung eines Alginat-biologisch aktives Mittel-Konjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 9 aus einem Alginat, einer Verknüpfungsgruppenverbindung zur Bildung der biologisch abbaubaren Spacer-Verknüpfung und dem biologisch aktiven Mittel, wobei das Verfahren die Schritte umfasst:
(a) Kombinieren der Verknüpfungsgruppenverbindung mit dem biologisch aktiven Mittel zur Bildung eines Verknüpfungsgruppen-modifizierten biologisch aktiven Mittels,
(b) Aktivieren des Alginats mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid,
(c) Kombinieren des aktivierten Alginats mit Ethylendiamin zur Bildung von Alginaten mit freien primären Aminogruppen (Alginat-NH_2),
(d) Aktivieren des Verknüpfungsgruppen-modifizierten biologisch aktiven Mittels mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid, und

(e) Kombinieren des aktivierten Verknüpfungsgruppen-modifizierten biologisch aktiven Mittels mit dem Alginat-NH_2 zur Bildung des Alginat-biologisch aktives Mittel-Konjugats.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

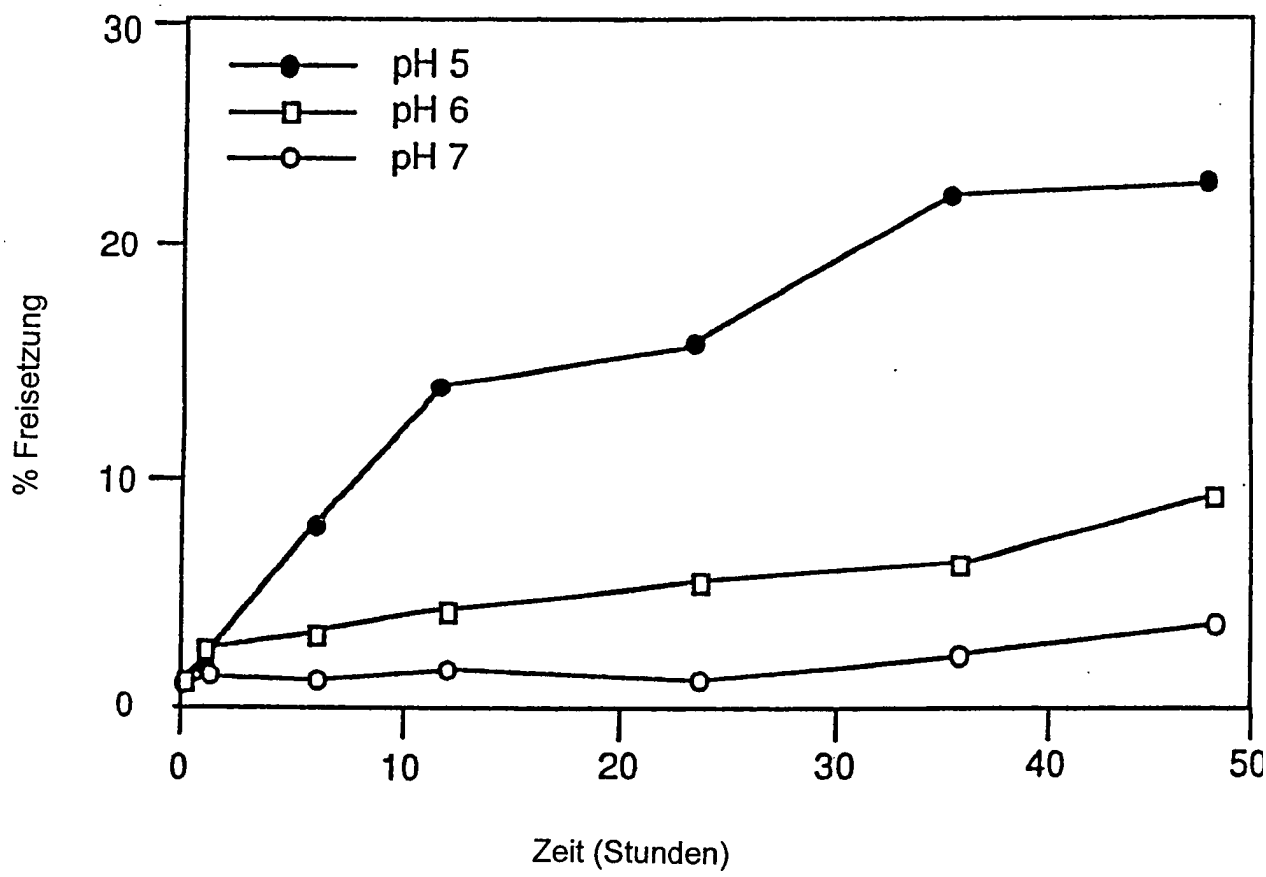


FIG. 2

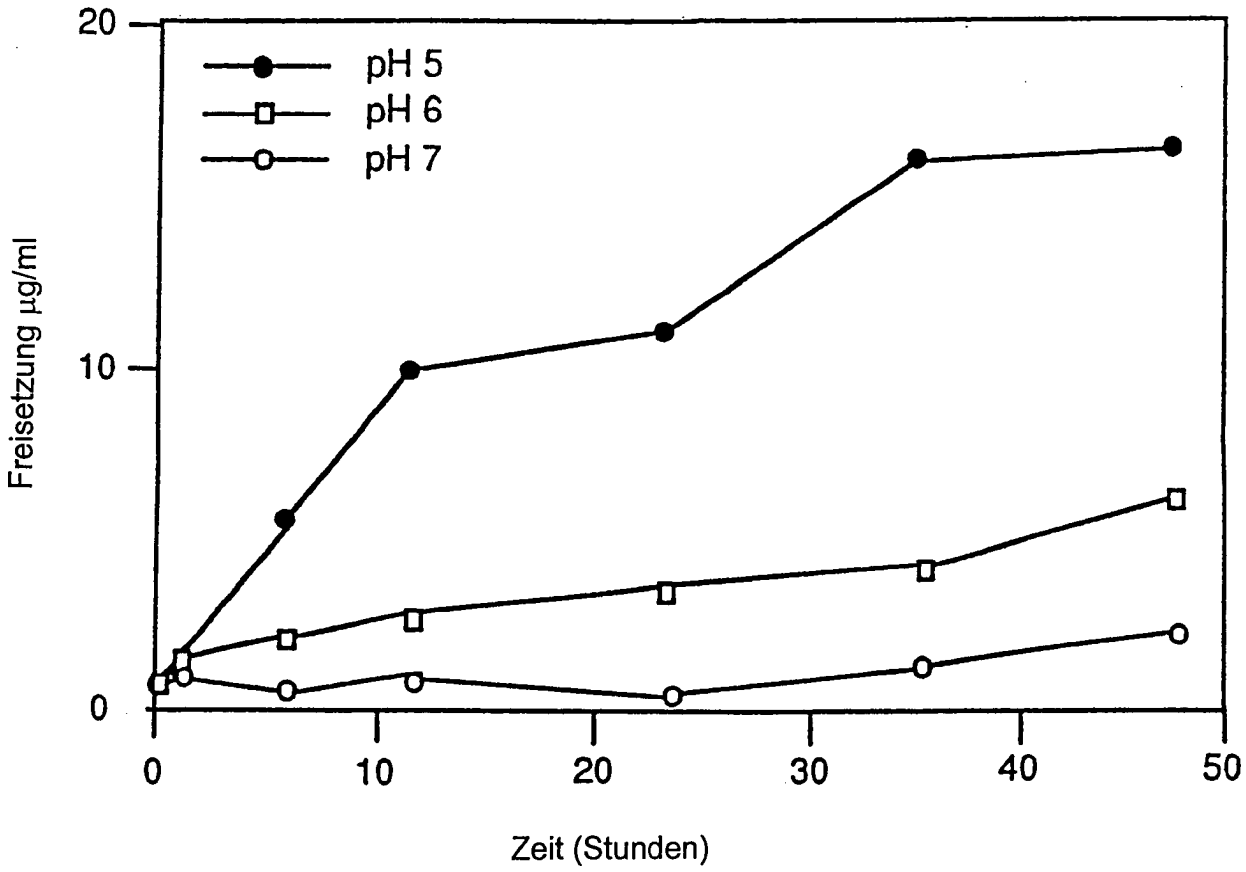
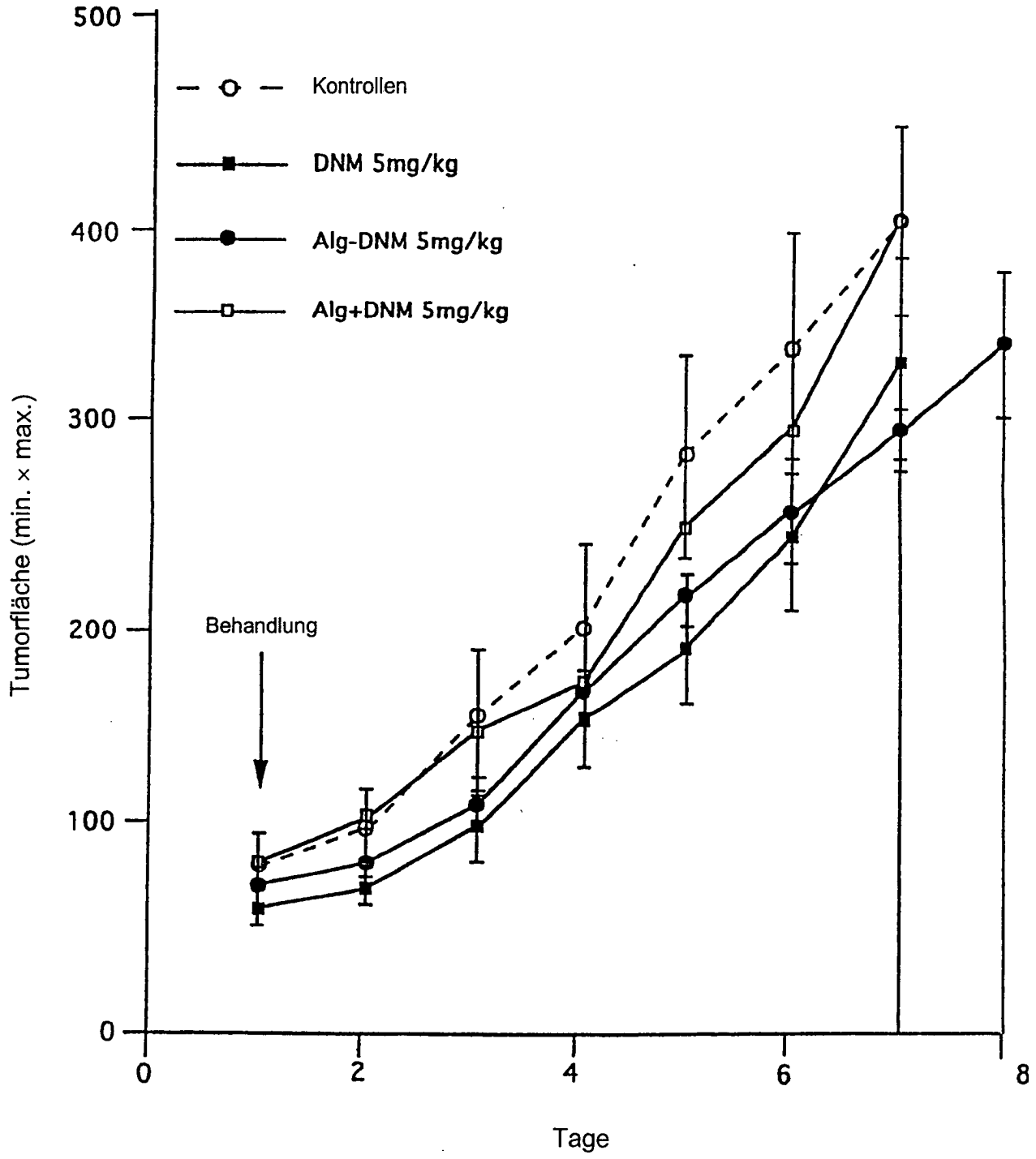

20
10
0
pH 5
pH 6
pH 7
Freisetzung µg/ml
0
10
20
30
40
50
Zeit (Stunden)

FIG. 3


500
400
300
200
100
0
Tumorfläche (min. × max.)
Kontrollen
DNM 5mg/kg
Alg-DNM 5mg/kg
Alg+DNM 5mg/kg
Behandlung
0
2
4
6
8
Tage