

PCT
WELTORGANISATION FÜR G
Internationales
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENT
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF D



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 47/48, 41/00	A1	(11) Ir WO 9609071A1 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 28. März 1996 (28.03.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE95/01323 (22) Internationales Anmeldedatum: 22. September 1995 (22.09.95) (30) Prioritätsdaten: P 44 33 890.2 22. September 1994 (22.09.94) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SINN, Hansjörg [DE/DE]; Ahornweg 10, D-69168 Wiesloch (DE). SCHRENK, Hans- Hermann [DE/DE]; Mittelgasse, D-67278 Zeiskam (DE). MAIER-BORST, Wolfgang [DE/DE]; Schlüsselweg 9, D- 69221 Dossenheim (DE). STEHLE, Gerd [DE/DE]; Kasseler Strasse 8, D-68305 Mannheim (DE). WUNDER, Andreas [DE/DE]; Beethovenstrasse 8, D-69214 Eppelheim (DE). HOFF-BIEDERBECK, Dirk [DE/DE]; Riedsaumstrasse 23, D-67063 Ludwigshafen (DE). HEENE, Dieter, Ludwig [DE/DE]; Gebrüder-Grimm-Strasse 5, D-68259 Mannheim (DE).		(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Müller-Boré & Partner, Grafinger Strasse 2, D-81671 München (DE). (81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Mit geänderten Ansprüchen und Erklärung.</i>
(54) Title: CONJUGATE CONSISTING OF AN ACTIVE SUBSTANCE AND A NON-EXOGENOUS NATIVE PROTEIN (54) Bezeichnung: KONJUGAT AUS EINEM WIRKSTOFF UND EINEM NICHT ALS KÖRPERFREMD ANGESEHENEN, NATIVEN PROTEIN (57) Abstract The invention concerns a conjugate consisting of an active substance and a native protein which is not considered exogenous. The conjugate is distinguished in that, between the active substance and the protein, there is a linker which can be cleaved in a cell. The invention further concerns a process for preparing such a conjugate and the use thereof. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft ein Konjugat aus einem Wirkstoff und einem nicht als körperfremd angesehenen, nativen Protein, das sich dadurch auszeichnet, daß zwischen dem Wirkstoff und dem Protein ein in einer Zelle spaltbarer Linker vorliegt. Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Konjugats und die Verwendung desselben.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

**Konjugat aus einem Wirkstoff und einem nicht als körperfremd
angesehenen, nativen Protein**

Die Erfindung betrifft ein Konjugat aus einem Wirkstoff und einem nicht als körperfremd angesehenen, nativen Protein, Verfahren zur Herstellung eines solchen Konjugates sowie dessen Verwendung.

- 5 Seit langem ist es ein großes Bedürfnis, Arzneimittel gezielt an bestimmte Orte im Körper zu bringen und sie dort ihre Aktivität entfalten zu lassen. Ersteres ist durch ein vorstehendes Konjugat erreicht (vgl. DE - 41 22 210). Mit diesem kann eine tumoraktive Verbindung im Tumor angereichert werden.
- 10 Überraschenderweise hat sich nun gezeigt, daß ein vorstehendes Konjugat auch eine sehr hohe Aktivität aufweist, wenn zwischen dem Wirkstoff und dem nicht als körperfremd angesehenen, nativen Protein ein in einer Zelle spaltbarer Linker vorliegt.
- 15 Ein derartiges Konjugat ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung.
- Der vorstehende Ausdruck "Wirkstoff" umfaßt Verbindungen jeglicher Art, die zur Therapie einer Erkrankung verwendet werden können. Dies sind z.B. Verbindungen zur Therapie von Tumor-, Infektions- und/oder Autoimmunerkrankungen. Beispiele
- 20 solcher Verbindungen sind Chemotherapeutika, wie Antibiotika, z.B. Tetracycline, und Antimetaboliten, z.B. Methotrexat, Sulfonamide und Nukleoside, die nach Einbau in eine Nukleinsäure deren Replikation bzw. Transkription inhibieren. Bevorzugte Verbindungen vorstehender Art sind solche, die eine Säuregruppe, wie -CO₂H, -SO₃H, -PO₃H₂ oder -AsO₃H₂, aufweisen. Besonders bevorzugte Verbindun-
- 25 gen sind 4- und 2-Aminobenzoessäure, 4- und 2-Aminophenylsulfonsäure, 4- und 2-Aminophenylphosphonsäure, 4- und 2-Aminophenylarsonsäure sowie Derivate davon. Weiter bevorzugte Verbindungen sind Desoxyuridin (UDR), Desoxycytidin (CDR), Cytosinarabinosid (AraC), 5-Fluoruracil (5-FU), 5-Fluordesoxyuridin(5-FUDR), Azidothymidin (AZT).
- 30 Weitere Beispiele von Verbindungen als Wirkstoff sind photoaktive Substanzen, wie Porphyrine, Chlorine und Bakteriochlorine, die zur photodynamischen Therapie

verwendet werden können.

Vorstehende Verbindungen liegen einzeln oder zu mehreren in einem erfindungsgemäßen Konjugat vor. Sie sind als Edukte dargestellt, was bedeutet, daß sie in
5 einem erfindungsgemäßen Konjugat in derivatisierter Form vorliegen (vgl. nachstehend, Beispiele 1-7 und Figuren 1-3).

Ein vorstehender Wirkstoff ist über einen Linker an ein Protein gebunden. Dieses Protein wird vom Körper nicht als fremd angesehen. Auch liegt es in nativer, d.h.
10 nicht-modifizierter, Form vor. Desweiteren hat das Protein ein Molekulargewicht (MG) von bis zu 90000, vorzugsweise ist es Albumin, insbesondere humanes Serumalbumin, oder Transferrin.

Ein vorstehender Linker ist in einer Zelle spaltbar. Der Ausdruck "Zelle" umfaßt
15 Einzelzellen und Zellverbände. Beispiele ersterer sind körpereigene, nicht in einem Verband vorliegende Zellen, z.B. Blutzellen und Virus-befallene Zellen, und körperfremde Zellen, z.B. Mikroorganismen, wie Bakterien, Pilze und Protozoen. Zellverbände umfassen Gewebe, Organe und Tumoren.

Ein Linker vorstehender Art ist dem Fachmann bekannt. Auch weiß er um Faktoren, z.B. Enzyme, die in Zellen die Spaltung bestimmter chemischer Bindungen bedingen. Somit ist er in der Lage, weitere Linker zu konstruieren, die in einer Zelle spaltbar sind. Günstigerweise umfaßt ein solcher Linker eine Azo-Gruppe. Diese wird bevorzugt gespalten. Besonders günstig ist es, wenn der Linker folgende
20 Struktur aufweist:



worin

30 R eine organische Gruppe, vorzugsweise eine aromatische, und besonders bevorzugt Phenylen oder ein Derivat davon ist, und
Y eine aus C(O), S(O)₂, P(O)OH und As(O)OH ausgewählte Gruppe ist.

Vorstehende Struktur eines bevorzugten Linkers entspricht jener, die der Linker in einem erfindungsgemäßen Konjugat aufweist. Ferner umfaßt die Struktur, zumindest wenn R Phenylen oder ein Derivat davon ist, eine aktive Verbindung, die sich besonders für die Therapie von Tumor-, Infektions- und Autoimmunerkrankungen eignet. Nach Spaltung des Linkers und gegebenenfalls Abbau des noch am Linker gebundenen Proteins kann die Verbindung ihre volle Aktivität entfalten (vgl. nachstehend, Beispiele 3 bis 7 und Figuren 2 und 3).

Bevorzugte Konjugate der vorliegenden Erfindung sind in den Figuren 1-3 angegeben.

Erfindungsgemäß wird auch ein Verfahren zur Herstellung eines vorstehenden Konjugats bereitgestellt. In einem solchen Verfahren werden übliche Umsetzungen der Chemie, wie Diazotierung einer Aminogruppe und Aktivierung einer Säuregruppe einzeln eingesetzt oder kombiniert. Es wird auf die Herstellung der Konjugate in den Beispielen 1-7 und Figuren 1-3 verwiesen.

Erfindungsgemäße Konjugate zeichnen sich dadurch aus, daß sie Wirkstoffe gezielt in bestimmten Zellen des Körpers anreichern und ihnen dort erlauben, ihre Aktivität voll zu entfalten. Dies wird durch die Kombination aus einem Protein, z.B. Albumin, und einem in einer Zelle spaltbaren Linker erreicht. Bestimmte Zellen im Körper, insbesondere Tumorzellen, Zellen entzündlicher Gewebe und Mikroorganismen, nehmen bevorzugt Albumin auf und spalten aufgrund ihrer Enzyme das Linker-Wirkstoff-Konjugat, wodurch der bzw. die Wirkstoff(e) freigesetzt wird (werden) und seine (ihre) Aktivität voll entfalten kann(können).

Erfindungsgemäße Konjugate eignen sich somit bestens für therapeutische Zwecke, insbesondere zur Therapie von Tumor-, Infektions- und Autoimmunerkrankungen.

Desweiteren können in erfindungsgemäßen Konjugaten Markierungen (z.B. radioaktive Markierungen) vorliegen, wodurch die Konjugate auch für diagnostische

Zwecke und Therapieüberwanderung, gegebenenfalls gleichzeitig zur Therapie, eingesetzt werden können.

Kurze Beschreibung der Zeichnung.

5

Fig. 1 zeigt die Anbindung von 4-Aminophenylsulfonsäure oder 4-Aminophenylphosphonsäure an Albumin, wobei eine Azogruppe als Linker vorliegt,

10 Fig. 2 zeigt die Anbindung von Cytidin an Albumin, wobei ein eine Azo-Gruppe enthaltender Linker vorliegt, sowie die Freisetzung von Aminocytidin,

15 Fig. 3 zeigt die Anbindung von Tetracyclin an Albumin, wobei ein eine Azo-Gruppe enthaltender Linker vorliegt, und

Fig. 4 zeigt die Wachstumsinhibition von Tumorzellen durch Verabreichung erfindungsgemäßer Konjugate.

20 Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1: Herstellung eines erfindungsgemäßen Konjugats aus humanem Serumalbumin und 4-Aminophenylsulfonsäure, wobei eine Azogruppe als Linker vorliegt

25

Die Herstellung des Konjugats und seine Struktur sind in Fig. 1 gezeigt.

1. Diazotierung von 4-Aminophenylsulfonsäure:

30 4-Aminophenylsulfonsäure (173 mg, 1 mMol) wurden in 5 ml 2 N HCl gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad abgekühlt und unter ständigem Rühren wurden 600 μ l einer eisgekühlten 2,5 M NaNO₂-Lösung (1,5 mMol) in

Portionen à 0,1 ml zugegeben. Nach etwa 10 min wurde der Überschuß an Nitrit durch Zugabe von Harnstoff beseitigt. Es wurde 4-Diazoniumphenylsulfonsäure (4-DAPS) erhalten.

5 2. Kopplung von 4-DAPS an humanes Serumalbumin (HSA):

10 Zu einer Lösung von 2 g HSA in 30 ml 0,17 M Bic wurde die unter 1. erhaltene 4-DAPS-Lösung in einem molaren Verhältnis von 1 : 1 langsam unter pH-Kontrolle und ständigem Rühren zugegeben, so daß der pH-Wert stets über 7,5 blieb. Schon während der Zugabe von 4-DAPS begann sich die Lösung rot zu färben, wobei die Färbung mit fortschreitender Reaktionsdauer ständig zunahm. Die Abtrennung von Verunreinigungen, wie überschüssiger Harnstoff oder Salze, erfolgte durch Ultrafiltration über eine YM 30 Membran in einer Amicon Druckfiltrationszelle. Es wurde ein Konjugat aus 4-Aminophenylsulfonsäure und HSA erhalten, wobei eine Azogruppe als Linker vorliegt.

15 Die Reinheit des erfindungsgemäßen Konjugats wurde mittels HPLC (Vorsäule: Zorbax Diol 20 µ(50x4mm), Säule 1: Zorbax GF 450, Säule 2: Zorbax GF 250, Laufmittel: 0,2 M Na-citrat, pH 7,5, Fluß: 1 ml/min) überprüft.

20 **Beispiel 2:** **Herstellung eines erfindungsgemäßen Konjugats aus humanem Serumalbumin und 4-Aminophenylphosphonsäure, wobei eine Azogruppe als Linker vorliegt**

Die Herstellung des Konjugats und seine Struktur sind in Fig. 1 gezeigt.

25 Die Herstellung erfolgte, wie in Beispiel 1 beschrieben, wobei anstatt 4-Aminophenylsulfonsäure die 4-Aminophenylphosphonsäure verwendet wurde.

Beispiel 3: Herstellung eines erfindungsgemäßen Konjugats aus Cytidin, einen eine Azogruppe enthaltenden Linker und humanem Serumalbumin (Cytidin-4-DAPS-HSA)

5 Die Herstellung des Konjugats und seine Struktur sind in Fig. 2 gezeigt.

Das 4-DAPS wurde wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt.

10 1. Kopplung von 4-DAPS an Cytidin:

2,6 mMol Cytidin (etwa 600 mg) wurden in 6 ml 2 N NaOH gelöst und unter Rühren wurde die 4-DAPS-Lösung portionsweise (je 1 ml) zugegeben. Die zunächst farblose Cytidin-Lösung nimmt schon während der Zugabe von 15 4-DAPS eine zunehmend intensiv rote Färbung an. Nach Vervollständigung der Reaktion wurde die tiefrote Lösung mit 1 N HCl auf einen pH-Wert von etwa 2 eingestellt und anschließend lyophilisiert. Der nach dem Lyophilisieren erhaltene trockene Rückstand wird anschließend in einem Gemisch von 8 ml Methanol und 2 ml DMF gelöst und durch Filtration vom unlöslichen 20 Bodenkörper abgetrennt. Es wurde 5(4-Diazophenylsulfonsäure)-cytidin (5(4-DAPS)-Cytidin) erhalten.

Die Reinheit des Produkts wurde mittels Dünnschichtchromatographie (Platten mit Fluoreszenz-Indikator, Laufmittel: Etac/MeOH 1/1) überprüft.

25

2. Aktivierung von 5(4-DAPS)-Cytidin zum entsprechenden HSI-Ester:

Ein Aliquot der Lösung des 5(4-DAPS)-Cytidin wurde im selben Lösungsmittel (4 Teile Methanol und 1 Teil DMF) mit der doppelten molaren Menge Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und der 7 bis 10-fachen molaren Menge an 30 N-Hydroxysuccinimid (HSI) versetzt. Nach einer Reaktionszeit von etwa 1 h ist die Aktivierung des 5(4-DAPS)-Cytidin zum entsprechenden HSI-Ester

beendet. Er kann direkt zur Kopplung an HSA eingesetzt werden.

3. Kopplung des HSI-Esters von 5(4-DAPS)-Cytidin an HSA:

5 Zu einer Lösung von 2 g HSA in 30 ml 0,17 M Bic wurde der HSI-Ester von 5(4-DAPS)-Cytidin langsam unter ständigem Rühren zugegeben. Schon während der Zugabe des HSI-Esters von 5(4-DAPS)-Cytidin fällt DCC aus. Die Trübung von DCC und DC-Harnstoff wurde mittels Filtration abgetrennt. Die Abtrennung anderer Verunreinigungen, wie Methanol, DMF und HSI, erfolgte anschließend über eine YM 30 Membran in einer Amicon Druck-

10 filtrationszelle. Es wurde Cytidin-4-DAPS-HSA erhalten.

Die Reinheit des erfindungsgemäßen Konjugats wurde mittels HPLC (vgl. Beispiel 1) überprüft.

15

Beispiel 4: Herstellung eines erfindungsgemäßen Konjugats aus UDR, einem eine Azogruppe enthaltenden Linker und humanem Serumalbumin (UDR-4-DAPS-HSA)

20

Die Herstellung des erfindungsgemäßen Konjugats erfolgte, wie in Beispiel 3 beschrieben, wobei anstelle von Cytidin UDR verwendet wurde. Es wurde UDR-4-DAPS-HSA erhalten.

25

Beispiel 5: Herstellung eines erfindungsgemäßen Konjugats aus AraC, einem eine Azogruppe enthaltenden Linker und humanem Serumalbumin (AraC-4-DAPS-HSA)

30

Die Herstellung des erfindungsgemäßen Konjugats erfolgte, wie in Beispiel 3 beschrieben, wobei anstelle von Cytidin AraC verwendet wurde. Es wurde AraC-4-DAPS-HSA erhalten.

Beispiel 6: Herstellung eines erfindungsgemäßen Konjugats aus CDR, einem eine Azogruppe enthaltenden Linker und humanem Serumalbumin (CDR-4-DAPS-HSA)

5

Die Herstellung des erfindungsgemäßen Konjugats erfolgte, wie in Beispiel 3 beschrieben, wobei anstelle von Cytidin CDR verwendet wurde. Es wurde CDR-4-DAPS-HSA erhalten.

10

Beispiel 7: Herstellung eines erfindungsgemäßen Konjugats aus 7-Chlortetracyclin, einem eine Azogruppe enthaltenden Linker und humanem Serumalbumin

15 Die Herstellung des Konjugats und seine Struktur sind in Fig. 3 gezeigt.

4-DAPS wurde wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt.

1. Kopplung von 4-DAPS an 7-Chlortetracyclin:

20

718,5 mg (1,5 mM) von 7-Chlortetracyclin (MG 478,9) wurden in 20 ml 1 N NaOH gelöst und unter ständigem Rühren die 4-DAPS-Lösung portionsweise (je 1 ml) zugegeben. Die zuerst gelb gefärbt 7-Chlortetracyclin-Lösung nahm während der Zugabe von 4-DAPS eine zunehmend intensiv rote Färbung an. Nach einer Reaktionszeit von etwa 24 h wurde die tiefrote Lösung mit 1 N HCl auf einen pH-Wert von etwa 2 eingestellt und lyophilisiert. Der trockne Rückstand wurde anschließend in einem Gemisch von 8 ml MeOH und 2 ml DMF gelöst und durch Filtration vom unlöslichen Bodenkörper abgetrennt. Es wurde 7-Chlor-9(4-diazophenylsulfonsäure)-tetracyclin (4-DAPS-Chlortetracyclin) erhalten.

25

30

2. Aktivierung des 4-DAPS-Chlortetracyclins zur Proteinkopplung:

Ein Aliquot der Lösung des 4-DAPS-Tetracyclins wurde im selben Lösungsmittel (4 Teile MeOH und 1 Teil DMF), ohne vorherige Abtrennung des überschüssigen 7-Chlortetracyclins mit der doppelten molaren Menge an DCC (bezogen auf die eingesetzte Menge an Phenylsulfonsäure) und der 7 - 10-fachen molaren Menge an HSI versetzt. Nach einer Reaktionszeit von etwa 2 h ist die Aktivierung des 4-DAPS-Chlortetracyclins zum entsprechenden HSI-Ester beendet. Der so erhaltene Ester kann direkt zur Proteinkopplung eingesetzt werden.

3. Kopplung des HSI-Esters von 4-DAPS-Chlortetracyclin an HSA:

Zu einer Lösung von 2g HSA in 30 ml 0,17 M Bic gibt man die äquimolare Menge an HSI-Ester von 4-DAPS-Chlortetracyclin langsam und unter ständigem Rühren. Schon während der Zugabe des HSI-Esters fällt der Überschuß an DCC aus. Die Trübung von DCC und DC-Harnstoff wurde vor der Druckfiltration mittels Filtration abgetrennt. Die Abtrennung anderer Verunreinigungen, wie MeOH, DMF und HSI, erfolgte über eine YM 30 Membran in einer Amicon Druckfiltrationszelle. Es wurde 7-Chlor-9(4-diazophenylsulfonsäure)-tetracyclin-HSA erhalten.

Die Reinheit des so erhaltenen Konjugats wurde mittels HPLC (vgl. Beispiel 1) bestimmt.

**Beispiel 8: Herstellung eines Konjugats aus Tetracyclin, einem eine Azo-
gruppe enthaltenden Linker und humanem Serumalbumin**

Die Herstellung des Konjugats erfolgte wie in Beispiel 7 beschrieben, wobei anstatt 7-Chlortetracyclin Tetracyclin verwendet wurde. Die Struktur des Konjugats ist in Fig. 3 gezeigt.

**Beispiel 9: Wachstumsinhibition von Tumorzellen durch Verabreichung
erfindungsgemäßer Konjugate**

5 Die Konjugate UDR-4-DAPS-HSA (vgl. Beispiel 4), AraC-4-DAPS-HSA (vgl. Beispiel 5) und CDR-4-DAPS-HSA (vgl. Beispiel 6) sowie als Kontrolle HSA alleine wurden jeweils mit Walker-256-Zellen unter üblichen Bedingungen inkubiert. Nach 24, 48 bzw. 72 h wurde in üblicher Weise die Zellzahl pro ml bestimmt.

10 Wie aus Fig. 4 zu ersehen ist, vermindert jedes der erfindungsgemäßen Konjugate im Vergleich zur Kontrolle die Proliferation von Tumorzellen.

5

Patentansprüche

10

1. Konjugat aus einem Wirkstoff und einem nicht als körperfremd angesehenen, nativen Protein, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen dem Wirkstoff und dem Protein ein in einer Zelle spaltbarer Linker vorliegt.

15

2. Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff eine zur Therapie von Tumor-, Infektions- und/oder Autoimmunerkrankungen verwendbare Verbindung ist.

20

3. Konjugat nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Chemotherapeutikum und/oder eine photoaktive Verbindung ist.

4. Konjugat nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Chemotherapeutikum ein Antibiotikum ist.

25

5. Konjugat nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Chemotherapeutikum ein Antimetabolit ist.

6. Konjugat nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Wirkstoffe vorliegen.

30

7. Konjugat nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker eine Azo-Gruppe umfaßt.

8. Konjugat nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker folgende Struktur aufweist:



worin

R eine aromatische Verbindung ist, und

Y eine aus C(O), S(O)₂, P(O)OH und As(O)OH ausgewählte Gruppe ist.

- 5 9. Konjugat nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein Albumin ist.
10. Konjugat nach Anspruch 1, nämlich das Konjugat von Fig. 1.
- 10 11. Konjugat nach Anspruch 1, nämlich das Konjugat von Fig. 2.
12. Konjugat nach Anspruch 1, nämlich das Konjugat von Fig. 3.
13. Verfahren zur Herstellung des Konjugates nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Anbinden des Wirkstoffs über den Linker an das Protein eine Diazotierung von Aminogruppen und/oder eine Aktivierung von Säuregruppen umfaßt.
- 15 14. Verwendung des Konjugates nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zur
- 20 Therapie von Tumor-, Infektions- und/oder Autoimmunerkrankungen.

GEÄNDERTE ANSPRÜCHE

[beim Internationalen Büro am 7 März 1996 (07.03.96) eingegangen;
ursprünglicher Anspruch 1 geändert; ursprünglicher Ansprüche 7 gestrichen;
ursprüngliche Ansprüche 8-14 unnummeriert als Ansprüche 7-13;
weitere Ansprüche unverändert (2 Seiten)]

5

10

15

20

25

30

1. Konjugat aus einem Wirkstoff und einem nicht als körperfremd angesehenen, nativen Protein, wobei zwischen dem Wirkstoff und dem Protein ein in einer Zelle spaltbarer Linker vorliegt, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker eine Azo-Gruppe umfaßt.
2. Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff eine zur Therapie von Tumor-, Infektions- und/oder Autoimmunerkrankungen verwendbare Verbindung ist.
3. Konjugat nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Chemotherapeutikum und/oder eine photoaktive Verbindung ist.
4. Konjugat nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Chemotherapeutikum ein Antibiotikum ist.
5. Konjugat nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Chemotherapeutikum ein Antimetabolit ist.
6. Konjugat nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Wirkstoffe vorliegen.
7. Konjugat nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker folgende Struktur aufweist:



worin

R eine aromatische Verbindung ist, und

Y eine aus C(O), S(O)₂, P(O)OH und As(O)OH ausgewählte Gruppe ist.

- 5 8. Konjugat nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß
das Protein Albumin ist.
9. Konjugat nach Anspruch 1, nämlich das Konjugat von Fig. 1.
- 10 10. Konjugat nach Anspruch 1, nämlich das Konjugat von Fig. 2.
11. Konjugat nach Anspruch 1, nämlich das Konjugat von Fig. 3.
- 15 12. Verfahren zur Herstellung des Konjugates nach Anspruch 1, dadurch
gekennzeichnet, daß das Anbinden des Wirkstoffs über den Linker an
das Protein eine Diazotierung von Aminogruppen und/oder eine Aktivie-
rung von Säuregruppen umfaßt.
- 20 13. Verwendung des Konjugates nach einem der Ansprüche 1 bis 11 zur
Therapie von Tumor-, Infektions- und/oder Autoimmunerkrankungen.

1/5

FIGUR 1

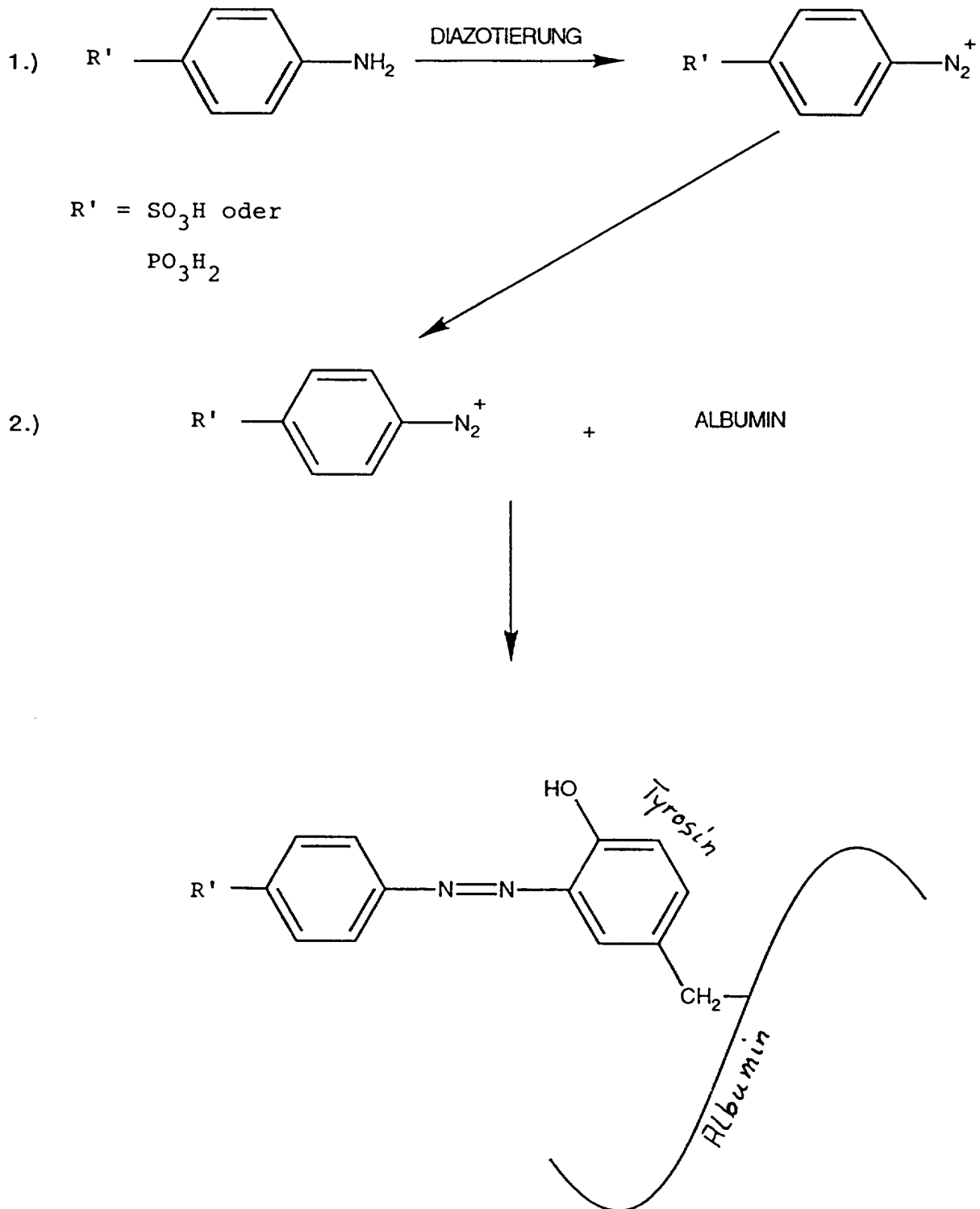
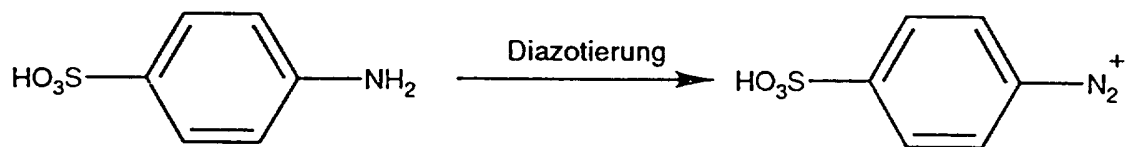


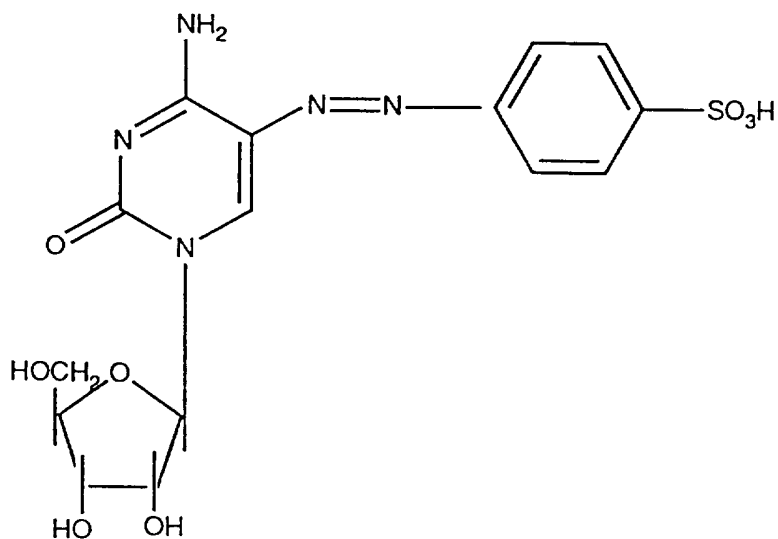
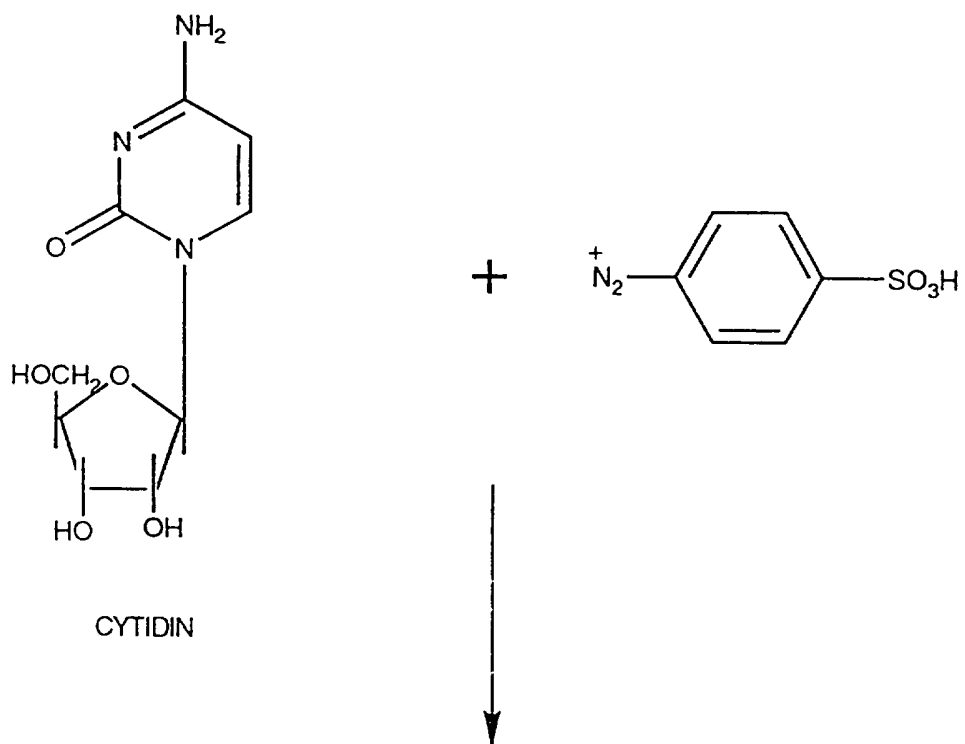
Fig. 1: Anbindung von 4-Aminophenylsulfonsäure oder 4-Aminophenylphosphonsäure an Albumin, wobei eine Azogruppe als Linker vorliegt.

2/5

FIGUR 2

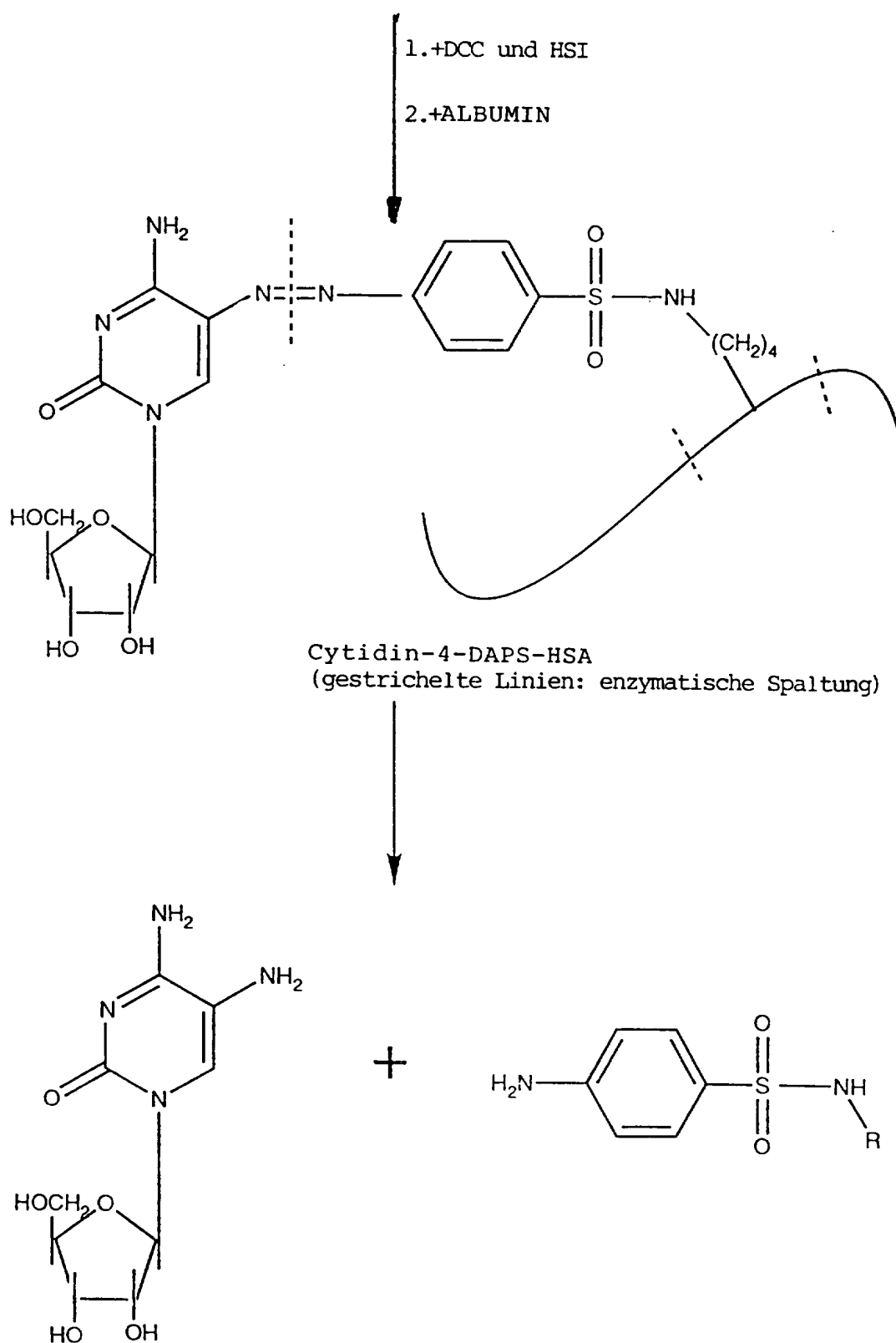


Sulfanilsäure



FIGUR 2 (Fortsetzung)

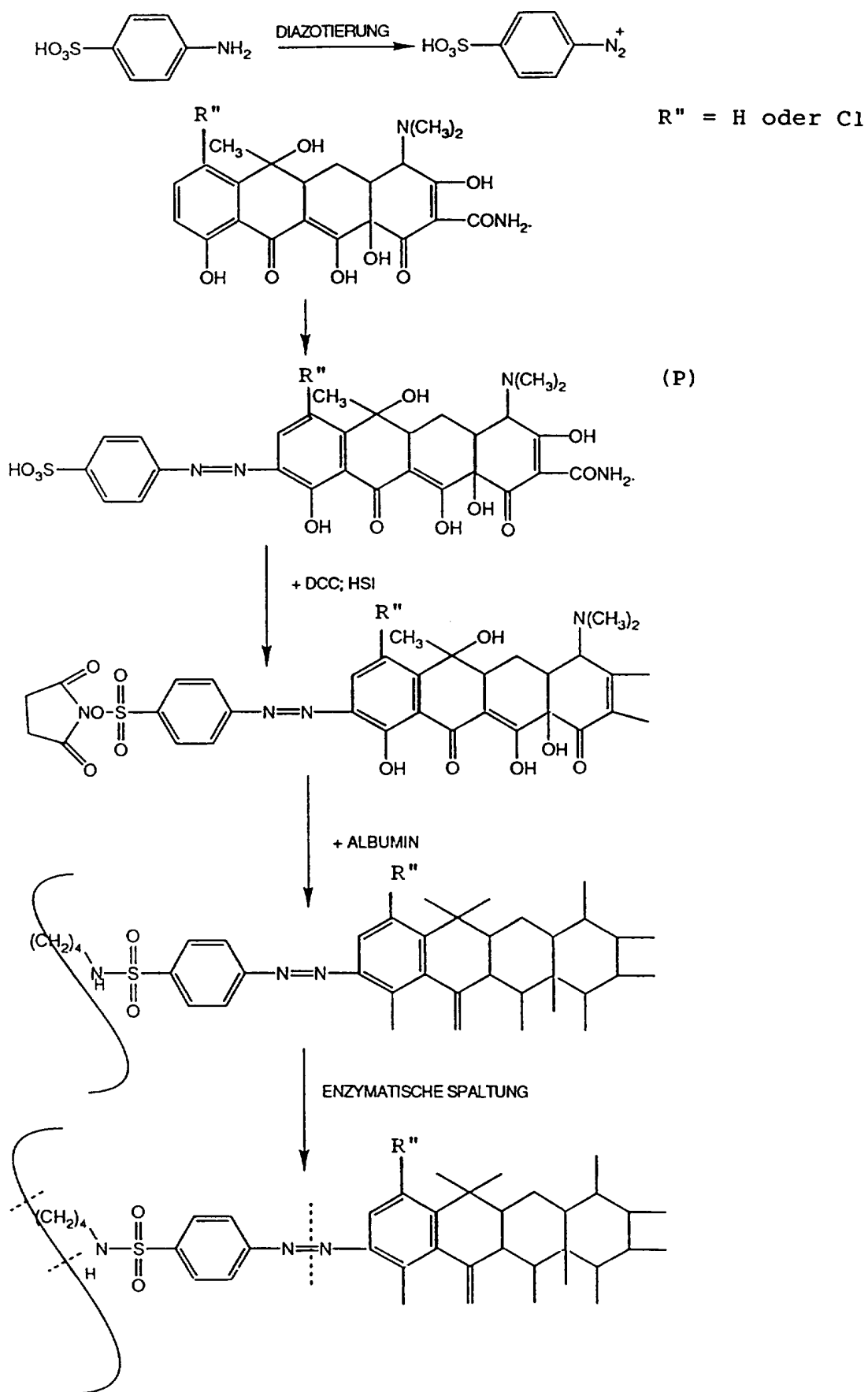
3/5



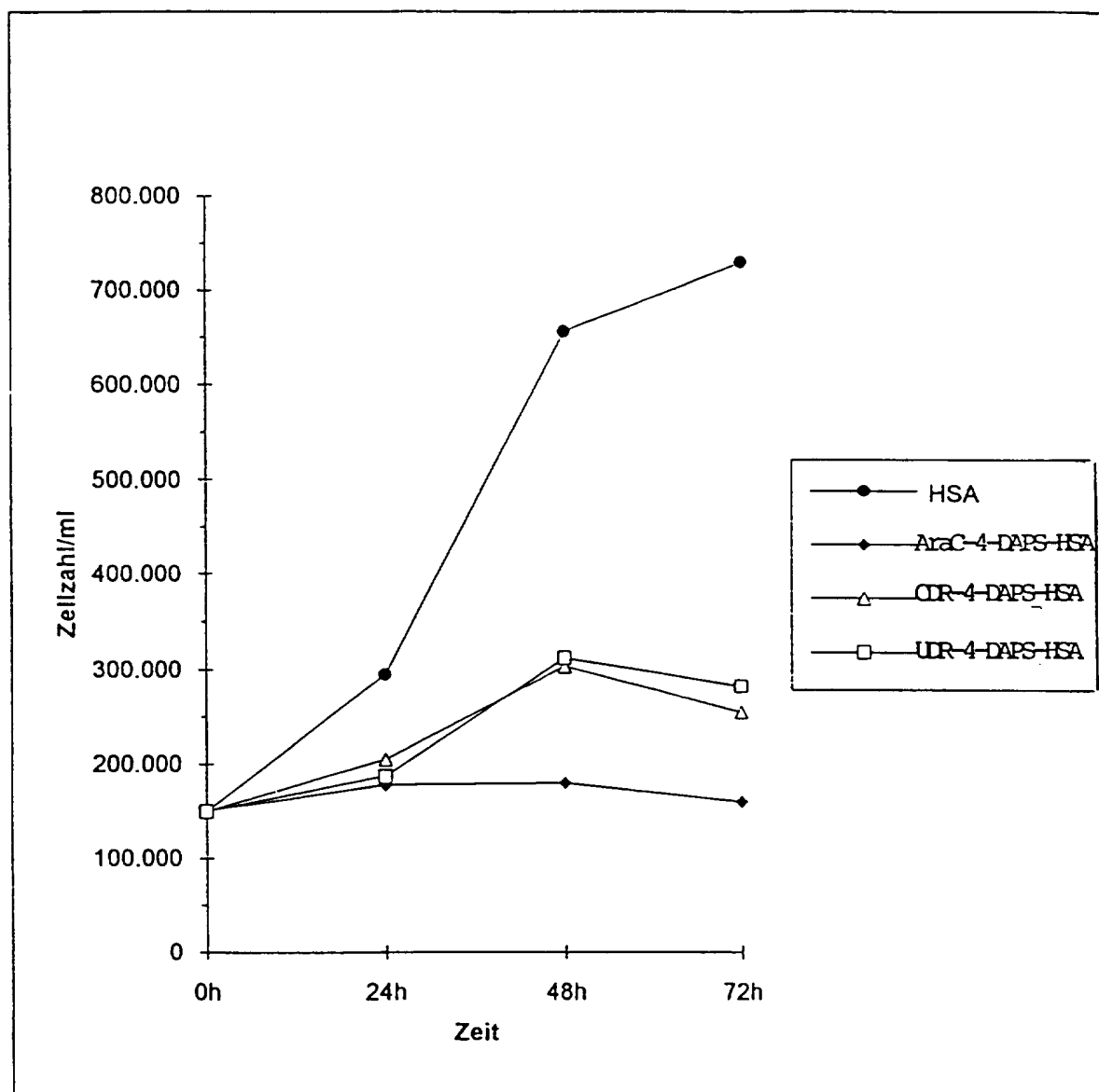
Figur 2: Anbindung von Cytidin über einen eine Azogruppe enthaltenden Linker an Albumin

4/5

FIGUR 3



Figur 3: Anbindung von Tetracyclin über einen Linker an Albumin

FIGUR 4

Figur 4: Wachstumsinhibition von Tumorzellen durch Verabreichung erfindungsgemäßer Konjugate

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 95/01323

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K47/48 A61K41/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE,A,41 22 210 (DEUTSCHES KREBSFORSCH) 14 January 1993 cited in the application see claims 1,2,10,12 ---	1-14
X	WO,A,91 18012 (BIOSPAN CORP) 28 November 1991 see page 1, paragraph 2 see page 8, line 2 - page 9, line 3; claims ---	1-6,9,14
X	BE,A,882 541 (PATHOLOGIE CELLULAIRE & MOLECU) 16 July 1980 see page 3, paragraph 4 see page 4, paragraph 2; claims ---	1-6,9,14
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 December 1995

Date of mailing of the international search report

10. 01. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Berte, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PC 1/DE 95/01323

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	J. PHOTOCHEM. PHOTOBIOLOG. B: BIOLOGY, vol. 26, October 1994 pages 45-56, HAMBLIN M.R. ET AL. 'PHOTOSENSITIZER TARGETING IN PHOTODYNAMIC THERAPY. I CONJUGATES OF HAEMATOPORPHYRIN WITH ALBUMIN AND TRANSFERRIN.' see page 45; table 1 ---	1-14
P,A	WO,A,94 27641 (BIOTECH AUSTRALIA PTY LTD ;RUSSELL JONES GREGORY JOHN (AU); WESTWO) 8 December 1994 see page 3, line 6 - line 12; claims 1,3 see page 8, line 1 - line 5 ---	1-8,13, 14
P,Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 115, no. 7, 19 August 1991 Columbus, Ohio, US; abstract no. 67675, HENRIKSEN, ULLA ET AL 'Azidobenzoyl-, azidoacridinyl-, diazocyclopentadienylcarbonyl- and 8-propyloxypsoralen photobiotinylation reagents. Syntheses and photoreactions with DNA and protein' see abstract & J. PHOTOCHEM. PHOTOBIOLOG., A (1991), 57(1-3), 331-42 CODEN: JPPCEJ;ISSN: 1010-6030, 1991 -----	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PC 1/DE 95/01323

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE-A-4122210	14-01-93	NONE	
WO-A-9118012	28-11-91	US-A- 5169934 CA-A- 2059649 EP-A- 0482185 JP-T- 5502886 US-A- 5334391	08-12-92 15-11-91 29-04-92 20-05-93 02-08-94
BE-A-882541	16-07-80	EP-A, B 0037388 JP-C- 1724800 JP-B- 4009771 JP-A- 57018624 US-A- 4376765	07-10-81 24-12-92 21-02-92 30-01-82 15-03-83
WO-A-9427641	08-12-94	US-A- 5449720 AU-B- 6790394	12-09-95 20-12-94

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PC 1/DE 95/01323

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K47/48 A61K41/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE,A,41 22 210 (DEUTSCHES KREBSFORSCH) 14.Januar 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche 1,2,10,12 ---	1-14
X	WO,A,91 18012 (BIOSPAN CORP) 28.November 1991 siehe Seite 1, Absatz 2 siehe Seite 8, Zeile 2 - Seite 9, Zeile 3; Ansprüche ---	1-6,9,14
X	BE,A,882 541 (PATHOLOGIE CELLULAIRE & MOLECU) 16.Juli 1980 siehe Seite 3, Absatz 4 siehe Seite 4, Absatz 2; Ansprüche ---	1-6,9,14
-/--		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21.Dezember 1995

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

10.01.96

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Berte, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	J. PHOTOCHEM. PHOTOBIOLOG. B: BIOLOGY, Bd. 26, Oktober 1994 Seiten 45-56, HAMBLIN M.R. ET AL. 'PHOTOSENSITIZER TARGETING IN PHOTODYNAMIC THERAPY. I CONJUGATES OF HAEMATOPORPHYRIN WITH ALBUMIN AND TRANSFERRIN.' siehe Seite 45; Tabelle 1 ---	1-14
P,A	WO,A,94 27641 (BIOTECH AUSTRALIA PTY LTD ;RUSSELL JONES GREGORY JOHN (AU); WESTWO) 8.Dezember 1994 siehe Seite 3, Zeile 6 - Zeile 12; Ansprüche 1,3 siehe Seite 8, Zeile 1 - Zeile 5 ---	1-8,13, 14
P,Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 115, no. 7, 19.August 1991 Columbus, Ohio, US; abstract no. 67675, HENRIKSEN, ULLA ET AL 'Azidobenzoyl-, azidoacridinyl-, diazocyclopentadienylcarbonyl- and 8-propyloxypsoralen photobiotinylation reagents. Syntheses and photoreactions with DNA and protein' siehe Zusammenfassung & J. PHOTOCHEM. PHOTOBIOLOG., A (1991), 57(1-3), 331-42 CODEN: JPPCEJ;ISSN: 1010-6030, 1991 -----	1-14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 95/01323

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE-A-4122210	14-01-93	KEINE	
WO-A-9118012	28-11-91	US-A- 5169934	08-12-92
		CA-A- 2059649	15-11-91
		EP-A- 0482185	29-04-92
		JP-T- 5502886	20-05-93
		US-A- 5334391	02-08-94
BE-A-882541	16-07-80	EP-A, B 0037388	07-10-81
		JP-C- 1724800	24-12-92
		JP-B- 4009771	21-02-92
		JP-A- 57018624	30-01-82
		US-A- 4376765	15-03-83
WO-A-9427641	08-12-94	US-A- 5449720	12-09-95
		AU-B- 6790394	20-12-94