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

(10) **DE 694 33 564 T2** 2004.12.23

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 734 264 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 33 564.9**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/12232**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 900 421.9**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/11694**
(86) PCT-Anmeldetag: **26.10.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **04.05.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.10.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **18.02.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.12.2004**

(51) Int Cl.[7]: **A61K 38/10**
G01N 33/534, G01N 33/532, G01N 33/566, A61K 47/48, A61K 51/08, A61P 35/04

(30) Unionspriorität:

141892	**26.10.1993**	**US**
305056	**13.09.1994**	**US**

(73) Patentinhaber:
Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pa., US

(74) Vertreter:
Müller-Boré & Partner, Patentanwälte, European Patent Attorneys, 81671 München

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

(72) Erfinder:
WALDMAN, Scott A., Ardmore, US

(54) Bezeichnung: **Verbindungen, die kolorektale Krebszellen spezifisch binden, und Verfahren zu ihrer Verwendung**

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

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

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen, die einen Rezeptorligandenanteil umfassen, der an den an einen therapeutischen oder bilderzeugenden Anteil konjugierten ST-Rezeptor bindet, und Verwendungen zum Nachweis und zu Behandlung von kolorektalen Tumoren, insbesondere metastasierenden Tumoren. Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen und Kits für Verfahren zum Nachweisen von metastasierenden kolorektalen Tumorzellen in Proben, zum Bestimmen, ob oder ob nicht ein Tumor kolorektalen Ursprungs ist, und zum Bewertung des Ausmaßes der invasiven Aktivität kolorektaler Tumorzellen in Proben aus dem Dickdarm. Diese Anmeldung bezieht sich auf die U.S. Patentanmeldung Nr. 08/141,892, angemeldet am 26. Oktober 1993 und auf die U.S. Patentanmeldung Nr. 08/305,056, angemeldet am 13. September 1994, wobei auf deren jeweiligen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Kolorektaler Krebs ist weltweit das dritthäufigste Neoplasma. Die Sterblichkeitsrate bei einem neu diagnostizierten Dickdarmkrebs nähert sich 50% und es gab während der vergangenen 40 Jahren nur wenig Verbesserung. Der Großteil dieser Sterbilchkeitsziffer spiegelt lokale, regionale und entfernte Metastasen wider.

[0003] Chirurgische Behandlung wird hauptsächlich zur Behandlung von kolorektalem Krebs verwendet, jedoch ist ein Wiederauftreten häufig. Der kolorektale Krebs erwies sich als beständig gegen Chemotherapie, obwohl ein begrenzter Erfolg unter Verwendung einer Kombination aus 5-Fluoruracil und Levamisol erreicht wurde. Eine chirurgische Behandlung wies den größten Einfluß auf das Überleben auf und bei manchen Patienten mit eingeschränkter Erkrankung erreichte sie eine Heilung. Die chirurgische Behandlung entfernt jedoch den Großteil des Tumors, wobei eine mikroskopische Resterkrankung zurückbleibt, die schließlich zu einem Rückfall führt.

[0004] Der frühe Nachweis einer primären, metastatischen und wiederauftretenden Krankheit kann signifikant die Prognose bei Individuen, die an kolorektalem Krebs leiden, beeinflussen. Der in einem frühen Stadium diagnostizierte Dickdarmkrebs weist ein signifikant besseres Ergebnis auf, als der in fortgeschritteneren Stadien diagnostizierte Krebs. Entsprechend hat eine frühere Diagnose einer metastatischen oder wiederauftretenden Krankheit eine potentiell bessere Prognose zur Folge.

[0005] Obwohl derzeit übliche radiotherapeutische Mittel, chemotherapeutische Mittel und biologische Toxine wirksame Zytotoxine sind, unterscheiden sie nicht zwischen normalen und bösartigen Zellen, wobei sie nachteilige Wirkungen und die Dosis einschränkende Toxizitäten erzeugen. Während der letzten zehn Jahre wurde eine neue Methode zum spezifischeren Zielmittel Targeting von Mitteln gegen Tumorzellen verwendet, die die Konjugation eines wirksamen Mittels an Moleküle, die vorzugsweise an überwiegend auf Tumorzellen vorkommende Antigene binden, betrifft. Diese Konjugate können systemisch verabreicht werden und binden spezifisch an die Zieltumorzellen. Das Targeting erlaubt theoretisch die Aufnahme von zytotoxischen Mittel durch Zellen in Konzentrationen, die keine ernsthaften Toxizitäten in normalen Geweben erzeugen. Ebenfalls erleichtert das selektive Binden an Zieltumorzellen den Nachweis eines verborgenen Tumors und ist daher zum Entwerfen bilderzeugender Mittel verwendbar. Das molekulare Targeting verwendete überwiegend monoklonale Antikörper, die gegen Antigene, die selektiv auf Tumorzellen exprimiert werden, erzeugt wurden.

[0006] Die Immunszintigraphie wurde unter Verwendung monoklonaler Antikörper, die auf Tumor-spezifische Marker gerichtet sind, zur Diagnose von kolorektalem Krebs verwendet. Monoklonale Antikörper gegen ein karzinomembryonisches Antigen (CEA), die mit ^{99}Technetium markiert waren, identifizierten 94% der Patienten mit wiederauftretenden Tumoren. Entsprechend diagnostizierten ^{111}Indium-markierte Anti-CEA monoklonale Antikörper erfolgreich 85% der Patienten mit wiederauftretenden kolorektalen Karzinomen, bei denen durch übliche Techniken keine Diagnose gestellt worden war. ^{125}Iod-markierte Antikörper waren bei der Lokalisierung von mehr als 80% der pathologisch bestätigten Rückfälle durch intraoperatives gamma-Sondenscanning wirksam.

[0007] Ebenfalls wurden monoklonale Antikörper zum spezifischen Targeting therapeutischer Mittel für kolorektalen Krebs verwendet. Vorklinische Untersuchungen zeigten, dass Anti-CEA-Antikörper, die mit ^{90}Yttrium markiert waren, menschliche Kolonkarzinom-Heterotransplantate in nackten Mäusen hemmten. Antikörper, die gegen kolorektale Krebszellen erzeugt wurden und an Mitomycin C oder Neocarzinostatin gekoppelt wurden, zeigten eine Anti-Tumorwirkung auf menschliche Kolonkrebs-Heterotransplantate in nackten Mäusen und auf

3 Patienten mit Kolonkrebs. Ähnliche Ergebnisse wurden in Tieren mit monoklonalen Antikörpern erhalten, die an die Ricintoxin A-Kette konjugiert waren.

[0008] Aufgrund der Empfindlichkeit, Spezifität und dem nachteiligen Wirkungsprofil von monoklonalen Antikörpern zeigten die Ergebnisse, die unter Verwendung von auf monoklonalen Antikörpern basierenden therapeutischen Mittel erhalten wurden, dass sie keineswegs ideale Targeting-Werkzeuge sind. Obwohl monoklonale Antikörper gegen Antigene, die selektiv auf Tumoren exprimiert werden, erzeugt worden waren, wurde kein wirklich Krebs-spezifischer Antikörper identifiziert. Die meisten auf neoplastischen Zellen exprimierten Antigene scheinen in diesen im Vergleich zu normalen Zellen quantitativ zugenommen zu haben, jedoch sind die Antigene trotzdem häufig in normalen Zellen vorhanden. Daher können Antikörper gegen derartige Determinanten mit nicht neoplastischen Geweben reagieren, was zu bedeutenden Toxizitäten führt. Die Antikörper sind ebenfalls relativ große Moleküle und rufen folglich häufig eine Immunreaktion in Patienten hervor. Diese Immunreaktionen können bei Patienten nach einem Wiederaussetzen gegen die Targeting-Mittel zu bedeutenden Toxizitäten führen und können das Targeting durch den monoklonalen Antikörper aufgrund von Immunkomplexbildung mit Abbau und Ausscheidung verhindern. Schließlich kann das Binden der Antikörper an Tumorzellen gering sein und zielgerichtete Mittel können an Zellen in Mengen abgegeben werden, die nicht ausreichend sind, um einen Nachweis oder eine Zytotoxizität zu erreichen.

[0009] Es besteht nach wie vor ein Bedarf für Zusammensetzungen, die sich spezifisch auf metastasierende kolorektale Krebszellen richten. Es gibt einen Bedarf für bilderzeugende Mittel, die an metastasierende kolorektale Krebszellen spezifisch binden können. Es gibt einen Bedarf an verbesserten Verfahren zur Abbildung von metastasierenden kolorektalen Krebszellen. Es gibt einen Bedarf an therapeutischen Mitteln, die an metastasierende kolorektale Krebszellen spezifisch binden können. Es gibt einen Bedarf an verbesserten Verfahren zur Behandlung von Individuen, die im Verdacht stehen, an kolorektalen Krebszellen zu leiden, insbesondere Individuen, die im Verdacht stehen, an einer Metastasierung von kolorektalen Krebszellen zu leiden.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0010] Die vorliegende Erfindung betrifft konjugierte Verbindungen, die einen ST-Rezeptorbindungsanteil und einen radiostabilen wirksamen Anteil umfassen.

[0011] Die vorliegende Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung, die einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung umfasst, die einen ST-Rezeptorbindungsanteil und einen radiostabilen wirksamen Anteil umfasst.

[0012] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Behandlung eines Individuums, das unter dem Verdacht steht, an metastasierendem kolorektalem Krebs zu leiden, umfassend die Schritte des Verabreichens einer pharmazeutischen Zusammensetzung an dieses Individuum, umfassend einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine therapeutisch wirksame Menge einer konjugierten Verbindung, die einen ST-Rezeptorbindungsanteil und einen radiostabilen wirksamen Anteil umfasst.

[0013] Die vorliegende Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassen einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung, die einen ST-Rezeptorbindungsanteil und einen radioaktiven wirksamen Anteil umfaßt, wobei die konjugierte Verbindung in einer Menge vorhanden ist, die zur therapeutischen oder diagnostischen Verwendung in Menschen, die an kolorektalem Krebs leiden, wirksam ist.

[0014] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Radioabbildung metastasierender kolorektaler Krebszellen, umfassend die Schritte des zuerst Verabreichens einer pharmazeutischen Zusammensetzung an ein Individuum, das unter dem Verdacht steht, metastasierende kolorektale Krebszellen aufzuweisen, die einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und einen konjugierte Verbindung umfasst, umfassend einen ST-Rezeptorbindungsanteil und einen radioaktiven wirksamen Anteil, wobei die konjugierte Verbindung in einer Menge vorhanden ist, die für eine diagnostische Verwendung in an kolorektalem Krebs leidenden Menschen wirksam ist, und des anschließenden Nachweisens der Lokalisierung und Anhäufung von Radioaktivität in dem Körper des Individuums.

[0015] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Behandlung eines Individuums, das unter dem Verdacht steht, an metastasierendem kolorektalen Krebs zu leiden, umfassend die Schritte des Verabreichens einer pharmazeutischen Zusammensetzung an dass Individuum, umfassend einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine therapeutisch wirksame Menge einer konjugierten Verbindung,

die einen ST-Rezeptorbindungsanteil und einen radioaktiven wirksamen Anteil umfaßt.

[0016] Die vorliegende Erfindung betrifft in vitro Verfahren zur Bestimmung ob oder ob nicht ein Individuum metastasierende kolorektale Krebszellen aufweist. Die vorliegende Erfindung betrifft in vitro Verfahren zum Untersuchen von Proben von nicht kolorektalem Gewebe und Körperflüssigkeiten von einem Individuum zur Bestimmung, ob oder ob nicht das ST-Rezeptorprotein, das ein für kolorektale Zellen, einschließlich kolorektaler Tumorzellen, spezifisches Protein ist, durch Zellen außerhalb des kolorektalen Trakts exprimiert wird. Das Vorhandensein des ST-Rezeptorproteins oder von Nukleinsäuremolekülen, die eine Expression des ST-Rezeptorproteins anzeigen, ist ein Beweis dafür, dass das Individuum an metastasierendem kolorektalen Krebs leidet.

[0017] Die vorliegende Erfindung betrifft in vitro Verfahren zur Bestimmung, ob oder ob nicht Tumorzellen kolorektalen Ursprungs sind. Die vorliegende Erfindung betrifft in vitro Verfahren zum Diagnostizieren, ob oder ob nicht ein an Krebs leidendes Individuum an kolorektalem Krebs leidet. Die vorliegende Erfindung betrifft in vitro Verfahren zur Untersuchung von Proben von Tumoren von einem Individuum, zur Bestimmung, ob oder ob nicht das ST-Rezeptorprotein, das ein für kolorektale Zellen, einschließlich kolorektaler Tumorzellen, spezifisches Protein ist, durch die Tumorzellen exprimiert wird. Das Vorhandensein des ST-Rezeptorproteins oder von Nukleinsäuremolekülen, die eine Expression des ST-Rezeptorproteins anzeigen, ist ein Beweis dafür, dass das Individuum an metastasierendem kolorektalen Krebs leidet.

[0018] Die vorliegende Erfindung betrifft in vitro Kits zum Ausführen der Verfahren der Erfindung und Reagenzien und Zusammensetzungen, die als Komponenten in derartigen in vitro Kits der Erfindung verwendbar sind.

BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN DER ERFINDUNG

[0019] Die Erfindung bezieht sich auf die U.S. Patentanmeldung Nr. 08/141,892 angemeldet am 26. Oktober 1993 und auf die U.S. Patentanmeldung Nr. 08/305,056, angemeldet am 13. September 1994, wobei auf deren jeweiligen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird.

[0020] Die Ausdrücke „ST" und „natives ST", wie sie hier verwendet werden, werden untereinander austauschbar verwendet und sollen sich auf hitzestabiles Toxin (ST) beziehen, das ein von E. coli, sowie auch von anderen Organismen erzeugtes Peptid ist. STs sind natürlich vorkommende Peptide, die 1) von Organismen natürlich hergestellt werden, 2) an den ST-Rezeptor binden und 3) die Signalkaskade aktivieren, die die ST-induzierte Diarrhoe vermittelt.

[0021] Der Ausdruck „ST-Rezeptor", wie er hier verwendet wird, soll sich auf die Rezeptoren beziehen, die an kolorektalen Zellen, einschließlich lokalen und metastasierenden kolorektalen Krebszellen, die an ST binden, festgestellt wurden. In normalen Individuen wurden ST-Rezeptoren ausschließlich in Zellen des Darms gefunden, insbesondere in Zellen des Zwölffingerdarms, Dünndarms (Leerdarm und Ileum), Dickdarms, Kolons (Blinddarm, aufsteigendes Kolon, Querkolon, absteigendes Kolon und Sigma) und des Rektums.

[0022] Der Ausdruck „ST-Rezeptorligand", wie er hier verwendet wird, soll sich auf Verbindungen beziehen, die spezifisch an den ST-Rezeptor binden. ST ist ein ST-Rezeptorligand.

[0023] Der Ausdruck „ST-Rezeptor-bindendes Peptid", wie er hier verwendet wird, soll sich auf ST-Rezeptorliganden, die Peptide sind, beziehen.

[0024] Der Ausdruck „ST-Peptide", wie er hier verwendet wird, soll sich auf ST-Rezeptorbindende Peptide beziehen, die aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3, SEQ ID Nr: 5–54 und Fragmente und Derivate davon, ausgewählt sind.

[0025] Der Ausdruck „Fragment", wie er hier verwendet wird, soll sich auf ein Peptid beziehen, das a) eine Aminosäuresequenz aufweist, die zu einem Teil eines ST-Rezeptorbindenden Peptids identisch ist und b) die in der Lage ist, an den ST-Rezeptor zu binden.

[0026] Der Ausdruck „Derivat", wie er hier verwendet wird, soll sich auf eine Peptid beziehen, das a) eine Aminosäuresequenz aufweist, die im wesentlichen zu mindestens einem Teil eines ST-Rezeptor-bindenden Peptids identisch ist, und b) die in der Lage ist, an den ST-Rezeptor zu binden.

[0027] Der Ausdruck „im wesentlichen identisch", wie er hier verwendet wird, soll sich auf eine Aminosäuresequenz beziehen, die dieselbe ist wie die Aminosäuresequenz eines ST-Peptids, außer dass einige Reste de-

letiert oder durch konservative Aminosäuren substituiert oder insertiert sind.

[0028] Der Ausdruck „wirksames Mittel", wie er hier verwendet wird, soll sich auf Verbindungen beziehen, die therapeutische Mittel oder bilderzeugende Mittel sind.

[0029] Der Ausdruck „radiostabil", wie er hier verwendet wird, soll sich auf Verbindungen beziehen, die keinen radioaktiven Zerfall erleiden, das heißt auf Verbindungen, die nicht radioaktiv sind.

[0030] Der Ausdruck „therapeutisches Mittel", wie er hier verwendet wird, soll sich auf Chemotherapeutika, Toxine, Radiotherapeutika, Targeting-Mittel oder Radiosensibilisierungsmittel beziehen.

[0031] Der Ausdruck „chemotherapeutisch", wie er hier verwendet wird, soll sich auf Verbindungen beziehen, die bei Kontakt mit/oder Einbau in eine Zelle eine Wirkung auf die Zelle erzeugen, einschließlich der Verursachung des Todes der Zelle, der Hemmung der Zellteilung oder der Induzierung der Differenzierung.

[0032] Der Ausdruck „Toxin", wie er hier verwendet wird, soll sich auf Verbindungen beziehen, die bei Kontakt mit/oder Einbau in eine Zelle den Tod der Zelle hervorrufen.

[0033] Der Ausdruck „radiotherapeutisch", wie er hier verwendet wird, soll sich auf Radionuklide beziehen, die bei Kontakt mit und/oder Einbau in eine Zelle den Tod der Zelle hervorrufen.

[0034] Der Ausdruck „Targeting-Mittel", wie er hier verwendet wird, soll sich auf Verbindungen beziehen, die durch andere Verbindungen gebunden werden oder mit diesen reagieren können. Targeting-Mittel können zum Abgeben von Chemotherapeutika, Toxinen, Enzymen, Radiotherapeutika, Antikörpern oder bilderzeugenden Mitteln an Zellen, die mit diesen assoziierte Targeting-Mittel aufweisen, und/oder zum Umwandeln oder anderweitigem Transformieren oder Verstärken der damit zusammen verabreichten wirksamen Mittel verwendet werden. Ein Targeting-Mittel kann einen Anteil umfassen, der ein erstes Mittel darstellt, das an die Zelle lokalisiert wird, und das bei Kontakt mit einem zweiten Mittel entweder zu einem dritten Mittel mit einer gewünschten Aktivität umgewandelt wird oder die Umwandlung des zweiten Mittels in ein Mittel mit einer gewünschten Aktivität bewirkt. Das Ergebnis ist, dass das lokalisierte Mittel die Freigabe eines Mittels mit einer gewünschten Aktivität gegen die metastasierende Zelle erleichtert.

[0035] Der Ausdruck „Radiosensibilisierungsmittel", wie er hier verwendet wird, soll sich auf Mittel beziehen, die die Empfindlichkeit der Zellen gegen die schädlichen Wirkungen von ionisierender Strahlung erhöht. Ein Radiosensibilisierungsmittel erlaubt die Verabreichung von geringeren Strahlungsdosen und sorgt dennoch für eine therapeutisch wirksame Dosis.

[0036] Der Ausdruck „bilderzeugendes Mittel", wie er hier verwendet wird, soll sich auf Verbindungen beziehen, die nachgewiesen werden können.

[0037] Der Ausdruck „ST-Rezeptor-Bindungsanteil", wie er hier verwendet wird, soll sich auf den Teil einer konjugierten Verbindung beziehen, der einen ST-Rezeptorliganden darstellt.

[0038] Der Ausdruck „wirksamer Anteil", wie er hier verwendet wird, soll sich auf den Teil einer konjugierten Verbindung beziehen, der ein aktives Mittel darstellt.

[0039] Die Ausdrücke „konjugierte Verbindung" und „konjugierte Zusammensetzung", wie sie hier verwendet werden, werden untereinander austauschbar verwendet, und sollen sich auf eine Verbindung beziehen, die einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteil umfasst, und die in der Lage ist, an den ST-Rezeptor zu binden. Erfindungsgemäße konjugierte Verbindungen umfassen einen Teil, der einen ST-Rezeptorliganden darstellt und einen Teil, der ein aktives Mittel darstellt. Daher sind erfindungsgemäßen konjugierten Verbindungen in der Lage, spezifisch an den ST-Rezeptor zu binden, und umfassen einen Teil, der ein therapeutisches Mittel oder ein bilderzeugendes Mittel ist. Konjugierte Zusammensetzungen können Vernetzer und/oder Moleküle umfassen, die als Spacer zwischen den Anteilen dienen.

[0040] Die Ausdrücke „Vernetzer", „Vernetzungsmittel", „Konjugationsmittel", „Kupplungsmittel", „Kondensationsreagenz" und „bifunktioneller Vernetzer", wie sie hier verwendet werden, werden untereinander austauschbar verwendet und sollen sich auf molekulare Gruppen beziehen, die zur Anlagerung des ST-Rezeptorliganden und des aktiven Mittels verwendet werden, um dadurch die konjugierte Verbindung zu bilden.

[0041] Der Ausdruck „kolorektaler Krebs", wie er hier verwendet wird, soll die gut akzeptierte medizinische Definition umfassen, die kolorektalen Krebs als einen medizinischen Zustand definiert, der durch den Krebs von Zellen des Darmtrakts unterhalb des Dünndarms charakterisiert ist (das heißt der Dickdarm (Kolon), einschließlich dem Blinddarm, aufsteigendem Kolon, Querkolon, absteigendem Kolon und Sigma und Rektum). Zusätzlich soll der Ausdruck „kolorektaler Krebs", wie hier verwendet wird, weiterhin medizinische Zustände umfassen, die durch den Krebs von Zellen des Zwölffingerdarms und Dünndarms (Leerdarm und Ileum) charakterisiert sind. Die hier verwendete Definition von kolorektalem Krebs ist weitergehender als die übliche medizinische Definition, wird jedoch als solches bereitgestellt, da die Zellen des Zwölffingerdarms und des Dünndarms ebenfalls ST-Rezeptoren enthalten und daher den Verfahren der vorliegenden Erfindung unter Verwendung der Verbindungen der vorliegenden Erfindung zugänglich sind.

[0042] Der Ausdruck „Metastasierung", wie er hier verwendet wird, soll sich auf den Prozess beziehen, bei dem aus einem Organ oder einem Teil des Körpers stammende Krebszellen in einen anderen Teil des Körpers umsiedeln und sich weiterreplizieren. Metastasierende Zellen bilden nachfolgend Tumore, die weiter metastasieren können. Die Metastasierung bezieht sich daher auf die Ausbreitung von Krebs ausgehend von dem Teil der Körpers, in dem er ursprünglich vorkommt, zu anderen Teilen des Körpers. Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Abgabe von wirksamen Mitteln an metastasierende kolorektale Krebszellen.

[0043] Der Ausdruck „metastasierende kolorektale Krebszellen", wie er hier verwendet wird, soll sich auf kolorektale Krebszellen beziehen, die metastasierten, kolorektale Krebszellen, die in einem Teil des Körpers lokalisiert sind, der ein anderer als der Zwölffingerdarm, Dünndarm (Leerdarm und Ileum), Dickdarm (Kolon), einschließlich dem Blinddarm, aufsteigendem Kolon, Querkolon, absteigendem Kolon und Sigma und Rektum, ist.

[0044] Die Ausdrücke „nicht kolorektale Probe" und „extra-intestinale Probe", wie sie hier verwendet werden, werden untereinander austauschbar verwendet und sollen sich auf eine Gewebe- oder Körperflüssigkeitsprobe von eine Quelle beziehen, die eine andere als das kolorektale Gewebe ist. In einigen bevorzugten Ausführungsformen ist die nicht kolorektale Probe eine Gewebeprobe, wie zum Beispiel Lymphknoten. In einigen bevorzugten Ausführungsformen ist die nicht kolorektale Probe eine extra-intestinale Gewebeprobe, die ein Adenokarzinom unbestätigten Ursprungs ist. In einigen bevorzugten Ausführungsformen ist die nicht kolorektale Probe eine Blutprobe.

[0045] „Ein an einem Adenokarzinom unbestätigten Ursprungs leidendes Individuum", wie hier verwendet wird, soll sich auf ein Individuum beziehen, das einen Tumor aufweist, wobei der Ursprung nicht definitiv identifiziert worden war.

[0046] Der Ausdruck „Ein Individuum steht im Verdacht, für metastasierenden kolorektalen Krebs anfällig zu sein", wie er hier verwendet wird, soll sich auf ein Individuum beziehen, das besonders gefährdet ist, einen metastasierenden kolorektalen Krebs zu entwickeln. Beispiele von Individuen, die besonders gefährdet sind, metastasierenden kolorektalen Krebs zu entwickeln, sind diejenigen, deren familiäre Krankheitsgeschichte auf ein überdurchschnittliches Auftreten von kolorektalem Krebs unter Familienmitgliedern hinweist, und/oder diejenigen, die schon kolorektalen Krebs entwickelt haben und wirksam behandelt worden waren und die daher einem Risiko für einen Rückfall und einem Wiederauftreten gegenüberstehen.

[0047] ST, das von E. coli sowie von anderen Organismen hergestellt wird, ist für die endemische Diarrhoe in Entwicklungsländern und für Reisediarrhoe verantwortlich. ST induziert eine intestinale Absonderung durch das Binden an spezifische Rezeptoren, ST-Rezeptoren, in den apikalen Bürstenrandmembranen der Schleimhautzellen, die den Darmtrakt auskleiden. Das Binden von ST an ST-Rezeptoren ist nicht kovalent und kommt in einer konzentrationsabhängigen und sättigenden Weise vor. Einmal gebunden, scheinen die ST-ST-Rezeptorkomplexe durch die Darmzellen aufgenommen worden zu sein, das heißt, sie wurden von der Oberfläche in das Innere der Zelle befördert. Das Binden von ST an ST-Rezeptoren löst eine Kaskade biochemischer Reaktionen in der apikalen Membran dieser Zellen aus, was zur Erzeugung eines Signals führt, das die Darmzellen veranlasst, Flüssigkeiten und Elektrolyte abzusondern, was zu einer Diarrhoe führt.

[0048] ST-Rezeptoren sind dadurch einmalig, dass sie nur in den apikalen Bürstenrandmembranen der Zellen, die den Darmtrakt auskleiden, lokalisiert sind. Tatsächlich werden sie in keinem anderen Zelltyp in plazentalen Säugetieren gefunden. Weiterhin sind ST-Rezeptoren beinahe ausschließlich an den apikalen Membranen lokalisiert, wobei wenige in den basolateralen Membranen auf den Seiten der Darmzellen gefunden wurden.

[0049] Die den Darm auskleidenden Schleimhautzellen sind durch feste Verbindungen verbunden, die eine

Barriere gegen den Durchgang der Darminhalte in den Blutstrom und der Komponenten des Blutstroms in das intestinale Lumen bilden. Daher isoliert die apikale Lage der ST-Rezeptoren diese Rezeptoren von dem Kreislaufsystem, so dass sie als von dem restlichen Körper getrennt, im wesentlichen „außerhalb" des Körpers, vorkommend betrachtet werden können. Der restliche Körper wird daher als „außerhalb" des Darmtrakts liegend betrachtet. Zusammensetzungen, die „außerhalb" des Darmtrakts verabreicht werden, werden beiseite gehalten und nur von den Zellen segregiert, die normalerweise ST-Rezeptoren exprimieren. Umgekehrt enthalten Gewebeproben, die von dem Gewebe außerhalb des Darmtrakts entnommen wurden, normalerweise keine Zellen, die ST-Rezeptoren exprimieren.

[0050] In an kolorektalem Krebs leidenden Individuen stammen Krebszellen häufig von Zellen, die den ST-Rezeptor herstellen und aufweisen, und diese Krebszellen stellen weiterhin den ST-Rezeptor auf ihren Zelloberflächen her und weisen ihn auf. Tatsächlich exprimieren T84-Zellen, die aus Lungenmetastasen isolierte menschliche Kolon-Adenokarzinomzellen sind, ST-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche. Entsprechend exprimierten HT29glu-Zellen, die menschliche Kolon-Adenokarzinomzellen sind, Rezeptoren für ST. Daher exprimieren in Individuen, die an kolorektalem Krebs leiden, einige metastasierende Darmkrebszellen ST-Rezeptoren.

[0051] Es wurden Anstrengungen zur Bestimmung des Anteils an kolorektalen Tumoren unternommen, die den ST-Rezeptor aufweisen. Jeder der getesteten Tumore wurde durch Standardtechniken der chirurgischen Pathologie unabhängig voneinander als kolorektaler Krebs bestätigt. Jeder der getesteten kolorektalen Krebstumore, einschließlich kolorektale Tumore und metastasierende kolorektale Tumore (Leber, Lunge, Lymphknoten, Peritoneum, Eierstock), besaß ST-Rezeptoren. In jedem Fall war die Affinität und Dichte der Rezeptoren für ein Targeting zugänglich. Bei normalen Leber-, Lymphknoten-, Peritoneum-, Gallenblasen, Eierstock-, Magen, Nieren- und Lungenzellen wurde festgestellt, dass sie keine ST-Rezeptoren besitzen.

[0052] Metastasieren derartige Krebszellen, fahren die Krebszellen fort, den ST-Rezeptor zu erzeugen und aufzuweisen. Die Expression von ST-Rezeptoren auf den Oberflächen metastatischer Tumore stellt ein Ziel zur selektiven Bindung von konjugierten Zusammensetzungen zur Verfügung. ST-Rezeptoren erlauben das völlig spezifische Targeting therapeutischer und diagnostischer Mittel, die an ST-Rezeptorliganden konjugiert sind, auf metastatische kolorektale Krebszellen.

[0053] Entsprechend einigen Ausführungsformen der Erfindung werden Zusammensetzungen und Verfahren zum Nachweis, Bilderzeugung oder zur Behandlung kolorektaler Tumore in einem Individuum zur Verfügung gestellt.

[0054] Die konjugierten Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung sind zum Targeting von Zellen, die die innere Darmwand auskleiden, einschließlich derjenigen Krebszellen, die von solchen Zellen stammen, insbesondere von derartigen Zellen stammende metastasierende Krebszellen verwendbar. Die konjugierten Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung, die außerhalb des Darmtrakts, wie zum Beispiel diejenigen, die in das Kreislaufsystem verabreicht werden, werden von den Zellen, die den Darmtrakt auskleiden, getrennt bleiben und werden nur an Zellen binden, die außerhalb des Darmtrakts sind und die von den Darmtraktzellen stammen, wie zum Beispiel kolorektale Zellen. Die konjugierten Zusammensetzungen werden nicht an von nicht-kolorektalen Zellen stammende Zellen binden. Daher werden die wirksamen Anteile konjugierter Zusammensetzungen, die außerhalb des Darmtrakts verabreicht werden, an Zellen abgegeben, die von dem Darmtrakt stammen, wie zum Beispiel metastasierende kolorektale Zellen, jedoch werden sie nicht an irgendwelche andere Zellen abgegeben.

[0055] Therapeutische diagnostische pharmazeutische Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung umfassen konjugierte Verbindungen, die spezifisch auf eine metastatische Erkrankung gerichtet sind. Diese konjugierten Verbindungen umfassen ST-Rezeptor-Bindungsanteile, die nicht an Zellen des normalen Gewebes im Körper binden, außer an Zellen des Darmtrakts, da die Zellen von anderen Geweben keine ST-Rezeptoren besitzen. Im Gegensatz zu normalen kolorektalen Zellen und lokalisierten kolorektalen Krebszellen, sind metastasierende kolorektale Krebszellen für Substanzen empfänglich, die außerhalb des intestinalen Trakts, zum Beispiel in das Kreislaufsystem verabreicht wurden. Die einzigen ST-Rezeptoren in normalem Gewebe kommen in den apikalen Membranen der Darmschleimhautzellen vor und diese Rezeptoren sind wirksam von den abzielenden Krebs-Chemotherapeutika und bilderzeugenden Mitteln, die außerhalb des Darmtrakts verabreicht werden, durch die Darmschleimhautbarriere isoliert. Daher können die konjugierten Verbindungen der vorliegenden Erfindung auf metastasierende kolorektale Zellen gerichtet sein, indem derartige Verbindungen außerhalb des Darmtrakts, wie zum Beispiel durch Verabreichen von pharmazeutischen Zusammensetzungen, die die konjugierten Verbindungen umfassen, in das Kreislaufsystem eingeführt werden.

[0056] Ein Durchschnittsfachmann kann ohne weiteres Individuen identifizieren, die unter dem Verdacht stehen, an kolorektalem Krebs und metastasierenden kolorektalen Zellen zu leiden. Bei den Individuen, bei denen kolorektaler Krebs diagnostiziert wurde, ist es eine Standardtherapie, Metastasen zu vermuten und es wird aggressiv versucht, metastasierende Zellen auszurotten. Die vorliegende Erfindung stellt pharmazeutische Zusammensetzungen und Verfahren zur Bilderzeugung und dadurch zur genaueren Metastasendiagnose zur Verfügung. Weiterhin stellt die vorliegende Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen zur Verfügung, umfassend therapeutische Mittel und Verfahren zum spezifischen Targeting und Beseitigung metastasierender kolorektaler Krebszellen. Weiterhin stellt die vorliegende Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen zur Verfügung, die Therapeutika und Verfahren zur spezifischen Beseitigung kolorektaler Krebszellen umfassen.

[0057] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen, die konjugierte Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung umfassen, können zur Diagnose oder zur Behandlung von Individuen verwendet werden, die an lokalisierten kolorektalen Tumoren, die primäre oder nicht-metastatische kolorektale Tumore sind, leiden, wenn diese durch die Grundmembran, die der Schleimhaut zugrunde liegt, in die Submukosa eingedrungen sind, wo es eine reichliche Blutversorgung gibt, zu der sie Zugang haben. Das Eindringen in die Submukosa umgeht die Schleimhautbarriere, was zu der Fähigkeit von konjugierten Zusammensetzungen, die in das Kreislaufsystem eingeführt worden waren, führt, auf diese Tumore einzuwirken.

[0058] Die vorliegende Erfindung ist auf die Verwendung eines ST-Rezeptor-Bindungsanteils in einer konjugierten Zusammensetzung angewiesen. Der ST-Rezeptor-Bindungsanteil ist im Wesentlichen ein Teil der konjugierten Zusammensetzung, der als Ligand für den ST-Rezeptor wirkt und daher spezifisch an diese Rezeptoren bindet. Die konjugierte Zusammensetzung umfasst ebenfalls einen wirksamen Anteil, der mit dem ST-Rezeptor-Bindungsanteil verbunden ist, wobei der wirksame Anteil ein wirksames Mittel ist, das entweder zur Bilderzeugung, zum Targeting, Neutralisieren oder Abtöten der Zelle verwendbar ist.

[0059] Entsprechend der vorliegenden Erfindung ist der ST-Rezeptor-Bindungsanteil der ST-Rezeptorligandteil einer konjugierten Zusammensetzung. In einigen Ausführungsformen kann der ST-Rezeptorligand natives ST sein.

[0060] Natives ST wurde aus einer Vielzahl von Organismen, einschließlich E. coli, Yersinia, Enterobacter und anderen isoliert. In der Natur sind die Toxine im Allgemeinen auf einem Plasmid kodiert, das zwischen verschiedenen Spezies „springen" kann. Von mehrere verschiedenen Toxinen wurde berichtet, dass sie in verschiedenen Spezies vorkommen. Diese Toxine besitzen alle eine signifikante Sequenzhomologie, sie binden alle an ST-Rezeptoren und sie alle aktiveren Guanylatcyclase, unter Erzeugung von Diarrhoe.

[0061] ST wurde sowohl kloniert als auch durch chemische Techniken synthetisiert. Die klonierten oder synthetischen Moleküle zeigen Bindungscharakteristiken, die ähnlich zu denjenigen von nativem ST sind. Aus E. coli isoliertes natives ST weist eine Länge von 18 oder 19 Aminosäuren auf. Das kleinste ST-„Fragment", das eine Aktivität behält, ist das Kernpeptid mit 13 Aminosäuren, das sich zum Carboxyende hin von Cystein 6 bis Cystein 18 erstreckt (von der Form mit 19 Aminosäuren). Analoga von ST wurden durch Klonieren und durch chemische Techniken erzeugt. Kleine Peptidfragmente der nativen ST-Struktur, die die strukturelle Determinante beinhaltet, die die Bindungsaktivität verleiht, können aufgebaut werden.

[0062] SEQ ID Nr: 1 offenbart eine Nukleotidsequenz, die ein ST mit 19 Aminosäuren, bezeichnet mit ST Ia, kodiert, das von So und McCarthy (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4011 beschrieben wurde, auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird.

[0063] Die Aminosäuresequenz von ST Ia ist in der SEQ ID Nr: 2 offenbart.

[0064] SEQ ID Nr: 3 offenbart die Aminosäuresequenz eines Peptids mit 18 Aminosäuren, das ST-Aktivität zeigt, mit ST I* bezeichnet ist und das von Chan und Giannella (1981) J. Biol. Chem. 256: 7744 beschrieben wurde, auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird.

[0065] SEQ ID Nr: 4 offenbart eine Nukleotidsequenz, die ein ST mit 19 Aminosäuren, bezeichnet mit ST Ib, kodiert, das von Mosely et al. (1983) Infect. Immun. 39: 1167 beschrieben wurde, auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird.

[0066] Die Aminosäuresequenz von ST Ib ist in der SEQ ID Nr: 5 offenbart.

[0067] Ein Peptid mit 15 Aminosäuren, genannt Guanylin, das eine Sequenzhomologie mit ST von 50% auf-

weist, wurde im Darm von Säugetieren identifiziert (Currier, M. G. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 947–951, auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird). Guanylin bindet an ST-Rezeptoren und aktiviert Guanylatcyclase bei einem Gehalt, der ungefähr 10–100 mal geringer ist als bei nativem ST. Guanylin kann als ein Peptid mit 15 Aminosäuren im Darm nicht vorkommen, vielmehr ist es Teil eines größeren Proteins in diesem Organ. Die Aminosäuresequenz von Guanylin aus Nagetieren ist als SEQ ID Nr: 6 offenbart.

[0068] SEQ ID Nr: 7 ist ein Fragment mit 18 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 2. SEQ ID Nr: 8 ist ein Fragment mit 17 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 2. SEQ ID Nr: 9 ist ein Fragment mit 16 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 2. SEQ ID Nr: 10 ist ein Fragment mit 15 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 2. SEQ ID Nr: 11 ist ein Fragment mit 14 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 2. SEQ ID Nr: 12 ist ein Fragment mit 13 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 2. SEQ ID Nr: 13 ist ein Fragment mit 18 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 2. SEQ ID Nr: 14 ist ein Fragment mit 17 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 2. SEQ ID Nr: 15 ist ein Fragment mit 16 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 2. SEQ ID Nr: 16 ist ein Fragment mit 15 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 2. SEQ ID Nr: 17 ist ein Fragment mit 14 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 2.

[0069] SEQ ID Nr: 18 ist ein Fragment mit 17 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 3. SEQ ID Nr: 19 ist ein Fragment mit 16 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 3. SEQ ID Nr: 20 ist ein Fragment mit 15 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 3. SEQ ID Nr: 21 ist ein Fragment mit 14 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 3. SEQ ID Nr: 22 ist ein Fragment mit 13 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 3. SEQ ID Nr: 23 ist ein Fragment mit 17 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 3. SEQ ID Nr: 24 ist ein Fragment mit 16 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 3. SEQ ID Nr: 25 ist ein Fragment mit 15 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 3. SEQ ID Nr: 26 ist ein Fragment mit 14 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 3.

[0070] SEQ ID Nr: 27 ist ein Fragment mit 18 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 5. SEQ ID Nr: 28 ist ein Fragment mit 17 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 5. SEQ ID Nr: 29 ist ein Fragment mit 16 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 5. SEQ ID Nr: 30 ist ein Fragment mit 15 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 5. SEQ ID Nr: 31 ist ein Fragment mit 14 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 5. SEQ ID Nr: 32 ist ein Fragment mit 13 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 5. SEQ ID Nr: 33 ist ein Fragment mit 18 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 5. SEQ ID Nr: 34 ist ein Fragment mit 17 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 5. SEQ ID Nr: 35 ist ein Fragment mit 16 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 5. SEQ ID Nr: 36 ist ein Fragment mit 15 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 5. SEQ ID Nr: 37 ist ein Fragment mit 14 Aminosäuren von SEQ ID Nr: 5.

[0071] SEQ ID Nr: 27, SEQ ID Nr: 31, SEQ ID Nr: 36 und SEQ ID Nr: 37 sind in Yoshimura, S., et al. (1985) FEBS Lett. 181: 138 offenbart, auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird.

[0072] SEQ ID Nr: 38, SEQ ID Nr: 39 und SEQ IDNr: 40, die Derivate von SEQ ID Nr: 3 sind, sind in Waldman, S. A. und O'Hanley, P. (1989) Infect Immun. 57: 2420 offenbart, auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird.

[0073] SEQ ID Nr: 41, SEQ ID Nr: 42, SEQ ID Nr: 43, SEQ ID Nr: 44 und SEQ ID Nr: 45, die Derivate von SEQ ID Nr: 3 sind, sind in Yoshimura, S., et al. (1985) FEBS Lett. 181: 138 offenbart, auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird.

[0074] SEQ ID Nr: 46 ist ein Peptid mit 25 Aminosäuren, das von Y. enterocolitica stammt und das an den ST-Rezeptor bindet.

[0075] SEQ ID Nr: 47 ist ein Peptid mit 16 Aminosäuren, das von V. cholerae stammt und das an den ST-Rezeptor bindet. SEQ ID Nr: 47 wird in Shimonishi, Y., et al. FEBS Lett. 215: 165 beschrieben, auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird.

[0076] SEQ ID Nr: 48 ist ein Peptid mit 18 Aminosäuren, das von Y. enterocolitica stammt und das an den ST-Rezeptor bindet. SEQ ID Nr: 48 wird in Okamoto, K., et al. Infec. Immun. 55: 2121 beschrieben, auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird.

[0077] SEQ ID Nr: 49 ist ein Derivat von SEQ ID Nr: 5.

[0078] SEQ ID Nr: 50, SEQ ID Nr: 51, SEQ ID Nr: 52 und SEQ ID Nr: 53 sind Derivate.

[0079] Die SEQ ID Nr: 54 ist die Aminosäuresequenz von menschlichem Guanylin.

[0080] In einigen bevorzugten Ausführungsformen umfassen konjugierte Verbindungen ST-Rezeptor-Bindungsanteile, die Aminosäuresequenzen umfassen, die aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3, SEQ ID Nr: 5–54 und Fragmenten und Derivaten davon, ausgewählt sind.

[0081] Ein Durchschnittsfachmann kann ohne weiteres Derivate mit im Wesentlichen identischen Aminosäuresequenzen der ST-Peptide mit Deletionen und/oder Insertionen und/oder konservativen Substitutionen der Aminosäuren entwerfen und herstellen. Zum Beispiel können entsprechend den als Dayhof-Regeln bezeichneten Regeln für die Aminosäuresubstitution (Dayhof, M. D. (1978) Nat. Biomed. Res. Found., Washington, D. C. Band 5, Supp. 3) Aminosäurereste in einer Peptidsequenz gegen vergleichbare Aminosäurereste ersetzt werden. Derartige Substitutionen sind gut bekannt und basieren auf den Ladungs- und Strukturcharakteristiken von jeder Aminosäure. Derivate umfassen Fragmente von ST-Rezeptor-bindenden Peptiden mit Deletionen und/oder Insertionen und/oder konservativen Substitutionen.

[0082] In einigen Ausführungsformen umfassen ST-Rezeptor-bindende Peptide D-Aminosäuren. Der Ausdruck „D-Aminosäurepeptide", wie er hier verwendet wird, soll sich auf ST-Rezeptor-bindende Peptide, Fragmente oder Derivate beziehen, die mindestens eine und vorzugsweise eine Vielzahl von D-Aminosäuren umfassen, die in der Lage sind, an den ST-Rezeptor zu binden. Die Verwendung von D-Aminosäurepeptiden ist erwünscht, das sie für einen Abbau weniger anfällig sind und daher eine längere Halbwertszeit aufweisen. D-Aminosäurepeptide, die größtenteils alle oder die bestehenden D-Aminosäuren umfassen, können Aminosäuresequenzen in umgekehrter Reihenfolge der Rezeptor-bindenden Peptide, die sich aus L-Aminosäuren zusammensetzen, umfassen.

[0083] In einigen Ausführungsformen sind ST-Rezeptor-bindenden Peptide, einschließlich D-AMiniosäurepeptide, in ihrer Konformation eingeschränkt, damit sie die geeignete strukturelle Konformation zum Binden an den ST-Rezeptor aufzeigen und beibehalten. Die Zusammensetzungen können zusätzliche Aminosäurereste, die zum Erreichen der geeigneten dreidimensionalen Konformation erforderlich sind, einschließlich Reste, die die Zirkularisierung oder gewünschte Faltung erleichtern, umfassen.

[0084] Es wird bevorzugt, dass der als ST-Rezeptor-Bindungsanteil verwendete ST-Rezeptorligand so klein wie möglich ist. Daher wird bevorzugt, dass der ST-Rezeptorligand ein kleines Peptid, mit vorzugsweise weniger als 25 Aminosäuren, besonders bevorzugt mit weniger als 20 Aminosäuren ist. In einigen Ausführungsformen weist der ST-Rezeptorligand, der den ST-Rezeptor-Bindungsanteil einer konjugierten Zusammensetzung bildet, weniger als 15 Aminosäuren auf. Als erfindungsgemäße ST-Bindungsanteile kann ein ST-Rezeptor-bindendes Peptid, umfassend weniger als 10 Aminosäuren und ein ST-Rezeptor-bindendes Peptid mit weniger als 5 Aminosäuren verwendet werden. Es liegt im Umfang der vorliegenden Erfindung, größere Moleküle einzubeziehen, die als ST-Rezeptor-Bindungsanteile dienen, einschließlich, jedoch nicht eingeschränkt auf Moleküle, wie zum Beispiel Antikörper, Fabs und F(Ab)2s, die spezifisch an den ST-Rezeptor binden.

[0085] Ein Assay kann zum Testen der Zusammensetzungen, zur Bestimmung, ob oder ob nicht sie ST-Rezeptorliganden sind, oder zum Testen konjugierter Zusammensetzungen, zur Bestimmung, ob sie eine ST-Rezeptor-Bindungsaktivität besitzen, verwendet werden. Derartige Zusammensetzungen, die spezifisch an ST-Rezeptoren binden, können durch einen Konkurrenzbindungsassay identifiziert werden. Der Konkurrenzbindungsassay ist eine Standardtechnik in der Pharmakologie, die leicht durch einen Durchschnittsfachmann unter Verwendung leicht verfügbarer Ausgangsmaterialien durchgeführt werden kann. Es wurde gezeigt, dass Konkurrenzbindungsassays, ST-Rezeptor-Bindungsassay zum Identifizieren von Zusammensetzungen, die spezifisch an ST-Rezeptoren binden, wirkungsvoll sind. Kurz gesagt, besteht der Assay aus dem Inkubieren eines Präparats von ST-Rezeptoren (zum Beispiel Darmmembranen aus einem Rattendarm, menschlichen Darm, T84-Zellen) mit einer konstanten Konzentration (1×10^{-10} M bis 5×10^{-10} M) an ^{125}I-ST (jeder ST-Rezeptorligand, wie zum Beispiel native STs SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 oder SEQ ID Nr: 5 kann verwendet werden) und einer bekannten Konzentration einer Testverbindung. Als Kontrolle werden genau gleiche Präparate von ST-Rezeptoren mit einer genau gleichen Konzentration an 125I-ST in Abwesenheit einer Testverbindung inkubiert. Die Assays werden bis zum Gleichgewicht (2 Stunden) inkubiert und die Menge an ^{125}I-ST, das an Rezeptoren gebunden ist, wird durch Standardtechniken quantitativ bestimmt. Die Fähigkeit der Testverbindung, an Rezeptoren zu binden, wird als deren Fähigkeit zum Verhindern des Bindens von (zur Konkurrenz mit) ^{125}I-ST gemessen. Daher wird es in Assays, die die Testverbindung enthalten, die an den Rezeptor bindet, weniger von der an die Rezeptoren gebundenen Radioaktivität geben. Dieser Assay, der zur Bestimmung der Fähigkeit eines jeden Moleküls zum Binden an ST-Rezeptoren geeignet ist, ist ein Standardkonkurrenzbindungsassay, der leicht von einem Durchschnittsfachmann unter Verwendung leicht verfügbarer Ausgangsmaterialien angewandt werden kann.

[0086] ST kann aus natürlichen Quellen unter Verwendung von Standardtechniken isoliert werden. Zusätzlich können ST-Rezeptor-bindende Peptide und konjugierte Zusammensetzungen oder Teile davon, die Peptide sind, routinemäßig durch jede der folgenden bekannten Techniken hergestellt werden.

[0087] ST-Rezeptor-bindende Peptide und konjugierte Zusammensetzungen oder Teile davon, die Peptide sind, können unter Verwendung der Festphasensynthesetechnik, die ursprünglich von Merrifield in J. Am. Chem. Soc., 15: 2149–2154 (1963) beschrieben wurde, hergestellt werden. Es können andere Peptidsynthesetechniken, wie zum Beispiel in Bodanszky et al., (1976) Peptid Synthesis, John Wiley & Sons, 2. Auflage, Kent und Clark-Lewis in Synthetic Peptides in Biology and Medicine, Seiten 295–358, Herausg. Alitalo, K., et al. Science Publishers, (Amsterdam, 1985), sowie andere dem Fachmann bekannte Arbeiten aus der Literatur gefunden werden. Eine Zusammenfassung von Peptidsynthesetechniken kann in J. Stuart und J. D. Young, Solid Phase Peptid Synthelia, Pierce Chemical Company, Rockford, IL (1984) gefunden werden, auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird. Die Synthese von Peptiden durch Lösungsverfahren, wie in The Proteins, Band II, 3. Auflage, Seiten 105–237, Neurath, H. et al., Herausg. Academic Press, New York, NY (1976) kann ebenfalls verwendet werden. Zur Verwendung in derartigen Synthesen geeignete Schutzgruppen werden in den vorstehenden Texten, sowie in J. F. W. McOmie, Protective Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, New York, NY (1973) gefunden, auf deren Offenbarungsgehalte hier vollumfänglich Bezug genommen wird. Im Allgemeinen betreffen diese synthetischen Verfahren die aufeinanderfolgende Zugabe von einem oder mehreren Aminosäureresten oder geeignet geschützten Aminosäureresten zu einer wachsenden Peptidkette. Normalerweise ist entweder die Amino- oder Carboxylgruppe des ersten Aminosäurerests durch eine geeignete selektiv entfernbare Schutzgruppe geschützt. Eine unterschiedliche selektiv entfernbare Schutzgruppe wird für Aminosäuren verwendet, die eine reaktive Seitengruppe, wie zum Beispiel Lysin enthalten.

[0088] Unter Verwendung einer Festphasesynthese als Beispiel, wird die geschützte oder derivatisierte Aminosäure an einen inerten festen Träger durch deren nicht geschützte Carboxyl- oder Aminogruppe gebunden. Die Schutzgruppe der Amino- oder Carboxylgruppe wird dann selektiv entfernt und die nächste Aminosäure in der Sequenz mit der komplementären (Amino- oder Carboxyl-) Gruppe wird geeignet geschützt dazu gemischt und mit dem schon an den festen Träger gebundenen Rest umgesetzt. Dann wird die Schutzgruppe der Amino- oder Carboxylgruppe von diesem neu addierten Aminosäurerest entfernt und die nächste (geeignete geschützte) Aminosäure dazugegeben, und so weiter. Nachdem alle gewünschten Aminosäuren in der richtigen Sequenz verknüpft worden sind, werden jegliche übrigen endständigen und Seitengruppenschutzgruppen (und der feste Träger) nacheinander oder gleichzeitig entfernt, um das endgültige Peptid zur Verfügung zu stellen. Die Peptide der Erfindung sind vorzugsweise ohne benzylierte oder methylbenzylierte Aminosäuren. Derartige Schutzgruppeneinheiten können im Verlauf der Synthese verwendet werden, jedoch werden sie vor der Verwendung der Peptide entfernt. Zusätzliche Reaktionen können notwendig sein, wie sie an anderer Stelle beschrieben sind, um intramolekulare Bindungen zu bilden oder die Konformation einzuschränken.

[0089] ST-Rezeptor-bindende Peptide und konjugierte Zusammensetzungen oder Teile davon, die Peptide sind, können ebenfalls durch rekombinante DNA-Techniken hergestellt werden. Die Bereitstellung einer das gewünschte Peptid kodierenden DNA-Sequenz erlaubt die Herstellung des Peptids unter Verwendung von Rekombinationstechniken, die mittlerweile aus dem Stand der Technik bekannt sind. Die kodierende Sequenz kann aus natürlichen Quellen erhalten werden oder synthetisiert oder auf andere Art unter Verwendung leicht erhältlicher Ausgangsmaterialen durch Routineverfahren hergestellt werden. Bei einer synthetischen Herstellung der kodierenden DNA können die bekannten Codonbevorzugungen des beabsichtigen Wirts, in dem die DNA exprimiert werden soll, ausgenutzt werden.

[0090] Zur Herstellung eines ST-Rezeptor-bindenden Peptids, das in der Natur vorkommt, erhält ein Durchschnittsfachmann unter Verwendung gut bekannter Techniken ein DNA-Molekül, das die ST-Rezeptor-bindenden Peptide kodiert, aus dem Genom des Organismus, der das ST-Rezeptor-bindende Peptid herstellt, und er inseriert dieses DNA-Molekül in einen kommerziell verfügbaren Expressionsvektor zur Verwendung in gut bekannten Expressionssystemen.

[0091] Ebenso kann ein Durchschnittsfachmann unter Verwendung gut bekannter Techniken ein DNA-Molekül kombinieren, das ein ST-Rezeptor-bindendes Peptid kodiert, wie zum Beispiel SEQ ID Nr: 1 und SEQ ID Nr: 4, und das von dem Genom des Organismus erhalten werden kann, der das ST herstellt, mit einer DNA, die ein Toxin, ein weiteres aktives Mittel, das ein Peptid ist, oder zusätzlich jegliche anderen Aminosäuresequenzen kodiert, von denen erwünscht ist, dass sie zu der Aminosäuresequenz des ST-Rezeptor-bindenden Peptids in einem einzigen Peptid benachbart sind, und er kann dieses DNA-Molekül in einen kommerziell verfügbaren Expressionsvektor zur Verwendung in gut bekannten Expressionssystemen inserieren.

[0092] Zum Beispiel kann das kommerziell verfügbare Plasmid pSE420 (Invitrogen, San Diego, CA) zur rekombinanten Herstellung in E. coli verwendet werden. Das kommerziell verfügbare Plasmid pYES2 (Invitrogen, San Diego, CA) kann zur Herstellung in S. cerevisiae-Hefestämmen verwendet werden. Das kommerziell verfügbare Max-Bac™ (Invitrogen, San Diego, CA) vollständige Baculovirus-Expressionssystem kann zur Herstellung in Insektenzellen verwendet werden. Das kommerziell verfügbare Plasmid pcDNA I (Invitrogen, San Diego, CA) kann zur Herstellung in Säugetierzellen, wie zum Beispiel die Eierstockzellen des chinesischen Hamsters verwendet werden.

[0093] Der Durchschnittsfachmann kann diese oder andere kommerziell erhältlichen Expressionsvektoren und Systeme verwenden oder Vektoren unter Verwendung gut bekannter Verfahren und leicht verfügbarer Ausgangsmaterialien herstellen. Die Expressionssysteme, die die erforderlichen Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Promotoren und Polyadenylierungssignale, und vorzugsweise Verstärker enthalten, sind leicht verfügbar und aus dem Stand der Technik für eine Vielzahl von Wirten bekannt. Siehe zum Beispiel Sambrook et al., Molecular Cloning a Laboratory Manual, zweite Auflage, Cold Spring Harbor Press (1989). Daher können die gewünschten Proteine sowohl in prokaryotischen als auch eukaryotischen Systemen hergestellt werden, was zu einem Spektrum an verarbeiteten Formen des Proteins führt.

[0094] Das üblichste verwendete prokaryotische System bleibt E. coli, obwohl andere Systeme, wie zum Beispiel B. subtilis und Pseudomonas ebenfalls verwendbar sind. Geeignete Kontrollsequenzen für prokaryotische Systeme umfassen sowohl konstitutive als auch induzierbare Promotoren, einschließlich des lac-Promotors, trp-Promotors, Hybridpromotoren, wie zum Beispiel der tac-Promotor, der lambda-Phagen P1-Promotor. Im Allgemeinen können fremde Proteine in diesen Wirten entweder als Fusions- oder gereifte Proteine hergestellt werden. Werden die gewünschten Sequenzen als gereifte Proteine hergestellt, kann der hergestellten Sequenz ein Methionin vorausgehen, das nicht notwendigerweise wirksam entfernt wurde. Dementsprechend kann den hier beanspruchten Peptiden und Proteinen bei der Herstellung in Bakterien N-endständiges Met vorausgehen. Überdies können Konstrukte hergestellt werden, wobei der Kodierungssequenz für das Peptid ein verfügbares Signalpeptid vorausgeht, das zur Absonderung des Proteins führt. Bei einer Herstellung in prokaryotischen Wirten auf diese Weise, wird die Signalsequenz nach der Absonderung entfernt.

[0095] Eine große Vielzahl an eukaryotischen Wirten ist nun ebenfalls zur Herstellung rekombinanter fremder Proteine verfügbar. Wie in Bakterien können eukaryotische Wirte mit Expressionssystemen transformiert werden, die das gewünschte Protein direkt herstellen, jedoch werden allgemeinere Signalsequenzen zur Verfügung gestellt, um die Sekretion des Proteins zu bewirken. Eukaryotische Systeme weisen den zusätzlichen Vorteil auf, dass sie in der Lage sind, Intronen zu verarbeiten, die in den Proteine kodierenden genomischen Sequenzen höherer Organismen vorkommen können. Eukaryotische Systeme stellten ebenfalls eine Vielzahl von Verarbeitungsmechanismen zur Verfügung, die zum Beispiel zur Glycosylierung, Carboxy-endständigen Amidierung, Oxidation oder zur Derivatisierung bestimmter Aminosäurereste, Konformationskontrolle und so weiter führen.

[0096] Übliche verwendete eukaryotische Systeme umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf Hefe, Pilzzellen, Insektenzellen, Säugetierzellen, Vogelzellen und Zellen höherer Pflanzen. Es sind geeignete Promotoren, die zur Verwendung in jedem dieser Wirtstypen kompatibel und verfügbar sind, sowie auch Terminationssequenzen und Verstärker, wie zum Beispiel der Baculovirus-Polyederpromotor, verfügbar. Wie vorstehend können die Promotoren entweder konstitutiv oder induzierbar sein. Zum Beispiel kann in Säugetiersystemen der Maus-Metallthionenpromotor durch die Zugabe von Schwermetallionen induziert werden.

[0097] Die Besonderheiten zum Aufbau der für die gewünschten Wirte geeigneten Expressionssysteme sind dem Fachmann bekannt. Für die rekombinante Herstellung des Proteins wird die das Protein kodierende DNA geeignet in den gewählten Expressionsvektor ligiert und dann zur Transformation des kompatiblen Wirts verwendet, der dann kultiviert und unter Bedingungen gehalten wird, unter denen die Expression des fremden Gens stattfindet. Das somit hergestellte Protein der vorliegenden Erfindung wird aus der Kultur entweder durch Lysieren der Zellen oder aus dem Kulturmedium rückgewonnen, wie es geeignet und dem Fachmann bekannt ist.

[0098] Ein Durchschnittsfachmann kann unter Verwendung gut bekannter Techniken das hergestellte Protein isolieren.

[0099] Entsprechend der vorliegenden Erfindung kann der wirksame Anteil ein therapeutisches Mittel oder ein bilderzeugendes Mittel sein. Ein Durchschnittsfachmann kann leicht die Vorteile dafür erkennen, dass er in der Lage ist, einen ST-Rezeptorliganden spezifisch auf metastasierende kolorektale Zellen zu richten und einen

derartigen Liganden mit vielen verschiedenen wirksamen Mitteln zu konjugieren.

[0100] Chemotherapeutika, die als wirksame Anteile verwendbar sind und die bei Konjugation an einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil spezifisch an metastasierende kolorektale Zellen abgegeben werden, sind typischerweise kleine chemische Einheiten, die durch chemische Synthese hergestellt werden. Chemotherapeutika umfassen zytotoxische und zytostatische Arzneimittel. Chemotherapeutika können diejenigen, die andere Wirkungen auf die Zellen aufweisen, wie zum Beispiel die Umkehrung des transformierten Zustands zu einem differenzierten Zustand oder diejenigen, die die Zellreplikation hemmen, umfassen. Beispiele von Chemotherapeutika umfassen allgemein zytotoxische oder zytostatische Arzneimittel, wie zum Beispiel Methotrexat (Amethopterin), Doxorubicin (Adrimycin), Daunorubicin, Cytosinarabinosid, Etoposid, 5-Fluoruracil, Melphalan, Chlorambucilund andere Sticksoffsenfe (zum Beispiel Cyclophosphamid), cis-Platin, Vindesin (und andere Vincaalkaloide), Mitomycin und Bleomycin. Andere Chemotherapeutika umfassen: Purothionin (Gerstenmehloligopeptid), Macromomycin, 1,4-Benzochinonderivate und Trenimon.

[0101] Toxine sind als wirksame Anteile verwendbar. Wenn ein Toxin an einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil konjugiert ist, wird die konjugierte Zusammensetzung spezifisch an eine metastasierende kolorektale Zelle über den ST-Rezeptor-Bindungsanteil abgegeben und der Toxinanteil tötet die Zelle. Toxine sind im Allgemeinen komplexe toxische Produkte von verschiedenen Organismen, einschließlich Bakterien, Pflanzen, usw. Beispiele von Toxinen umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf Ricin, Ricin A-Kette (Ricintoxin), Pseudomonas Exotoxin (PE), Diphtherietoxin (DT), Clostridium perfringens Phospholipase C, Rinderpankreasribonukleoase (BPR), antivirales Kermesbeere („pokeweed")-Protein, Abrin, Abrin A-Kette, Kobra-Giftfaktor (CVF), Gelonin (GEL), Saporin (SAP), Modeccin, Viscumin und Volkensin. Wie vorstehend erörtert, können, bei Verwendung von Toxinen mit ST-Rezeptorbindenden Peptiden, konjugierte Zusammensetzungen unter Verwendung rekombinanter DNA-Techniken hergestellt werden. Kurz gesagt, kann ein rekombinantes DNA-Molekül aufgebaut werden, das sowohl den ST-Rezeptorliganden als auch das Toxin auf einem chimären Gen kodiert. Wird das Chimäre Gen exprimiert, wird ein Fusionsprotein hergestellt, das einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteill umfast. Proteintoxine sind zur Bildung von konjugierten Verbindungen mit ST-Rezeptor-bindenden Peptiden über nicht Peptidylbindungen ebenfalls verwendbar.

[0102] Weiterhin gibt es andere Methoden zur Verwendung wirksamer Mittel zur Behandlung von Krebs. Zum Beispiel können konjugierte Zusammensetzungen hergestellt werden, die einen ST-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteil, der ein wirksames Enzym ist, umfassen. Der ST-Bindungsanteil lokalisiert die konjugierte Zusammensetzung spezifisch auf die Tumorzellen. Dem Patienten wird ein nicht wirksames Proarzneimittel verabreicht, das durch das Enzym in ein wirksames Arzneimittel umgewandelt werden kann. Das Proarzneimittel wird nur durch das Enzym, das auf dem Tumor lokalisiert ist, zu einem wirksamen Arzneimittel umgewandelt. Ein Beispiel eines Enzym/Proarzneimittel-Paars umfasst alkalische Phosphatase/Etoposidphosphat. In einem solchen Fall ist die alkalische Phosphatase an einen ST-Rezeptor-bindenden Liganden konjugiert. Die konjugierte Verbindung wird verabreicht und lokalisiert auf der metastasierenden Zelle. Mit dem Kontakt mit Etoposidphosphat (dem Proarzneimittel) wird das Etoposidphosphat zu Etoposid, einem chemotherapeutischen Arzneimittel, das von der Krebszelle aufgenommen wird, umgewandelt.

[0103] Radiosensibilisierungsmittel sind Substanzen, die die Empfindlichkeit der Zellen gegen Strahlung erhöhen. Beispiele von Radiosensibilisierungsmitteln umfassen Nitroimidazole, Metronidazol und Misonidazol (siehe: DeVita, V. T. Jr. in Harrison's Principles of Intemal Medicine, Seite 68, McGraw-Hill Book Co., N. Y. 1983, auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird). Die konjugierte Verbindung, die ein Radiosensibilisierungsmittel als den wirksamen Anteil umfasst, wird verabreicht und lokalisiert auf der metastasierenden Zelle. Wenn das Individuum einer Strahlung ausgesetzt wird, wird das Radiosensibilisierungsmittel „angeregt" und verursacht den Tod der Zelle.

[0104] In pharmazeutischen Zusammensetzungen können Radionuklide verwendet werden, die zur Radiotherapie oder für Bilderzeugungsverfahren verwendbar sind.

[0105] Beispiele für Radionuklide, die als Toxine in der Strahlentherapie verwendbar sind, umfassen: ^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{90}Y, ^{109}Pd, ^{123}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{199}Au, ^{211}At, ^{212}Pb und ^{212}B. Andere Radionuklide, die von einem Durchschnittsfachmann verwendet worden sind, umfassen: ^{32}P und ^{33}P, ^{71}Ge, ^{77}As, ^{103}Pb, ^{105}Rh, ^{111}Ag, ^{119}Sb, ^{121}Sn, ^{131}Cs, ^{143}Pr, ^{161}Tb, ^{177}Lu, ^{191}Os, ^{193M}Pt, ^{197}Hg, die alle beta negativ und/oder Auger-Emitter sind. Einige bevorzugte Radionuklide umfassen: ^{90}Y, ^{131}I, ^{211}At und ^{212}Pb/^{212}Bi.

[0106] Entsprechend der vorliegenden Erfindung können die wirksamen Anteile bilderzeugende Mittel sein. Bilderzeugende Mittel sind brauchbare diagnostische Verfahren, als auch die Verfahren, die zur Identifikation

der Stelle der metastasierenden Zellen verwendet werden. Die Bilderzeugung kann durch viele Verfahren durchgeführt werden, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind, und das in derartigen Verfahren verwendbare geeignete bilderzeugende Mittel kann an einen ST-Rezeptorliganden durch gut bekannte Mittel konjugiert werden. Die Abbildung kann zum Beispiel durch Radioszintigraphie, kernmagnetische Resonanzabbildung (MRI) oder durch Computertomographie (CT-Scan) durchgeführt werden. Die üblichsten angewandten bilderzeugenden Radionuklidmittel umfassen radioaktives Iod und Indium. Die Abbildung durch einen CT-Scan kann ein Schwermetall, wie zum Beispiel Eisenchelate verwenden. MRI-Scannen kann Chelate von Gadolinium oder Mangan verwenden. Weiterhin kann die Positronenemissionstomographie (PET) unter Verwendung von Positronenemittern des Sauerstoffs, Stickstoffs, Eisens, Kohlenstoffs oder Galliums möglich sein. Beispiele von Radionukliden, die in bilderzeugenden Verfahren verwendbar sind, umfassen: ^{43}K, ^{52}Fe, ^{57}Co, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{77}Br, ^{81}Rb/^{81M}Kr, ^{87M}Sr, ^{99M}Tc, ^{111}In, ^{113M}In, ^{123}I, ^{125}I, ^{127}Cs, ^{129}Cs, ^{131}I, ^{132}I, ^{197}Hg, ^{203}Pb und ^{206}Bi.

[0107] Es wird bevorzugt, dass die konjugierten Zusammensetzungen nicht immunogen oder in einem sehr geringen Niveau immunogen sind. Dementsprechend wird bevorzugt, dass der ST-Rezeptor-Bindungsanteil ein kleines, schwach immunogenes oder nicht immunogenes Peptid oder ein Nicht-Peptid ist. Ebenso wird bevorzugt, dass der wirksame Anteil ein kleines, schwach immunogenes oder nicht immunogenes Peptid oder ein Nicht-Peptid ist. Es wurde gezeigt, dass natives ST, das ein kleines Peptid ist, schwach immunogen ist. (Siehe: Klipstein, F. A. et al. (1982) Infect. Immun. 37: 550–557, Giannella, R. A. et al. (1981) Infect. Immun. 33: 186, Burgess, M. N. et al. (1978) Infect. Immun. 21: 60, Evans, D. G. et al. (1973) Infect. Immun. 7: 873, Gyles, C. L. (1979) Ann. N. Y. Acad. Sci. 16: 314 und Sack, R. B. (1975) Ann. Rev. Microbiol. 29: 333.) Ähnliche Fragmente und Aminosäureersatzderivate von nativem ST sind schwach immunogen. Dementsprechend sind konjugierte Zusammensetzungen, die das gesamte oder ein Teil des nativen ST als einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfassen, im Allgemeinen in dem Maß schwach immunogen, in dem das native ST schwach immunogen ist.

[0108] ST-Rezeptorliganden werden an wirksame Mittel durch eine Vielzahl gut bekannter Techniken konjugiert, die leicht ohne übermäßiges Experimentieren durch den Durchschnittsfachmann durchgeführt werden können. Die zum Konjugieren des ST-Rezeptorliganden an das wirksame Mittel verwendete Technik hängt von der molekularen Natur des ST-Rezeptorliganden und des wirksamen Mittels ab. Nachdem der ST-Rezeptorligand und das wirksame Mittel unter Bildung eines einzelnen Moleküls konjugiert wurden, können Assays durchgeführt werden, um sicherzustellen, dass das konjugierte Molekül die Aktivitäten der Anteile behält. Der vorstehend beschriebene ST-Rezeptorbindungsassay kann unter Verwendung der konjugierten Verbindung durchgeführt werden, um zu testen, ob sie zur Bindung an den ST-Rezeptor in der Lage ist. Entsprechend kann die Aktivität des wirksamen Anteils unter Verwendung verschiedener Assays für jeden entsprechenden Typ des wirksamen Mittels getestet werden. Radionuklide behalten ihre Aktivität, das heißt ihre Radioaktivität ohne Rücksicht auf eine Konjugation. Was die wirksamen Mittel anbelangt, die Toxine, Arzneimittel und Targeting-Mittel sind, können Standardassays zum Aufzeigen der Aktivität von nicht konjugierten Formen dieser Verbindungen verwendet werden, um zu bestätigen, dass die Aktivität beibehalten wurde.

[0109] Die Konjugation kann direkt zwischen dem ST-Rezeptorliganden und dem wirksamen Mittel ausgeführt werden oder verbindende dazwischen liegende molekulare Gruppen können zwischen dem ST-Rezeptorliganden und dem wirksamen Mittel zur Verfügung gestellt werden. Vernetzungsmittel sind besonders zur Erleichterung der Konjugation brauchbar, indem sie Bindungsstellen für jeden Anteil zur Verfügung stellen. Vernetzungsmittel können zusätzliche molekulare Gruppen umfassen, die als Spacer zur Trennung der Anteile voneinander dienen, um eine gegenseitige Störung in der Aktivität der beiden Anteile zu verhindern.

[0110] In einigen bevorzugten Ausführungsformen ist das ST-Rezeptorligandpeptid SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3, SEQ ID Nr: 5–54 oder Fragmente oder Derivate davon. Es wurde beobachtet, dass die Konjugation an diese Moleküle vorzugsweise am entsprechenden Aminoende von jedem Peptid durchgeführt wird. In den ST-Rezeptorligandpeptiden, die D-Aminosäuresequenzen in der umgekehrten Reihenfolge, wie SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3, SEQ ID Nr: 5–54 umfassen, wird die Konjugation vorzugsweise am Carboxyende durchgeführt.

[0111] Ein Durchschnittsfachmann kann ein ST-Rezeptorligandpeptid an ein chemotherapeutisches Arzneimittel unter Verwendung gut bekannter Techniken konjugierten. Zum Beispiel lehrt Magerstadt, M. Antibody Conjugates and Malignant Disease. (1991) CRC Press, Boca Raton, USA, Seiten 110–152), auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird, die Konjugation verschiedener zytostatischer Arzneimittel an Aminosäuren von Antikörpern. Derartige Reaktionen können zur Konjugation von chemotherapeutischen Arzneimitteln an ST-Rezeptorliganden, einschließlich ST-Rezeptor-bindende Peptide, mit einem geeigneten Linker angewandt werden- ST-Rezeptorliganden, die eine freie Aminogruppe aufweisen, wie zum Beispiel ST-Rezeptor-bindende Peptide, können an wirksame Mittel als diese Gruppe konjugiert werden. Die

meisten derzeitig zur Behandlung von Krebs verwendeten chemotherapeutischen Mittel besitzen funktionelle Gruppen, die einer chemischen Vernetzung direkt mit Proteinen zugänglich sind. Zum Beispiel sind freie Aminogruppen auf Methotrexat, Doxorubicin, Daunorubicin, Cytosinarabinosid, cis-Platin, Vindesin, Mitomycin und Bleomycin verfügbar, während freie Carboxylgruppen auf Methotrexat, Melphalan und Chlorambucil verfügbar sind. Diese funktionellen Gruppen, das heißt, die freien Amino- und Carbonsäuren, sind Ziele für eine Vielzahl von homobifunktionellen und heterobifunktionellen chemischen Vernetzungsmittels, die diese Arzneimittel direkt an die einzige freien Aminogruppe von ST vernetzen können. Zum Beispiel wendet ein Verfahren zum Vernetzen von ST-Rezeptorliganden, die eine freie Aminogruppe aufweisen, wie zum Beispiel ST-Rezeptor-bindende Peptide, wie zum Beispiel SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3, SEQ ID Nr: 5–54, an wirksame Mittel mit einer freien Aminogruppe, wie zum Beispiel Methotrexat, Doxorubicin, Daunorubicin, Cytosinarabinosid, cis-Platin, Vindesin, Mitomycin und Bleomycin oder alkalische Phosphatase oder Protein- oder Peptid basierendes Toxin, homobifunktionelle Succinimidylester, vorzugsweise mit Kohlenstoffkettenspacern, wie zum Beispiel Disuccinimidylsuberat an (Pierce Co., Rockford, IL). Für den Fall, dass eine spaltbare konjugierte Verbindung erforderlich ist, würde dasselbe Protokoll unter Verwendung von 3,3'-Dithiobis(sulfosuccinimidylpropionat, Pierce Co.) angewandt werden.

[0112] Zum Konjugieren eines ST-Rezeptorligandpeptids an ein auf einem Peptid basierenden wirksamen Mittel kann der ST-Rezeptorligand und das Toxin als ein einzelnes Fusionsprotein entweder durch eine Standardpeptidsynthese oder durch rekombinante DNA-Technologie hergestellt werden, wobei beide routinemäßig von dem Durchschnittsfachmann durchgeführt werden können. Alternativ dazu können zwei Peptide, das ST-Rezeptorligandpeptid und das auf einem Peptid basierende Toxin hergestellt und/oder als getrennte Peptide isoliert und unter Verwendung von Vernetzungsmitteln konjugiert werden. Wie bei konjugierten Zusammensetzungen, die chemotherapeutische Arzneimittel enthalten, kann die Konjugation von ST-Rezeptorbindenden Peptiden und Toxinen die Fähigkeit zur Modifikation der einzelnen freien Aminogruppe eines ST-Rezeptor-bindenden Peptids ausnutzen, während die Rezeptor-Bindungsfunktion dieses Moleküls erhalten bleibt.

[0113] Ein Durchschnittsfachmann kann ein ST-Rezeptorligandpeptid an ein Radionuklid unter Verwendung gut bekannter Techniken konjugieren. Beispielsweise lehren Magerstadt, M. (1991) Antibody Conjugates And Malignant Disease, CRC Press, Boca Raton, FLA, und Barchel, S. W. und Rhodes, B. H., (1983) Radioimaging and Radiotherapie, Elsevier, NY, NY, auf deren Offenbarungsgehalte hier vollumfägnlich Bezug genommen wird, die Konjugation von verschiedenen therapeutischen und diagnostischen Radionukliden an Aminosäuren von Antikörpern. Derartige Reaktionen können zum Konjugieren von Radionukliden an ST-Rezeptorligandpeptide oder an ST-Rezeptorliganden, einschließlich ST-Rezeptorligandpeptiden, mit einem geeigneten Linker angewandt werden.

[0114] Die vorliegende Erfindung stellt pharmazeutische Zusammensetzungen zur Verfügung, die die konjugierten Verbindungen der Erfindung und pharmazeutisch verträgliche Träger oder Verdünnungsmittel umfassen. Die pharmazeutische Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung kann von dem Durchschnittsfachmann formuliert werden. Geeignete pharmazeutische Träger sind in Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, ein Standardnachschlagewerk auf diesem Gebiet, auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird, beschrieben. Zur Ausführung der Verfahren der vorliegenden Erfindung können die konjugierten Verbindungen der vorliegenden Erfindung allein oder in Kombination mit anderen diagnostischen, therapeutischen oder zusätzlichen Mitteln verwendet werden. Derartige zusätzliche Mittel umfassen Arzneimittelträger, wie zum Beispiel Farbmittel, Stabilisatoren, osmotische Mittel und antibakterielle Mittel.

[0115] Die konjugierten Zusammensetzungen der Erfindung können zum Beispiel als eine Lösung, Suspension oder Emulsion in Verbindung mit einem pharmazeutisch verträglichen parenteralen Vehikel formuliert sein. Beispiele für derartige Vehikel sind Wasser, Salzlösung, Ringers Lösung, Dextroselösung und 5% menschliches Serumalbumin. Es können ebenfalls Liposomen verwendet werden. Das Vehikel kann Zusatzstoffe enthalten, die die Isotonizität (zum Beispiel Natriumchlorid, Mannitol) und chemische Stabilität (zum Beispiel Puffer und Konservierungsstoffe) erhalten. Die Formulierung wird durch üblicherweise verwendete Techniken sterilisiert. Zum Beispiel wird eine zur Verabreichung über Injektion geeignete parenterale Zusammensetzung durch Auflösen von 1,5 Gewichts-% eines wirksamen Bestandteils in 0,9% Natriumchloridlösung hergestellt.

[0116] Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen können entweder als eine einzelne Dosis oder in mehrfachen Dosen verabreicht werden. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können entweder als individuelle therapeutische Mittel oder in Kombination mit anderen therapeutischen Mitteln verabreicht werden. Die Behandlungen der vorliegenden Erfindung können mit herkömm-

lichen Therapien kombiniert werden, die aufeinanderfolgend oder gleichzeitig verabreicht werden können.

[0117] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können durch Mittel verabreicht werden, die es der konjugierten Zusammensetzung ermöglichen, die Zielzellen zu erreichen. In einigen Ausführungsformen umfassen die Verabreichungswege diejenigen, die aus der Gruppe, bestehend aus intravenöser, intraarterieller, intraperitonealer, lokaler Verabreichung in die Blutversorgung des Organs, in dem der Tumor liegt, oder direkt in den Tumor selbst, ausgewählt sind. Die intravenöse Verabreichung ist bevorzugte Art der Verabreichung. Sie kann mit Hilfe einer Infusionspumpe ausgeführt werden.

[0118] Die verabreichte Dosierung variiert in Abhängigkeit von Faktoren, wie der Natur des wirksamen Anteils, der Natur der konjugierten Zusammensetzung, pharmakodynamischen Charakteristiken, der Art und des Weges der Verabreichung, Alter, Gesundheit und Gewicht des Empfängers, Natur und Ausmaß der Symptome, Art der parallel ablaufenden Behandlung und Häufigkeit der Behandlung.

[0119] Da die konjugierten Verbindungen spezifisch auf Zellen mit ST-Rezeptoren gerichtet sind, werden konjugierte Verbindungen, die Chemotherapeutika oder Toxine umfassen, in Dosen verabreicht, die geringer sind als diejenigen, die bei der Verabreichung der Chemotherapeutika oder Toxine als nicht konjugierte wirksame Mittel verwendet werden, vorzugsweise in Dosen, die bis zu 100 mal weniger an wirksamem Mittel enthalten. In einigen Ausführungsformen werden konjugierte Verbindungen, die Chemotherapeutika oder Toxine umfassen, in Dosen verabreicht, die 10–100 mal weniger an wirksamem Mittel als wirksamen Anteil enthalten, als die Dosierung von Chemotherapeutika oder Toxinen, die als nicht konjugierte wirksame Mittel verabreicht werden. Zur Bestimmung der geeigneten Dosis wird die Menge der Verbindung vorzugsweise in Mol anstelle von Gewicht gemessen. Auf diese Weise beeinflusst das variable Gewicht verschiedener ST-Bindungsanteile nicht die Berechnung. Unter der Annahme eines eins zu eins Verhältnisses an ST-Bindungsanteil zu wirksamem Anteil in den konjugierten Zusammensetzungen der Erfindung können im Vergleich zu dem Molwert der verabreichten nicht konjugierten Verbindungen weniger Mol der konjugierten Verbindungen verabreicht werden, vorzugsweise bis zu einem 100 mal kleineren Molwert.

[0120] Typischerweise werden chemotherapeutische Konjugate in mehrfach aufgeteilten Dosen intravenös verabreicht.

[0121] Typischerweise wird bis zu 20 gm IV/Dosis Methotrexat in einer nicht konjugierten Form verabreicht. Bei Verabreichung von Methotrexat als wirksamen Anteil in einer konjugierten Verbindung der Erfindung, gibt es eine Verringerung der Dosis um das 10 bis 100-fache. Unter der Annahme, dass jede konjugierte Verbindung ein Molekül Methotrexat an einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil konjugiert umfaßt, ist daher von der Gesamtmenge an der verabreichten konjugierten Verbindung bis zu ungefähr 0,2 –2,0 g Methotrexat vorhanden daher verabreicht worden. In einigen Ausführungsformen ist von der Gesamtmenge an verabreichter konjugierter Verbindung bis zu ungefähr 200 mg–2 g Methotrexat vorhanden und daher verabreicht worden.

[0122] Methotrexat weist ein Molekulargewicht von 455 auf. Ein Mol des ST-Peptid-Methotrexatkonjugats wiegt zwischen ungefähr 1755–2955 in Abhängigkeit des verwendeten ST-Peptids. Der wirksame Dosisbereich für das ST-Peptid-Methotrexatkonjugate liegt zwischen ungefähr 10 bis 1000 mg. In einigen Ausführungsformen werden Dosierungen von 50 bis 500 mg ST-Peptid-Methotrexatkonjugat verabreicht. In einigen Ausführungsformen werden Dosierungen von 80 bis 240 mg ST-Peptid-Methotrexatkonjugat verabreicht.

[0123] Doxorubicin und Daunorubicin wiegen beide ungefähr 535. Daher weisen ST-Peptid-Doxorubicinkonjugate und ST-Peptid-Daunorubicinkonjugate jeweils Molekulargewichte zwischen ungefähr 1835–2553,5 auf. Angenommen, jede konjugierte Verbindung umfasst ein Molekül Doxorubicin oder Daunorubicin konjugiert an einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil, so liegt die wirksame Dosis für ein ST-Peptid-Doxorubicinkonjugat oder ein ST-Peptid-Daunorubicinkonjugat zwischen ungefähr 40 bis 4000 mg. In einigen Ausführungsformen werden Dosierungen von 100 bis 1000 mg ST-Peptid-Doxorubicinkonjugat oder ST-Peptid-Daunorubicinkonjugat verabreicht. In einigen Ausführungsformen werden Dosierungen von 200 bis 600 mg ST-Peptid-Doxorubicinkonjugat oder ST-Peptid-Daunorubicinkonjugat verabreicht.

[0124] Toxin-enthaltende konjugierte Verbindungen sind zur intravenösen Verabreichung formuliert. Unter Verwendung dieser Methode wurden bis zu 6 Nanomol/kg Körpergewicht Toxin als eine Einzeldosis mit merklichen therapeutischen Wirkungen bei Patienten mit Melanom verabreicht (Spitler L. E., et al. (1987) Cancer Res. 47: 1717). In einigen Ausführungsformen können bis zu ungefähr 11 Mikrogramm an ST-Peptid-Toxin konjugierter Verbindung/kg Körpergewicht zur Therapie verabreicht werden.

[0125] Angenommen, jede konjugierte Verbindung umfaßt ein Molekül Ricintoxin A-Kette, die an einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil konjugiert ist, so werden konjugierte Zusammensetzungen, umfassend eine Ricintoxin A-Kette in Doses verabreicht, in denen der Gewichtsanteil von Ricintoxin A-Kette 1–500 µg bezüglich des Gesamtgewichts der verabreichten konjugierten Verbindung beträgt. In einigen bevorzugten Ausführungsformen werden konjugierte Zusammensetzungen, umfassend Ricintoxin A-Kette, in Dosen verabreicht, in denen der Gewichtsanteil der Ricintoxin A-Kette 10–100 µg bezüglich des Gesamtgewichts der verabreichten konjugierten Verbindung beträgt. In einigen bevorzugten Ausführungsformen werden konjugierte Zusammensetzungen, umfassend Ricintoxin A-Kette, in Dosen verabreicht, in denen der Gewichtsanteil der Ricintoxin A-Kette 2–50 µg bezüglich des Gesamtgewichts der verabreichten konjugierten Verbindung beträgt. Das Molekulargewicht der Ricintoxin A-Kette beträgt 32000. Daher weist eine konjugierte Verbindung, die eine an ein ST-Peptid gebundene Ricin A-Kette enthält, ein Molekulargewicht von ungefähr 33300–34500 auf. Der Bereich von Dosen derartiger zu verabreichender konjugierter Verbindungen beträgt 1 bis 500 µg. In einigen Ausführungsformen werden 10 bis 100 µg derartiger konjugierter Verbindungen verabreicht. In einigen Ausführungsformen werden 20 bis 50 µg derartiger konjugierter Verbindungen verabreicht.

[0126] Angenommen, jede konjugierte Verbindung umfasst ein Molekül Diphtherietoxin A-Kette, die an einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil konjugiert ist, so werden konjugierte Zusammensetzungen, umfassend Diphtherietoxin A Kette, in Dosen verabreicht, in denen der Gewichtsanteil an der Diphtherietoxin A-Kette 1–500 µg bezüglich des Gesamtgewichts der verabreichten konjugierten Verbindung beträgt. In einigen bevorzugten Ausführungsformen werden konjugierte Zusammensetzungen, umfassend Diphtherietoxin A-Kette, in Dosen verabreicht, in denen der Gewichtsanteil der Diphtherietoxin A-Kette 10–100 µg bezüglich des Gesamtgewichts der verabreichten konjugierten Verbindung beträgt. In einigen bevorzugten Ausführungsformen werden konjugierte Zusammensetzungen, umfassend Diphtherietoxin A-Kette, in Dosen verabreicht, in denen der Gewichtsanteil der Diphtherietoxin A-Kette 40–80 µg bezüglich des Gesamtgewichts der verabreichten konjugierten Verbindung beträgt. Das Molekulargewicht der Diphtherietoxin A-Kette beträgt 66600. Daher weist eine konjugierte Verbindung, die eine an ein ST-Peptid gebundene Diphtherietoxin A-Kette enthält, ein Molekulargewicht von ungefähr 67900–69100 auf. Der Bereich von Dosen derartiger getesteter zu verabreichender konjugierter Verbindungen beträgt 1 bis 500 µg. In einigen Ausführungsformen werden 10 bis 100 µg derartiger konjugierter Verbindungen verabreicht. In einigen Ausführungsformen werden 40 bis 80 µg derartiger konjugierter Verbindungen verabreicht.

[0127] Angenommen, jede konjugierte Verbindung umfasst ein Molekül Pseudomonas Exotoxin, das an einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil gebunden ist, so werden konjugierte Zusammensetzungen, umfassend Pseudomonas Exotoxin, in Dosen verabreicht, in denen der Gewichtsanteil von Pseudomonas Exotoxin 0,01–100 µg bezüglich des Gesamtgewichts der verabreichten konjugierten Verbindung beträgt. In einigen Ausführungsformen werden konjugierte Verbindungen, umfassend Pseudomonas Exotoxin, in Dosen verabreicht, in denen der Gewichtsanteil von Pseudomonas Exotoxin 0,1–10 µg bezüglich des Gesamtgewichts der verabreichten konjugierten Verbindung beträgt. In einigen Ausführungsformen werden konjugierte Zusammensetzungen, umfassend Pseudomonas Exotoxin, in Dosen verabreicht, in denen der Gewichtsanteil von Pseudomonas Exotoxin 0,3–2,2 µg bezüglich des Gesamtgewichts der verabreichten konjugierten Verbindung beträgt. Das Molekulargewicht von Pseudomonas Exotoxin beträgt 22000. Daher weist eine konjugierte Verbindung, die eine an ein ST-Peptid gebundenes Pseudomonas Exotoxin enthält, ein Molekulargewicht von ungefähr 23300–24500 auf. Der Bereich von Dosen derartiger getesteter zu verabreichender konjugierter Verbindungen beträgt 0,01 bis 100 µg. In einigen Ausführungsformen werden 0,1 bis 10 µg derartiger konjugierter Verbindungen verabreicht. In einigen Ausführungsformen werden 0,3 bis 2,2 µg derartiger konjugierter Verbindungen verabreicht.

[0128] Für die Dosierung konjugierter Zusammensetzungen, umfassend ST-Rezeptor-Bindungsanteile, die an wirksame Anteile gebunden sind, die Radioisotope in als bilderzeugende Mittel verwendbaren pharmazeutischen Zusammensetzungen sind, wird angenommen, dass jeder ST-Rezeptor-Bindungsanteil an einen radioaktiv wirksamen Anteil gebunden ist. Die Menge an dem zu verabreichenden Radioisotop hängt von dem Radioisotop ab. Der Durchschnittsfachmann kann leicht die Menge an der zu verabreichenden konjugierten Verbindung, basierend auf der spezifischen Aktivität und Energie eines gegebenen als wirksamen Anteil verwendeten Radionuklids, formulieren. Typischerweise werden 0,1–100 Millicurie pro Dosis an bilderzeugendem Mittel, vorzugsweise 1–10 Millicurie, besonders häufig 2–5 Millicurie verabreicht. Daher umfassen erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzungen, die als bilderzeugende Mittel, die konjugierte Zusammensetzungen, umfassend einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen radioaktiv wirksamen Anteil, verwendbar sind, 0,1–100 Millicurie, in einigen Ausführungsformen vorzugsweise 1–10 Millicurie, in einigen Ausführungsformen vorzugsweise 2–5 Millicurie, in einigen Ausführungsformen besonders bevorzugt 1–5 Millicure. Beispiele von Dosierungen umfassen: ^{131}I = zwischen ungefähr 0,1–100 Millicurie pro Dosis, in einigen Ausführungs-

formen vorzugsweise 1–10 Millicurie, in einigen Ausführungsformen 2–5 Millicurie und in einigen Ausführungsformen ungefähr 4 Millicurie; ^{111}In = zwischen ungefähr 0,1–100 Millicurie pro Dosis, in einigen Ausführungsformen vorzugsweise 1–10 Millicurie, in einigen Ausführungsformen 1–5 Millicurie und in einigen Ausführungsformen ungefähr 2 Millicurie; ^{99m}Tc = zwischen ungefähr 0,1–100 Millicurie pro Dosis, in einigen Ausführungsformen vorzugsweise 5–75 Millicurie, in einigen Ausführungsformen 10–50 Millicurie und in einigen Ausführungsformen ungefähr 27 Millicurie. In Abhängigkeit von der spezifischen Aktivität des radioaktiv wirksamen Anteils und des Gewichts des ST-Rezeptor-Bindungsanteils variiert die auf das Gewicht bezogene Dosierung. ST-Peptide weisen Molekulargewichte zwischen ungefähr 1300–2500 auf. In der pharmazeutischen Zusammensetzung, umfassend ein ST-Peptid, das an ein einzelnes ^{131}I gebunden ist, und wobei die spezifische Aktivität des ^{131}I-ST-Peptids ungefähr 2000 Ci/mol beträgt, ist das Verabreichen der Dosis von 0,1–100 Millicurie äquivalent zu 0,1–100 µg ^{131}I-ST-Peptid, das Verabreichen der Dosis von 1–10 Millicurie äquivalent zu 1–10 µg ^{131}I-ST-Peptid, das Verabreichen der Dosis von 2–5 Millicurie äquivalent zur Gabe von 2–5 µg ^{131}I-ST-Peptid und das Verabreichen der Dosis von 1–5 Millicurie äquivalent zur Gabe von 1–5 µg ^{131}I-ST-Peptid. In der pharmazeutischen Zusammensetzung, umfassend ein ST-Peptid, das an ein einzelnes ^{111}In gebunden ist, in der die spezifische Aktivität des ^{111}In-ST-Peptids ungefähr 1 Ci/mmol beträgt, ist das Verabreichen der Dosis von 0,1–100 Millicurie äquivalent zu 0,2–200 mg ^{111}In-ST-Peptid, das Verabreichen der Dosis von 1–10 Millicurie äquivalent zu 2–20 mg ^{111}In-St-Peptid, das Verabreichen der Dosis von 2–5 Millicurie äquivalent zur Gabe von 4–10 mg ^{111}In-ST-Peptid und das Verabreichen der Dosis von 1–5 Millicurie äquivalent zur Gabe von 2–10 mg ^{111}In-ST-Peptid.

[0129] Für die Dosierung konjugierter Zusammensetzungen, umfassend ST-Rezeptor-Bindungsanteile, die an wirksame Anteile gebunden sind, die Radioisotope in als therapeutische Mittel verwendbaren pharmazeutischen Zusammensetzungen sind, wird angenommen, dass jeder ST-Rezeptor-Bindungsanteil an einen radioaktiv wirksamen Anteil gebunden ist. Die Menge an dem zu verabreichenden Radioisotop hängt von dem Radioisotop ab. Der Durchschnittsfachmann kann leicht die Menge an der zu verabreichenden konjugierten Verbindung, basierend auf der spezifischen Aktivität und Energie eines gegebenen als wirksamen Anteil verwendeten Radionuklids, formulieren. Für Therapeutika, die ^{131}I umfassen, sind zwischen 10–1000 nM, vorzugsweise 50–500, bevorzugter ungefähr 300 Nanomol ^{131}I an dem Tumor pro Gramm Tumor wünschenswert. Ist ungefähr 1 Gramm Tumor vorhanden und bindet ungefähr 0,1% der verabreichten Dosis an den Tumor, werden daher 0,5–100 mg der ^{131}I-ST-Peptid konjugierten Verbindung verabreicht. In einigen Ausführungsformen werden 1 bis 50 mg der ^{131}I-ST-Peptid konjugierten Verbindung verabreicht. In einigen Ausführungsformen werden 5 bis 10 mg der ^{131}I-ST-Peptid konjugierten Verbindung verabreicht. Wessels B. W. und R. D. Rogus (1984) Med. Phys. 11: 638 und Kwok, C. S. et al. (1985) Med. Phys. 12: 405, auf deren Offenbarungsgehalte hier vollumfänglich Bezug genommen wird, offenbaren ausführliche Berechnungen für diagnostische und therapeutische Konjugate, die in der Herstellung der pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung, die radioaktive konjugierte Verbindungen umfassen, verwendet werden können.

[0130] Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Behandlung von Individuen, von denen vermutet wird, dass sie an metastasierendem kolorektalen Krebs leiden. Derartige Individuen können behandelt werden, indem dem Individuum eine pharmazeutische Zusammensetzung verabreicht wird, die einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung umfasst, die einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteil umfasst, wobei der aktive Anteil ein radiostabiles therapeutisches Mittel ist. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung, die einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteil umfasst, wobei der wirksame Anteil ein radiostabiles wirksames Mittel ist und der ST-Rezeptor-Bindungsanteil ein Peptid ist. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung, die einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteil umfasst, wobei der wirksame Anteil ein radiostabiles wirksames Mittel ist und der ST-Rezeptor-Bindungsanteil aus der Gruppe, bestehend aus: SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3, SEQ ID Nr: 5–54 und Fragmenten und Derivaten davon, ausgewählt ist. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung, die einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteil umfasst, wobei der wirksame Anteil ein radiostabiles wirksames Mittel ist und der ST-Rezeptor-Bindungsanteil aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3, SEQ ID Nr: 5, SEQ ID Nr: 6 und SEQ ID Nr: 54 ausgewählt ist. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst die pharmazeutisch Zusammensetzung einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder ein Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung, die einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteil umfasst, wobei der wirksame Anteil ein radiostabiles therapeutisches Mittel ist. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung einen pharmazeutisch verträglichen

Träger oder Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung, die einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteil umfasst, wobei der wirksame Anteil ein radiostabiles wirksames Mittel ist, das aus der Gruppe, bestehend aus Methotrexat, Doxorubicin, Daunorubicin, Cytosinarabinosid, Etoposid, 5-Fuoruracil, Melphalan, Chlorambucil, cis-Platin, Vindesin, Mitomycin, Bleomycin, Purothionin, Macromycin, 1,4-Benzochinonderivate, Trenimon, Ricin, Ricin A-Kette, Pseudomonas Exotoxin, Diphtherietoxin, Clostridium perfringens Phospholipase C, Rinderpankreasribonuklease, antivirales Kermesbeere („pokeweed")-Protein, Abrin, Abrin A-Kette, Kobra-Giftfaktor, Gelonin, Saporin, Modeccin, Viscumin, Volkensin, alkalische Phosphatase, Nitroimidazol, Metronidazol und Misonidazol, ausgewählt ist. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung, die einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteil umfasst, wobei der ST-Rezeptor-Bindungsanteil aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3, SEQ ID Nr: 5–54 und Fragmenten und Derivaten davon, ausgewählt ist, und der wirksame Anteil ein radiostabiles wirksames Mittel ist, das aus der Gruppe, bestehend aus Methotrexat, Doxorubicin, Daunorubicin, Cytosinarabinosid, Etoposid, 5-Fuoruracil, Melphalan, Chlorambucil, cis-Platin, Vindesin, Mitomycin, Bleomycin, Purothionin, Macromycin, 1,4-Benzochinonderivate, Trenimon, Ricin, Ricin A-Kette, Pseudomonas Exotoxin, Diphtherietoxin, Clostridium perfringens Phospholipase C, Rinderpankreasribonuklease, antivirales Kermesbeere („pokeweed")-Protein, Abrin, Abrin A-Kette, Kobra-Giftfaktor, Gelonin, Saporin, Modeccin, Viscumin, Volkensin, alkalische Phosphatase, Nitroimidazol, Metronidazol und Misonidazol, ausgewählt ist. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung, die einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteil umfasst, wobei der wirksame Anteil ein radiostabiles wirksames Mittel ist, das aus der Gruppe, bestehend aus Methotrexat, Doxorubicin, Daunorubicin, Cytosinarabinosid, cis-Platin, Vindesin, Mitomycin und Bleomycin, alkalische Phosphatase, Ricin A-Kette, Pseudomonas Exotoxin und Diphtherietoxin, ausgewählt ist. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung, die einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteil umfasst, wobei der ST-Rezeptor-Bindungsanteil aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3, SEQ ID Nr: 5, SEQ ID Nr: 6 und SEQ ID Nr: 54, ausgewählt ist und der wirksame Anteil ein radiostabiles wirksames Mittel ist, das aus der Gruppe, bestehend aus Methotrexat, Doxorubicin, Daunorubicin, Cytosinarabinosid, cis-Platin, Vindesin, Mitomycin und Bleomycin, alkalische Phosphatase, Ricin A-Kette, Pseudomonas Exotoxin, und Diphtherietoxin, ausgewählt ist. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine radiostabile konjugierte Verbindung, wie in Beispiel 1 beschrieben ist. Dem behandelten Individuum kann die Diagnose gestellt werden, dass es einen metastasierenden kolorektalen Krebs aufweist, oder es kann ihm die Diagnose gestellt werden, dass es einen lokalisierten kolorektalen Krebs aufweist und es kann sich schon vorher der Behandlung unterziehen für den Fall, dass es etwas Metastasierung gibt, auch wenn sie noch nicht nachgewiesen ist. Die pharmazeutische Zusammensetzung enthält eine therapeutisch wirksame Menge der konjugierten Zusammensetzung. Eine therapeutisch wirksame Menge ist eine Menge, die die Verursachung einer zytotoxischen oder zytostatischen Wirkung auf die metastasierenden kolorektalen Krebszellen bewirkt, ohne tödliche Nebenwirkungen auf das Individuum zu verursachen.

[0131] Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Behandlung von Individuen, die unter dem Verdacht stehen, an metastasierendem kolorektalen Krebs zu leiden. Derartige Individuen können dadurch behandelt werden, dass dem Individuum eine pharmazeutische Zusammensetzung verabreicht wird, umfassend einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung, die einen ST-Rezeptorbindungsanteil und einen wirksamen Anteil umfasst, wobei der wirksame Anteil radioaktiv ist. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung, die einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteil umfasst, wobei der wirksame Anteil ein radioaktives Mittel ist und der ST-Rezeptor-Bindungsanteil ein Peptid ist. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung, die einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteil umfasst, wobei der wirksame Anteil ein radioaktives Mittel ist und der ST-Rezeptor-Bindungsanteil aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3, SEQ ID Nr: 5–54 und Fragmenten und Derivaten davon, ausgewählt ist. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung, die einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteil umfasst, wobei der wirksame Anteil ein radioaktives Mittel ist und der ST-Rezeptor-Bindungsanteil aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3, SEQ ID Nr: 5, SEQ ID Nr: 6 und SEQ ID Nr: 54, ausgewählt ist. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung einen phar-

mazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung, die einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteil umfasst, wobei der wirksame Anteil ein radioaktives Mittel ist, das aus der Gruppe, bestehend aus ^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{90}Y, ^{109}Pd, ^{123}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{199}Au, ^{211}At, ^{212}Pb, ^{212}B, ^{32}P und ^{33}P, ^{71}Ge, ^{77}As, ^{103}Pb, ^{105}Rh, ^{111}Ag, ^{119}Sb, ^{121}Sn, ^{131}Cs, ^{143}Pr, ^{161}Tb, ^{177}Lu, ^{191}Os, ^{193M}Pt und ^{197}Hg, ausgewählt ist. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung, die einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteil umfasst, wobei der ST-Rezeptor-Bindungsanteil aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3, SEQ ID Nr: 5–54 und Fragmenten und Derivaten davon, ausgewählt ist und der wirksame Anteil ein radioaktives Mittel ist, das aus der Gruppe, bestehend aus ^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{90}Y, ^{109}Pd, ^{123}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{199}Au, ^{211}At, ^{212}Pb, ^{212}B, ^{32}P und ^{33}P, ^{71}Ge, ^{77}As, ^{103}Pb, ^{105}Rh, ^{111}Ag, ^{119}Sb, ^{121}Sn, ^{131}Cs, ^{143}Pr, ^{161}Tb, ^{177}Lu, ^{191}Os, ^{193M}Pt, ^{197}Hg, ^{32}P und ^{33}P, ^{71}Ge, ^{77}As, ^{103}Pb, ^{105}Rh, ^{111}Ag, ^{119}Sb, ^{121}Sn, ^{131}Cs, ^{143}Pr, ^{161}Tb, ^{177}Lu, ^{191}Os, ^{193M}Pt, ^{197}Hg, die alle beta negativ und/oder Auger-Emitter sind, ausgewählt ist. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung, die einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteil umfasst, wobei der wirksame Anteil ein radioaktives Mittel ist, das aus der Gruppe, bestehend aus ^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{90}Y, ^{109}Pd, ^{123}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{199}Au, ^{211}At, ^{212}Pb, ^{212}B, ^{32}P Und ^{33}P, ^{71}Ge, ^{77}As, ^{103}Pb, ^{105}Rh, ^{111}Ag, ^{119}Sb, ^{121}Sn, ^{131}Cs, ^{143}Pr, ^{161}Tb, ^{177}Lu, ^{191}Os, ^{193M}Pt und ^{197}Hg, ausgewählt ist. In einigen Ausführungsformen umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung, die einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteil umfasst, wobei der ST-Rezeptor-Bindungsanteil aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3, SEQ ID Nr: 5, SEQ ID Nr: 6 und SEQ ID Nr: 54, ausgewählt ist und der wirksame Anteil ein radioaktives Mittel ist, das aus der Gruppe, bestehend aus ^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{90}Y, ^{109}Pd, ^{123}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{199}Au, ^{211}At, ^{212}Pb, ^{212}B, ^{32}P und ^{33}P, ^{71}Ge, ^{77}As, ^{103}Pb, ^{105}Rh, ^{111}Ag, ^{119}Sb, ^{121}Sn, ^{131}Cs, ^{143}Pr, ^{161}Tb, ^{177}Lu, ^{191}Os, ^{193M}Pt und ^{197}Hg, ausgewählt ist. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine radioaktive konjugierte Verbindung, die in Beispiel 1 beschrieben ist. Dem behandelten Individuum kann diagnostiziert werden, dass es metastasierenden kolorektalen Krebs aufweist, oder es kann bei ihm diagnostiziert werden, dass es lokalisierten kolorektalen Krebs aufweist und es kann sich schon vorher der Behandlung unterziehen für den Fall, dass es etwas Metastasierung gibt, auch wenn sie noch nicht nachgewiesen ist. Die pharmazeutische Zusammensetzung enthält eine therapeutisch wirksame Menge der konjugierten Zusammensetzung. Eine therapeutisch wirksame Menge ist eine Menge, die die Verursachung einer zytotoxischen oder zytostatischen Wirkung auf die metastasierenden kolorektalen Krebszellen bewirkt, ohne tödliche Nebenwirkungen auf das Individuum zu verursachen.

[0132] Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweisen durch Radioabbildung von metastasierenden kolorektalen Krebszellen in einem Individuum, das unter dem Verdacht steht, an metastasierendem kolorektalem Krebs zu leiden. Bei derartigen Individuen kann diagnostiziert werden, dass sie an metastasierendem kolorektalen Krebs leiden und die metastasierenden kolorektalen Krebszellen können nachgewiesen werden, indem dem Individuum, vorzugsweise durch intravenöse Verabreichung, eine pharmazeutische Zusammensetzung verabreicht wird, die einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung umfasst, die einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteil umfasst, wobei der wirksame Anteil ein radioaktives Mittel ist, und der Nachweis des Vorhandenseins einer lokalisierten Anhäufung oder Aggregation von Radioaktivität auf das Vorhandensein von Zellen mit ST-Rezeptoren hinweist. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung, die einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteil umfasst, wobei der wirksame Anteil ein radioaktives Mittel ist und der ST-Rezeptor-Bindungsanteil ein Peptid ist. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung, die einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteil umfasst, wobei der wirksame Anteil ein radioaktives Mittel ist und der ST-Rezeptor-Bindungsanteil aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3, SEQ ID Nr: 5.54 und Fragmenten und Derivaten davon, ausgewählt ist. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung, die einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteil umfasst, wobei der wirksame Anteil ein radioaktives Mittel ist und der ST-Rezeptor-Bindungsanteil aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3, SEQ ID Nr: 5, SEQ ID Nr: 6 und SEQ ID Nr: 54, ausgewählt ist. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung, die einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteil umfasst, wobei der wirksame Anteil ein radioaktives Mittel ist, das aus der Gruppe, bestehend aus radioaktiven Schwermetallen, wie zum Bei-

spiel Eisenchelate, radioaktive Chelate von Gadolinium oder Mangan, Positronemittern des Sauerstoffs, Stickstoffs, Eisens, Kohlenstoffs oder Galliums, ^{43}K, ^{52}Fe, ^{57}Co, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{77}Br, ^{81}Rb/^{81M}Kr, ^{87M}Sr, ^{99M}Tc, ^{111}In, ^{113M}In, ^{123}I, ^{125}I, ^{127}Cs, ^{129}Cs, ^{131}I, ^{132}I, ^{197}Hg, ^{203}Pb, und ^{206}Bi, ausgewählt ist. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung, die einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteil umfasst, wobei der ST-Rezeptor-Bindungsanteil aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3, SEQ ID Nr: 5–54 und Fragmenten und Derivaten davon, ausgewählt ist und der wirksame Anteil ein radioaktives Mittel ist, das aus der Gruppe, bestehend aus radioaktiven Schwermetallen, wie zum Beispiel Eisenchelate, radioaktive Chelate von Gadolinium oder Mangan, Positronemittern des Sauerstoffs, Stickstoffs, Eisens, Kohlenstoffs oder Galliums, ^{43}K, ^{52}Fe, ^{57}Co, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{77}Br, ^{81}Rb/^{81M}Kr, ^{87M}Sr, ^{99M}Tc, ^{111}In, ^{113M}In, ^{123}I, ^{125}I, ^{127}Cs, ^{129}Cs, ^{131}I, ^{132}I, ^{197}Hg, ^{203}Pb und ^{206}Bi, ausgewählt ist. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung, die einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteil umfasst, wobei der wirksame Anteil ein radioaktives Mittel ist, das aus der Gruppe, bestehend aus ^{43}K, ^{52}Fe, ^{57}Co, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{77}Br, ^{81}Rb/^{81M}Kr, ^{87M}Sr, ^{99M}Tc, ^{111}In, ^{113M}In, ^{123}I, ^{125}I, ^{127}Cs, ^{129}Cs, ^{131}I, ^{132}I, ^{197}Hg, ^{203}Pb und ^{206}Bi, ausgewählt ist. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine konjugierte Verbindung, die einen ST-Rezeptor-Bindungsanteil und einen wirksamen Anteil umfasst, wobei der ST-Rezeptor-Bindungsanteil aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3, SEQ ID Nr: 5, SEQ ID Nr: 6 und SEQ ID Nr: 54, ausgewählt ist, und der wirksame Anteil ein radioaktives Mittel ist, das aus der Gruppe, bestehend aus ^{43}K, ^{52}Fe, ^{57}Co, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{77}Br, ^{81}Rb/^{81M}Kr, ^{87M}Sr, ^{99M}Tc, ^{111}In, ^{113M}In, ^{123}I, ^{125}I, ^{127}Cs, ^{129}Cs, ^{131}I, ^{132}I, ^{197}Hg, ^{203}Pb und ^{206}Bi, ausgewählt ist. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und eine radioaktive konjugierte Verbindung, die in Beispiel 1 beschrieben ist. Dem behandelten Individuum kann diagnostiziert werden, dass es metastasierenden kolorektalen Krebs aufweist, oder es kann ihm diagnostiziert werden, dass es lokalisierten kolorektalen Krebs aufweist und es kann sich schon vorher der Behandlung unterziehen für den Fall, dass es etwas Metastasierung gibt, auch wenn sie noch nicht nachgewiesen ist. Die pharmazeutische Zusammensetzung enthält eine diagnostisch wirksame Menge der konjugierten Zusammensetzung. Eine diagnostisch wirksame Menge ist eine Menge, die in dem Körper an der Stelle nachgewiesen werden kann, an der sich Zellen mit ST-Rezeptoren befinden, ohne tödliche Nebenwirkungen auf das Individuum zu verursachen.

[0133] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft nicht konjugierte Zusammensetzungen, die einen ST-Rezeptor-bindenden Liganden und ein wirksames Mittel umfassen. Zum Beispiel sind Liposomen kleine aus Lipiden bestehende Vesikel. Die Außenhülle dieser Vesikel umfasst einen ST-Rezeptor-bindenden Liganden. Liposomen Band 1, 2 und 3 CRC Press Inc. Boca Raton FLA, auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird, offenbart die Herstellung von Liposomeingekapselten wirksamen Mitteln, die Targeting-Mittel umfassen, die dem ST-Rezeptorliganden in der Außenhülle entsprechen. Nicht konjugierte Zusammensetzungen, die einen ST-Rezeptorliganden in der Matrix eines Lipsoms mit einem wirksamen Mittel im Inneren umfassen, umfassen derartige Zusammensetzungen, in denen der ST-Rezeptorligand aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3, SEQ ID Nr: 5–54 und Fragmenten und Derivaten davon, ausgewählt ist, und das wirksame Mittel aus der Gruppe, bestehend aus Methotrexat, Doxorubicin, Daunorubicin, Cytosinarabinosid, Etoposid, 5-Fuoruracil, Melphalan, Chlorambucil, cis-Platin, Vindesin, Mitomycin, Bleomycin, Purothionin, Macromycin, 1,4-Benzochinonderivate, Trenimon, Ricin, Ricin A-Kette, Pseudomonas Exotoxin, Diphtherietoxin, Clostridium penfringens Phospholipase C, Rinderpankreasribonuklease, antivirales Kermesbeere („pokeweed")-Protein, Abrin, Abrin A-Kette, Kobra-Giftfaktor, Gelonin, Saporin, Modeccin, Viscumin, Volkensin, alkalische Phosphatase, Nitroimidazol, Metronidazol und Misonidazol, ausgewählt ist.

[0134] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft nicht konjugierte und konjugierte Zusammensetzungen, die einen ST-Rezeptorliganden umfassen, der zum Abgeben der therapeutischen Nukleinsäuremoleküle an die Zellen, die einen ST-Rezeptor umfassen, wie zum Beispiel normale Zellen des Darmtrakts, sowie metastasierende kolorektale Krebszellen, verwendet wird. In einigen Ausführungsformen wird das genetische Material an metastasierende Tumorzellen zur Herstellung eines Antigens, auf das sich das Immunsystem richten kann, oder zur Herstellung eines Proteins abgegeben, das die Zelle abtötet oder deren starke Vermehrung hemmt. In einigen Ausführungsformen wird der ST-Rezeptorligand zum Abgeben von Nukleinsäuren verwendet, die Nukleinsäuremoleküle kodieren, die schadhafte endogene Gene ersetzen, oder die therapeutische Proteine kodieren. In einigen Ausführungsformen wird daher der ST-Rezeptorligand zum spezifischen Abgeben des wirksamen Mittels an die den Darmtrakt auskleidenden Zellen verwendet, um Krankheiten zu behandeln, die für dieses Organ spezifisch sind. Entsprechend diesem Aspekt der Erfindung umfassen Zusammensetzungen Nukleinsäuremoleküle, die schadhafte Gene ersetzen können. In einigen Ausführungsformen werden die Zu-

sammensetzungen in Gentherapieprotokollen zur Abgabe von benötigtem und/oder gewünschtem genetischem Material zum Wiedergutmachen eines genetischen Mangels verwendet.

[0135] In einigen Ausführungsformen wird der ST-Rezeptorligand mit einem Abgabevehikel kombiniert oder darin eingeschlossen, wodurch das Abgabevehikel zu einem spezifisch gerichteten Abgabevehikel umgewandelt wird. Zum Beispiel kann ein ST-Rezeptor-bindendes Peptid in den äußeren Teil eines Virusteilchens eingebaut werden, wodurch ein derartiger Virus zu einem für ST-Rezeptor-tragende Zellen spezifischer Virus wird. Ähnlich kann das Hüllprotein eines Virus derartig gestaltet werden, dass es als ein Fusionsprotein hergestellt wird, das ein aktives ST-Rezeptorbindendes Peptid umfasst, das ausgesetzt oder anderweitig auf der Außenseite des Virusteilchens zugänglich ist, wodurch ein derartiger Virus zu einem für ST-Rezeptortragende Zellen spezifischer Virus wird. In einigen Ausführungsformen kann ein ST-Rezeptorligand in die Liposomen eingebaut oder anderweitig eingeschlossen werden, wobei der ST-Rezeptorligand ausgesetzt oder anderweitig auf der Außenseite des Liposoms zugänglich ist, wodurch derartige Liposomen zu spezifisch auf ST-Rezeptor-tragende Zellen gerichteten Liposomen werden.

[0136] Das wirksame Mittel in den konjugierten oder nicht konjugierten Zusammensetzungen, entsprechend diesem Aspekt der Erfindung, ist ein Nukleinsäuremolekül. Das Nukleinsäuremolekül kann eine RNA oder vorzugsweise eine DNA sein. In einigen Ausführungsformen ist das Nukleinsäuremolekül ein Antisense-Molekül oder es kodiert eine Antisense-Sequenz, deren Vorhandensein in der Zelle die Herstellung eines unerwünschten Proteins hemmt. In einigen Ausführungsformen kodiert das Nukleinsäuremolekül ein Ribozym, dessen Vorhandensein in der Zelle die Herstellung eines unerwünschten Proteins hemmt. In einigen Ausführungsformen kodiert das Nukleinsäuremolekül ein Protein oder ein Peptid, das in der Zelle erwünscht hergestellt wird. In einigen Ausführungsformen kodiert das Nukleinsäuremolekül eine funktionale Kopie eines Gens, das in der Zielzelle schadhaft ist. Das Nukleinsäuremolekül ist vorzugsweise verfügbar an Regulationselemente gebunden, die zum Exprimieren der kodierenden Sequenz in der Zelle benötigt werden.

[0137] Liposomen sind kleine Vesikel, die aus Lipiden zusammengesetzt sind. Genetische Konstrukte, die Proteine kodieren, deren Expression in den ST-Rezeptor-tragenden Zellen erwünscht ist, werden in das Zentrum dieser Vesikel eingeführt. Die Außenhülle dieser Vesikel umfasst einen ST-Rezeptorliganden, in einigen Ausführungsformen vorzugsweise ein ST-Peptid. Liposomes Band 1,2 und 3 CRC Press Inc. Boca Raton FLA, auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird, offenbart die Herstellung von Liposom-eingekapselten wirksamen Mitteln, die Antikörper in der Außenhülle beinhalten. In der vorliegenden Erfindung entspricht ein ST-Rezeptorligand, wie zum Beispiel ein ST-Peptid, den Antikörpern in der Außenhülle. Nicht konjugierte Zusammensetzungen, die einen ST-Rezeptorliganden in der Matrix eines Liposoms mit einem wirksamen Mittel im Inneren umfassen, umfassen derartige Zusammensetzungen, in denen der ST-Rezeptorligand aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3, SEQ ID Nr: 5–54 und Fragmenten und Derivaten davon, ausgewählt ist.

[0138] In einer Ausführungsform wird zum Beispiel zystische Fibrose, eine genetische Krankheit, bei der es eine Mutation eines ein Chloridtransportprotein kodierenden spezifischen Gens gibt, die letztendlich in vielen Systemen, besonders im Atmungs- und Darmtrakt Abnormalitäten erzeugt, durch Gentherapietechniken unter Verwendung von ST-Rezeptorliganden zur Abgabe des korrigierenden Gens an die Zellen behandelt. Die Derzeitige Therapie richtete sich auf das Ersetzen des mutierten Gens im Atmungssystem gegen das normale Gen, indem diese Gene direkt auf die Zellen gerichtet werden, die den Atmungstrakt auskleiden, wobei Viren verwendet werden, die nur an diese Zellen binden. Entsprechend wird das normale Gen in Liposomen eingebaut, die durch ST-Rezeptorliganden auf ihrer Oberfläche zielgerichtet sind, und an den Darmtrakt abgegeben. ST-Rezeptorliganden richten und steuern spezifisch das Liposom, das das normale Gen zur Korrektur der Läsion bezüglich der zystischen Fibrose enthält, auf die den Darmtrakt auskleidenden spezifischen Zellen vom Zwölffingerdarm bis zum Enddarm. Die Aufnahme des genetischen Materials durch diese Zellen sollte zur Heilung der zystischen Fibrose in dem Darmtrakt führen.

[0139] In einer weiteren Ausführungsform wird die Abgabe normaler Kopien des p53-Tumorsuppressorgens an den Darmtrakt unter Verwendung eines ST-Rezeptorliganden zum therapeutischen Trageting des Gens erreicht. Es scheint, dass Mutationen des p53-Tumorsuppressorgens in der Entwicklung des kolorektalen Krebses im Darmtrakt eine herausragende Rolle spielen. Eine Methode zur Bekämpfung dieser Krankheit ist die Abgabe von normalen Kopien dieses Gens in den Darmtrakt an Zellen, die mutierte Formen dieses Gens exprimieren. Genetische Konstrukte, die normale p53-Tumorsuppressorgene umfassen, werden in Liposomen eingebaut, die einen ST-Rezeptorliganden umfassen. Die Zusammensetzung wird in den Darmtrakt befördert. Die ST-Rezeptor-bindenden Liganden richten und steuern spezifisch die Liposomen, die das normale Gen zur Korrektur der Läsion enthalten, die durch die Mutation des p53-Suppressorgens in den Darmzellen erzeugt

worden war.

[0140] Der Durchschnittsfachmann ist zur Herstellung der genetischen Konstrukte in der Lage. Die vorliegende Erfindung gestattet, dass ein derartiges Konstrukt spezifisch unter Verwendung der ST-Rezeptorliganden der vorliegenden Erfindung zielgerichtet wird. Die Zusammensetzungen der Erfindung umfassen einen ST-Rezeptorliganden, wie zum Beispiel ein ST-Peptid, das mit einem Abgabevehikel verbunden ist, und ein Genkonstrukt, das eine kodierende Sequenz für ein Protein umfasst, dessen Herstellung in den Zellen des Darmtrakts erwünscht ist, und das an notwendige Regulationssequenzen zur Expression in der Zelle gebunden ist. Zur Aufnahme durch die Zellen des Darmtrakts werden die Zusammensetzungen oral oder durch ein Klistier verabreicht, wobei sie in den Darmtrakt eindringen und in Kontakt mit den Zellen kommen, die ST-Rezeptoren umfassen. Die Abgabevehikel binden aufgrund des ST-Rezeptorliganden an den ST-Rezeptor und das Vehikel gelangt in das Innere der Zelle oder das wirksame Mittel/genetische Konstrukt wird anderweitig von der Zelle aufgenommen. Einmal verinnerlicht kann das Konstrukt für eine therapeutische Wirkung auf das Individuum sorgen. Der Durchschnittsfachmann kann ohne weiteres derartige Zusammensetzungen zur oralen oder Klistier-Verabreichung formulieren und die wirksame Menge einer zur Behandlung der Krankheit oder Störung zu verabreichenden derartigen Zusammensetzung bestimmen.

[0141] Zusätzlich zu bilderzeugenden und therapeutischen Zusammensetzungen, Systemen, Verfahren und Kits betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren, Zusammensetzungen, Kits und Verfahren, die zum in vitro Screening, Diagnose und Analyse eines Patienten und Patientenproben verwendbar sind. Die Zusammensetzungen, Kits und Verfahren der Erfindung, die zum in vitro Screening, Diagnose und Analyse eines Patienten und Patientenproben verwendbar sind, können zum Nachweisen der ST-Rezeptorproteinexpression in Zellen verwendet werden, wobei das Vorhandensein von Zellen, die den ST-Rezeptor exprimieren, auf eine Metastasierung des kolorektalen Krebses hinweist. Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren, Zusammensetzungen und Kits, die zum in vitro Screening, Diagnose und Analyse eines Patienten und Patientenproben verwendbar sind, zum Nachweisen der ST-Rezeptorproteinexpression in Zellen, wobei das Vorhandensein von Zellen, die den ST-Rezeptor exprimieren, darauf hinweist und/oder bestätigt, dass ein Tumor kolorektalen Ursprungs ist. In einem weiteren Aspekt der Erfindung werden Zusammensetzungen, Kits und Verfahren zur Verfügung gestellt, die zum Sichtbarmachen kolorektaler Zellen verwendbar sind. Derartige Zusammensetzungen, Kits und Verfahren werden zum Analysieren von Gewebeproben aus dem Kolongewebe zur Bewertung des Ausmaßes der Metastasierung oder des Eindringens kolorektaler Tumorzellen in die Lamina propria verwendet.

[0142] In vitro Screening und diagnostische Zusammensetzungen, Verfahren und Kits können in der Überwachung von Individuen verwendet werden, die Gruppen mit hohem Risiko für kolorektalen Krebs sind, wie zum Beispiel diejenigen mit der Diagnose einer lokalisierten Krankheit und/oder metastasierenden Krankheit und/oder diejenigen mit einer genetischen Verbindung zu dieser Krankheit. In vitro Screening und diagnostische Zusammensetzungen, Verfahren und Kits können in der Überwachung von Individuen, die einen lokalisierten kolorektalen Krebs durchmachen und/oder dagegen behandelt werden, zum Bestimmen, ob der Krebs metastasiert hat, verwendet werden. In vitro Screening und diagnostische Zusammensetzungen, Verfahren und Kits können in der Überwachung von Individuen, die einen metastasierenden kolorektalen Krebs durchmachen und/oder dagegen behandelt werden, zum Bestimmen, ob der metastasierende Krebs beseitigt worden ist, verwendet werden In vitro Screening und diagnostische Zusammensetzungen, Verfahren und Kits können in der Überwachung von Individuen verwendet werden, die anderweitig anfällig sind, das heißt Individuen, die zum Beispiel durch genetisches Screening und/oder die Familiengeschichte als genetisch anfällig identifiziert worden sind. Die Fortschritte im Verständnis der Genetik und die Entwicklungen in der Technologie, sowie auch der Epidemiologie gestatten die Bestimmung der Bewertung der Wahrscheinlichkeit und des Risikos, das ein Individuum für die Entwicklung von kolorektalem Krebs aufweist. Unter Verwendung der familiären Gesundheitsgeschichte und/oder des genetischen Screenings ist es möglich, die Wahrscheinlichkeit zu abschätzen, die ein spezielles Individuum für die Entwicklung bestimmter Krebstypen, einschließlich des kolorektalen Krebses, hat. Diejenigen Individuen, die als anfällig gegen die Entwicklung einer speziellen Krebsform identifiziert worden sind, können überwacht oder gescreent werden, um ein Anzeichen eines metastasierenden kolorektalen Krebses nachzuweisen. Mit dem Nachweis eines solchen Anzeichens kann eine frühe Behandlung zum Bekämpfen der Krankheit vorgenommen werden. Dementsprechend können Individuen mit einem Risiko für die Entwicklung eines metastasierenden kolorektalen Krebses identifiziert werden und Proben können aus derartigen Individuen isoliert werden. Die Erfindung ist insbesondere zum Überwachen von Individuen verwendbar, bei denen erkannt wurde, dass sie eine medizinische Familiengeschichte aufweisen, die Verwandte beinhaltet, die an kolorektalem Krebs litten. Ebenso ist die Erfindung besonders zum Überwachen von Individuen verwendbar, bei denen diagnostiziert wurde, dass sie kolorektalen Krebs aufweisen, und besonderes diejenigen, die behandelt worden waren und bei denen Tumoren entfernt worden waren und/oder die anderweitig

eine vorübergehende Besserung erfuhren, einschließlich diejenigen, die gegen metastasierenden kolorektalen Krebs behandelt worden waren.

[0143] In vitro Screening und diagnostische Zusammensetzungen, Verfahren und Kits können in der Analyse von Tumoren verwendet werden. Die Expression des ST-Rezeptors ist ein Marker für den Zelltyp und gestattet die Identifikation des Ursprungs von Adenokarzinomen unbestätigten Ursprungs wie kolorektale Tumore, sowie eine Anfangsdiagnose von kolorektalem Krebs, der bestätigt werden muss. Tumoren, von denen angenommen wird, dass sie kolorektalen Ursprungs sind, können als solche unter Verwendung der Zusammensetzungen, Verfahren und Kits der Erfindung bestätigt werden. Die Erfindung kann zum Bestätigen der Diagnose eines kolorektalen Krebses verwendet werden, indem bestätigt wird, dass die Tumore kolorektalen Ursprungs sind. Entsprechend können Tumore unbekannten Ursprungs unter Verwendung der Zusammensetzungen, Verfahren und Kits der Erfindung als Tumore mit kolorektalem Ursprung analysiert und identifiziert werden. Die Erfindung kann zur Identifikation kolorektaler Tumore in Tumorproben, die aus an Adenokarzinomen unbekannten Ursprungs leidenden Individuen entfernt worden waren, verwendet werden.

[0144] In vitro Screening und diagnostische Zusammensetzungen, Kits und Verfahren der Erfindung können zum Analysieren von Gewebeproben aus dem Kolongewebe zur Bewertung des Ausmaßes der Metastasierung oder des Eindringen von kolorektalen Tumorzellen in die Lamina propria verwendet werden. Die Lamina propria stellt die Barriere zwischen dem kolorektalen Trakt und dem restlichen Körper dar, siehe Bailey's Textbook of Histology, 16. Auflage, Coperhaven et al. 1975 Williams und Wilkens, Baltimore MD auf Seite 404, auf deren Offenbarungsgehalte hier vollumfänglich Bezug genommen wird. Durch das Identifizieren des Vorhandenseins eines ST-Rezeptors oder einer mRNA, die ein ST-Rezeptorprotein in den Zellen der Lamina propria kodiert, kann das Ausmaß des Eindringens/Infiltration kolorektaler Tumorzellen in nicht kolorektales Gewebe bewertet und bestätigt werden.

[0145] Entsprechend der Erfindung werden Verbindungen zur Verfügung gestellt, die an ein ST-Rezeptorprotein oder eine den Rezeptor kodierende mRNA binden. Normales Gewebe im Körper weist keine ST-Rezeptoren oder ST-Rezeptoren kodierende mRNA auf, außer den Zellen des Darmtrakts. Metastasierende kolorektale Zellen können durch Nachweisen von ST-Rezeptoren oder ST-Rezeptoren kodierende mRNA in nicht kolorektalen Proben identifiziert werden. Die Expression eines ST-Rezeptors ist ein Marker für den Zelltyp und gestattet die Identifikation einer kolorektale Metastasierung in extra-intestinalen Proben. Das ST-Rezeptorprotein oder dessen kodierende mRNA können zum Sichtbarmachen kolorektal abstammender Zellen von anderen Zellen des Lumens verwendet werden, um den Grad des Eindringens kolorektaler Tumorzellen in die Grundmembran zu bewerten.

[0146] In einigen Ausführungsformen der Erfindung können nicht kolorektales Gewebe und flüssige Proben oder Tumorproben zum Identifizieren des Vorhandenseins oder der Abwesenheit des ST-Rezeptorproteins gescreent werden. Techniken, wie zum Beispiel ST-Rezeptor/Lingand-Bindungsassays, ELISA-Assays und Western-Blots können zur Bestimmung, ob der ST-Rezeptor in einer Probe vorhanden ist, durchgeführt werden.

[0147] In einigen Ausführungsformen der Erfindung können nicht kolorektales Gewebe und flüssige Proben oder Tumorproben zum Identifizieren, ob ein ST-Rezeptorprotein in den Zellen außerhalb des kolorektalen Trakts exprimiert wird, durch Nachweisen des Vorahndenseins oder der Abwesenheit von mRNA, die das ST-Rezeptorprotein kodiert, gescreent werden. Das Vorhandensein von mRNA, die das ST-Rezeptorprotein kodiert, oder davon erzeugter cDNA kann unter Verwendung von Techniken, wie zum Beispiel PCR-Amplifikation, Northern-Blots (mRNA), Southern-Blots (cDNA) oder Oligonukleotidhybridisierung bestimmt werden.

[0148] In einigen Ausführungsformen der Erfindung können Zellen aus nicht kolorektalen Gewebeproben oder Tumorproben zum Identifizieren des Vorahndenseins oder der Abwesenheit des ST-Rezeptorproteins untersucht werden. Techniken, wie zum Beispiel ST-Rezeptor/Ligand-Bindung oder Immunhistochemie-Blots können auf Gewebeschnitten zur Bestimmung, ob der ST-Rezeptor in einer Probe vorhanden ist, durchgeführt werden.

[0149] In einigen Ausführungsformen der Erfindung können Zellen aus nicht kolorektalen Gewebeproben oder Tumorproben zur Bestimmung, ob ein ST-Rezeptorprotein in den Zellen außerhalb des kolorektalen Trakts exprimiert wird, durch Nachweisen des Vorhandenseins oder der Abwesenheit von mRNA, die das ST-Rezeptorprotein kodiert, untersucht werden. Das Vorhandensein von mRNA, die das ST-Rezeptorprotein kodiert, oder davon erzeugter cDNA in Zellen aus Gewebeschnitten kann unter Verwendung von Techniken, wie zum Beispiel in situ Hybridisierung bestimmt werden.

[0150] Das Vorhandensein des ST-Rezeptors in nicht kolorektalem Gewebe und flüssigen Proben oder auf Zellen von nicht kolorektalen Gewebeproben weist auf kolorektale Tumormetastasierung hin. Das Vorhandensein des ST-Rezeptors in einer Tumorprobe oder auf Tumorzellen, zeigt an, dass der Tumor kolorektalen Ursprungs ist. Das Vorhandensein von mRNA, die den ST-Rezeptor kodiert, in nicht kolorektalem Gewebe und flüssigen Proben oder in Zellen von nicht kolorektalen Gewebeproben weist auf eine kolorektale Tumormetastasierung hin. Das Vorhandensein von mRNA, die den ST-Rezeptor kodiert, in Tumorproben und Tumorzellen zeigt an, dass der Tumor kolorektalen Ursprungs ist.

[0151] Einige Aspekte der vorliegenden Erfindung betreffen Verfahren und Kits werden zur Bewertung der metastatischen Wanderung von Tumorzellen in die Lamina propria zur Verfügung gestellt, wobei der Grad des Eindringens kolorektaler Tumorzellen in die Grundmembran angezeigt wird. In einigen Ausführungsformen der Erfindung können Gewebeproben, die Schnitte der Lamina propria umfassen, aus Individuen isoliert werden, die sich einer Operation zur Entfernung kolorektaler Tumore unterziehen oder davon erholen. Das Gewebe wird zur Bestimmung des Ausmaßes des Eindringens von neoplastischen kolorektalen Zellen in die Grundmembran der Lamina propria analysiert. Die Identifikation des Vorhandenseins oder der Abwesenheit des ST-Rezeptorproteins bestätigt die Bewertung der Wanderung von Tumorzellen in die Grundmembran, was eine Metastasierung anzeigt. Techniken, wie zum Beispiel ST-Rezeptor/Ligandbindungs- und Immunhistochemie-Assays können zur Bestimmung, ob der ST-Rezeptor in den Zellen in der Gewebeprobe vorhanden ist, was auf eine metastatische Wanderung hinweist, durchgeführt werden. Alternativ dazu werden in einigen Ausführungsformen der Erfindung Gewebeproben, die die Lamina propria umfassen, zur Identifikation analysiert, ob das ST-Rezeptorprotein in den Zellen in der Gewebeprobe exprimiert wird, was auf eine metastatische Wanderung hinweist, indem das Vorhandensein oder die Abwesenheit von mRNA, die das ST-Rezeptorprotein kodiert, nachgewiesen wird. Das Vorhandensein von mRNA, die das ST-Rezeptorprotein kodiert, oder von davon erzeugter cDNA kann unter Verwendung von Techniken, wie zum Beispiel der in situ Hybridisierung bestimmt werden.

[0152] Proben von Tumoren können durch Identifikation der Expression von ST-Rezeptoren unter Verwendung der Verfahren der Erfindung als Proben von Tumoren kolorektalen Ursprungs identifiziert werden. Proben von Tumoren, die von an Adenokarzinomen unbestätigten Ursprungs leidenden Individuen entfernt wurden, können zur Bestimmung, ob oder ob nicht sie ein ST-Rezeptorprotein oder eine das ST-Rezeptorproteinkodierende mRNA besitzen, getestet werden. Wenn die Probe aus dem Darmtrakt entfernt wird, kann ein Schnitt von gefrorenen Zellen zur Bestimmung, ob die Tumorzellen das ST-Rezeptorprotein exprimieren, untersucht werden. Wird die Probe aus dem extra-intestinalen Gewebe entfernt, kann ein Schnitt von gefrorenen Zellen zur Bestimmung, ob die Tumorzellen das ST-Rezeptorprotein exprimieren, untersucht werden oder die Probe kann homogenisiert und gestestet werden, da die Nicht-Krebszellen kein ST-Rezeptorprotein besitzen und daher keinen Hintergrund darstellen.

[0153] Die Proben können aus resektiertem Gewebe oder aus Biopsiematerial, einschließlich Nadelbiopsie, erhalten werden. Das Gewebeschnittpräparat für die chirurgische Pathologie kann unter Verwendung von Standardtechniken gefroren und hergestellt werden. In ST-Bindungsassays an Gewebeschnitten wird vor dem Fixieren der Zellen ST zugegeben. Die Immunhistochemie- und in situ Hybridisierungsbindungsassays an Gewebeschnitten werden in fixierten Zellen durchgeführt. Extra-intestinale Proben können durch Standardtechniken, wie zum Beispiel Beschallung, mechanisches Zerreißen oder chemische Lyse, wie zum Beispiel Detergenslyse, homogenisiert werden. Es wird ebenfalls erwogen, dass Tumorproben im Körper, wie zum Beispiel Blut, Urin, Lymphflüssigkeit, cerebrale Spinalflüssigkeit, amniotische Flüssigkeit, Vaginalflüssigkeit, Samenflüssigkeit und Stuhlproben zur Bestimmung, ob derartige Tumoren kolorektalen Ursprungs sind, gescreent werden können.

[0154] Nicht kolorektale Gewebeproben können von jedem Gewebe, außer von denjenigen des kolorektalen Trakts, das heißt des Darmtrakts unterhalb des Dünndarms (das heißt der Dickdarm (Kolon), einschließlich Blinddarm, aufsteigendes Kolon, Querkolon, absteigendes Kolon und Sigma und Rektum) und zusätzlich des Zwölffingerdarms und Dünndarms (Leerdarm und Ileum), erhalten werden. Die Zellen aller Gewebe, außer derjenigen des kolorektalen Trakts, exprimieren nicht den ST-Rezeptor.

[0155] Wird daher das ST-Rezeptorprotein oder die mRNA, die das ST-Rezeptorprotein kodiert, in nicht kolorektalen Proeben nachgewiesen, wird das Vorhandensein metastatischer kolorektaler Krebszellen angezeigt. In einigen bevorzugten Ausführungsformen sind die Gewebeproben Lymphknoten.

[0156] Gewebeproben können durch operative Standardtechniken, einschließlich der Verwendung von Biopsienadeln, erhalten werden. Dem Fachmann ist ohne weiteres klar, dass es eine Vielzahl an Testproben gibt,

die auf das ST-Rezeptorprotein untersucht werden können, und er erkennt die Verfahren, um Gewebeproben zu erhalten.

[0157] Gewebeproben können homogenisiert oder anderweitig zum Screening auf das Vorhandensein eines ST-Rezeptorproteins durch gut bekannte Techniken, wie zum Beispiel Beschallung, mechanisches Zerreißen, chemische Lysis, wie zum Beispiel Detergenslyse oder Kombinationen davon, hergestellt werden.

[0158] Beispiele von Körperflüssigkeitsproben umfassen Blut, Urin, Lymphflüssigkeit, cerebrale Spinalflüssigkeit, amniotische Flüssigkeit, Vaginalflüssigkeit und Samenflüssigkeit. In einigen bevorzugten Ausführungsformen wird Blut als eine Körperflüssigkeitsprobe verwendet. Die Zellen können aus der Flüssigkeitsprobe, zum Beispiel durch Zentrifugation, isoliert werden. Dem Fachmann ist ohne weiteres klar, dass es eine Vielzahl an Testproben gibt, die auf das ST-Rezeptorprotein untersucht werden können. Testproben können durch solche Verfahren, wie Entnehmen der Flüssigkeit mit einer Spritze oder durch einen Abstrich erhalten werden. Der Fachmann würde ohne weiteres andere Verfahren zum Erhalten von Testproben erkennen.

[0159] In einem Assay kann unter Verwendung einer Blutprobe das Blutplasma von den Blutzellen getrennt werden. Das Blutplasma kann auf das ST-Rezeptorprotein, einschließlich abgeschnittenen Proteins, das in das Blut abgegeben wird, wenn das ST-Rezeptorprotein von metastasierenden kolorektalen Tumorzellen abgespalten oder abgestreift wird, gescreent werden. In einigen Ausführungsformen werden Blutzellenfraktionen auf das Vorhandensein von metastasierenden kolorektalen Tumorzellen gescreent. In einigen Ausführungsformen werden Lymphozyten, die in der Blutzellenfraktion vorhanden sind, durch Lysieren der Zellen und Nachweisen des Vorhandenseins des ST-Rezeptorproteins oder der das ST-Rezeptorprotein kodierenden mRNA, die als ein Ergebnis des Vorhandenseins jeglicher metastasierender kolorektaler Tumorzellen, die von den Blutzellen verschlungen worden sein könnten, vorhanden sein können, gescreent.

[0160] Für die Aspekte der Erfindung, die sich auf die Analyse des Lumengewebes beziehen, ist die Erfindung zur Bewertung des Grades der metastatischen Wanderung kolorektaler Tumorzellen unter Verwendung von Lumenproben, die durch eine Operation von Patienten an oder in der Nähe der Stelle des Tumor entnommen worden sind, verwendbar. Einige Aspekte der Erfindung stellen Verfahren zum Analysieren von Gewebeproben zur Verfügung, die durch chirurgische Pathologen routinemäßig hergestellte fixierte Schnitte sind, um Zellen zu charakterisieren und zu bewerten. In einigen Ausführungsformen sind die Zellen aus der Lamina propria und werden zur Bestimmung und Bewertung des Ausmaßes der Metastasierung kolorektaler Tumorzellen analysiert. Die Lamina propria stellt die Barriere zwischen dem kolorektalen Trakt und dem restlichen Körper dar. Durch Identifizieren des Vorhandenseins eines ST-Rezeptors oder mRNA, die das ST-Rezeptorprotein kodiert, in den Zellen der Lamina propria kann das Ausmaß des Eindringens/Infiltration kolorektaler Tumorzellen in nicht kolorektales Gewebe bewertet werden. In einigen Ausführungsformen werden die Zellen in einer Biopsy oder als ein Adenokarzinom unbekannten Ursprungs entfernt und analysiert, um zu bestimmen und zu bewerten, ob sie kolorektale Tumorzellen sind. In einigen Ausführungsformen sind die Zellen von einem Tumor, der unter dem Verdacht steht, kolorektalen Ursprungs zu sein, und das Verfahren und die Zusammensetzungen und Kits der Erfindung werden zum Bestätigen der Identität des Ursprungs der Tumorzellen verwendet.

[0161] Proben der Lamina propria werden während der Operation zur Entfernung des kolorektalen Tumors, zum Beispiel durch Resektion oder Dickdarmspiegelung entfernt. Die Probe, einschließlich der Grundmembranzellen, wird gefroren. Falls ein ST-Bindungsassay durchgeführt werden soll, wird das markierte ST mit dem gefrorenen Schnitt in Kontakt gebracht und die Zellen werden dann fixiert und gefärbt. Falls eine Immunhistochemie oder eine in situ Hybridisierung durchgeführt werden soll, wird der gefrorene Schnitt gefärbt und dann lässt man den Assay ablaufen. Der Durchschnittsfachmann kann leicht Proben isolieren, die Teile der Lamina propria umfassen, und sie unter Verwendung von Standardtechniken fixieren und färben. Durch eine hinzukommende Sichtbarmachung, die durch eine ST-Rezeptor-Nachweistechnik zur Verfügung gestellt wird, kann der Schnitt umfassender analysiert werden und der Grad des Eindringens neoplastischer kolorektaler Zellen in die Lamina propria bestimmt werden. Die vorliegende Erfindung kann zum Analysieren und Bewerten des Ausmaßes des Fortschreitens lokalisierter kolorektaler Tumore, das heißt primäre oder nicht metastatische kolorektale Tumore, verwendet werden, wenn diese durch die der Schleimhaut zugrundeliegenden Grundmembran in die Submukosa eingedrungen sind.

[0162] Immunoassayverfahren können zum Identifizieren von Individuen, die an kolorektaler Krebsmetastasierung leiden, durch Nachweisen des Vorhandenseins von ST-Rezeptorprotein in einer Probe von nicht kolorektalem Gewebe oder Körperflüssigkeit unter Verwendung von Antikörpern, die als Reaktion zu dem Aussetzen gegen das Rezeptorprotein erzeugt wurden, verwendet werden. Überdies können Immunoassayverfahren zum Identifizieren von Individuen, die an kolorektalem Krebs leiden, durch Nachweisen des Vorhandenseins

von ST-Rezeptorprotein in einer Probe des Tumors unter Verwendung von Antikörpern, die als Reaktion zum Aussetzen gegen das ST-Rezeptorprotein erzeugt wurden, verwendet werden.

[0163] Die Antikörper sind vorzugsweise monoklonale Antikörper. Die Antikörper werden vorzugsweise gegen das in menschlichen Zellen hergestellte ST-Rezeptorprotein hervorgerufen. Die Antikörper binden vorzugsweise an ein Epitop auf der extrazellulären Domäne des ST-Rezeptorproteins. Immunoassays sind gut bekannt und ihre Gestaltung kann routinemäßig von dem Durchschnittsfachmann übernommen werden. Der Durchschnittsfachmann kann monoklonale Antikörper erzeugen, die spezifisch an das ST-Rezeptorprotein binden und in Verfahren und Kits der Erfindung unter Verwendung von Standardtechniken und leicht verfügbaren Ausgangsmaterialien verwendbar sind. Die Techniken zur Herstellung monoklonaler Antikörper sind in Harlow, E. und D. Lane, (1998) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird, dargelegt und stellen eine ausführliche Anleitung zur Herstellung von Hybridomen und monoklonalen Antikörpern, die spezifisch an Zielproteine binden, zur Verfügung. Der Umfang der vorliegenden Erfindung umfasst FABs und F(AB)2s, die anstelle von Antikörpern spezifisch an den ST-Rezeptor binden.

[0164] Kurz gesagt, das ST-Rezeptorprotein wird in Mäuse eingespritzt. Die Milz der Maus wird entfernt, die Milzzellen werden isoliert und mit unsterblichen Mauszellen fusioniert. Die Hybridzellen oder Hybridome werden kultiviert und diejenigen Zellen, die Antikörper absondern, werden ausgewählt. Die Antikörper werden analysiert und, falls festgestellt wird, dass sie spezifisch an das ST-Rezeptorprotein binden, wird das Hybridom, das sie erzeugt, zur Herstellung eines fortlaufenden Angebots an anti-ST-Rezeptorprotein spezifischen Antikörpern kultiviert.

[0165] Die vorliegende Erfindung betrifft Antikörper, die als Reaktion zu dem Aussetzen gegen das ST-Rezeptorprotein hergestellt werden. Die Antikörper sind vorzugsweise monoklonale Antikörper. Die Antikörper werden vorzugsweise gegen das in menschlichen Zellen hergestellte ST-Rezeptorprotein hervorgerufen. In einigen Ausführungsformen binden Antikörper spezifisch an die extrazelluläre Domäne des ST-Rezeptorproteins. In einigen Ausführungsformen binden Antikörper spezifisch an die transmembranische Domäne. In einigen Ausführungsformen binden Antikörper spezifisch an die zytoplasmatische Domäne.

[0166] Die Mittel zum Nachweisen des Vorhandenseins eines Proteins in einer Testprobe sind Routine und der Durchschnittsfachmann kann das Vorhandensein oder die Abwesenheit eines Proteins oder eines Antikörpers unter Verwendung gut bekannter Verfahren nachweisen. Ein gut bekanntes Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins eines Proteins ist ein Immunoassay. Dem Durchschnittsfachmann ist ohne weiteres die Vielzahl der Wege klar, einen Immunoassay zu praktizieren, um das Vorhandensein des ST-Rezeptorproteins in einer Probe nachzuweisen.

[0167] Entsprechend einigen Ausführungsformen umfassen Immunoassays, dass man die Proteine in der Probe an einen Festphasenträger, wie zum Beispiel eine Kunststoffoberfläche, binden lässt. Dann werden nachweisbare Antikörper zugegeben, die selektiv an jedes ST-Rezeptorprotein binden. Der Nachweis des nachweisbaren Antiköpers weist auf das Vorhandensein des ST-Rezeptorproteins hin. Der nachweisbare Antikörper kann ein markierter oder ein nicht markierter Antikörper sein. Ein nicht markierter Antikörper kann unter Verwendung eines zweiten markierten Antikörpers, der spezifisch an den ersten Antikörper bindet, oder eines zweiten nicht markierten Antikörpers, der unter Verwendung eines markierten Protein A, ein Protein, das mit Antikörpern komplexiert, nachgewiesen werden kann, nachgewiesen werden. Verschiedene Immunoassayverfahren sind in Immunoassays for the 80's, A. Voller et al., Herausg., University Park, 1981, auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird, beschrieben.

[0168] Einfache Immunoassay können durchgeführt werden, in denen ein Festphasenträger mit der Testprobe in Kontakt gebracht wird. Jegliche in der Testprobe vorhandenen Proteine binden an den Festphasenträger und können durch ein spezifisches nachweisbares Antikörperpräparat nachgewiesen werden. Eine derartige Technik ist der Kern des Dot-Blots, Western-Blots und anderer solcher ähnlicher Assays.

[0169] Andere Immunoassays können komplizierter sein, sorgen jedoch tatsächlich für ausgezeichnete Ergebnisse. Typische und bevorzugte immunometrische Assays umfassen "Vorwärts"-Assays für den Nachweis eines Proteins, wobei ein an einen Festphasenträger gebundener erster Anti-Protein-Antikörper mit der Testprobe in Kontakt gebracht wird. Nach einer geeigneten Inkubationszeitdauer wird der Festphasenträger gewaschen, um nicht gebundenes Protein zu entfernen. Ein zweiter verschiedener Anti-Protein-Antikörper wird dann dazugegeben, der bezüglich eines Teils des spezifischen Proteins spezifisch ist, der nicht von dem ersten Antikörper erkannt wird. Der zweite Antikörper ist vorzugsweise nachweisbar. Nach einer zweiten Inkubations-

zeitdauer, um dem nachweisbaren Antikörper die Komplexierung mit dem durch den ersten Antikörper an den Festphasenträger gebundenen spezifischen Protein zu erlauben, wird der Festphasenträger ein zweites mal gewaschen, um den nicht gebundenen nachweisbaren Antikörper zu entfernen. Alternativ dazu kann der zweite Antikörper nicht nachweisbar sein. In diesem Fall wird zu dem System ein dritter nachweisbarer Antikörper gegeben, der an den zweiten Antikörper bindet. Diese Art des „Vorwärts-Sandwich"-Assays kann ein einfacher ja/nein Assay zum Bestimmen, ob die Bindung stattgefunden kann, sein oder er kann quantitativ gemacht werden, indem die Menge an nachweisbarem Antikörper mit der in einer Kontrolle erhaltenen verglichen wird. Derartige „Zwei-Seiten"- oder „Sandwich"-Assays wurden von Wide, Radioimmune Assay Method, Kirkham, Herausg., E. & S. Livingstone, Edinburgh, 1970, Seiten 199–206, auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollummfänglich Bezug genommen wird, beschrieben.

[0170] Andere Arten von immunometrischen Assay sind die sogenannten „simultanen" und „Umkehr"-Assays. Ein simultaner Assay betrifft einen einzigen Inkubationsschritt, wobei der an den Festphasenträger gebundene erste Antikörper, der zweite nachweisbare Antikörper und die Testprobe gleichzeitig zugegeben werden. Nach Beendigung der Inkubation wird der Festphasenträger zur Entfernung nicht gebundenen Proteins gewaschen. Dann wird das Vorhandensein von nachweisbarem Antikörper, der an den festen Träger gebunden ist, bestimmt, wie es auch in einem üblichen „Vorwärts-Sandwich"-Assay der Fall wäre. Der simultane Assay kann ebenfalls auf ähnliche Weise für den Nachweis von Antikörpern in einer Testprobe angepasst werden.

[0171] Der „Umkehr"-Assay umfasst die schrittweise Zugabe einer Lösung des nachweisbaren Antikörpers zu der Testprobe, gefolgt von einer Inkubationszeitdauer und der Zugabe von an einen Festphasenträger gebundenen Antikörper nach einer zusätzlichen Inkubationszeitdauer. Der Festphasenträger wird auf übliche Art gewaschen, um nicht gebundene Protein/Antikörper-Komplexe und nicht umgesetzten nachweisbaren Antikörper zu entfernen. Die Bestimmung von nachweisbarem Antikörper, der an den Festphasenträger gebunden ist, wird dann wie in den „simultanen"- und „Vorwärts"-Assays bestimmt. Der Umkehr-Assay kann ebenfalls auf ähnliche Weise für den Nachweis von Antikörpern in einer Testprobe angepasst werden.

[0172] Die erste Komponente des immunometrischen Assays kann auf Nitrozellulose oder einen anderen Festphasenträger, der zur Immobilisierung von Proteinen in der Lage ist, zugegeben werden. Die erste Komponente zur Bestimmung des Vorhandenseins eines ST-Rezeptors in einer Testprobe ist ein Anti-ST-Rezeptorantikörper. Mit „Festphasenträger" oder „Träger" ist jedes Material gemeint, das in der Lage ist, Proteine zu binden. Gut bekannte Festphasenträger umfassen Glas, Polystyrol, Polypropylen, Polyethylen, Dextran, Nylon, Amylase, natürliche und modifizierte Cellulose, Polyacrylamide, Agarosen und Magnetit. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung kann der Träger zu einem gewissen Ausmaß entweder löslicher oder unlöslicher Natur sein. Die Trägerkonfiguration kann kugelförmig, wie ein Kügelchen, oder zylindrisch, wie die innere Oberfläche eines Teströhrchens oder die äußere Oberfläche eines Stabes sein. Alternativ dazu kann die Oberfläche flach, wie eine dünne Platte, ein Teststreifen, usw. sein. Der Fachmann wird viele andere geeigneten „Festphasenträger" zum Binden von Proteinen kennen oder er wird in der Lage sein, dieselben durch Verwendung von Routineexperimenten in Erfahrung zu bringen. Ein bevorzugter Festphasenträger ist eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen.

[0173] Zum Nachweisen des Vorhandenseins von ST-Rezeptorprotein werden nachweisbare Anti-ST-Rezeptorantikörper verwendet. Es sind mehrere Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gut bekannt.

[0174] Ein Verfahren, in dem die Antikörper nachweisbar markiert werden können, besteht darin, dass die Antikörper an ein Enzym gebunden werden und nachfolgend die Antikörper in einem Enzym-Immunassay (EIA) oder Emzym-gebundenen Immunsorbensassay (ELISA), wie zum Beispiel Einfang-ELISA verwendet werden. Das Enzym reagiert, wenn es nachfolgend seinem Substrat ausgesetzt wird, mit dem Substrat und erzeugt einen chemischen Anteil, der zum Beispiel durch spektrophotometrische, fluorometrische oder optische Mittel nachgewiesen werden kann. Enzyme, die zum nachweisbaren Markieren von Antikörpern verwendet werden können, umfassen, sind jedoch nicht eingeschränkt auf Malatdehydrogenase, Staphylokokkennuklease, delta-5-Steroidisomerase, Hefe-Alkoholdehydrogenase, alpha-Glycerophosphatdehydrogenase, Triosephosphatisomerase, Meerrettichperoxidase, alkalische Phosphatase, Asparaginase, Glucoseoxidase, beta-Galactosidase, Ribonuklease, Urease, Katalase, Glucose-6-phosphatdehydrogenase, Glucoamylase und Acetylcholinesterase. Der Fachmann würde leicht andere Enzyme erkennen, die ebenfalls verwendet werden können.

[0175] Ein weiteres Verfahren, in dem Antikörper nachweisbar markiert werden können, beruht auf radioaktiven Isotopen und nachfolgender Verwendung in einem Radioimmunassay (RIA) (siehe zum Beispiel Work, T. S. et al., Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, North Holland Publishing Company, N. Y., 1978, auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird). Das radioaktive Isotop

kann durch solche Mittel, wie die Verwendung eines Gamma-Zählers oder eines Szintillationszählers oder durch Autoradiographie nachgewiesen werden.

[0176] Isotopen, die für den Zweck der vorliegenden Erfindung besonders verwendbar sind, umfassen ^{3}H, ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S und ^{14}C. Das bevorzugte Isotop ist ^{125}I. Der Fachmann würde leicht andere Radioisotope erkennen, die ebenfalls verwendet werden können.

[0177] Es ist ebenfalls möglich, den Antikörper mit einer fluoreszierenden Verbindung zu markieren. Wird der fluoreszierend-markierte Antikörper Licht mit der geeigneten Wellenlänge ausgesetzt, kann dessen Vorhandensein aufgrund seiner Fluoreszenz nachgewiesen werden. Unter den üblichsten verwendeten fluoreszierenden Markierungsverbindungen sind Fluoreszeinisothiocyanat, Rhodamin, Phycoerythrin, Phycocyanin, Allophycocyanin, o-Phthaldehyd und Fluorescamin. Der Fachmann würde leicht andere fluoreszierende Verbindungen erkennen, die ebenfalls verwendet werden können.

[0178] Antikörper können ebenfalls unter Verwendung von Fluoreszenz-emittierenden Metallen, wie zum Beispiel ^{152}Eu oder anderen aus der Reihe der Lanthaniden, nachweisbar markiert werden. Diese Metalle können an den Protein-spezifischen Antikörper unter Verwendung derartiger Metallchelat-bildenden Gruppen, wie Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) oder Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), gebunden werden. Der Fachmann würde leicht andere Fluoreszenz-emittierende Metalle, so wie andere Metallchelat-bildende Gruppen, die ebenfalls verwendet werden können, erkennen.

[0179] Antikörper können ebenfalls durch Kupplung an eine Chemilumineszenzverbindung markiert werden. Das Vorhandensein des lumineszierend-markierten Antikörpers wird durch Nachweisen des Vorhandenseins von Lumineszens bestimmt, die während des Verlaufs einer chemischen Reaktion entsteht. Beispiele für besonders verwendbare Chemilumineszens-Markierungsverbindungen sind Luminol, Isoluminol, threo-Acridiniumester, Imidazol, Acridiniumsalz und Oxalatester. Der Fachmann würde leicht andere Chemilumineszenzverbindungen, die ebenfalls verwendet werden können, erkennen.

[0180] Ebenso kann eine Biolumineszenzverbindung zur Markierung von Antikörpern verwendet werden. Biolumineszenz ist eine Art der Chemilumineszenz, die in biologischen Systemen vorgefunden wird, in denen ein katalytisches Protein den Wirkungsgrad der Chemilumineszenzreaktion erhöht. Das Vorhandensein eines Biolumineszenzproteins wird durch Nachweisen des Vorhandenseins von Lumineszenz bestimmt. Bedeutende Biolumineszenzverbindungen zum Zwecke der Markierung sind Luciferin, Luciferase und Aequorin. Der Fachmann würde leicht andere Biolumineszenzverbindungen, die ebenfalls verwendet werden können, erkennen.

[0181] Der Nachweis des Protein-spezifischen Antikörpers, Fragments oder ein Derivat davon, kann durch einen Szintillationszähler ausgeführt werden, falls zum Beispiel die nachweisbare Markierung ein radiaktiver gamma-Emitter ist. Alternativ dazu kann der Nachweis durch ein Fluormeter ausgeführt werden, falls zum Beispiel die Markierung ein fluoreszierendes Material ist. Für den Fall einer Enzymmarkierung kann der Nachweis durch kolorimetrische Verfahren, die ein Substrat für das Enzym verwenden, ausgeführt werden. Der Nachweis kann ebenfalls durch optischen Vergleich des Ausmaßes einer enzymatischen Reaktion eines Substrats im Vergleich mit ähnlich hergestellten Standards, ausgeführt werden. Der Fachmann würde leicht andere geeignete Nachweisverfahren, die ebenfalls verwendet werden können, erkennen.

[0182] Die Bindungsaktivität einer gegebenen Menge an Antikörpern kann entsprechend gut bekannten Verfahren bestimmt werden. Der Fachmann wird in der Lage sein, die Betriebs- und optimalen Assaybedingungen für jede Bestimmung durch Verwenden von Routineexperimenten zu bestimmen.

[0183] Positive und negative Kontrollen können durchgeführt werden, in denen bekannte Mengen an ST-Rezeptorprotein beziehungsweise kein ST-Rezeptorprotein zu Assays, die parallel zum Testassay durchgeführt werden, gegeben werden. Der Fachmann würde die notwendige Kenntnis aufweisen, um die geeigneten Kontrollen durchzuführen.

[0184] Das ST-Rezeptorprotein kann als ein Reagenz für positive Kontrollen routinemäßig hergestellt werden. Dem Fachmann würden die verschiedenen Arten, auf die das ST-Rezeptorprotein hergestellt und isoliert werden kann, klar sein.

[0185] Eine „Antikörperzusammensetzung" betrifft den Antikörper oder die Antikörper, die zum Nachweis des Proteins erforderlich sind. Zum Beispiel umfasst die Antikörperzusammensetzung, die zum Nachweis des ST-Rezeptors in einer Testprobe verwendet wird, einen ersten Antikörper, der an das ST-Rezeptorprotein bin-

det, sowie einen zweiten oder dritten nachweisbaren Antikörper, der an den ersten beziehungsweise zweiten Antikörper bindet.

[0186] Zum Untersuchen einer Testprobe auf das Vorhandensein eines ST-Rezeptorproteins kann ein immunometrischer Standardassay, wie zum Beispiel der nachstehend beschriebene, durchgeführt werden. Ein erster Anti-ST-Rezeptorproteinantikörper, der einen spezifischen Teil des ST-Rezeptors, wie zum Beispiel den extrazellulären oder zytoplasmatischen Teil, erkennt, wird auf eine Mikrotiterplatte in einem Puffervolumen gegeben. Die Platte wird während einer Zeitdauer inkubiert, die zum Stattfinden des Bindens ausreicht und nachfolgend mit PBS zur Entfernung nicht gebundenen Antikörpers gewaschen. Dann wird die Platte mit einer PBS/BSA-Lösung blockiert, um Probenproteine an dem nicht spezifischen Binden an die Mikrotiterplatte zu hindern. Die Testprobe wird nachfolgend zu den Vertiefungen gegeben und die Platte wird während einer Zeitdauer inkubiert, die zum Stattfinden des Bindens ausreicht. Die Vertiefungen werden mit PBS zur Entfernung nicht gebundenen Proteins gewaschen. Markierte Anti-ST-Rezeptorantikörper, die Teile des ST-Rezeptors erkennen, die von dem ersten Antikörper nicht erkannt werden, werden zu den Vertiefungen gegeben. Die Platte wird während einer Zeitdauer inkubiert, die zum Stattfinden des Bindens ausreicht, und nachfolgend mit PBS zur Entfernung des nicht gebundenen markierten Anti-ST-Rezeptorantikörpers gewaschen. Die Menge an markiertem und gebundenem Anti-ST-Rezeptorantikörper wird anschließend durch Standardtechniken bestimmt.

[0187] Kits, die zum Nachweis eines ST-Rezeptors in einer Testprobe verwendbar sind, umfassen einen Behälter, umfassend Anti-ST-Rezeptorantikörper, und einen Behälter oder mehrere Behälter, umfassend Kontrollen. Die Kontrollen umfassen eine Kontrollprobe, die kein ST-Rezeptorprotein enthält, und/oder eine weitere Kontrollprobe, die das ST-Rezeptorprotein enthält. Die in dem Kit verwendeten Anti-ST-Rezeptorantikörper sind nachweisbar, sie sind beispielsweise nachweisbar markiert. Ist der nachweisbare Anti-ST-Antikörper nicht markiert, kann er durch zweite Antikörper oder ein Protein A, das zum Beispiel ebenfalls in einigen Kits in getrennten Behältern bereitgestellt wird, nachgewiesen werden. Zusätzliche Komponenten umfassen in einigen Kits einen festen Träger, Puffer und Anweisungen zur Ausführen des Assays. Die in dem Kit verwendeten Anti-ST-Rezeptorantikörper binden vorzugsweise an ein Epitop auf der extrazellulären Domäne eines ST-Rezeptorproteins.

[0188] Der Immunoassay ist zum Nachweisen des ST-Rezeptor in homogenisierten Gewebeproben und Körperflüssigkeitsproben, einschließlich des Plasmaanteils oder der Zellen in der flüssigen Probe, verwendbar.

[0189] Western-Blots können in Verfahren zum Identifizieren von Individuen, die an kolorektaler Krebsmetastasierung leiden, verwendet werden, indem das Vorhandensein des ST-Rezeptorproteins in einer Probe mit nicht kolorektalem Gewebe oder Körperflüssigkeit nachgewiesen wird. Western-Blots können ebenfalls zum Nachweisen des Vorhandenseins von ST-Rezeptorprotein in einer Tumorprobe von einem Individuum, das an Krebs leidet, verwendet werden, um zu identifizieren und/oder bestätigen, dass der Tumor kolorektalen Ursprungs ist. Western-Blots verwenden nachweisbare Anti-ST-Rezeptorantikörper, um an jeden in einer Probe vorhandenen ST-Rezeptor zu binden, und zeigen somit das Vorhandensein des Rezeptors in der Probe an.

[0190] Western-Blot-Techniken, die in Sambrook, J. et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglcih Bezug genommen wird, beschrieben sind, sind ähnlich zu Immunoassays mit dem wesentlichen Unterschied, dass vor dem Aussetzen der Probe gegenüber den Antikörper, die Proteine in den Proben durch Gelelektrophorese getrennt werden und die getrennten Proteine dann mit Antikörpern untersucht werden. In einigen bevorzugten Ausführungsformen ist die Matrix eine SDS-PAGE Gelmatrix und die in der Matrix getrennten Proteine werden auf einen Träger, wie zum Beispiel Filterpapier, übertragen, bevor mit Antikörpern untersucht wird. Die vorstehend beschriebenen Anti-ST-Rezeptorantikörper sind in Western-Blot-Verfahren verwendbar.

[0191] Im Allgemeinen werden Proben homogenisiert und Zellen unter Verwendung eines Detergens, wie zum Beispiel Triton-X lysiert. Dann wird das Material durch die Standardtechniken in Sambrook, J. et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, getrennt.

[0192] Die zum Nachweis des ST-Rezeptors in einer Testprobe durch Western-Blot verwendbare Kits umfassen einen Behälter, umfassend Anti-ST-Rezeptorantikörper, und einen Behälter oder mehrere Behälter, umfassend Kontrollen. Die Kontrollen umfassen eine Kontrollprobe, die kein ST-Rezeptorprotein enthält, und/oder eine weitere Kontrollprobe, die ein ST-Rezeptorprotein enthält. Die in dem Kit verwendeten Anti-ST-Rezepto-

rantikörper sind nachweisbar und sie sind zum Beispiel nachweisbar markiert. Ist der nachweisbare Anti-ST-Antikörper nicht markiert, kann er durch zweite Antikörper oder ein Protein A, das zum Beispiel ebenfalls in einigen Kits in getrennten Behältern bereitgestellt wird, nachgewiesen werden. Zusätzliche Komponenten umfassen in einigen Kits Anweisungen zum Ausführen des Assays. Die Antikörper des Kits binden vorzugsweise an ein Epitop auf der extrazellulären Domäne eines SR-Rezeptorproteins.

[0193] Western-Blots sind zum Nachweisen des ST-Rezeptors in homogenisierten Gewebeproben und Körperflüssigkeitsproben, einschließlich des Plasmaanteils oder der Zellen in der Flüssigkeitsprobe, verwendbar.

[0194] ST-Bindungsassays können in Verfahren zum Identifizieren von Individuen, die an kolorektaler Krebsmetastasierung leiden, verwendet werden, indem das Vorhandensein von ST-Rezeptorprotein in der Probe des nicht kolorektalen Gewebes oder der Körperflüssigkeit nachgewiesen wird. ST-Bindungsassays können ebenfalls in Verfahren zum Nachweisen des Vorhandenseins des ST-Rezeptorproteins in einer Probe des Tumors von einem Individuum, das an Krebs leidet, verwendet werden, um zu identifizieren und/oder zu bestätigen, dass der Tumor kolorektalen Ursprungs ist. Der ST-Rezeptorbindungsassay verwendet einen nachweisbaren ST-Rezeptorliganden, um an jeden vorhandenen ST-Rezeptor zu binden, und zeigt somit das Vorhandensein des Rezeptors in einer Probe an.

[0195] In einigen Ausführungsformen kann der ST-Rezeptorligand natives ST sein. In einigen Ausführungsformen kann der ST-Rezeptorligand ein ST-Rezeptor-bindendes Peptid sein. In einigen Ausführungsformen kann der ST-Rezeptorligand ein ST-Peptid sein.

[0196] Der vorstehend beschriebene ST-Rezeptor-Bindungsassay kann leicht durch den Fachmann unter Verwendung leicht verfügbarer Ausgangsmaterialien durchgeführt werden. ST-Rezeptor-Bindungsassays können auf eine Vielzahl von Wegen durchgeführt werden, jedoch identifiziert jeder, ob oder ob nicht ein ST-Rezeptorprotein in einer Probe vorhanden ist, indem bestimmt wird, ob oder ob nicht ein nachweisbarer ST-Rezeptorligand an einen Rezeptor in einer Probe bindet. Kurz gesagt, der Assay besteht aus dem Inkubieren einer Probe mit einer konstanten Konzentration an ST-Ligand, wie zum Beispiel 1×10^{-10} M bis 5×10^{-10} M an ^{125}I-ST. Als Kontrolle wird ein genau gleiches Präparat einer Probe, von der bekannt ist, dass sie ST-Rezeptoren enthält, mit einer genau gleichen Konzentration an 125I-ST inkubiert. Die Assays werden bis zum Gleichgewicht (zum Beispiel 2 Stunden) inkubiert und die Probe wird zur Bestimmung, ob oder ob nicht ^{125}I-ST an das Material in der Probe gebunden ist, analysiert. Dann wird die ^{125}I-ST-Probe durch ein Filter gegeben, das in der Lage ist, ^{125}I-ST durchlaufen zulassen, das den ST-Rezeptor jedoch nicht durchlaufen lässt. Ist daher der ST-Rezeptor in der Probe vorhanden, wird er an das ^{125}I-ST binden, das dann durch den Filter aufgefangen wird. Der Nachweis von ^{125}I-ST in dem Filter weist auf das Vorhandensein von ST-Rezeptor in der Probe hin. In einigen bevorzugten Ausführungsformen ist der Filter ein Whitman GFB Glasfilterpapier. Kontrollen umfassen die Verwendung von Proben, von denen bekannt ist, dass sie ST-Rezeptoren enthalten, zum Beispiel Darmmembranen aus dem Rattendarm, menschlicher Darm, T84-Zellen, isoliertes ST-Rezeptorprotein oder Zellen, die eine ST-Rezeptorproteine kodierende klonierte Nukleotidsequenz exprimieren.

[0197] ST kann abgesehen, davon, dass es an ^{125}I konjugiert ist, zusätzlich durch sein Binden an andere Radionuklide, wie zum Beispiel ^{43}K, ^{52}Fe, ^{57}Co, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{77}Br, ^{81}Rb/^{81M}Kr, ^{87M}Sr, ^{99M}Tc, ^{111}In, ^{113M}In, ^{123}I, ^{125}I, ^{127}Cs, ^{129}Cs, ^{131}I, ^{132}I, ^{197}Hg, ^{203}Pb und ^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{90}Y, ^{109}Pd, ^{123}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{199}Au, ^{211}At, ^{212}Pb, ^{212}B, ^{32}P und ^{33}P, ^{71}Ge, ^{77}As, ^{103}Pb, ^{105}Rh, ^{111}Ag, ^{119}Sb, ^{121}Sn, ^{131}Cs, ^{143}Pr, ^{161}Tb, ^{177}Lu, ^{191}Os, ^{193M}Pt und ^{197}Hg, oder durch Binden an andere Markierungen, wie zum Beispiel Fluoreszein oder Enzyme, nachweisbar sein. Jedes der vorstehend beschriebenen Markierungsmittel zum nachweisbaren Markieren von Antikörpern kann zum Markieren von ST-Rezeptorliganden angepasst werden und es wird betrachtet, dass sie als solche hierin beschrieben sind.

[0198] Kits umfassen Behälter, umfassend einen nachweisbaren ST-Rezeptorliganden, zusammen mit Behältern mit positiven und/oder negativen Kontrollen, das heißt Proben, die einen ST-Rezeptor enthalten, beziehungsweise Proben, die keinen ST-Rezeptor enthalten. Der nachweisbare ST-Rezeptorligand ist vorzugsweise markiert. Der nachweisbare ST-Rezeptorligand ist vorzugsweise radioaktiv markiert, vorzugsweise mit ^{125}I radioaktiv markiert. Der nachweisbare ST-Rezeptorligand ist vorzugsweise ein ST-Rezeptor-bindendes Peptid. Das nachweisbare ST-Rezeptor-bindende Peptid ist vorzugsweise ein ST-Peptid. In einigen bevorzugten Ausführungsformen ist das ST-Peptid aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3, SEQ ID Nr: 5, SEQ ID Nr: 6 und SEQ ID Nr: 54, ausgewählt. Zusätzliche Komponenten umfassen in manchen Kits einen festen Träger, Puffer und Anweisungen zum Ausführen des Assays.

[0199] Der ST-Rezeptor-Bindungsassay ist zum Nachweisen eines ST-Rezeptors in homogenisierten Gewe-

beproben und Körperflüssigkeitsproben, einschließlich des Plasmaanteils oder der Zellen in der Flüssigkeitsprobe, verwendbar.

[0200] Zusätzlich zum Nachweisen des ST-Rezeptorproteins umfassen Aspekte der vorliegenden Erfindung verschiedene Verfahren zur Bestimmung, ob eine Probe Zellen enthält, die einen ST-Rezeptor exprimieren, durch eine auf der Nukleotidsequenz basierenden molekularen Analyse. Mehrere verschiedene Verfahren sind dafür verfügbar, einschließlich denjenigen, die die Polymerasekettenreaktions(PCR)-Technologie, die Northern-Blot-Technologie, die Oligonukleotidhybridisierungstechnologie und die in situ Hybridisierungstechnologie verwenden.

[0201] Die Erfindung betrifft Oligonukleotidsonden und Primer, die in den Verfahren zum Identifizieren von mRNA, die den ST-Rezeptor kodiert, verwendet werden und diagnostische Kits, die derartige Komponenten umfassen.

[0202] Die auf der mRNA-Sequenz basierenden Verfahren zum Bestimmen, ob eine Probe einen den ST-Rezeptor kodierende mRNA aufweist, umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf die Polymerasekettenreaktionstechnologie, Northern- und Southern-Blot-Technologie, in situ Hybridisierungstechnologie und Oligonukleotidhybridisierungstechnologie.

[0203] Die hier beschriebenen Verfahren sollen an Beispielen erläutern, wie die vorliegende Erfindung ausgeführt werden kann, und sollen nicht den Umfang der Erfindung einschränken. Es wird angenommen, dass eine andere Sequenz-basierende Methodologie zum Nachweisen des Vorhandenseins einer spezifischen mRNA, die den ST-Rezeptor kodiert, in nicht kolorektalen Proben erfindungsgemäß angewandt werden kann.

[0204] Ein bevorzugtes Verfahren zum Nachweisen von den ST-Rezeptor kodierender mRNA in genetischem Material, das aus nicht kolorektalen Proben stammt, verwendet die Polymerasekettenreaktions(PCR)-Technologie. Die PCR-Technologie wird von dem Durchschnittsfachmann routinemäßig ausgeübt und ihre Verwendungen in der Diagnose sind gut bekannt und akzeptiert. Verfahren zur Ausübung der PCR-Technologie sind in „PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Innis, M. A., et al. Herausg. Academic Press, Inc. San Diego, CA (1990), auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird, offenbart. Anwendungen der PCR-Technologie sind in „Polymerasekettenreaktion" Erlich, H. A., et al., Herausg. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird, offenbart. Das U.S. Patent Nr. 4,683,202, U.S. Patent Nr. 4,683,195, U.S. Patent Nr. 4,965,188 und U.S. Patent Nr. 5,075,216, auf deren Offenbarungsgehalte hier vollumfänglich Bezug genommen wird, beschreiben Verfahren zum Durchführen der PCR. Die PCR kann routinemäßig unter Verwendung eines Perkin Elmer Cetus GENE AMP RNA PCR-Kits, Teil Nr. N808-0017 ausgeübt werden.

[0205] Die PCR-Technologie gestattet die schnelle Erzeugung mehrfacher Kopien von DNA-Sequenzen, indem 5'- und 3'-Primer zur Verfügung gestellt werden, die an Sequenzen hybridisieren, die in einem RNA- oder DNA-Molekül vorhanden sind, und indem weiterhin frei Nukleotide und ein Enzym, das die zu der Nukleotidsequenz komplementäre Basen zwischen die Primer mit den freien Nukleotiden auffüllt, um einen komplementären DNA-Strang herzustellen. Das Enzym wird die komplementären Sequenzen benachbart zu den Primern auffüllen. Wenn sowohl der 5'-Primer als auch der 3' Primer an Nukleotidsequenzen an dasselbe kleine Nukleinsäurefragment hybridisieren, führt dies zu einer exponentiellen Amplifikation eines spezifisch großen Doppelstrangprodukts. Wenn nur ein einzelner Primer an das Nukleinsäurefragment hybridisiert, erzeugt die lineare Amplifikation Einzelstrangprodukte mit variabler Länge.

[0206] PCR-Primer können unter Verwendung von Sequenzinformation routinemäßig durch den Fachmann gestaltet werden. Die das ST-Rezeptorprotein kodierende Nukleotidsequenz ist gut bekannt, wie zum Beispiel in U.S. Patent Nr. 5,237,051 und F. J. Sauvage et al. 1991 J. Biol. Chem. 266: 17912–17918, auf deren Offenbarungsgehalte hier vollumfänglich Bezug genommen wird. Zur Durchführung dieses Verfahrens wird RNA aus Zellen in einer Probe extrahiert und getestet oder zur Herstellung von cDNA unter Verwendung gut bekannter Verfahren und leicht verfügbarer Ausgangsmaterialien verwendet.

[0207] Der Durchschnittsfachmann kann leicht PCR-Primer herstellen. Ein Satz von Primern enthält im Allgemeinen zwei Primer. Wird eine PCR mit extrahierter mRNA oder davon erzeugter cDNA durchgeführt, falls die das ST-Rezeptorprotein kodierende mRNA oder cDNA vorhanden ist, werden mehrfache Kopien der mRNA oder cDNA hergestellt. Falls sie nicht vorhanden ist, wird die PCR kein einzelnes nachweisbares Produkt erzeugen. Primer weisen im Allgemeinen 8–50 Nukleotide, vorzugsweise ungefähr 15–35 Nukleotide, bevorzugter 18–28 Nukleotide auf, die identisch oder komplementär zu der das ST-Rezeptorprotein kodierenden mRNA

oder davon erzeugter cDNA sind und daher an daran hybridisieren. In bevorzugten Ausführungsformen weisen die Primer jeweils 15–35 Nukleotid-, bevorzugter 18–28 Nukleotidfragmente des Nukleinsäuremoleküls auf, das die das ST-Rezeptorprotein kodieren Nukleotidsequenz umfasst, wie in dem U.S. Patent Nr. 5,237,051 und F. J. Sauvage et al. 1991 J. Biol. Chem. 266: 17912–17918 beschrieben ist. Der Primer muss an die zu amplifizierende Sequenz hybridisieren. Typische Primer weisen eine Länge von 18–28 Nukleotiden auf und weisen im Allgemeinen eine Zusammensetzung von 50% bis 60% G + C auf. Der gesamte Primer ist vorzugsweise zu der Sequenz, an die er hybridisieren muss, komplementär. Primer erzeugen vorzugsweise PCR-Produkte mit 100 Basenpaaren bis 2000 Basenpaaren. Es ist jedoch möglich, Produkte mit 50 bis zu 10 kb und mehr zu erzeugen. Falls mRNA als Matrize verwendet wird, müssen die Primer an mRNA-Sequenzen hybridisieren. Falls cDNA als Matrize verwendet wird, müssen die Primer an cDNA-Sequenzen hybridisieren. Die extrazelluläre Domäne ist der einzigartigste Teil des ST-Rezeptorproteins. Es hybridisiert mindestens ein Primer an eine Nukleotidsequenz, die der extrazellulären Domäne des ST-Rezeptorproteins entspricht.

[0208] In einigen bevorzugten Ausführungsformen wird der 5'-PCR-Primer basierend auf den Nukleotiden 15–41 der ST-Rezeptor-kodierenden Sequenz ausgelegt, wie in dem U.S. Patent Nr. 5,237,051 beschrieben ist. In einigen bevorzugten Ausführungsformen wird der 5'-PCR-Primer basierend auf den Nukleotiden 20–40 der ST-Rezeptor-kodierenden Sequenz ausgelegt, wie in dem U.S. Patent Nr. 5,237,051 beschrieben ist. In einigen bevorzugten Ausführungsformen wird der 5'-PCR-Primer basierend auf den Nukleotiden 25–43 der ST-Rezeptor-kodierenden Sequenz ausgefegt, wie in dem U.S. Patent Nr. 5,237,051 beschrieben ist. In einigen bevorzugten Ausführungsformen wird der 5'-PCR-Primer basierend auf den Nukleotiden 40–62 der ST-Rezeptor-kodierenden Sequenz ausgelegt, wie in dem U.S. Patent Nr. 5,237,051 beschrieben ist. In einigen bevorzugten Ausführungsformen wird der 3'-PCR-Primer basierend auf den Nukleotiden 350–375 der ST-Rezeptor-kodierenden Sequenz ausgelegt, wie in dem U.S. Patent Nr. 5,237,051 beschrieben ist. In einigen bevorzugten Ausführungsformen wird der 3'-PCR-Primer basierend auf den Nukleotiden 290–308 der ST-Rezeptor-kodierenden Sequenz ausgelegt, wie in dem U.S. Patent Nr. 5,237,051 beschrieben ist. In einigen bevorzugten Ausführungsformen wird der 3'-PCR-Primer basierend auf den Nukleotiden 121–141 der ST-Rezeptor-kodierenden Sequenz ausgelegt, wie in dem U.S. Patent Nr. 5,237,051 beschrieben ist. In einigen bevorzugten Ausführungsformen wird der 3'-PCR-Primer basierend auf den Nukleotiden 171–196 der ST-Rezeptor-kodierenden Sequenz ausgelegt, wie in dem U.S. Patent Nr. 5,237,051 beschrieben ist.

[0209] Die mRNA oder cDNA wird mit den Primern, freien Nukleotiden und dem Enzym, den Standard PCT-Protokollen folgend, kombiniert. Die Mischung macht eine Reihe von Temperaturwechseln durch. Falls die den ST-Rezeptor kodierende mRNA oder cDNA vorhanden ist, das heißt, falls beide Primer an Sequenzen auf demselben Molekül hybridisieren, wird das die Primer und die komplementären Intervening-Sequenzen umfassende Molekül exponentiell amplifiziert. Die amplifizierte DNA kann leicht durch eine Vielzahl gut bekannter Mittel nachgewiesen werden. Falls keine den ST-Rezeptor kodierende mRNA oder cDNA vorhanden ist, wird kein PCR-Produkt exponentiell amplifiziert. Die PCR-Technologie stellt daher ein äußerst einfaches unkompliziertes und zuverlässiges Verfahren zum Nachweis von mRNA, die das ST-Rezeptorprotein kodiert, in einer Probe zur Verfügung.

[0210] Das PCR-Produkt kann durch mehrere gut bekannte Mittel nachgewiesen werden. Das bevorzugte Verfahren zum Nachweisen den Vorhandenseins amplifizierter DNA besteht darin, das PCR-Reaktionsmaterial durch Gelelektrophorese zu trennen und das Gel mit Ethidiumbromid zur färben, um die amplifizierte DNA, falls vorhanden, sichtbar zu machen. Ein Größenstandard der erwarteten Größe der amplifizierten DNA wird vorzugsweise als eine Kontrolle auf dem Gel laufen gelassen.

[0211] In machen Fällen, wie zum Beispiel, wenn ungewöhnlich kleine Mengen an RNA rückgewonnen werden und nur kleine Menge an cDNA davon erzeugt wurden, ist es erwünscht oder notwendig, eine PCR-Reaktion mit dem ersten PCR-Reaktionsprodukt durchzuführen. Das heißt, wenn es schwierig ist, Mengen an amplifizierter DNA, die durch die erste Reaktion erzeugt wurde, nachzuweisen, kann eine zweite PCR durchgeführt werden, um mehrfache Kopien der DNA-Sequenzen der ersten amplifizierten DNA herzustellen. Ein verschachtelter Satz von Primern hybridisiert an Sequenzen stromabwärts von dem 5'-Primer und stromaufwärts von dem 3'-Primer, die in der ersten Reaktion verwendet wurden.

[0212] Die vorliegende Erfindung umfasst Oligonukleotide, die als Primer zum Durchführen von PCR-Verfahren zur Amplifikation von der das ST-Rezeptorprotein kodierender mRNA oder cDNA verwendbar sind.

[0213] Entsprechend der Erfindung können diagnostische Kits zusammengesetzt werden, die zum Ausüben von Verfahren zum Nachweisen des Vorhandenseins von mRNA oder cDNA, die den ST-Rezeptor kodiert, in nicht kolorektalen Proben verwendbar sind. Derartige diagnostische Kits umfassen Oligonukleotide, die als Pri-

mer zum Durchführen von PCR-Verfahren verwendbar sind. Es wird bevorzugt, dass die erfindungsgemäßen diagnostischen Kits einen Behälter, umfassend einen Größenmarker, der als Standard auf einem Gel laufen gelassen werden soll und der zum Nachweisen des Vorhandenseins amplifizierter DNA verwendet wird, umfassen. Der Größenmarker weist dieselbe Größe auf wie die durch die Primer in Gegenwart von der den ST-Rezeptor kodierenden RNA oder cDNA, erzeugte DNA.

[0214] PCR-Assays sind zum Nachweisen von mRNA, die den ST-Rezeptor kodiert, in homogenisierten Gewebeproben und Zellen in Körperflüssigkeitsproben verwendbar. Es wird angenommen, dass eine PCR mit dem Plasmaanteil einer flüssigen Probe zum Nachweisen von mRNA, die das ST-Rezeptorprotein kodiert, verwendet werden könnte.

[0215] Ein weiteres Verfahren zum Bestimmen, ob eine Probe Zellen enthält, die den ST-Rezeptor exprimieren, ist die Northern-Blot-Analyse von mRNA, die aus einer nicht kolorektalen Probe extrahiert wurde. Die Techniken zur Durchführung von Northern-Blot-Analysen sind dem Durchschnittsfachmann gut bekannt und sind in Sambrook, J. et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY beschrieben. mRNA-Extraktion, elektrophoretische Trennung der mRNA, Blotting, Sondenherstellung und Hybridisierung sind alles gut bekannte Techniken, die unter Verwendung leicht verfügbarer Ausgangsmaterialien routinemäßig durchgeführt werden können.

[0216] Die mRNA wird unter Verwendung von Poly-dT-Säulen extrahiert und das Material wird durch Elektrophorese getrennt und zum Beispiel auf Nitrozellulosepapier übertragen. Markierte Sonden, hergestellt aus einem isolierten spezifischen Fragment oder Fragmenten, können zum Sichtbarmachen des Vorhandenseins eines komplementären Fragments, das an dem Papier fixiert ist, verwendet werden. Sonden, die zum Identifizieren von mRNA in einem Northern-Blot verwendbar sind, weisen eine Nukleotidsequenz auf, die zu der mRNA komplementär ist, die von dem Gen transkribiert wird, das das ST-Rezeptorprotein kodiert. Der Durchschnittsfachmann könnte die Sequenzinformation in dem U.S. Patent Nr. 5,237,051 und F. J. Sauvage et al. 1991 J. Biol. Chem. 266: 17912–17918 dazu verwenden, derartige Sonden zu entwerfen oder das ST-Rezeptorgen oder cDNA zu isolieren und zu klonieren, die als eine Sonde verwendet werden können. Sonden hybridisieren vorzugsweise an den Teil der mRNA, der der extrazellulären Domäne des ST-Rezeptorproteins entspricht. In bevorzugten Ausführungsformen sind die Sonden Klone mit voller Länge oder Fragmente des Nukleinsäuremoleküls, das die das ST-Rezeptorprotein kodierende Nukleotidsequenz umfasst, wie in dem U.S. Patent Nr. 5,237,051 und F. J. Sauvage et al. 1991 J. Biol. Chem. beschrieben ist. Derartige Sonden weisen mindestens 15 Nukleotide, vorzugsweise 30–200, bevorzugter 40–100 Nukleotidfragmente auf und können die gesamte kodierende Sequenz von ST-Rezeptoren, bevorzugter 18–28 Nukleotidfragmente des Nukleinsäuremoleküls aufweisen, das die Nukleotidsequenz umfasst, die das ST-Rezeptorprotein kodiert, wie in dem U.S. Patent Nr. 5,237,051 und F. J. Sauvage et al. 1991 J. Biol. Chem. 266: 17912–17918 beschrieben ist. Eine bevorzugte Sonde hybridisiert an die mRNA, die das ST-Rezeptorprotein kodiert, von Nukleotid 50 bis Nukleotid 90.

[0217] Entsprechend der Erfindung können diagnostische Kits zusammengesetzt werden, die zum Ausüben von Verfahren zum Nachweisen des Vorhandenseins von mRNA, die den ST-Rezeptor kodiert, in nicht kolorektalen Proben verwendbar sind. Derartige diagnostische Kits umfassen Oligonukleotide, die als Sonden zum Hybridisieren an die mRNA verwendbar sind. Die Sonden können radioaktiv markiert sein. Es wird bevorzugt; dass erfindungsgemäße diagnostische Kits einen Behälter umfassen, umfassend einen Größenmarker, den man als Standard auf einem Gel laufen lässt. Es wird bevorzugt, dass erfindungsgemäße diagnostische Kits einen Behälter, umfassend eine positive Kontrolle, die an die Sonde hybridisieren wird, umfassen.

[0218] Die Northern-Blot-Analyse ist zum Nachweisen von mRNA, die den ST-Rezeptor kodiert, in homogenisierten Gewebeproben und Zellen in Körperflüssigkeitsproben verwendbar. Es wird angenommen, dass eine PCR mit dem Plasmaanteil einer flüssigen Probe zum Nachweisen von mRNA, die das ST-Rezeptorprotein kodiert, verwendet werden könnte.

[0219] Ein weiteres Verfahren zum Nachweisen des Vorhandenseins von mRNA, die das ST-Rezeptorprotein kodiert, besteht aus der Oligonukleotidhybridisierungstechnologie. Die Oligonukleotidhybridisierungstechnologie ist dem Durchschnittsfachmann gut bekannt. Kurz gesagt, nachweisbare Sonden enthalten eine spezifische Nukleotidsequenz, die an die Nukleotidsequenz der mRNA hybridisieren wird, die das ST-Rezeptorprotein kodiert. RNA oder von RNA hergestellte cDNA aus einer Probe wird üblicherweise auf Filterpapier oder dergleichen fixiert. Die Sonden werden zugegeben und unter Bedingungen gehalten, die die Hybridisierung nur dann gestatten, wenn die Sonden vollständig das fixierte genetische Material ergänzen. Die Bedingungen sind ausreichend stringent, um Sonden abzuwaschen, bei denen nur einen Teil der Sonde an das fixierte Material

hybridisiert. Der Nachweis der Sonde auf dem gewaschenen Filter weist auf komplementäre Sequenzen hin.

[0220] In Oligonukleotidassays verwendbare Sonden weisen mindestens 18 Nukleotide der komplementären DNA auf und können so groß wie die zur ST-Rezeptor-cDNA vollständige komplementäre Sequenz sein. In einigen bevorzugten Ausführungsformen weisen die Sonden der Erfindung 30–200 Nukleotide, vorzugsweise 40–100 Nukleotide auf. Die Sonden enthalten vorzugsweise eine Sequenz, die zu dem Anteil komplementär ist, der die extrazelluläre Domäne des ST-Rezeptors kodiert.

[0221] Der Durchschnittsfachmann kann unter Verwendung der in dem U.S. Patent 5.237,051 und F. J. Sauvage et al. 1991 J. Biol. Chem. 266: 17912–17918 offenbarten Sequenzinformation Sonden gestalten, die zu mRNA-Sequenzen vollständig komplementär aber keine genomischen DNA-Sequenzen sind. Die Hybridisierungsbedingungen können durch nicht vollständig komplementäre Hybridisierung routinemäßig optimiert werden, um das Hintergrundsignal zu minimieren. Die Sonden hybridisieren vorzugsweise an den Teil der mRNA, der eine Nukleotidsequenz umfasst, die der extrazellulären Domäne des ST-Rezeptorproteins entspricht. Die Sonden hybridisieren vorzugsweise an den Teil der mRNA, die der extrazellulären Domäne des ST-Rezeptorproteins entspricht. In bevorzugten Ausführungsformen sind die Sonden Klone mit voller Länge oder Fragmente des Nukleinsäuremoleküls, das die das ST-Rezeptorprotein kodierende Nukleotidsequenz umfasst, wie in dem U.S. Patent 5.237,051 und F. J. Sauvage et al. 1991 J. Biol. Chem. beschrieben ist. Derartige Sonden weisen mindestens 15 Nukleotide, vorzugsweise 30–200, bevorzugter 40–100 Nukleotidfragmente auf und können die gesamte kodierende Sequenz der ST-Rezeptoren, vorzugsweise 18–28 Nukleotidfragmente des Nukleinsäuremoleküls umfassen, das die Nukleotidsequenz, die das ST-Rezeptorprotein kodiert, umfasst, wie in dem Patent 5.237,051 und F. J. Sauvage et al. 1991 J. Biol. Chem. 266: 17912–17918 beschrieben ist. Eine bevorzugte Sonde hybridisiert an die mRNA, die das ST-Rezeptorprotein kodiert, von Nukleotid 50 bis Nukleotid 90.

[0222] Die vorliegende Erfindung umfasst markierte Oligonukleotide, die als Sonden zum Durchführen einer Oligonukleotidhybridisierung verwendbar sind. Das heißt, sie sind vollständig zu mRNA-Sequenzen komplementär aber keine genomischen Sequenzen. Zum Beispiel umfasst die mRNA-Sequenz Teile, die von verschiedenen Exonen kodiert sind. Die markierten Sonden der vorliegenden Erfindung sind mit radioaktiv markierten Nukleotiden oder anderweitig durch leicht verfügbare nicht radioaktive Nachweissysteme markiert.

[0223] Entsprechend der Erfindung können diagnostische Kits zusammengesetzt werden, die zum Ausüben von Oliognukleotidhybridisierungsverfahren der Erfindung verwendbar sind. Derartige diagnostische Kits umfassen ein markiertes Oligonukleotid, das Teile eines ST-Rezeptor kodiert, der durch verschiedenen Exone kodiert ist. Es wird bevorzugt, dass die markierten Sonden des erfindungsgemäßen Oliogonukleotid-Diagnosekits mit einem Radionukleotid markiert sind. Die auf der Oligonukleotidhybridisierung basierenden erfindungsgemäßen diagnostischen Kits umfassen vorzugsweise DNA-Proben, die positive und negative Kontrollen darstellen. Eine positive Kontroll-DNA-Probe ist eine, die ein Nukleinsäuremolekülumfasst, das eine Nukleotidsequenz aufweist, die zu den Sonden des Kits vollständig komplementär ist, so dass die Sonden unter Assaybedingungen an das Molekül hybridisieren werden. Eine negative Kontroll-DNA-Probe ist eine, die mindestens ein Nukleinsäuremolekülumfasst, dessen Nukleotidsequenz zu den Sequenzen der Sonde des Kits teilweise komplementär ist. Unter Assaybedingungen wird die Sonde nicht an die negative Kontroll-DNA-Probe hybridisieren. Der Durchschnittsfachmann könnte die Sequenzinformation in dem U.S. Patent Nr. 5,237,051 und F. J. Sauvage et al. 1991 J. Biol. Chem. 266: 17912–17918 dazu verwenden, derartige Sonden zugestalten oder das ST-Rezeptorgen oder die cDNA, die als eine Sonde verwendet werden kann, zu isolieren und zu klonieren. Jeder der beiden Stränge oder deren komplementärer Strang kann als eine Sonde verwendet werden.

[0224] Oliognukleotidhybridisierungstechniken sind zum Nachweisen der den ST-Rezeptor kodierenden mRNA in homogenisierten Proben und Zellen in Körperflüssigkeitsproben verwendbar. Es wird angenommen, dass die PCR mit dem Plasmaanteil einer flüssigen Probe zum Nachweisen der das ST-Rezeptorprotein kodierenden mRNA verwendet werden kann.

[0225] Die vorliegende Erfindung betrifft in vitro Kits zum Bewerten von Gewebeproben, um den Grad der Metastasierung zu bestimmen, und Reagenzien und Zusammensetzungen, die zu ihrem Ausüben verwendbar sind.

[0226] In einigen Ausführungsformen der Erfindung können Gewebeproben, die Teile der Lamina propria umfassen, aus Individuen isoliert werden, die sich von einer Operation zur Entfernung kolorektaler Tumore, einschließlich Resektion oder Dickdarmspiegelung, erholen oder sich dieser unterziehen. Das Gewebe wird zur Identifikation des Vorhandenseins oder der Abwesenheit des ST-Rezeptorproteins analysiert. Techniken, wie

zum Beispiel ein ST-Rezeptor/Ligand-Bindungsassays und Immunhistochemieassays können zur Bestimmung, ob der ST-Rezeptor in den Zellen der Gewebeprobe vorhanden ist, was eine metastatische Wanderung anzeigt, durchgeführt werden. Alternativ dazu werden in einigen Ausführungsformen der Erfindung Gewebeproben zur Identifikation, ob das ST-Rezeptorprotein in den Zellen der Gewebeprobe exprimiert wird, was eine metastatische Wanderung anzeigt, analysiert, indem das Vorhandensein oder die Abwesenheit von mRNA, die das ST-Rezeptorprotein kodiert, nachgewiesen wird. Das Vorhandensein von mRNA, die das ST-Rezeptorprotein kodiert, oder von davon erzeugter cDNA kann unter Verwendung von Techniken, wie zum Beispiel der in situ Hybridisierung, Immunhistochemie und dem in situ ST-Bindungsassay, bestimmt werden.

[0227] Die vorliegende Erfindung betrifft in vitro Kits zur Bewertung von Proben von Tumoren zur Bestimmung, ob oder ob nicht sie kolorektalen Ursprungs sind, und Reagenzien und Zusammensetzungen, die zu ihrer Ausübung verwendbar sind. In einigen Ausführungsformen der Erfindung können Tumorproben aus Individuen isoliert werden, die sich von einer Operation zur Entfernung von Tumoren im Kolon, Tumoren in anderen Organen oder Biopsiematerial erholen, oder sich dieser unterziehen. Die Tumorprobe wird zum Identifizieren des Vorhandenseins oder der Abwesenheit des ST-Rezeptorproteins analysiert. Techniken, wie zum Beispiel ST-Rezeptor/Ligand-Bindungsassays und Immunhistochemieassays können zum Bestimmen, ob der ST-Rezeptor in den Zellen der Tumorprobe vorhanden ist, was auf einen kolorektalen Ursprung hinweist, durchgeführt werden. Alternativ dazu werden in einigen Ausführungsformen der Erfindung Lumengewebeproben zur Identifikation, ob das ST-Rezeptorprotein in den Zellen der Tumorprobe exprimiert wird, was auf einen kolorektalen Ursprung hinweist, analysiert, indem das Vorhandensein oder die Abwesenheit von mRNA, die das ST-Rezeptorprotein kodiert, nachgewiesen wird. Das Vorhandensein von mRNA, die das ST-Rezeptorprotein kodiert, oder cDNA, die davon erzeugt wurde, kann unter Verwendung von Techniken, wie zum Beispiel der in situ Hybridisierung, Immunhistochemie und dem in situ ST-Bindungsassay bestimmt werden.

[0228] Die in situ Hybridisierungstechnologie ist dem Durchschnittsfachmann gut bekannt. Kurz gesagt, Zellen werden fixiert und nachweisbare Sonden, die eine spezifische Nukleotidsequenz enthalten, werden zu den fixierten Zellen gegeben. Falls die Zellen komplementäre Nukleotidsequenzen enthalten, werden die Sonden, die nachgewiesen werden können, an sie hybridisieren.

[0229] Sonden, die in Oligonukleotidassays verwendbar sind, weisen mindestens 18 Nukleotide der komplementären DNA auf und können so groß wie eine zu der ST-Rezeptor-mRNA vollständig komplementäre Sequenz sein. In einigen bevorzugten Ausführungsformen weisen die Sonden der Erfindung 30–200 Nukleotide, vorzugsweise 40–100 Nukleotide auf. Die Sonden enthalten vorzugsweise eine Sequenz, die zum dem Teil komplementär ist, der die extrazelluläre Domäne des ST-Rezeptors kodiert.

[0230] Der Durchschnittsfachmann kann unter Verwendung der in dem U.S. Patent Nr. 5,237,051 und F. J. Sauvage et al. 1991 J. Biol. Chem. 266: 17912–17918 offenbarten Sequenzinformation Proben entwerfen, die in der in situ Hybridisierungstechnologie zum Identifizieren von Zellen, die den ST-Rezeptor exprimieren, verwendbar sind. Die Sonden hybridisieren vorzugsweise an eine Nukleotidseuqenz, die der extrazellulären Domäne auf dem ST-Rezeptorprotein entspricht. Die Hybridisierungsbedingungen können routinemäßig zum Minimieren des Hintergrundsignals durch nicht völlig komplementäre Hybridisierung optimiert werden. Die Sonden hybridisieren vorzugsweise an den Teil der mRNA, die eine Nukleotidsequenz umfasst, die der extrazellulären Domäne des ST-Rezeptorproteins entspricht. Die Sonden hybridisieren vorzugsweise an den Teil der mRNA, der der extrazellulären Domäne des ST-Rezeptorproteins entspricht. In bevorzugten Ausführungsformen sind die Sonden Klone mit voller Länge oder Fragmente des Klone mit voller Länge oder Fragmente des Nukleinsäuremoleküls, das die Nukleotidsequenz umfasst, die das ST-Rezeptorprotein kodiert, wie in dem U.S. Patent Nr. 5,237,051 und F. J. Sauvage et al. 1991 J. Biol. Chem. beschrieben ist. Derartige Sonden weisen mindestens 15 Nukleotide, vorzugsweise 30–200, bevorzugter 40–100 Nukleotidfragmente auf und können aus der gesamten kodierenden Sequenz des ST-Rezeptors, besonders bevorzugt aus 18–28 Nukleotidfragmenten des Nukleinsäuremoleküls bestehen, das die das ST-Rezeptorprotein kodierende Nukleotidsequenz umfasst, wie in dem U.S. Patent Nr. 5,237,051 und F. J. Sauvage et al. 1991 J. Biol. Chem. 266: 17912–17918 beschrieben ist. Eine bevorzugte Sonde hybridisiert an die mRNA, die das ST-Rezeptorprotein kodiert, von Nukleotid 50 bis Nukleotid 90.

[0231] Die Sonden sind völlig komplementär und hybridisieren nicht gut an teilweise komplementäre Sequenzen. Für die erfindungsgemäße in situ Hybridisierung wird bevorzugt, dass die Sonden durch Fluoreszenz nachweisbar sind. Ein übliches Verfahren besteht aus dem Markieren der Sonde mit Biotin-modifiziertem Nukleotid und anschließendem Nachweisen mit Fluoreszenz-markiertem Avidin. Daher müssen die Sonden nicht selbst fluoreszenzmarkiert sein, sondern können nachfolgend mit einem Fluoreszenzmarker nachgewiesen werden.

[0232] Die vorliegende Erfindung umfasst markierte Oligonukleotide, die als Sonden zum Durchführen der Oligonukleotidhybridisierung verwendbar sind. Das heißt, sie sind zu den mRNA-Sequenzen vollständig komplementär, aber keine genomischen Sequenzen. Zum Beispiel umfasst die mRNA-Sequenz Teile, die von verschiedenen Exonen kodiert werden. Die markierten Sonden der vorliegenden Erfindung sind mit radioaktiv markierten Nukleotiden markiert oder anderweitig durch leicht verfügbare nicht radioaktive Nachweissysteme nachweisbar.

[0233] Die vorliegende Erfindung betrifft Sonden, die zur in situ Hybridisierung verwendbar sind, um Zellen zu identifizieren, die das ST-Rezeptorprotein exprimieren.

[0234] Zellen werden fixiert und die Sonden werden zu dem genetischen Material gegeben. Die Sonden werden an die in der Probe vorhandenen komplementäre Nukleinsäuresequenzen hybridisieren. Unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops, können die Sonden durch ihre Fluoreszenzmarker sichtbar gemacht werden.

[0235] Entsprechend der Erfindung können diagnostische Kits zusammengesetzt werden, die zum Ausüben der in situ Hybridisierungsverfahren der Erfindung verwendbar sind, die zu mRNA-Sequenzen vollständig komplementär sind, aber keine genomischen Sequenzen sind. Zum Beispiel umfasst die mRNA-Sequenz Teile, die von verschiedenen Exonen kodiert werden. Es wird bevorzugt, dass die markierten Sonden der erfindungsgemäßen in situ diagnostischen Kits mit einem Fluoreszenzmarker markiert sind.

[0236] Der Durchschnittsfachmann kann die fixierten Zellen zur Charakterisierung des Grades der metastatischen Wanderung der Kolonkrebszellen analysieren. Das Markieren der vom Kolon stammenden Zellen gestattet eine verbesserte Analyse.

[0237] Immunhistochemietechniken können zum Identifizieren und im wesentlichen zum Färben von Zellen mit dem ST-Rezeptor verwendet werden. Ein derartiges „Färben" gestattet eine Analyse der metastatischen Wanderung. Anti-ST-Rezeptorantikörper, wie die vorstehend beschriebenen, werden mit den fixierten Zellen in Kontakt gebracht und der in den Zellen vorhandene ST-Rezeptor reagiert mit den Antikörpern. Die Antikörper sind nachweisbar markiert oder werden unter Verwendung markierter zweiter Antikörper oder Protein A zum Färben der Zellen nachgewiesen.

[0238] ST-Bindungsassays können anstelle von Immunhistochemie durchgeführt werden, außer, dass der Zellschnitt zuerst gefroren wird, dann der ST-Bindungsassay durchgeführt wird und dann die Zellen fixiert werden.

[0239] Die hier zur Bewertung von Tumorschnitten beschriebenen Techniken können ebenfalls zum Analysieren von Gewebeschnitten für Proben von Lymphknoten sowie anderen Geweben verwendet werden, um das Vorhandensein von kolorektalen Tumorzellen zu Identifizieren. Die Proben können zum Nachweis der Expression des ST-Rezeptors präpariert und „gefärbt" werden.

[0240] Die folgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung und beabsichtigen nicht, die vorliegende Erfindung einzuschränken.

BEISPIELE

Beispiel 1

[0241] Die Folgenden sind repräsentative erfindungsgemäße Verbindungen. Jedes mal, wenn nachstehend zur Effizienz ein Verweis auf eine Reihe von Verbindungen zur Verfügung gestellt wird, bedeutet es, dass jede Verbindung in den Reihen, einschließlich aller Verbindungen in numerischer Reihenfolge, genannt wird, wie zum Beispiel „3-D1 bis 3-D16" bedeutet den Verweis auf die Verbindungen 3-D1, 3-D2, 3-D3, 3-D4, 3-D5, 3-D6, 3-D7, 3-D8, 3-D9, 3-D10, 3-D11, 3-D12, 3-D13, 3-D14, 3-D15 und 3-D16. Ebenso jedes Mal, wenn nachstehend zur Effizienz ein Verweis auf eine Reihe von SEQ ID Nr: 's zur Verfügung wird, bedeutet es, dass jede SEQ ID Nr: in der Reihe, einschließlich aller SEQ ID Nr: 's in numerischer Reihenfolge genannt wird, wie zum Beispiel SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 bedeutet den Verweis auf die SEQ ID Nr: 5, SEQ ID Nr: 6, SEQ ID Nr: 7, SEQ ID Nr: 8, SEQ ID Nr: 9, SEQ ID Nr: 10, SEQ ID Nr: 11, SEQ ID Nr: 12, SEQ ID Nr: 13, SEQ ID Nr: 14, SEQ ID Nr: 15, SEQ ID Nr: 16, SEQ ID Nr: 17, SEQ ID Nr: 18, SEQ ID Nr: 19, SEQ ID Nr: 20, SEQ ID Nr: 21, SEQ ID Nr: 22, SEQ ID Nr: 23, SEQ ID Nr: 24, SEQ ID Nr: 25, SEQ ID Nr: 26, SEQ ID Nr: 27, SEQ ID Nr: 28, SEQ ID Nr: 29, SEQ ID Nr: 30, SEQ ID Nr: 31, SEQ ID Nr: 32, SEQ ID Nr: 33, SEQ ID Nr: 34, SEQ ID Nr:

35, SEQ ID Nr: 36, SEQ ID Nr: 37, SEQ ID Nr: 38, SEQ ID Nr: 39, SEQ ID Nr: 40, SEQ ID Nr: 41, SEQ ID Nr: 42, SEQ ID Nr: 43, SEQ ID Nr: 44, SEQ ID Nr: 45, SEQ ID Nr: 46, SEQ ID Nr: 47, SEQ ID Nr: 48, SEQ ID Nr: 49, SEQ ID Nr: 50, SEQ ID Nr: 51, SEQ ID Nr: 52, SEQ ID Nr: 53 und SEQ ID Nr: 54. Entsprechend jedes Mal wenn zur Effizienz ein Verweis auf eine Reihe von Verbindungen zur Verfügung gestellt wird, bedeutet es, dass jede Verbindung in den Reihen, einschließlich aller Verbindungen in numerischer Reihenfolge genannt wird, wie zum Beispiel „5-AP bis 54-AP" bedeutet den Verweis auf die Verbindungen 5-AP, 6-AP, 7-AP, 8AP, 9-AP, 10-AP, 11-AP, 12-AP, 13-AP, 14-AP, 15-AP, 16-AP, 17-AP, 18-AP, 19-AP, 20-AP, 21-AP, 22-AP, 23-AP, 24-AP, 25-AP, 26-AP, 27-AP, 28-AP, 29-AP, 30-AP, 31-AP, 32-AP, 33-AP, 34-AP, 35-AP, 36-AP, 37-AP, 38-AP, 39-AP, 40-AP, 41-AP, 42-AP, 43-AP, 44-AP, 45-AP, 46-AP, 47-AP, 48-AP, 49-AP, 50-AP, 51-AP, 52-AP, 53-AP und 54-AP.

[0242] Die Verbindung 2-D1 umfasst Methotrexat (Amethopterin) konjugiert an SEQ Nr: 2.

[0243] Die Verbindung 2-D2 umfasst Doxorubicin (Adrimycin) konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0244] Die Verbindung 2-D3 umfasst Daunorubicin konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0245] Die Verbindung 2-D4 umfasst Cytosinarabinosid konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0246] Die Verbindung 2-D5 umfasst Etoposid konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0247] Die Verbindung 2-D6 umfasst Fluoruracil konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0248] Die Verbindung 2-D7 umfasst Melphalan konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0249] Die Verbindung 2-D8 umfasst Chlorambucil konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0250] Die Verbindung 2-D9 umfasst Cyclophosphamid konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0251] Die Verbindung 2-D10 umfasst cis-Platin konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0252] Die Verbindung 2-D11 umfasst Vindesin konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0253] Die Verbindung 2-D12 umfasst Mitomycin konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0254] Verbindung 2-D13 umfasst Bleomycin konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0255] Verbindung 2-D14 umfasst Purothionin konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0256] Verbindung 2-D15 umfasst Macromycin konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0257] Verbindung 2-D16 umfasst Trenimon konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0258] Die Verbindungen 3-D1 bis 3-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 3-D1 bis 3-D16 SEQ ID Nr: 3 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0259] Die Verbindungen 5-D1 bis 5-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 5-D1 bis 5-D16 SEQ ID Nr: 5 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0260] Die Verbindungen 6-D1 bis 6-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 6-D1 bis 6-D16 SEQ ID Nr: 6 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0261] Die Verbindungen 7-D1 bis 7-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 7-D1 bis 7-D16 SEQ ID Nr: 7 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0262] Die Verbindungen 8-D1 bis 8-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis

2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 8-D1 bis 8-D16 SEQ ID Nr: 8 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0263] Die Verbindungen 9-D1 bis 9-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 9-D1 bis 9-D16 SEQ ID Nr: 9 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0264] Die Verbindungen 10-D1 bis 10-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 10-D1 bis 10-D16 SEQ ID Nr: 2 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0265] Die Verbindungen 12-D1 bis 12-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 12-D1 bis 12-D16 SEQ ID Nr: 11 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0266] Die Verbindungen 12-D1 bis 12-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 12-D1 bis 12-D16 SEQ ID Nr: 12 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0267] Die Verbindungen 13-D1 bis 13-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 13-D1 bis 13-D16 SEQ ID Nr: 13 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0268] Die Verbindungen 14-D1 bis 14-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 14-D1 bis 14-D16 SEQ ID Nr: 14 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0269] Die Verbindungen 15-D1 bis 15-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 15-D1 bis 15-D16 SEQ ID Nr: 15 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0270] Die Verbindungen 16-D1 bis 16-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 16-D1 bis 16-D16 SEQ ID Nr: 16 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0271] Die Verbindungen 17-D1 bis 17-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 17-D1 bis 17-D16 SEQ ID Nr: 17 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0272] Die Verbindungen 18-D1 bis 18-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 18-D1 bis 18-D16 SEQ ID Nr: 18 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0273] Die Verbindungen 19-D1 bis 19-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 19-D1 bis 19-D16 SEQ ID Nr: 19 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0274] Die Verbindungen 20-D1 bis 20-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 20-D1 bis 20-D16 SEQ ID Nr: 20 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0275] Die Verbindungen 22-D1 bis 22-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 22-D1 bis 22-D16 SEQ ID Nr: 21 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0276] Die Verbindungen 22-D1 bis 22-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 22-D1 bis 22-D16 SEQ ID Nr: 22 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0277] Die Verbindungen 23-D1 bis 23-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis

2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 23-D1 bis 23-D16 SEQ ID Nr: 23 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0278] Die Verbindungen 24-D1 bis 24-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 24-D1 bis 24-D16 SEQ ID Nr: 24 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0279] Die Verbindungen 25-D1 bis 25-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 25-D1 bis 25-D16 SEQ ID Nr: 25 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0280] Die Verbindungen 26-D1 bis 26-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 26-D1 bis 26-D16 SEQ ID Nr: 26 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0281] Die Verbindungen 27-D1 bis 27-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 27-D1 bis 27-D16 SEQ ID Nr: 27 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0282] Die Verbindungen 28-D1 bis 28-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 28-D1 bis 28-D16 SEQ ID Nr: 28 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0283] Die Verbindungen 29-D1 bis 29-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 29-D1 bis 29-D16 SEQ ID Nr: 29 als den ST-Rezeptor-Bindunganteil.

[0284] Die Verbindungen 30-D1 bis 30-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 30-D1 bis 30-D16 SEQ ID Nr: 30 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0285] Die Verbindungen 32-D1 bis 32-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 32-D1 bis 32-D16 SEQ ID Nr: 31 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0286] Die Verbindungen 32-D1 bis 32-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 32-D1 bis 32-D16 SEQ ID Nr: 32 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0287] Die Verbindungen 33-D1 bis 33-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 33-D1 bis 33-D16 SEQ ID Nr: 33 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0288] Die Verbindungen 34-D1 bis 34-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 34-D1 bis 34-D16 SEQ ID Nr: 34 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0289] Die Verbindungen 35-D1 bis 35-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 35-D1 bis 35-D16 SEQ ID Nr: 35 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0290] Die Verbindungen 36-D1 bis 36-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 36-D1 bis 36-D16 SEQ ID Nr: 36 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0291] Die Verbindungen 37-D1 bis 37-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 37-D1 bis 37-D16 SEQ ID Nr: 37 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0292] Die Verbindungen 38-D1 bis 38-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis

2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 38-D1 bis 38-D16 SEQ ID Nr: 38 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0293] Die Verbindungen 39-D1 bis 39-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 39-D1 bis 39-D16 SEQ ID Nr: 39 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0294] Die Verbindungen 40-D1 bis 40-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 40-D1 bis 40-D16 SEQ ID Nr: 40 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0295] Die Verbindungen 42-D1 bis 42-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 42-D1 bis 42-D16 SEQ ID Nr: 41 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0296] Die Verbindungen 42-D1 bis 42-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 42-D1 bis 42-D16 SEQ ID Nr: 42 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0297] Die Verbindungen 43-D1 bis 43-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 43-D1 bis 43-D16 SEQ ID Nr: 43 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0298] Die Verbindungen 44-D1 bis 44-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 44-D1 bis 44-D16 SEQ ID Nr: 44 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0299] Die Verbindungen 45-D1 bis 45-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 45-D1 bis 45-D16 SEQ ID Nr: 45 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0300] Die Verbindungen 46-D1 bis 46-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 46-D1 bis 46-D16 SEQ ID Nr: 46 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0301] Die Verbindungen 47-D1 bis 47-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 47-D1 bis 47-D16 SEQ ID Nr: 47 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0302] Die Verbindungen 48-D1 bis 48-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 48-D1 bis 48-D16 SEQ ID Nr: 48 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0303] Die Verbindungen 49-D1 bis 49-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 49-D1 bis 49-D16 SEQ ID Nr: 49 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0304] Die Verbindungen 50-D1 bis 50-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 50-D1 bis 50-D16 SEQ ID Nr: 50 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0305] Die Verbindungen 51-D1 bis 51-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 51-D1 bis 51-D16 SEQ ID Nr: 51 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0306] Die Verbindungen 52-D1 bis 52-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 52-D1 bis 52-D16 SEQ ID Nr: 52 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0307] Die Verbindungen 53-D1 bis 53-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis

2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 53-D1 bis 53-D16 SEQ ID Nr: 53 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0308] Die Verbindungen 54-D1 bis 54-D16 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-D1 bis 2-D16, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 54-D1 bis 54-D16 SEQ ID Nr: 54 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0309] Die Verbindung 2-T1 umfasst Ricin konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0310] Die Verbindung 2-T2 umfasst Ricin A-Kette (Ricintoxin) konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0311] Die Verbindung 2-T3 umfasst Pseudomonas Exotoxin (PE) konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0312] Die Verbindung 2-T4 umfasst Diphtherietoxin (DT) konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0313] Die Verbindung 2-T5 umfasst Clostridium perfringens Phospholipase C (PLC) konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0314] Die Verbindung 2-T6 umfasst Rinderpankreasribonukleoase (BPR) konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0315] Die Verbindung 2-T7 umfasst antivirales Kermesbeere („pokeweed")-Protein (PAP) konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0316] Die Verbindung 2-T8 umfasst Abrin konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0317] Die Verbindung 2-T9 umfasst Abrin A-Kette (Abrintoxin) konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0318] Die Verbindung 2-T10 umfasst Kobra-Giftfaktor (CVF) konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0319] Die Verbindung 2-T11 umfasst Gelonin (GEL) konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0320] Die Verbindung 2-T12 umfasst Saporin (SAP) konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0321] Die Verbindung 2-T13 umfasst Modeccin konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0322] Verbindung 2-T14 umfasst Viscumin konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0323] Verbindung 2-T15 umfasst Volkensin konjugiert an SEQ ID Nr: 2.

[0324] Die Verbindungen 3-T1 bis 3-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 3-T1 bis 3-T15 SEQ ID Nr: 3 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0325] Die Verbindungen 5-T1 bis 5-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 5-T1 bis 5-T15 SEQ ID Nr: 5 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0326] Die Verbindungen 6-T1 bis 6-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 6-T1 bis 6-T15 SEQ ID Nr: 6 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0327] Die Verbindungen 7-T1 bis 7-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 7-T1 bis 7-T15 SEQ ID Nr: 7 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0328] Die Verbindungen 8-T1 bis 8-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 8-T1 bis 8-T15 SEQ ID Nr: 8 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0329] Die Verbindungen 9-T1 bis 9-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis

2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 9-T1 bis 9-T15 SEQ ID Nr: 9 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0330] Die Verbindungen 10-T1 bis 10-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 10-T1 bis 10-T15 SEQ ID Nr: 2 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0331] Die Verbindungen 11-T1 bis 11-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 11-T1 bis 11-T15 SEQ ID Nr: 11 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0332] Die Verbindungen 12-T1 bis 12-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 12-T1 bis 12-T15 SEQ ID Nr: 12 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0333] Die Verbindungen 13-T1 bis 13-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 13-T1 bis 13-T15 SEQ ID Nr: 13 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0334] Die Verbindungen 14-T1 bis 14-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 14-T1 bis 14-T15 SEQ ID Nr: 14 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0335] Die Verbindungen 15-T1 bis 15-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 15-T1 bis 15-T15 SEQ ID Nr: 15 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0336] Die Verbindungen 15-T1 bis 15-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 15-T1 bis 15-T15 SEQ ID Nr: 15 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0337] Die Verbindungen 17-T1 bis 17-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 17-T1 bis 17-T15 SEQ ID Nr: 17 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0338] Die Verbindungen 18-T1 bis 18-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 18-T1 bis 18-T15 SEQ ID Nr: 18 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0339] Die Verbindungen 19-T1 bis 19-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 19-T1 bis 19-T15 SEQ ID Nr: 19 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0340] Die Verbindungen 20-T1 bis 20-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 20-T1 bis 20-T15 SEQ ID Nr: 20 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0341] Die Verbindungen 21-T1 bis 21-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 21-T1 bis 21-T15 SEQ ID Nr: 21 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0342] Die Verbindungen 22-T1 bis 22-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 22-T1 bis 22-T15 SEQ ID Nr: 22 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0343] Die Verbindungen 23-T1 bis 23-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 23-T1 bis 23-T15 SEQ ID Nr: 23 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0344] Die Verbindungen 24-T1 bis 24-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis

2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 24-T1 bis 24-T15 SEQ ID Nr: 24 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0345] Die Verbindungen 25-T1 bis 25-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 25-T1 bis 25-T15 SEQ ID Nr: 25 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0346] Die Verbindungen 26-T1 bis 26-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 26-T1 bis 26-T15 SEQ ID Nr: 26 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0347] Die Verbindungen 27-T1 bis 27-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 27-T1 bis 27-T15 SEQ ID Nr: 27 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0348] Die Verbindungen 28-T1 bis 28-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 28-T1 bis 28-T15 SEQ ID Nr: 28 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0349] Die Verbindungen 29-T1 bis 29-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 29-T1 bis 29-T15 SEQ ID Nr: 29 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0350] Die Verbindungen 30-T1 bis 30-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 30-T1 bis 30-T15 SEQ ID Nr: 30 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0351] Die Verbindungen 31-T1 bis 31-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 31-T1 bis 31-T15 SEQ ID Nr: 31 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0352] Die Verbindungen 32-T1 bis 32-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 32-T1 bis 32-T15 SEQ ID Nr: 32 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0353] Die Verbindungen 33-T1 bis 33-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 33-T1 bis 33-T15 SEQ ID Nr: 33 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0354] Die Verbindungen 34-T1 bis 34-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 34-T1 bis 34-T15 SEQ ID Nr: 34 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0355] Die Verbindungen 35-T1 bis 35-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 35-T1 bis 35-T15 SEQ ID Nr: 35 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0356] Die Verbindungen 36-T1 bis 36-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 36-T1 bis 36-T15 SEQ ID Nr: 36 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0357] Die Verbindungen 37-T1 bis 37-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 37-T1 bis 37-T15 SEQ ID Nr: 37 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0358] Die Verbindungen 38-T1 bis 38-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 38-T1 bis 38-T15 SEQ ID Nr: 38 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0359] Die Verbindungen 39-T1 bis 39-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis

2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 39-T1 bis 39-T15 SEQ ID Nr: 39 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0360] Die Verbindungen 40-T1 bis 40-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 40-T1 bis 40-T15 SEQ ID Nr: 40 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0361] Die Verbindungen 41-T1 bis 41-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 41-T1 bis 41-T15 SEQ ID Nr: 41 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0362] Die Verbindungen 42-T1 bis 42-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 42-T1 bis 42-T15 SEQ ID Nr: 42 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0363] Die Verbindungen 43-T1 bis 43-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 43-T1 bis 43-T15 SEQ ID Nr: 43 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0364] Die Verbindungen 44-T1 bis 44-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 44-T1 bis 44-T15 SEQ ID Nr: 44 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0365] Die Verbindungen 45-T1 bis 45-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 45-T1 bis 45-T15 SEQ ID Nr: 45 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0366] Die Verbindungen 46-T1 bis 46-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 46-T1 bis 46-T15 SEQ ID Nr: 46 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0367] Die Verbindungen 47-T1 bis 47-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 47-T1 bis 47-T15 SEQ ID Nr: 47 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0368] Die Verbindungen 48-T1 bis 48-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 48-T1 bis 48-T15 SEQ ID Nr: 48 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0369] Die Verbindungen 49-T1 bis 49-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 49-T1 bis 49-T15 SEQ ID Nr: 49 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0370] Die Verbindungen 50-T1 bis 50-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 50-T1 bis 50-T15 SEQ ID Nr: 50 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0371] Die Verbindungen 51-T1 bis 51-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 51-T1 bis 51-T15 SEQ ID Nr: 51 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0372] Die Verbindungen 52-T1 bis 52-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteilumfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 52-T1 bis 52-T15 SEQ ID Nr: 52 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0373] Die Verbindungen 53-T1 bis 53-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis 2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 53-T1 bis 53-T15 SEQ ID Nr: 53 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0374] Die Verbindungen 54-T1 bis 54-T15 sind dieselben wie die entsprechenden Verbindungen 2-T1 bis

2-T15, außer, statt dass SEQ ID Nr: 2 als der ST-Rezeptor-Bindungsanteil umfasst wird, umfasst jede der Verbindungen 54-T1 bis 54-T15 SEQ ID Nr: 54 als den ST-Rezeptor-Bindungsanteil.

[0375] Die Verbindungen 2-AP, 3-AP und 5-AP bis 54-AP beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die alkalische Phosphatase konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0376] Die Verbindungen 2-NIZ, 3-NIZ und 5-NIZ bis 54-NIZ beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die Nitroimidazol konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0377] Die Verbindungen 2-MEZ, 3-MEZ und 5-MEZ bis 54-ME beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die Metronidazol konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0378] Die Verbindungen 2-MIS, 3-MIS und 5-MIS bis 54-MIS beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die Misonidazol konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0379] Die Verbindungen 2-47Sc, 3-47Sc und 5-47Sc bis 54-47Sc beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{47}Sc konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0380] Die Verbindungen 2-67Cu, 3-67Cu und 5-67Cu bis 54-67Cu beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{67}Cu konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0381] Die Verbindungen 2-90Y, 3-90Y und 5-90Y bis 54-90Y beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{90}Y konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0382] Die Verbindungen 2-109Pd, 3-109Pd und 5-109Pd bis 54-109Pd beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{109}Pd konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0383] Die Verbindungen 2-123I, 3-123I und 5-123I bis 54-123I beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{123}I konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0384] Die Verbindungen 2-125I, 3-125 und 5-125I bis 54-125I beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{125}I konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0385] Die Verbindungen 2-131I, 3-131I und 5-131I bis 54-131I beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{131}I konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0386] Die Verbindungen 2-132I, 3-132I und 5-132I bis 54-132I beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{132}I konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0387] Die Verbindungen 2-186Re, 3-186Re und 5-186Re bis 54-186Re beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{186}Re konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0388] Die Verbindungen 2-188Re, 3-188Re und 5-188Re bis 54-188Re beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{188}Re konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0389] Die Verbindungen 2-199Au, 3-199Au und 5-199Au bis 54-199Au beziehen sich auf die 51 konjugierten

Verbindungen, die ^{199}Au konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0390] Die Verbindungen 2-211At, 3-211At und 5-211At bis 54-211At beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{211}At konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0391] Die Verbindungen 2-212Pb, 3-212Pb und 5-212Pb bis 54-212Pb beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{212}Pb konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0392] Die Verbindungen 2-212Bi, 3-212Bi und 5-212Bi bis 54-212Bi beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{212}Bi konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0393] Die Verbindungen 2-203Pb, 3-203Pb und 5-203Pb bis 54-203Pb beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{203}Pb konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0394] Die Verbindungen 2-206Bi, 3-206Bi und 5-206Bi bis 54-206Bi beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{206}Bi konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0395] Die Verbindungen 2-32P, 3-32P und 5-32P bis 54-32P beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{32}P konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0396] Die Verbindungen 2-33P, 3-33P und 5-33P bis 54-33P beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{33}P konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0397] Die Verbindungen 2-71Ge, 3-71Ge und 5-71Ge bis 54-71Ge beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{71}Ge konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0398] Die Verbindungen 2-77As, 3-77As und 5-77As bis 54-77As beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{77}As konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0399] Die Verbindungen 2-103Pd, 3-103Pd und 5-103Pd bis 54-103Pd beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{103}Pd konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0400] Die Verbindungen 2-105Rh, 3-105Rh und 5-105Rh bis 54-105Rh beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{105}Rh konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0401] Die Verbindungen 2-111Ag, 3-111Ag und 5-111Ag bis 54-111Ag beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{111}Ag konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0402] Die Verbindungen 2-119Sb, 3-119Sb und 5-119Sb bis 54-119Sb beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{119}Sb konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0403] Die Verbindungen 2-121Sn, 3-121Sn und 5-121Sn bis 54-121Sn beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{121}Sn konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0404] Die Verbindungen 2-131Cs, 3-131Cs und 5-131Cs bis 54-131Cs beziehen sich auf die 51 konjugierten

Verbindungen, die ^{131}Cs konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0405] Die Verbindungen 2-127Cs, 3-131 Cs und 5-131 Cs bis 54-127Cs beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die 127Cs konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0406] Die Verbindungen 2-129Cs, 3-129Cs und 5-129Cs bis 54-129Cs beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{129}Cs konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0407] Die Verbindungen 2-143Pr, 3-143Pr und 5-143Pr bis 54-143Pr beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{143}Pr konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0408] Die Verbindungen 2-161Tb, 3-161Tb und 5-161Tb bis 54-161Tb beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{161}Tbkonjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0409] Die Verbindungen 2-177Lu, 3-177Lu und 5-177Lu bis 54-177Lu beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{111}Lu konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0410] Die Verbindungen 2-191Os, 3-191Os und 5-191Os bis 54-191Os beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{191}Os konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0411] Die Verbindungen 2-193mPt, 3-193mPt und 5-193mPt bis 54-193mPt beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{193M}Pt konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0412] Die Verbindungen 2-197Hg, 3-197Hg und 5-197Hg bis 54-197Hg beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die 197Hg konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0413] Die Verbindungen 2-43K, 3-43K und 5-43K bis 54-43K beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{43}K konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0414] Die Verbindungen 2–52Fe, 3-52Fe und 5-52Fe bis 54-52Fe beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{52}Fe konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0415] Die Verbindungen 2-57Co, 3-57Co und 5-57Co bis 54-57Co beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{57}Co konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0416] Die Verbindungen 2-67Ga, 3-67Ga und 5-67Ga bis 54-67Ga beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{67}Ga konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0417] Die Verbindungen 2-68Ga, 3-68Ga und 5-68Ga bis 54-68Ga beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{68}Ga konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0418] Die Verbindungen 2-77Br, 3-77Br und 5-77Br bis 54-77Br beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{77}Br konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0419] Die Verbindungen 2-81Rb, 3-81Rb und 5-81Rb bis 54-81Rb beziehen sich auf die 51 konjugierten Ver-

bindungen, die ^{81}Rb konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0420] Die Verbindungen 2-81mKr, 3-81mKr und 5-81mKr bis 54-81mKr beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{81M}Kr konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0421] Die Verbindungen 2-87mSr, 3-87mSr und 5-87mSr bis 54-87mSr beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{87M}Sr konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0422] Die Verbindungen 2-99mTc, 3-99mTc und 5-99mTc bis 54-99mTc beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{99M}Tc konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0423] Die Verbindungen 2-111In, 3-111In und 5-111In bis 54-111In beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{111}In konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0424] Die Verbindungen 2-113mIn, 3-113mIn und 5-113mIn bis 54-113mIn beziehen sich auf die 51 konjugierten Verbindungen, die ^{113M}In konjugiert an SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 beziehungsweise SEQ ID Nr: 5 bis SEQ ID Nr: 54 umfassen.

[0425] Die in diesem Beispiel beschriebenen Verbindungen werden mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel zur Herstellung erfindungsgemäßer pharmazeutischer Zusammensetzungen kombiniert. Die hier beschriebenen radiostabilen Verbindungen sind in pharmazeutischen Zusammensetzungen als Therapeutika in der Behandlung von Individuen, die unter dem Verdacht stehen, an metastsierendem kolorektalen Krebs zu leiden, einschließlich der Behandlung von Individuen mit diagnostiziertem lokalisierten kolorektalen Krebs, als ein prophylaktisches/therapeutisches Mittel, bevor eine Metastasierung ohne weiteres nachgewiesen werden kann, verwendbar. Bei Vorhandensein in therapeutisch wirksamen Mengen sind die hier beschriebenen radioaktiven Verbindungen in pharmazeutischen Zusammensetzungen als therapeutische Mittel in der Behandlung von Individuen, die unter dem Verdacht stehen, an metastasierendem kolorektalen Krebs zu leiden, einschließlich der Behandlung von Individuen mit diagnostiziertem lokalisierten kolorektalen Krebs als ein prophylaktisches/therapeutisches Mittel, bevor eine Metastasierung ohne weiteres nachgewiesen werden kann, verwendbar. Bei Vorhandensein in diagnostisch wirksamen Mengen sind die hier beschriebenen radioaktiven Verbindungen in pharmazeutischen Zusammensetzungen als bilderzeugende Mittel für die Diagnose und Identifikation von metastasirendem kolorektalen Krebs in Individuen verwendbar.

Beispiel 2

[0426] Ein Verfahren zum Vernetzen von ST-Rezeptorliganden mit einer freien Aminogruppe, wie zum Beispiel ST-Rezeptor-bindende Peptide, wie zum Beispiel SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 und SEQ ID Nr: 5–54, mit wirksamen Mitteln mit einer freien Aminogruppe, wie zum Beispiel Methotrexat, Doxorubicin, Daunorubicin, Cytosinarabinosid, cis-Platin, Vindesin, Mitomycin und Bleomycin oder alkalische Phosphatase oder Protein- oder Peptid-basierendes Toxin, verwendet homobifunktionelle Succinimidylester, vorzugsweise mit Kohlenstoffkettenspacern, wie zum Beispiel Disuccinimidylsuberat (Pierce Co, Rockford, IL). Diese Methode der Aminogruppenderivatisierung wurde erfolgreich zum Vernetzen von nativem ST mit Biotin und schließlich mit großen Agarosekügelchen im Mikrometermaßstab, verwendet, wobei die Funktion des nativen ST erhalten blieb (Hughes, M., et al. (1991) Biochem. 30: 10738; Hakki, S. et al. (1993) Int. J. Biochem. 25: 557; Almenoff, J. S., et al. (1992) Mol. Micro. 8: 865, auf deren Offenbarungsgehalte hier vollumfänglich Bezug genommen wird).

[0427] Ein ST-bindender Ligand mit der freien Aminogruppe, wie zum Beispiel ein ST-Rezeptor-bindendes Peptid wird in Gegenwart des chemischen Vernetzungsmittels und einem wirksamen Mittel, das eine freie Aminogruppe aufweist, in äquimolaren Mengen bei Raumtemperatur während 15–30 Min inkubiert. Die Inkubation wird durch Trennen der Reaktanden durch Gelpermeationschromatographie durch HPLC beendet. Diese Technik trennt die konjugierten Verbindungen von freien wirksamen Mitteln und freien ST-bindenden Liganden, wirksames Mittel-wirksames Mittel-Konjugate und ST-bindender Ligand-St-bindender Ligand-Konjugate. Es werden homogene durch ihre freien Aminogruppen konjugierte Präparate mit einem bevorzugten molaren Verhältnis von 1 : 1 erhalten. Wie vorstehend aufgezeigt wurde, erhält das Komplexieren der freien Aminogruppe eines ST-Peptids die Rezeptor-Bindungsfunktion.

Beispiel 3

[0428] Für den Fall, dass eine spaltbare konjugierte Verbindung erforderlich ist, kann dasselbe Protokoll, wie vorstehend beschrieben, unter Verwendung von 3,3'-Dithiobis(sulfosuccinimidylpropionat (SPDP), Pierce, IL) angewandt werden. SPDP bildet aus einer freien Aminogruppe eine Sulfhydrylgruppe, die zum Konjugierten einer Verbindung an eine andere freie Aminogruppe verwendet werden kann. Zum Beispiel werden ST-Peptide, wie zum Beispiel SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3, SEQ ID Nr: 5–54 unter Verwendung eingeführter Verfahren derivatisiert, wobei N-Succinimidyl-3-(2-Pyridildithio)propionat (SPDP, Pharmacia-LKB, NJ) verwendet wird. Das ST-Peptid wird mit einem 5-fachen molaren Überschuß an SPDP während 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das ST-Pyridylthipropionatkonjugat wird von nicht umgesetzten Reagenzien durch Gelpermeationschromatographie durch HPLC getrennt. Ein wirksames Mittel mit einer freien Aminogruppe, wie zum Beispiel ein Proteinbasierendes Toxin, wird für die Konjugation durch Reduktion mit Dithiothreitol während 4 Stunden bei Raumtemperatur hergestellt. Das reduzierte wirksame Mittel wird mit einem 2-fachen molaren Überschuß an St-Rezeptorligand-PDP-Konjugat bei pH-Wert 8,0 während 36 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Konjugatverbindung wird von nicht umgesetzten Mitteln durch Gelpermeationschromatographie durch HPLC gereinigt.

[0429] Dieses Protokoll zur Konjugation ist besondere zum Konjugieren von St-Peptiden an Diphtherietoxin A-Ketten und Pseudomonas Exotoxin, sowie Ricintoxin A-Ketten verwendbar (Magerstadt, M. Antibody Conjugates and Malignant Disease. (1991) CRC Press, Boca Raton, USA, Seiten 110–152; Cawley, D. B. et al. (1980) Cell 22: 563; Cumber, A. J., et al. (1985) Meth. Enz. 112: 207, Gros, O. (1985) J. Immunol. Meth. 81: 283, Worrell, N. R., et al. (1986) Anti-Cancer Drug Design 1: 179, Thorpe, P. E. et al. (1987) Cancer Res. 47: 5924, auf deren Offenbarungsgehalte hier vollumfänglich Bezug genommen wird).

Beispiel 4

[0430] Wirksame Mittel mit einer freien Aminogruppe können mit SPDP, wie vorstehend beschrieben, derivatisiert werden und an einen ST-Liganden konjugiert werden, der eine freie Aminogruppe aufweist und der mit dem Succinimidylester der Iodessigsäure (Pierce Co., Rockford IL) modifiziert wurde (Magerstadt, M. (1991) Antibody Conjugates And Malignant Disease, CRC Press Boca Raton, Cumber, A. J. et al. (1985) Meth. Enz. 112: 20, auf deren Offenbarungsgehalte hier vollumfänglich Bezug genommen wird). Die Konjugation hängt von der selektiven Reaktion der Iodacetylgruppen, die in das Aminoende des ST-Liganden eingeführt wurden, mit den Thiolgruppen, die in das wirksame Mittel eingeführt wurden, ab. Wie bei dem vorstehenden Protokoll, vermeidet dieses Verfahren eine Homopolymerbildung. Das Produkt ist jedoch über eine zentrale Thioetherbindung, die nicht reduziert werden kann, konjugiert.

Beispiel 5

[0431] Ein ST-Rezeptorligand mit einer freien Aminogruppe und wirksame Mittel mit freien Aminogruppen können über eine Disulfidbindung, unter Verwendung von Iminothiolan (Pierce, Rockford, IL) (Fitzgerald, D. J. P. et al. (1983) Cell 32: 607, Magerstadt, M. (1991) Antibody Conjugates And Malignant Disease, CRC Press, Boca Raton, Bjorn, M. J., et al. (1985) Cancer Res. 45: 1214, Bjorn, M. J., et al. (1986) Cancer Res. 46: 3262, auf deren Offenbarungsgehalte hier vollumfänglich Bezug genommen wird) konjugiert werden. Der St-Rezeptorligand mit einer freien Aminogruppe wird an dem Aminoende mit Iminothiolan derivatisiert und das wirksame Mittel wird mit SPDP, wie vorstehend beschrieben, derivatisiert. Das Umsetzen des Iminothiolan-derivatisierten ST-Rezeptorliganden mit SPDP-derivatisiertem wirksamen Mittel führt zur Konjugation über eine reduzierbare Disulfidbindung. Zusätzlich sorgt Iminothiolan für die vielseitigen Möglichkeiten, diese Proteine über andere Bindungen als Disulfide zu konjugieren. Daher wird die Derivatisierung von wirksamen Mitteln mit dem heterobifunktionellen Mittel Sulfosuccinimidyl-4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexan (Pierce, Rockford, IL) und die Reaktion mit Iminothiolan-derivatisierten ST-Rezeptorliganden diese Peptide ohne Bildung von Disulfiden konjugieren.

Beispiel 6

[0432] Erfindungsgemäße konjugierte Verbindungen, die einen wirksamen Anteil umfassen, der ein therapeutisches Mittel ist, hemmt spezifisch T84-Zellen in vitro. Die folgenden Protokolle können verwendet werden, um darzulegen, dass die erfindungsgemäßen konjugierten Verbindungen, die einen wirksamen Anteil, der ein Chomotherapeutium oder ein Toxin ist, umfassen, spezifisch T84-Zellen in vitro hemmen. Die Hemmung von T84-Zellen wird durch Bestimmen der Wirkungen der konjugierten Verbindungen auf die Fähigkeit von T84-Zellen, ^{35}S-Leucin in Protein, 3H-Thymidin in DNA einzubauen und Kolonien zu bilden, bewertet. Die Be-

wertung von Protein und der DNA-Synthese sind klassische Techniken zur Bestimmung der Zytotoxizität konjugierter Verbindungen in vitro. Die Hemmung der Proteinsynthese wird gemessen, weil die als wirksame Anteile verwendeten Toxine spezifische Hemmstoffe für diesen Prozess sind. Daher sind diese Assays ein besonders empfindliches Maß dafür, ob konjugierte Verbindungen an T84-Zellen binden und von diesen aufgenommen werden. Die Hemmung der DNA-Synthese wird gemessen, weil einige Chemotherapeutika die DNA-Synthese hemmen und weiterhin, weil es ein Zytotoxizitätsassay ist, der eng mit der reproduktiven Überlebensfähigkeit der Zellen in Kultur korreliert. Die Zytotoxizität oder das Unterbrechen normaler zellulärer metabolischer Prozesse muss nicht immer direkt mit der Zell-Überlebensfähigkeit korrelieren. Daher wird die Bewertung der Kolonienbildung direkt die Fähigkeit der experimentellen Mittel zur Verringerung der Überlebensfähigkeit von Tumorzellen messen, die eng mit der Wirkung therapeutischer Mittel auf die Tumorlebensfähigkeit in vivo korreliert. Kontrollen umfassen das Durchführen desselben Assays unter Verwendung der nicht konjugierten Form des wirksamen Mittels und der nicht konjugierten Form des ST-Rezeptorliganden, von dem die konjugierte Verbindung umfasst wird, anstelle der konjugierten Verbindung. Die von den Testassays und Kontrollassays erhaltenen Ergebnisse werden verglichen.

[0433] Konjugierte Verbindungen werden auf ihre Fähigkeit zur Hemmung der Protein- und DNA-Synthese in vitro und zur Hemmung des Überlebens und der Wucherung durch Messen der Koloniebildung in einer Monolagenkultur durch eingeführte Protokolle bewertet (Wilson, A. P. (1987) „Cytotoxicity and viability assays", Animal Cell Culture: A Practical Approach. Freshney, R. I., Herausg. Seiten 183–216, IRL Press, Oxford, auf deren Offenbarungsgehalte hier vollumfägnlich Bezug genommen wird).

[0434] Zur Bewertung der Fähigkeit einer konjugierten Verbindung die Proteinsynthese in vitro zu hemmen, werden Zellen in 200 µl Medium bei einer Dichte von 1–2 × 10^5 unterhalb des Zusammenflusses ausgestrichen und man lässt sie anhaften, um während 12 Stunden bei 37°C eine trennende Zellmonolage zu bilden. Anschießend wird das Medium durch 200 µl frisches Medium, das die geeignete Konzentration an konjugierten Verbindungen enthält, ersetzt, und die Zellen werden bei 37°C über verschiedene Zeitdauern inkubiert. Am Ende der angezeigten Inkubationszeit werden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und bei 37°C in 0,5 ml Methionin-freiem Medium, das mit 0,5 µCi L^{35}S-Methionin (800 Ci/mmol) ergänzt worden war, inkubiert. Nach Inkubation während weiteren 2 Stunden bei 37°C wird das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit Medium, das 1 mg/ml Methionin enthält, gewaschen und dann in 12% eiskaltem TCA gefällt. Die in den TCA-Niederschlägen durch Zentrifugation rückgewonnene Radioaktivität wird durch Flüssigszintillationsspektroskopie quantitativ bestimmt. In diesen Untersuchungen werden Zellen im logarithmischen Wachstum gehalten und Assays werden unter Verwendung von Vertiefungen in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Daten werden als Prozentssatz der in Gegenwart der experimentellen Mittel beobachteten Proteinsynthese im Vergleich zu nicht behandelten Zellen ausgedrückt.

[0435] Zum Bewerten der Fähigkeit einer konjugierten Verbindung zur Hemmung der DNA-Synthese in vitro werden Zellen als eine Monolage unterhalb des Zusammenflusses ausgestrichen und mit experimentellen Mitteln, wie vorstehend beschrieben inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit werden die Zellen zweimal gewaschen und bei 37°C in einem Medium, das 2,5 µCi ^{3}H-Thymidin (5 Ci/mmol) enthält, inkubiert. Nach Inkubation während einer weiteren Stunde werden die Zellen mit TCA weiterverarbeitet, die Niederschläge rückgewonnen und, wie vorstehend beschrieben, die Radioaktivität quantitativ bestimmt. Wie vorstehend werden die Zellen im logarithmischen Wachstum gehalten und die Assays werden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Daten werden als Prozentsatz der in Gegenwart der experimentellen Mittel beobachteten DNA-Synthese im Vergleich zu nicht behandelten Zellen ausgedrückt.

[0436] Zum Bewerten der Fähigkeit einer konjugierten Verbindung, das Überleben und die Wucherung zu hemmen, durch Messen der Koloniebildung in einer Monolagenkultur, werden Zellen als Monolage unterhalb des Zusammenflusses auf 25 cm^2 Kolben ausgestrichen und man lässt sie, wie vorstehend beschrieben, anhaften. Das Medium wurde durch das, das verschiedene Konzentrationen an experimentellen Mitteln enthält, ersetzt und mit den Zellen während verschiedener Zeitdauern inkubiert. Am Ende der Inkubation werden die Zellen als eine Einzelzellsuspension durch Trypsinierung rückgewonnen und wieder mit einer Dichte ausgestrichen, die 100–200 Kolonien pro 6 cm Platte ergab. Man ließ die Zellen während 7 Tagen wachsen, fixierte sie dann in Methanol, färbte mit 1% Kristallviolett und die Zahl der Kolonien wurde quantitativ bestimmt. Die Assays wurden in zweifacher Ausführung durchgeführt und die Daten wurden als Prozentsatz der in Gegenwart experimenteller Mittel beobachteten Koloniebildung im Vergleich zu nicht behandelten Zellen ausgedrückt. Die Ergebnisse in unserem Labor zeigten, dass T84-Zellen in Einzelzellsuspensionen unter Verwendung von Trypsin (10 µg/ml) mit einer Plattierungsleistungsfähigkeit von 40% und einer Verdopplungszeit von 18 Stunden gesetzt werden können.

Beispiel 7

[0437] Radioaktives Iod, wie zum Beispiel ^{123}I, ^{125}I, ^{131}I und ^{132}I kann zu einem ST-Rezeptorbindenden Peptid, wie zum Beispiel ein ST-Peptid, unter Verwendung eines dem Durchschnittsfachmann gut bekannten Standardprotokolls gegeben werden (Thompson, M. et al. (1985) Analytical Biochemistry 148: 26, auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird. Radioaktives Jod wird direkt an ein ST-Peptid, wie zum Beispiel SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 oder SEQ ID Nr: 5 an Tyrosin-5, Tyrosin-4 beziehungsweise Tyrosin-5 konjugiert.

[0438] Kurz gesagt, das ST-Peptid wird in Bakterien hergestellt. Zum Beispiel wird der E. coli-Stamm 431 in Kultur vermehrt und er sondert ST in diese Kultur ab. Die Kulturmedien werden dann unter Verwendung von Routinetechniken gereinigt. ST kann ebenfalls durch Festphasensynthesetechniken, wie früher durchgeführt worden war, unter Verwendung von Standardtechniken hergestellt werden (Dreyfus, L., et al. (1983) Infec. Immun. 42: 539, auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird.

[0439] Zehn Mikrogramm ST-Peptid werden mit 2 Millicurie radioaktivem INa (Amersham Corporation, Massachusetts) in Gegenwart von Iodkügelchen (Bio Rad Laboratories, CA) und beta-D-Glucose umgesetzt. Diese werden 30 Min umgesetzt, worauf die Produkte einer Chromatographie auf einer Sepak Umkehrphasenpatrone (Milipore Corp., MA), gefolgt von Trennung auf einer C_{18}-Umkehrphasensäule durch HPLC unter Verwendung eines 20–25% Acetonitrilgradienten, unterzogen werden. Die konjugierten Zusammensetzungen, die SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3 oder SEQ ID Nr: 5 umfassen, wobei das radioaktive Jod an Tyrosin-4 gebunden ist, eluieren bei 45 Min. Diese Moleküle bewahren ihre vollständige biochemische und pharmakologische Aktivität.

Beispiel 8

[0440] ^{125}I wird direkt an ein ST-Peptid, wie zum Beispiel SEQ ID Nr: 13 an Tyrosin-4 konjugiert.

[0441] SEQ ID Nr: 13 wird durch Festphasensynthese, wie vorstehend beschrieben, hergestellt. Zehn Mikrogramm SEQ ID Nr: 13 werden mit 2 Millicurie ^{125}INa (Amersham Corporation, Massachusetts) in Gegenwart von Iodkügelchen (Bio Rad laboratories, CA) und beta-D-Glucose umgesetzt. Diese werden 30 Min umgesetzt, worauf die Produkte einer Chromatographie auf einer Sepak Umkehrphasenpatrone (Milipore Corp., MA), gefolgt von Trennung auf einer C_{18}-Umkehrphasensäule durch HPLC unter Verwendung eines 20–25% Acetonitrilgradienten, unterzogen werden. Das ^{125}I-SEQ ID Nr: 13-Konjugat, bei dem das radioaktive Iod an Tyrosin-4 gebunden ist, eluiert bei 45 Min. Diese Moleküle bewahren ihre vollständige biochemische und pharmakologische Aktivität.

[0442] Das Dosieren von radioaktivem Iod für die diagnostische Bilderzeugung erfordert typischerweise ungefähr 4 Millicurie/Patient (Steinstraber, A., et al. (1988) J. Nucl. Med. 29: 875; Wessels, B. W. und Rogus, R. D. (1984) Med. Phys. 11: 638, Kwok, C. S., et al. (1985) Med. Phys. 12: 405). Bei Proteinen, die mit einer spezifischen Aktivität von 2000 Curie/mmol markiert sind, wie zum Beispiel ein ST-Peptid, würde dies für die diagnostische Abbildung ungefähr 10 Mikrogramm an intravenös eingespritztem markiertem Peptid pro Patienten erfordern.

Beispiel 9

[0443] ^{131}I wird direkt an ein ST-Peptid, wie zum Beispiel SEQ ID Nr: 13 an Tyrosin-4 konjugiert.

[0444] SEQ ID Nr: 13 wird durch Festphasensynthese, wie vorstehend beschrieben, hergestellt. Zehn Mikrogramm SEQ ID Nr: 13 werden mit 2 Millicurie ^{131}INa (Amersham Corporation, Massachusetts) in Gegenwart von Iodkügelchen (Bio Rad Laboratories, CA) und beta-D-Glucose umgesetzt. Diese werden 30 Min umgesetzt, worauf die Produkte einer Chromatographie auf einer Sepak Umkehrphasenpatrone (Milipore Corp., MA), gefolgt von Trennung auf einer C_{18}-Umkehrphasensäule durch HPLC unter Verwendung eines 20–25% Acetonitrilgradienten, unterzogen werden. Das ^{131}I-SEQ ID Nr: 113-Konjugat, bei dem das radioaktive Iod an Tyrosin-4 gebunden ist, eluiert bei 45 Min. Diese Moleküle bewahren ihre vollständige biochemische und pharmakologische Aktivität.

[0445] Für radioaktiv iodierte Antikörper (MW = 160000 Da) sind typischerweise 150 Nanomol Protein (24 Milligramm) markiert mit einer spezifischen Aktivität von 10000 Curie/mmol pro Gramm Tumor pro Patient erforderlich (Humm, J. L. (1986) J. Nucl. Med. 27: 1490). Daher sind für Proteine, die mit einer spezifischen Aktivität

von 2000 Curie/mmol markiert sind und ein Molekulargewicht von 2000 Da aufweisen, wie zum Beispiel ein ST-Peptid, ungefähr 3 Milligramm pro Gramm Tumor pro Patient für eine intravenöse Infusion erforderlich.

Beispiel 10

[0446] In einigen Ausführungsformen wird die Kupplung von ST-Rezeptorliganden mit einer freien Aminogruppe, insbesondere ST-Rezeptor-bindende Peptide, wie zum Beispiel ST-Peptide, mit wirksamen Mitteln mit einer freien Aminogruppe, wie zum Beispiel Protein-basierende Toxine, durch Einführen einer Disulfidbrücke zwischen die 2 Moleküle durchgeführt. Diese Strategie ist besonders zum Konjugieren von ST-Peptiden verwendbar, da gezeigt wurde, dass das freie Aminoende als ein Punkt für die Konjugation verwendbar ist, ohne dass die ST-Bindungsaktivität beeinflusst wird. Diese Strategie ist besonders zum Konjugieren von Protein-basierenden Toxinen verwendbar, da das freie Aminoende bei derartigen Molekülen verfügbar ist und für einige konjugierte Verbindungen, vor allem RTA-Konjugate, wurde gezeigt, dass eine Disulfidbrücke, die reduziert werden kann, um getrennte Proteine zu ergeben, in dem Aufbau von funktionellen Chimären, auf die monoklonale Antikörper gerichtet sind, wichtig ist (Magerstadt, M. (1991) Antibody Conjugates And Malignant Disease, CRC Press, Boca Raton; Bjorn, M. J. et al. (1985) Cancer Res. 45: 1214, Bjorn, M. J., et al. (1986) Cancer Res. 46: 3262; Masuho, Y., et al. (1982) J. Biochem. 91: 1583, auf deren Offenbarungsgehalte hier vollumfänglich Bezug genommen wird). Während einige Toxine an ST-Peptide unter Verwendung von Vernetzungsmitteln gekuppelt werden können, was zu keiner reduzierbaren Disulfidbrücke zwischen den einzelnen Komponenten führt, jedoch eine funktionale Zytotoxizität erhält, erfordert das Ricin A-Kettetoxin für die Zytotoxizität ein reduzierbares Disulfid, während zum Beispiel Pseudomonas Exotoxin dies nicht erfordert.

[0447] Die Disulfidkupplung wird unter Verwendung eingeführter Verfahren erreicht, die das heterobifunktionelle Mittel N-Succinimidyl-3 (2-Pyridiyldithio)propionat verwenden (SPDP, Pharmacia-LKB, Piscataway, NJ) (Magerstadt, M. (1991) Antibody Conjugates And Malignant Disease, CRC Press, Boca Raton; Cawley, D. B. et al. (1980) Cell 22: 563; Cumber, A. J., et al. (1985) Meth. Enz. 112: 20; Gros, O., et al. (1985) J. Immunol. Meth. 81: 283; Worrell, N. R., (1986) Anti-Cancer Drug Design 1: 19; Thorpe, P. E., et al. (1987) Cancer Res. 4: 5924, auf deren Offenbarungsgehalte hier vollumfänglich Bezug genommen wird).

[0448] In einigen Ausführungsformen werden Toxine, einschließlich der A Ketten von deglycosyliertem Ricintoxin (RTA; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), Diphtherietoxin A (DTA, Calbiochem, La Jolla, CA) und Pseudomonas Exotoxin (PEA) an ST-Peptide zur Herstellung erfindungsgemäßer konjugierter Zusammensetzungen unter Verwendung dieses Verfahrens konjugiert. Es wird deglycosyliertes RTA verwendet, da die glycosylierte Form dieses Toxins unspezifisches Binden an Leberzellen verhindert. DTA wird aus Diphtherietoxin durch ein eingeführtes Verfahren hergestellt (Michel, A. und Drykx, J. (1975) Biochem. Biophys. Acta 365: 15; Cumber, A. J., et al. (1985) Meth. Enz. 112: 207, auf deren Offenbarungsgehalte hier vollumfänglich Bezug genommen wird). PEA

[0449] In einigen Ausführungsformen werden ST-Peptide an Toxine durch dieses Verfahren konjugiert. Zum Beispiel das ST-Peptid SEQ ID Nr: 3, das wie vorstehend beschrieben, hergestellt wurde (siehe Dreyfus, L., et al. (1983) Infec. Immun. 42: 539, auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird).

[0450] Toxine werden zur Kupplung durch Reduktion mit 0,1 M Dithiothreitol (DTT) während 4 Stunden bei Raumtemperatur in 0,4 M Tris-HCl, pH-Wert 8,0 und 1 mM EDTA hergestellt. Reduzierte Toxine werden auf einer in TES-Puffer äquilibrierten Sephadex G-25 Säule entsalzt und mit einem 2-fach molaren Überschuß an ST-PDP gemischt. Die Reaktionen wurden mit TES auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt und bei 4°C während 36 Stunden inkubiert. ST-Peptid-Toxinkonjugate werden von nicht umgesetzten Produkten und Homopolymeren von ST-Peptiden und Toxinen durch Gelfiltration auf Sephadex G-75 in 20 mM TES, pH-Wert 8,0, 0,1 M NaCl enthaltend, gereinigt. Die chromatographischen Fraktionen werden durch SDS-PAGE auf 10% Polyacrylamidgelen unter nicht reduzierenden Bedingungen bezüglich des Vorhandenseins von 1 : 1-Konjugaten von ST-Peptiden und Toxinen überwacht. Diese Konjugate werden ebenfalls durch 10% SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen analysiert, um sicherzustellen, dass ST und Zytotoxine durch eine reduzierbare Disulfidbindung gekuppelt sind. Die molaren Konzentrationen des Konjugats werden durch quantitative Bestimmung der Radioaktivität in diesen Proben berechnet.

[0451] Die mit ^{125}I an Tyrosin 4 markierte ST-Spur (10 Ci/mmol) wird verwendet, um das Konjugat durch verschiedene Trenn- und Chromatographieschritte zu verfolgen und um uns zu befähigen, das molare Verhältnis von ST zu Zytotoxin in dem gereinigten Endkonjugat zu berechnen. Die mit ^{125}I markierte ST-Spur wird durch Inkubieren von 1 mg/ml mit einem 5-fachen molaren Überschuß an SPDP während 30 Min bei Raumtemperatur in Na-Phosphatpuffer, pH-Wert 7,4, derivatisiert. Das ST-Pyridylthiopropionat (ST-PDP)-Konjugat wird von

nicht umgesetzten Vernetzungsmittel durch Chromatographie auf einer mit 20 mM N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethansulfonsäure (TES)-Puffer, pH-Wert 7,4 äquilibrierten Sephadex G-25 gereinigt. Die Erhaltung der Rezeptorbindung der konjugierten ST-Peptide in menschlichen Darmmembranen wird in Konkurrenzassays mit zunehmenden Konzentrationen an ST-PDP und ^{125}I-ST (5×10^{10} M) bestimmt, um sicherzustellen, dass dieses Verfahren nicht die Funktion des ST-Rezeptorliganden zerstört.

[0452] Das vorstehende Kupplungsprotokoll weist für das Konjugieren der verschiedenen Toxine mehrere Vorteile auf. Erstens, führt es eine reduzierbare Disulfidbrücke in die konjugierte Zusammensetzung ein, die für die RTA-Zytotoxizität von Bedeutung ist. Ebenfalls vermeidet diese Technik das Aussetzen des ST-Peptides einer quantitativen Reduktion mit DTT, die seine 3 intrakettigen Disulfidbindungen, die für die Rezeptor-Bindungsaktivität von Bedeutung sind, spalten könnte. Zusätzlich gibt es eine einzelne an dem Aminoende des ST-Peptids für eine Derivatisierung mit SPDP verfügbare Gruppe und frühere Experimente zeigten, dass die Derivatisierung dieser Gruppe die Bindungseigenschaften des Liganden bewahrt. Daher sind andere Konfigurationen für eine Konjugation, die zu einer Inaktivierung des STs führen könnten, nicht möglich. Weiterhin erfordert PEA die Voraktivierung mit DTT, um eine optimale Zytotoxizität zu erreichen, die unter Verwendung des vorstehenden Protokolls erreicht wird.

[0453] Zur Herstellung einer funktionellen konjugierten Verbindung, die ein Toxin umfasst, ist es wesentlich, dass die Rezeptorbindungs- und Enzymaktivitäten der Anteile über das gesamte Konjugationsverfahren hinweg erhalten bleiben. Sobald daher derartige Konjugatverbindungen erhalten werden, werden sie auf die Erhaltung dieser Funktionen getestet. Die ST-Rezeptorbindungsaktivität konjugierter Verbindungen wird in Konkurrenzbindungsassays, wie vorstehend beschrieben untersucht. In diesen Untersuchungen werden zunehmende Konzentrationen der konjugierten Verbindungen mit einer konstanten Konzentration (5×10^{10} M) an ^{125}I-ST und Darmmembranen (50–100 µg Protein) inkubiert, um ein Gleichgewicht zu erreichen. Parallele Inkubationen enthalten nicht markiertes ST im Überschuß (5×10^{7} M), um die unspezifische Bindung zu bewerten. Die konzentrationsabhängige konkurrierende Verdrängung von radioaktiv markiertem ST durch konjugierte Verbindungen wird mit der konkurrierenden Verdrängung, die durch natives ST erreicht wird, vergleichen. Die Verdrängungskurven werden zum Schätzen der Affinität jeder konjugierten Verbindung (K_p) und zum Vergleichen der Affinität mit der Affinität von nativem ST, gemessen mit dieser Technik, verwendet. Kontrolluntersuchungen umfassen die Bewertung der Fähigkeit nicht konjugierter Toxine zur Konkurrenz mit nativem ST um die Rezeptorbindung. Diese Untersuchungen beweisen, dass die Bindungsfunktion von ST in dem konjugierten Konstrukt erhalten bleibt.

[0454] Die Erhaltung der Toxinaktivität in konjugierten Verbindungen wird ebenfalls bewertet. PEA und DTA induzieren eine Toxizität durch Katalysieren der NAD-abhängigen ADP-Ribosylierung des Verlängerungsfaktors 2 (EF2), wobei die Proteinsynthese gehemmt wird. DIE ADP-Ribosyltransferaseaktivität wird unter Verwendung eines eingeführten Assays (Chung, D. W. und Collier, R. J. Infect. Immun. 16: 832; Fitzgerald, D. J. P. (1987) Meth. Enz. 151: 139, auf deren Offenbarungsgehalte hier vollumfänglich Bezug genommen wird, bewertet. Die Reaktionen werden in 30 Mm Tris-HCl, pH-Wert 8,2, das 40 mM DTT, 50 mCi ^{14}C-NAD und 20 µl Kaninchenreticulocytlysat, enthaltend den Verlängerungsfaktor 2 (EF-2, Promega, Madison, WI), enthält, in einem gesamten Volumen von 500 µl durchgeführt. Die Reaktionen werden durch Zugabe des Lysats initiiert, während 30 Min bei 37°C inkubiert und durch Zugabe von eiskaltem 12% TCA abgebrochen. Die Radioaktivität in den durch Zentrifugation gesammelten Proteinniederschlägen wird durch Flüssigszintillationsspektroskopie quantitativ bestimmt. Die Fähigkeit der konjugierten Verbindungen, die DTA oder PEA umfassen, zur Katalyse der Übertragung von markierter ADP-Ribose an EF-2 wird mit derjenigen verglichen, die durch ähnliche Menge an nicht konjugierten Toxinen katalysiert wird. Kontrollexperimente umfassen das Untersuchen der Fähigkeit nicht konjugierter Toxine oder ST zur Katalyse der ADP-Ribose-Übertragung und die Wirkungen von ST auf die enzymatische Aktivität nicht konjugierter Zytotoxine.

[0455] RTA hemmt die Proteinsynthese durch katalytische Inaktivierung der 60S ribosomalen Untereinheit. Die katalytische Aktivität konjugierter Verbindungen, die RTA umfassen, wird durch deren Fähigkeit zur Hemmung der Proteinsynthese in zellfreien Assays unter Verwendung eingeführter Verfahren (Leonard, J. E. et al. (1985) Cancer Res. 45: 5263, auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird) bewertet. Die Assays enthalten 35 µl an Nuklease-behandelten Kaninchenreticulocytlysaten, 1 µl 1 mM gemischte Aminosäuren mit Mangel an Methionin, 2 µl Brome-Mosaik-RNA (Promega, Madison, WI) mit 0,5 µg/µl, 7 µl steriles Wasser oder Konjugatlösung und 5 µCi ^{35}S-Methionin in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Reaktionen werden durch die Zugabe des Lysats initiiert, bei 30°C während 30 Minuten inkubiert und durch die Verwendung der Zugabe von 12% TCA abgebrochen. Die Radioaktivität in den durch Zentrifugation gesammelten Proteinniederschlägen wird durch Flüssigszintillationsspektroskopie quantitativ bestimmt. Kontrollexperimente umfassen das Untersuchen der Fähigkeit von nicht konjugiertem RTA oder ST-Peptid zur Hemmung der zell-

freien Proteinsynthese und die Wirkungen von ST-Peptid auf die Hemmaktivität des nicht konjugierten Zytotoxins.

Beispiel 11

[0456] Methotrexat wird durch die homobifunktionellen Succinimidylester-Vernetzer mit langen Kohlenstoffkettenspacern, wie zum Beispiel Disuccinimidylsuberat (Pierce, IL) an SEQ ID Nr: 12 gebunden. SEQ ID Nr: 12 wird in Gegenwart des chemischen Vernetzungsmittels und Methotrexat in äquimolaren Mengen bei Raumtemperatur während 15–30 Min inkubiert. Die Inkubation wird durch Trennen der Reaktanden durch Gelpermeationschromatographie durch HPLC beendet. Diese Technik trennt die Methotrexat/SEQ ID Nr: 12-Konjugate von dem freien Arzneimittel, freiem ST-Peptid, Arzneimittel-Arzneimittelkonjugaten und ST-Peptid-ST-Peptidkonjugaten. Es werden homogene Präparate der SEQ ID Nr: 12-Methotrexatkonjugate, die über ihre freien Aminogruppen gekoppelt sind, mit einem bevorzugten molaren Verhältnis von 1 : 1 erhalten. Das Komplexieren der freien Aminogruppe von ST bewahrt die Rezeptor-Bindungsfunktion.

Beispiel 12

[0457] ^{111}In wird an SEQ ID Nr: 37 mit funktionellen Aminogruppen unter Verwendung eines Chelatbildners gekuppelt. Das St-Peptid weist eine freie Aminofunktion an dem Aminoende auf, die ohne Änderung der ST-Rezeptorbindungsaktivität des ST-Peptids modifiziert werden kann. ^{111}In wird schnell und wirksam durch entweder EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) oder DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure) komplexiert. DTPA ist gegenüber EDTA bevorzugt, weil das letztgenannte in vivo instabiler sein kann. Das ^{111}In-DTPA wird zu einem gemischten N-Hydroxysuccinimidester umgewandelt, der mit freien Aminogruppen reaktiv ist, mit St gemischt und die Reaktionsprodukte, einschließlich ^{111}In-SEQ ID Nr: 37, werden durch HPLC getrennt (Bremer, K. H. und Schwarz, A. (1987) in Safety And Efficacy of Radiopharmaceuticals. Kristensen, K. und Norbygaard, E., Herausg. Martinius Nijhoff, Dordrecht, Die Niederlande, Seite 43; Krejcarek, G. E., und Tucker, K. L. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 77: 581; Paxton, R. J., of al. (1985) Cancer Res. 45: 5694; Richardson, A. P., et al. (1986) Nucl. Med. Biol. 14: 569, auf deren Offenbarungsgehalte hier vollumfänglich Bezug genommen wird.

Beispiel 13

[0458] ^{99m}Tc kann an SEQ ID Nr: 46 unter Verwendung einer Methode, die ähnlich zu derjenigen für Indium ist konjugiert werden. Daher kann Technetium durch DTPA, das zu einem Anhydrid, wie zum Beispiel N-Succinimidanhydrid, umgewandelt wird, komplexiert werden und mit SEQ ID Nr: 46 umgesetzt werden. Das ST-Technetiumkonjugat kann dann unter Verwendung von HPLC getrennt werden (Magerstadt, M. (1991) Antibody Conjugates And Malignant Disease CRC Press, Boca Raton; Eckelman, W. C. und Paik, C. H. (1986) Nucl. Med. Biol. 14: 569).

Beispiel 14

[0459] Diphtherietoxin A-Kette (DTA) wird aus nativem Diphtherietoxin durch Standardtechniken hergestellt. SEQ ID Nr: 22 wird an N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP, Pharmacia-LKB, Piscataway, NJ) gekuppelt und das SEQ ID Nr: 22-PDP-Konjugat wird durch HPLC durch eingeführte Verfahren gereinigt. DTA wird mit Dithiothreitol reduziert und mit SEQ ID Nr: 22-PDP inkubiert. DTA-SEQ ID Nr: 22 wird nach der Konjugation unter Verwendung von HPLC gereinigt.

Beispiel 15

[0460] Pseudomonas Exotoxin wird aus nativen Quellen durch Standardtechniken hergestellt. SEQ ID Nr: 14 wird an N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP, Pharmacia-LKB, Piscataway, NJ) gekuppelt und das SEQ ID Nr: 54-PDP-Konjugat wird durch HPLC durch eingeführte Verfahren gereinigt. Pseudomonas Exotoxin wird mit Dithiothreitol reduziert und mit SEQ ID Nr: 54-PDP inkubiert. Pseudomonas Exotoxin-SEQ ID Nr: 54 wird nach der Konjugation unter Verwendung von HPLC gereinigt.

Beispiel 16

[0461] Doxorubicin wird an SEQ ID Nr: 54 durch die homobifunktionellen Succinimidylester-Vernetzer mit langen Kohlenstoffkettenspacern, wie zum Beispiel Disuccinimidylsuberat (Pierce, IL) gebunden. SEQ ID Nr: 54 wird in Gegenwart des chemischen Vernetzungsmittels und Doxorubicin in äquimolaren Mengen bei Raum-

temperatur während 15–30 Min inkubiert. Die Inkubation wird durch Trennen der Reaktanden durch Gelpermeationschromatographie durch HPLC beendet. Diese Technik trennt die Doxorubicin/SEQ ID Nr: 54-Konjugate von freiem Doxorubicin, freiem St-Peptid, Arzneimittel-Arzneimittelkonjugaten und ST-Peptid-ST-Peptidkonjugaten. Es werden homogene Präparate der SEQ ID Nr: 54-Doxorubicinkonjugate, die über ihre freien Aminogruppen gekoppelt sind, mit einem bevorzugten molaren Verhältnis von 1 : 1 erhalten. Das Komplexieren der freien Aminogruppe von ST bewahrt die Rezeptor-Bindungsfunktion.

Beispiel 17

[0462] Daunorubicin wird an SEQ ID Nr: 32 durch die homobifunktionellen Succinimidylester-Vernetzer mit langen Kohlenstoffkettenspacern, wie zum Beispiel Disuccinimidylsuberat (Pierce, IL) gebunden. SEQ ID Nr: 32 wird in Gegenwart des chemischen Vernetzungsmittels und Daunorubicin in äquimolaren Mengen bei Raumtemperatur während 15–30 Min inkubiert. Die Inkubation wird durch Trennen der Reaktanden durch Gelpermeationschromatographie durch HPLC beendet. Diese Technik trennt die Daunorubicin/SEQ ID Nr: 54-Konjugate von freiem Daunorubicin, freiem St-Peptid, Arzneimittel-Arzneimittelkonjugaten und ST-Peptid-ST-Peptidkonjugaten. Es werden homogene Präparate der SEQ ID Nr: 54-Daunorubicinkonjugate, die über ihre freien Aminogruppen gekoppelt sind, mit einem bevorzugten molaren Verhältnis von 1 : 1 erhalten. Das Komplexieren der freien Aminogruppe von ST bewahrt die Rezeptor-Bindungsfunktion.

SEQUENZAUFLISTUNG

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER: Waldman, Scott A.

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Verbindungen die spezifisch an kolorektale Krebszellen binden und Verfahren für ihre Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 54

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) ADRESSE: Woodcock Washburn Kurtz Mackiewicz & Norris

(B) STRASSE: One Liberty Place, 46th Floor

(C) STADT: Philadelphia

(D) BUNDESSTAAT: Pennsylvania

(E) LAND: USA

(F) POSTLEITZAHL: 19103

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) MEDIUM: Floppydisk

(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: WordPerfect 5.0

(vi) GEGENWÄRTIGE ANMELDEDATEN:

(A) ANMELDENUMMER:

(B) ANMELDETAG:

(C) KLASSIFIKATION:

(vii) VORHERIGE ANMELDEDATEN:

(A) ANMELDENUMMER: 08/141,892

(B) ANMELDETAG: 26.Okt. 1993

(C) KLASSIFIKATION:

(vii) VORHERIGE ANMELDEDATEN:

(A) ANMELDENUMMER: 08/305,056

(B) ANMELDETAG: 13.Sept. 1994

(C) KLASSIFIKATION:

(viii) ANWALT/VERTRETERINFORMATION

(A) NAME: DeLuca, Mark

(B) REGISTRIERNUMMER: 33,229

(C) REFERENZ/AKTENZEICHEN: TJU-1360

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION:

(A) TELEFON: 215-568-3100

(B) TELEFAX: 215-568-3439

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 57 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: doppelt

(D) TOPOLOGIE: beide

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) STELLE: 1..57

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 1:

AAC	AAC	ACA	TTT	TAC	TGC	TGT	GAA	CTT	TGT	TGT	AAT	CCT	GCC	TGT	GCT	48
Asn	Asn	Thr	Phe	Tyr	Cys	Cys	Glu	Leu	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys	Ala	
1				5					10					15		
GGA	TGT	TAT														57
Gly	Cys	Tyr														

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 2:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 19 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 2:

Asn	Asn	Thr	Phe	Tyr	Cys	Cys	Glu	Leu	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys	Ala	
1				5					10					15		
Gly	Cys	Tyr														

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 3:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 18 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 3:

Asn 1 Cys	Thr Asn	Phe	Tyr	Cys 5	Cys	Glu	Leu	Cys	Cys 10	Tyr	Pro	Ala	Cys	Ala 15	Gly		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 4:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 57 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: doppelt

(D) TOPOLOGIE: beide

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) STELLE: 1..57

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 4:

AAT Asn 1 GGG Gly	AGT Ser TGC Cys	AGC Ser TAT Tyr	AAT Asn	TAC Tyr 5	TGC Cys	TGT Cys	GAA Glu	TTG Leu	TGT Cys 10	TGT Cys	AAT Asn	CCT Pro	GCT Ala	TGT Cys 15	AAC Asn		48 57

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 5:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 19 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 5:

Asn 1 Gly	Ser Cys	Ser Tyr	Asn	Tyr 5	Cys	Cys	Glu	Leu	Cys 10	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys 15	Asn		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 6:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 6:

Pro 1	Asn	Thr	Cys	Glu 5	Ile	Cys	Ala	Tyr	Ala 10	Ala	Cys	Thr	Gly	Cys 15			

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 7:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 18 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 7:

Asn 1 Gly	Asn Cys	Thr	Phe	Tyr 5	Cys	Cys	Glu	Leu	Cys 10	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys 15	Ala		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 8:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 17 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 8:

Asn 1	Thr	Phe	Tyr	Cys 5	Cys	Glu	Leu	Cys	Cys 10	Asn	Pro	Ala	Cys	Ala 15	Gly		
Cys																	

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 9:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 16 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 9:

Thr 1	Phe	Tyr	Cys	Cys 5	Glu	Leu	Cys	Cys	Asn 10	Pro	Ala	Cys	Ala	Gly 15	Cys		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 10:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 10:

Phe 1	Tyr	Cys	Cys	Glu 5	Leu	Cys	Cys	Asn	Pro 10	Ala	Cys	Ala	Gly	Cys 15			

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 11:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 11:

Tyr 1	Cys	Cys	Glu	Leu 5	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala 10	Cys	Ala	Gly	Cys				

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 12:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 13 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 12:

Cys 1	Cys	Glu	Leu	Cys 5	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys 10	Ala	Gly	Cys					

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 13:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 18 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 13:

Asn 1 Cys	Thr Tyr	Phe	Tyr	Cys 5	Cys	Glu	Leu	Cys	Cys 10	Asn	Pro	Ala	Cys	Ala 15	Gly		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 14:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 17 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 14:

Thr 1 Tyr	Phe	Tyr	Cys	Cys 5	Glu	Leu	Cys	Cys	Asn 10	Pro	Ala	Cys	Ala	Gly 15	Cys		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 15:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 16 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 15:

Phe 1	Tyr	Cys	Cys	Glu 5	Leu	Cys	Cys	Asn	Pro 10	Ala	Cys	Ala	Gly	Cys 15	Tyr		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 16:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 16:

Tyr 1	Cys	Cys	Glu	Leu 5	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala 10	Cys	Ala	Gly	Cys	Tyr 15		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 17:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 17:

Cys 1	Cys	Glu	Leu	Cys 5	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys 10	Ala	Gly	Cys	Tyr			

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 18:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 17 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 18:

Asn 1 Cys	Thr	Phe	Tyr	Cys 5	Cys	Glu	Leu	Cys	Cys 10	Tyr	Pro	Ala	Cys	Ala 15	Gly		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 19:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 16 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 19:

Thr 1	Phe	Tyr	Cys	Cys 5	Glu	Leu	Cys	Cys	Tyr 10	Pro	Ala	Cys	Ala	Gly 15	Cys		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 20:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 20:

Phe 1	Tyr	Cys	Cys	Glu 5	Leu	Cys	Cys	Tyr	Pro 10	Ala	Cys	Ala	Gly	Cys 15			

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 21:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 21:

Tyr 1	Cys	Cys	Glu	Leu 5	Cys	Cys	Tyr	Pro	Ala 10	Cys	Ala	Gly	Cys				

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 22:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 13 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 22:

Cys 1	Cys	Glu	Leu	Cys 5	Cys	Tyr	Pro	Ala	Cys 10	Ala	Gly	Cys					

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 23:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 17 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 23:

Thr 1	Phe	Tyr	Cys	Cys 5	Glu	Leu	Cys	Cys	Tyr 10	Pro	Ala	Cys	Ala	Gly 15	Cys		
Asn																	

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 24:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 16 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 24:

Phe 1	Tyr	Cys	Cys	Glu 5	Leu	Cys	Cys	Tyr	Pro 10	Ala	Cys	Ala	Gly	Cys 15	Asn		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 25:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 25:

Tyr 1	Cys	Cys	Glu	Leu 5	Cys	Cys	Tyr	Pro	Ala 10	Cys	Ala	Gly	Cys	Asn 15			

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 26:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 26:

Cys 1	Cys	Glu	Leu	Cys 5	Cys	Tyr	Pro	Ala	Cys 10	Ala	Gly	Cys	Asn				

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 27:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 18 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 27:

Asn 1 Gly	Ser Cys	Ser	Asn	Tyr 5	Cys	Cys	Glu	Leu	Cys 10	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys 15	Thr		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 28:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 17 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 28:

Ser 1 Cys	Ser	Asn	Tyr	Cys 5	Cys	Glu	Leu	Cys	Cys 10	Asn	Pro	Ala	Cys	Thr 15	Gly		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 29:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 16 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 29:

Ser 1	Asn	Tyr	Cys	Cys 5	Glu	Leu	Cys	Cys	Asn 10	Pro	Ala	Cys	Thr	Gly 15	Cys		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 30:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 30:

Asn 1	Tyr	Cys	Cys	Glu 5	Leu	Cys	Cys	Asn	Pro 10	Ala	Cys	Thr	Gly	Cys 15			

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 31:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 31:

Tyr 1	Cys	Cys	Glu	Leu 5	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala 10	Cys	Thr	Gly	Cys				

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 32:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 13 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 32:

Cys 1	Cys	Glu	Leu	Cys 5	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys 10	Thr	Gly	Cys					

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 33:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 18 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 33:

Ser 1	Ser	Asn	Tyr	Cys 5	Cys	Glu	Leu	Cys	Cys 10	Asn	Pro	Ala	Cys	Thr 15	Gly		
Cys	Tyr																

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 34:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 17 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 34:

Ser 1	Asn	Tyr	Cys	Cys 5	Glu	Leu	Cys	Cys	Asn 10	Pro	Ala	Cys	Thr	Gly 15	Cys		
Tyr																	

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 35:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 16 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 35:

Asn 1	Tyr	Cys	Cys	Glu 5	Leu	Cys	Cys	Asn	Pro 10	Ala	Cys	Thr	Gly	Cys 15	Tyr		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 36:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 36:

Tyr 1	Cys	Cys	Glu	Leu 5	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala 10	Cys	Thr	Gly	Cys	Tyr 15			

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 37:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 37:

Cys 1	Cys	Glu	Leu	Cys 5	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys 10	Thr	Gly	Cys	Tyr				

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 38:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 18 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 38:

Asn 1 Cys	Thr Tyr	Phe	Tyr	Cys 5	Cys	Glu	Leu	Cys	Cys 10	Asn	Pro	Ala	Cys	Ala 15	Gly		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 39:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 18 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 39:

Asn 1 Cys	Thr Tyr	Phe	Tyr	Cys 5	Cys	Glu	Leu	Cys	Cys 10	Ala	Pro	Ala	Cys	Ala 15	Gly		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 40:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 18 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 40:

Asn 1 Cys	Thr Tyr	Phe	Tyr	Cys 5	Cys	Glu	Leu	Cys	Cys 10	Asn	Ala	Ala	Cys	Ala 15	Gly		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 41:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 17 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 41:

Asn 1 Cys	Thr	Phe	Tyr	Cys 5	Cys	Glu	Leu	Cys	Cys 10	Asn	Pro	Ala	Cys	Ala 15	Gly		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 42:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 42:

Tyr 1	Cys	Cys	Glu	Leu 5	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala 10	Cys	Ala	Gly	Cys	Tyr 15			

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 43:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 43:

Tyr 1	Cys	Cys	Glu	Leu 5	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala 10	Cys	Ala	Gly	Cys				

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 44:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 44:

Cys	Cys	Glu	Leu	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys	Ala	Gly	Cys	Tyr				
	1				5					10							

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 45:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 13 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 45:

Cys	Cys	Glu	Leu	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys	Ala	Gly	Cys					
1				5					10								

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 46:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 25 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 46:

Gln	Ala	Cys	Asp	Pro	Pro	Ser	Pro	Pro	Ala	Glu	Val	Cys	Cys	Asp	Val		
1				5					10					15			
Cys	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys	Ala	Gly	Cys									
			20														

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 47:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 16 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 47:

Ile 1	Asp	Cys	Cys	Ile 5	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala 10	Cys	Phe	Gly	Cys	Leu 15	Asn		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 48:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 18 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 48:

Ser 1 Gly	Ser Cys	Asp	Trp	Asp 5	Cys	Cys	Asp	Val	Cys 10	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys 15	Ala		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 49:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 19 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 49:

Asn 1 Gly	Ser Cys	Ser Tyr	Asn	Tyr 5	Cys	Cys	Glu	Lsu	Cys 10	Cys	Tyr	Pro	Ala	Cys 15	Thr		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 50:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 13 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 50:

Cys 1	Cys	Asp	Val	Cys 5	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys 10	Thr	Gly	Cys					

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 51:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 51:

Cys 1	Cys	Asp	Val	Cys 5	Cys	Tyr	Pro	Ala	Cys 10	Thr	Gly	Cys	Tyr				

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 52:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 52:

Cys 1	Cys	Asp	Leu	Cys 5	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys 10	Ala	Gly	Cys	Tyr				

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 53:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 53:

Cys 1	Cys	Gln	Leu	Cys 5	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys 10	Thr	Gly	Cys	Tyr				

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 54:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 54:

Pro 1	Gly	Thr	Cys	Glu 5	Ile	Cys	Ala	Tyr	Ala 10	Ala	Cys	Thr	Gly	Cys 15			

Patentansprüche

1. Konjugierte Verbindung, umfassend
a) einen hitzestabilen Peptid-, Antikörper-, Fab- oder $F(Ab)_2$-Toxinrezeptor-Bindungsanteil und
b) einen wirksamen Anteil,
wobei der aktive Anteil ein radiostabiler Wirkstoff ist.

2. Verbindung nach Anspruch 1, wobei der hitzestabile Toxinrezeptor-Bindungsanteil aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3, SEQ ID Nr: 5–54 und Fragmenten und Derivaten davon ausgewählt ist, wobei die Fragmente und Derivate Peptide sind, die zum Binden des hitzestabilen Toxinrezeptors befähigt sind, wobei die Fragmente eine mit einem Teil des hitzestabilen Toxinrezeptor-Bindungspeptids identische Aminosäuresequenz aufweisen und die Derivate eine Aminosäuresequenz aufweisen, die dieselbe ist wie die Aminosäuresequenz von mindestens einem Teil eines hitzestabilen Toxinpeptids, außer daß einige der Reste deletiert oder durch konservative Aminosäuren substituiert oder zusätzliche Aminosäuren insertiert sind.

3. Verbindung nach Anspruch 1, wobei der wirksame Anteil ein Heilmittel ist.

4. Verbindung nach Anspruch 1, wobei der wirksame Anteil aus der Gruppe, bestehend aus Methotrexat, Doxorubicin, Daunorubicin, Cytosinarabinosid, Etoposid, 5-Fluorouracil, Melphalan, Chlorambucil, Cisplatin, Vindesin, Mitomycin, Bleomycin, Purothionin, Macromomycin, 1,4-Benzochinonderivate, Trenimon, Ricin, Ricin A-Kette, Pseudomonas Exotoxin, Diphterietoxin, Clostridium perfringens Phospholipase C, Rinderpankreasribonuklease, antivirales Kermesbeere („pokeweed")-Protein, Abrin, Abrin A-Kette, Kobra-Giftfaktor, Gelonin, Saporin, Modeccin, Viscumin, Volkensin, alkalische Phosphatase, Nitroimidazol, Metronidazol und Misonidazol, ausgewählt ist.

5. Arzneimittel, umfassend
a) einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel und
b) eine konjugierte Verbindung nach Anspruch 1.

6. Verwendung einer konjugierten Verbindung nach Anspruch 1 für die Herstellung eines Arzneimittels zum Behandeln eines Individuums mit Diagnose oder Verdacht auf ein Leiden an einem metastasierenden kolorektalen Karzinom.

7. Arzneimittel, umfassend
a) ein pharmazeutisch verträglicher Träger oder Verdünnungsmittel und
b) eine konjugierte Verbindung, umfassend
i) einen hitzestabilen Peptid-, Antikörper-, Fab- oder $F(Ab)_2$-Toxinrezeptor-Bindungsanteil und
ii) einen wirksamen Anteil,
wobei der wirksame Anteil ein radioaktives Mittel ist und die konjugierte Verbindung in einer Menge vorhanden ist, die für eine therapeutische und diagnostische Verwendung in einem an kolorektalem Krebs leidenden Menschen wirksam ist.

8. Arzneimittel nach Anspruch 7, wobei der aktive Anteil aus der Gruppe, bestehend aus ^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{90}Y, ^{109}Pd, ^{123}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{199}Au, ^{211}At, ^{212}Pb, ^{212}B, ^{32}P, und ^{33}P, ^{71}Ge, ^{77}As, ^{103}Pb, ^{105}Rh, ^{111}Ag, ^{119}Sb, ^{121}Sn, ^{131}Cs, ^{143}Pr, ^{161}Tb, ^{177}Lu, ^{191}Os, ^{193M}Pt, ^{197}Hg, ^{43}K, ^{52}Fe, ^{57}Co, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{77}Br, $^{81}Rb/^{81M}Kr$, ^{87M}Sr, ^{99M}Tc, ^{111}In, ^{113M}In, ^{127}Cs, ^{129}Cs, ^{203}Pb und ^{206}Bi, ausgewählt ist.

9. Arzneimittel nach Anspruch 7, wobei der hitzestabile Toxinrezeptor-Bindungsanteil aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID Nr: 2, SEQ ID Nr: 3, SEQ ID Nr: 5–54 und Fragmenten und Derivaten davon ausgewählt ist, wobei die Fragmente und Derivate Peptide sind, die zum Binden des hitzestabilen Toxinrezeptors befähigt sind, wobei die Fragmente eine mit einem Teil des hitzestabilen Toxinrezeptor-Bindungspeptids identische Aminosäuresequenz aufweisen und die Derivate eine Aminosäuresequenz aufweisen, die dieselbe ist wie die Aminosäuresequenz von mindestens einem Teil eines hitzestabilen Toxinpeptids, außer daß einige der Reste deletiert oder durch konservative Aminosäuren substituiert oder zusätzliche Aminosäuren insertiert sind.

10. Verwendung einer konjugierten Verbindung, umfassend
a) einen hitzestabilen Peptid-, Antikörper-, Fab- oder $F(Ab)_2$-Toxinrezeptor-Bindungsanteil und
b) einen wirksamen Anteil,
wobei der wirksame Anteil ein radiostabiler Wirkstoff ist und die konjugierte Verbindung in einer Menge vorhanden ist, die für eine therapeutische und diagnostische Verwendung in einem an kolorektalem Krebs leidenden Menschen wirksam ist, zur Herstellung eines Arzneimittels für den diagnostischen Gebrauch.

11. Verwendung einer konjugierten Verbindung, umfassend
a) einen hitzestabilen Peptid-, Antikörper-, Fab- oder $F(Ab)_2$-Toxinrezeptor-Bindungsanteil und
b) einen wirksamen Anteil,
wobei der wirksame Anteil ein radiostabiler Wirkstoff ist und die konjugierte Verbindung in einer Menge vorhanden ist, die für eine therapeutische und diagnostische Verwendung in einem an kolorektalem Krebs leidenden Menschen wirksam ist, zur Herstellung eines Arzneimittels für den therapeutischen Gebrauch.

12. Arzneimittel, umfassend
a) einen pharmazeutisch annehmbaren Träger oder Verdünnungsmittel und
b) eine Verbindung, umfassend
i) einen hitzestabilen Peptid-, Antikörper-, Fab- oder $F(Ab)_2$-Toxinrezeptor-Bindungsanteil und
ii) ein Nukleinsäuremolekül,
zur Beförderung eines Nukleinsäuremoleküls zu Zellen des Verdauungstrakts eines Individuums.

13. In vitro-Verfahren zur Bestimmung, ob oder ob nicht ein Individuum metastasierende kolorektale Krebszellen aufweist, umfassend die Schritte des Analysierens einer Probe von extraintestinalem Gewebe oder Körperflüssigkeit eines Individuums, um zu bestimmen, ob das hitzestabile Toxinrezeptor-Protein von den Zellen der Probe exprimiert wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Expression des hitzestabilen Toxinrezeptor-Proteins durch die Zellen mit einem Nachweisverfahren, ausgewählt aus einem Immunoassay, wobei die Probe mit nachweisbaren Antikörpern, die spezifisch an den hitzestabilen Toxinrezeptor binden, in Kontakt gebracht wird, einem hitzestabilen Toxinrezeptor-Bindungsnachweisverfahren, wobei die Probe mit einem markierten hitzestabilen Toxinrezeptor-Liganden in Kontakt gebracht wird, einer Polymerasekettenreaktion, wobei die Probe mit Primern, die selektiv mRNA oder cDNA, die das hitzestabile Toxinrezeptor-Protein kodierern, amplifizieren, in Kontakt gebracht wird, bestimmt wird.

15. In vitro-Verfahren zur Bestimmung, ob eine Tumorzelle eine kolorektale Tumorzelle ist, umfassend die Schritte zur Bestimmung, ob eine Tumorzelle hitzestabiles Toxinrezeptor-Protein exprimiert.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Expression des hitzestabilen Toxinrezeptor-Proteins durch die Zellen mit einem Nachweisverfahren, ausgewählt aus einem Immunoassay, wobei die Tumorzelle mit nachweisbaren Antikörpern, die spezifisch an den hitzestabilen Toxinrezeptor binden, in Kontakt gebracht wird, einem hitzestabilen Toxinrezeptor-Bindungsnachweisverfahren, wobei die Tumorzelle mit einem markierten hitzestabilen Toxinrezeptor-Liganden in Kontakt gebracht wird, einer Polymerasekettenreaktion, wobei die Tumorzelle mit Primern, die selektiv mRNA oder cDNA, die das hitzestabile Toxinrezeptor-Protein kodieren, amplifizieren, in Kontakt gebracht wird, bestimmt wird.

17. Kit zur Bestimmung, ob eine Probe eine kolorektale Krebszelle enthält, umfassend einen ersten Behälter, umfassend Antikörper, die an ein hitzestabiles Toxinrezeptor-Protein binden, und einen zweiten Behälter, der ein isoliertes hitzestabiles Toxinrezeptor-Protein umfaßt, oder einen ersten Behälter, umfassend einen detektierbaren hitzestabilen Toxinrezeptor-Ligand, und einen zweiten Behälter, der ein isoliertes hitzestabiles Toxinrezeptor-Protein umfaßt, oder einen ersten Behälter, umfassend einen Satz PCR-Primer, wobei eine PCR-Reaktion unter Verwendung von diesem Satz Primer, der ein DNA-Molekül von einem Substrat aus mRNA, das ein hitzestabiles Toxinrezeptor-Protein kodiert, amplifiziert, oder von einem Satz Primer, der ein

DNA-Molekül von einem Substrat aus cDNA von mRNA, das ein hitzestabiles Toxinrezeptor-Proteinmolekül kodiert, amplifiziert, und einen zweiten Behälter, umfassend ein DNA-Molekül von der gleichen Größe wie ein DNA-Molekül, das von einer PCR unter Verwendung der ersten PCR-Primer und der zweiten PCR-Primer und der mRNA oder der cDNA amplifiziert wird, oder einen ersten Behälter, umfassend ein Nukleinsäuremolekül, das eine Sequenz identisch und/oder komplementär zur mRNA oder cDNA, die ein hitzestabiles Toxinrezeptor-Protein kodiert, umfaßt, und einen zweiten Behälter, der ein Nukleinsäuremolekül, das mit dem Nukleinsäuremolekül in dem ersten Behälter hybridisiert, umfaßt.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen