



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2010148447/10, 26.08.2005**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.08.2005

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
03.09.2004 DE 102004043153.1Номер и дата приоритета первоначальной заявки,
из которой данная заявка выделена:
2007112115 26.08.2005(43) Дата публикации заявки: **10.06.2012** Бюл. № 16(45) Опубликовано: **10.08.2013** Бюл. № 22(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **ENG J. et al. Purification and structure of
exendin-3, a new pancreatic secretagogue isolated
from Heloderma horridum venom. J. Biol. Chem.
1990, v.265, n.33, pp.20259-20262. RAUFMAN
J.P. et al. Exendin-3, a novel peptide from
Heloderma horridum venom, interacts with
vasoactive intestinal peptide receptors and a
newly described receptor on (см. прод.)**

Адрес для переписки:

**129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег.№ 517**

(72) Автор(ы):

**ГОТТХАРДТ Мартин (DE),
БЭЭ Мартин (DE),
БЕР Томас (DE),
ГЕКЕ Буркхард Й. (DE)**

(73) Патентообладатель(и):

**ФИЛИППС-УНИВЕРЗИТЕТ
МАРБУРГ (DE)****(54) ИЗОБРЕТЕНИЕ, ОТНОСЯЩЕЕСЯ К GLP-1 И ЭКСЕНДИНАМ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии.
Описаны пептидные производные эксендина-3
(1-39), обладающие активностью глюкагон-
подобных пептидов (GLP-1),
модифицированные у С-конца амином и
обладающие способностью связываться N-
концом с GLP-1-рецепторами. Раскрыто
применение пептидных производных
эксендина-3 для получения средства длядиагностики и терапии заболеваний, при
которых играет роль экспрессия
рецепторов GLP-1, для определения плотности
инсулинпродуцирующих клеток в ткани, для
определения экспрессии GLP-1 - рецепторов
или их плотности. Изобретение может быть
использовано для получения средства для
диагностики и терапии заболеваний, в которых
играет роль экспрессия рецепторов GLP-1. 12 н.
и 9 з.п. ф-лы.

(56) (продолжение):

**dispersed acini from guinea pig pancreas. Description of exendin-3(9-39) amide, a specific exendin receptor
antagonist. J. Biol. Chem. 1991, v.266, n.5, pp.2897-2902. RU 95108231 A1, 20.03.1997.**



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 14/575 (2006.01)**A61K 38/26** (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2010148447/10, 26.08.2005**(24) Effective date for property rights:
26.08.2005

Priority:

(30) Convention priority:
03.09.2004 DE 102004043153.1Number and date of priority of the initial application,
from which the given application is allocated:
2007112115 26.08.2005(43) Application published: **10.06.2012 Bull. 16**(45) Date of publication: **10.08.2013 Bull. 22**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj, reg.№ 517**

(72) Inventor(s):

**GOTTkhardt Martin (DE),
BEhEh Martin (DE),
BER Tomas (DE),
GEKE Burkhard J. (DE)**

(73) Proprietor(s):

FILIPPS-UNIVERZITET MARBURG (DE)**(54) INVENTION RELATING TO GLP-1 AND EXENDINS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: peptide derivatives of exendin -3 (1-39) are described, having activity of glucagon-like peptides (GLP-1), modified near C-end with amine and capable of binding with their N-end to GLP-1-receptors. Application of peptide derivatives of exendin-3 is disclosed for production of an agent for diagnostics and therapy of diseases, where

expression of GLP-1 receptors is important, to define density of insulin-producing cells in a tissue, in order to define expression of GLP-1 -receptors or their density.

EFFECT: invention may be used to produce an agent for diagnostics and therapy of diseases, where expression of GLP-1 receptors is important.

21 cl

Описание и введение в общую область изобретения

В топической диагностике гастроэнтеропанкреатических нейроэндокринных опухолей в качестве важного диагностического метода наряду с ультразвуком используют сцинтиграфию рецепторов соматостатина (SRS). Используемый принцип состоит в специфическом отображении опухолей с помощью радиоактивно меченых пептидов, которые захватываются опухолевыми клетками. Таким образом с помощью гамма-камеры можно наглядно обнаруживать повышение радиоактивности в опухолевой ткани. Если тип опухоли обладает рецепторами, требующими SRS, например, аналог соматостатина октреотид[®], определение указанных опухолей возможно без проблем. Однако если соответствующие рецепторы не экспрессируются, они не поддаются сцинтиграфическому определению. Но наряду с топикальной диагностикой радиоактивно меченые пептиды также дают возможность подхода к лечению опухолей, при котором путем мечения аналога соматостатина, например, октреотида[®], подходящим радионуклидом (α - или β -лучами) можно производить специфическую направленную на рецепторы радиопептидную терапию. Так как соответствующие радионуклиды химически связаны с пептидом таким образом (например, путем комплексообразования с ранее связанным с пептидом хелатирующим агентом), что хотя опухолевые клетки их поглощают, но не могут их больше выбрасывать, происходит высокое специфическое обогащение их в опухолевой ткани.

Конечно, целый ряд нейроэндокринных опухолей (NET), в том числе инсулинома и мелкоклеточный бронхогенный рак, не экспрессируют требуемых подтипов рецепторов соматостатина, которые необходимы для SRS или радиопептидной терапии с аналогом соматостатина октреотидом[®]. В частности, инсулинома в значительном проценте не поддается сцинтиграфической диагностике. Также при мелкоклеточном бронхогенном раке SRS не представляет собой подходящего способа, так как хотя первичные опухоли часто могут быть отображены, однако метастазы нет, поскольку утрачивается экспрессия рецепторов. Таким образом, также недоступна радиотерапия, которая представляет собой интересный дополнительный или альтернативный способ лечения. Отсюда возникает потребность в подходящем пептиде, который поглощался бы указанными опухолями.

Гормон внутренней секреции глюкагонподобный пептид-1 (GLP-1), а также его аналоги эксендин-3 и эксендин-4 (из слюны ящериц (*Heloderma horridum* и *Heloderma suspectum*)) представляют собой пептиды, для которых инсулинома и мелкоклеточный бронхогенный рак - наряду с многими другими видами опухолей - экспрессируют рецепторы. Инсулинома происходит от продуцирующих инсулин β -клеток островков Лангеранса поджелудочной железы, в котором GLP-1, а также эксендин-3 и эксендин-4 инициируют возникающую после приема пищи секрецию инсулина.

Состояние техники

Для применения глюкагонподобных пептидов (GLP-1) в сцинтиграфии требуется мечение пептидов. Способы мечения белков радионуклидами известны специалисту и представлены в многочисленных патентных описаниях (например, DE 690 18 226 T2) и научных работах. При этом описанные пептиды для использования в диагностических изображениях и для опосредования терапевтически активных молекул в патологических тканях, как правило, содержат у N-конца введенный в пептид амин. Пептиды при этом должны быть дополнительно модифицированы в смысле стабильности.

Например, использованный в патенте US 2003/0232761A1 GLP-1 и его

производное GLP-1(7-37) модифицированы у N-конца амином. Таким образом, N-конец GLP-1 более не может быть использован в связывании с GLP-1-рецепторами, так что с указанными пептидами возможно только неудовлетворительное связывание и внутренние (взаимодействия) с рецепторами, указанные пептиды таким образом не
 5 подходят для применения в радиопептидной терапии инсулиномы и мелкоклеточного бронхогенного рака. Мутация, например замена аминокислоты внутри пептидной последовательности GLP-1 и эксендина-3 или эксендина-4 и их возможных модификаций под действием лекарственного препарата или подающей сигнал
 10 молекулы, на основе опытов приводит в основном к тому, что структура пептида разрушается таким образом, что становится невозможным связывание с рецепторами.

Дополнительный метод модифицирования GLP-1 без воздействия на N-конец до настоящего времени неизвестен. Сверх того не известны меченые или немеченые производные GLP-1 для использования при радиотерапии инсулиномы и
 15 мелкоклеточного бронхогенного рака.

Задача

Задача предлагаемого изобретения состоит в том, чтобы устранить недостаток современного уровня техники и получить пептиды, которые могут быть мечеными, и
 20 также с указанным мечением могут связываться с GLP-1-рецепторами и могут вводиться для получения средства для диагностики и терапии заболеваний, при которых играет роль экспрессия рецепторов GLP-1.

Решение задачи

Указанную задачу предложено решить путем получения производных пептидов GLP-1, эксендина-3 и эксендина-4, которые модифицированы амином у C-конца, а N-концом связываются с GLP-1-рецепторами, а также химерных пептидов из GLP-1 с эксендином-3 или эксендином-4. Указанные пептиды, а также химерные пептиды, меченые или немеченые, используют для получения средства для
 25 диагностики и терапии доброкачественных и злокачественных заболеваний, при которых играет роль экспрессия GLP-1-рецепторов.

С помощью указанных производных пептидов GLP-1, эксендина-3 и эксендина-4, а также химерных пептидов из GLP-1, эксендина-3 или эксендина-4 осуществляют получение средства для сцинтиграфического применения, которое используют для
 35 диагностики и терапии опухолей, экспрессирующих GLP-1-рецепторы, в том числе NET (в частности, инсулиномы) и мелкоклеточного бронхогенного рака. Прежде всего, это возможно, так как предложенные производные пептидов модифицированы амином у C-конца и, таким образом, N-конец остается в распоряжении для связывания с GLP-1-рецепторами.
 40

Благодаря связыванию предложенных, например, радиоактивно меченых, производных пептидов и химерных пептидов GLP-1, эксендина-3 и эксендина-4 с GLP-1-рецепторами возможно отображение опухолей, экспрессирующих GLP-1-рецепторы и вместе с тем значительное улучшение помощи пациенту. В первую очередь это
 45 (касается) гастроэнтеропанкреатических NET, таких как инсулинома, для которых в настоящее время не существует неинвазивных способов с достаточной чувствительностью, или мелкоклеточного бронхогенного рака, локализованного в области легких, при котором в настоящее время невозможно дифференцирование
 50 между воспалительными процессами и опухолями или метастазами, и также невозможны неинвазивные способы (лечения).

Далее посредством предложенных производных пептидов и химерных пептидов отображают плотность продуцирующих инсулин клеток в поджелудочной железе, а

также экспрессию GLP-1-рецепторов *in vivo* и *in vitro*. Так, например, при отображении клеток, экспрессирующих GLP-1-рецепторы, при сахарном диабете отображение (происходит) *in vivo*, так как это клетки, которые также выделяют инсулин.

Отображение плотности GLP-1-рецепторов в поджелудочной железе особенно важно для пациентов с сахарным диабетом во время и после терапии лекарственными препаратами. Дополнительно отображают распределение GLP-1-рецепторов в злокачественных и доброкачественных тканях. Постановки вопросов носят здесь как клинический, так и научный характер, так как еще не дают всеохватывающих данных *in vivo* для распределения GLP-1-рецепторов у человека.

Изобретение также имеет то преимущество, что производные пептидов GLP-1 (глюкагон-подобного пептида-1), эксендина-3 и эксендина-4, а также химерных пептидов из GLP-1, эксендина-3 или эксендина-4 использовали для получения средства, в частности, для направленного на рецепторы специфического отображения и терапии, в частности NET, особенно инсулиномы и мелкоклеточного бронхогенного рака.

В частности, при диагностике мелкоклеточного бронхогенного рака применима сцинтиграфия GLP-1-рецепторов и, возможно в первую очередь, специфическое определение пораженных метастазами лимфатических узлов (воспалительно измененных лимфатических узлов или пораженных лимфатических узлов).

Дополнительно возможно применение предложенных производных пептидов GLP-1 (глюкагон-подобного пептида-1), эксендина-3 и эксендина-4, а также химерных пептидов из GLP-1, эксендина-3 или эксендина-4 в качестве средств для диагностики и терапии всех доброкачественных и злокачественных заболеваний, при которых играет роль экспрессия рецепторов GLP-1, в частности, в качестве контрастных средств для магниторезонансной томографии (MRT), в качестве радиоактивного средства для сцинтиграфии (SPECT, компьютерной томографии единичных фотонов) или радиопептидотерапии, в PET (позитронно-эмиссионной томографии), в опосредованной рецепторами химиотерапии и в оптической диагностике. При этом под оптической диагностикой понимают возбуждение флуоресцирующей молекулы волной определенной длины, которая вызывает последующую эмиссию света других длин волн. При этом определяют испускаемые длины волн.

Специалист легко может выбрать вид мечения у С-конца производных пептидов GLP-1 (глюкагонподобного пептида-1), эксендина-3 и эксендина-4, а также химерных пептидов из GLP-1, эксендина-3 или эксендина-4 в зависимости от желаемого применения, которое состоит, например, (в использовании) для сцинтиграфии или радиотерапии по радиоактивным нуклидам, для контрастных средств в магниторезонансной томографии (MRT), например, по гадолинию, для эндоскопического или научного изучения по флуоресцирующим красителям.

Под злокачественными заболеваниями предложено понимать злокачественные заболевания, при которых наблюдаются изменения соответствующих тканей, отличающие их от здоровых тканей, проявляется инвазивный рост или ткани разрываются на кровяное или лимфатическое русло. Сюда относятся все нейроэндокринные опухоли, в частности, желудочно-кишечного тракта, бронхогенный рак, рак поджелудочной железы и другие злокачественные заболевания, которые связаны со сверхэкспрессией GLP-1-рецепторов.

Под доброкачественными заболеваниями предложено понимать доброкачественные заболевания, которые отличаются тем, что соответствующие ткани не теряют своей степени дифференцировки, не проявляют инвазивного роста и

не образуют метастазирования тканей в лимфатическое или кровяное русло. Сюда относятся, например, сахарный диабет, а также нарушения аппетита (Essverhalten) или психические (расстройства).

Характеристика производных пептидов и химерных пептидов

Неожиданно было обнаружено, что производные пептидов GLP-1, эксендина-3 и эксендина-4, а также химерные пептиды из GLP-1, эксендина-3 или эксендина-4, которые модифицированы амином у С-конца, связываются через N-конец с GLP-1-рецепторами. Они даже проявляют подобно природному пептиду очень высокое сродство к GLP-1-рецепторам. Эксперименты с имеющими опухоли голыми мышами показывают специфический захват опухолевой тканью, позитивной по GLP-1-рецепторам.

Предложенные производные пептидов, а также химерные пептиды, немеченные или через хелатирующий агент меченые у С-концевого амина, вводили в качестве средства для диагностики и терапии доброкачественных и злокачественных заболеваний, при которых играет роль экспрессия рецепторов GLP-1. Вид мечения заключался при этом, в частности, (во введении) радиоактивного металла, MRT-контрастного средства, флуоресцирующего хромофора или химиотерапевтического средства.

Процесс и способы мечения известны специалисту (например, патент DE 690 18 226 T2), и оно осуществляется, например, путем взаимодействия с радионуклидами немагнитных металлов и другими MRT-контрастными средствами или флуоресцирующими красителями таким образом, чтобы не мешать связыванию с рецепторами или интернализации предложенных производных пептидов, а также химерных пептидов и чтобы связывающие GLP-1-рецепторы N-концы оставались свободными.

Аминокислотные последовательности исходных пептидов:

GLP-1:

H-His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly-OH

19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37

Эксендин-3:

H-His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-

19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37

Pro-Ser-NH₂

38 39

Эксендин-4:

H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
 Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-
 5 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37
 Pro-Ser-NH₂
 38 39

10 Предложены следующие полученные производные пептидов GLP-1 (1-37),
 эксендина-3 и эксендина-4

GLP-1(x-y)A¹⁻³⁷

Эксендин-3(z-k)A¹⁻⁴⁰

15 Эксендин-4(z-k)A¹⁻⁴⁰

При чем означают:

x=аминокислоты 1-36 аминокислотной последовательности GLP-1

y=аминокислоты 2-37 аминокислотной последовательности GLP-1

20 z=аминокислоты 1-38 аминокислотной последовательности эксендина-3 или
 эксендина-4

k=аминокислоты 2-39 аминокислотной последовательности эксендина-3 или
 эксендина-4

25 A=присоединенная группа, состоящая из одной или более аминокислот или их
 производных в качестве сигнальной молекулы как таковой или для связывания
 сигнальных молекул или для стабилизации. (Группа) A предпочтительно
 локализована у С-конца и представляет собой, например, амин, предпочтительно
 лизин или в качестве альтернативы другую аминокислоту со свободной
 30 аминокислотной группой, такую как, например, орнитин, или органическую группу со
 свободной аминокислотной группой, с которыми может взаимодействовать хелатирующий агент
 для мечення радионуклидами или MRT-контрастным средством, флуоресцирующим
 красителем или химиотерапевтическим средством. Хелатирующие агенты
 представляют собой, например, ДТРА (диэтилентриаминопентауксусную кислоту,
 35 применяемый в качестве альтернативы N,N-бис(2-[бис(карбоксиметил)амино]
 этил)глицин), в качестве альтернативы DOTA (1,4,7,10-тетраазаацетилдодекан-1,4,7,10-
 тетрауксусную кислоту), HYNIC (6-гидразинопиридин-3-карбоновую кислоту), MAG3
 (меркаптоацетилглицилглицилглицин), N4 (1,4,8,11-тетраазаундекан) и известные
 производные всех названных хелатирующих агентов.

40 Верхний индекс указывает, в каком месте аминокислотной последовательности
 могут альтернативно находиться присоединенные группы.

GLP-1(x-y)A¹⁻³⁷

45 при этом охватывают производные GLP-1 различной длины, в которых x
 представляет собой число от 1 до 36, но меньше y, который может означать число от 2
 до 37. A представляет собой присоединенную группу, которая стоит в любом месте, но
 предпочтительно у С-конца и у более высокого (положения), чем у. Присоединенная
 группа предпочтительно представляет собой амин лизин.

Эксендин-3(z-k)A¹⁻⁴⁰

50 при этом охватывают производные эксендина-3 различной длины, в которых z
 представляет собой число от 1 до 38, но меньше k, которое может означать число от 2
 до 39. A представляет собой присоединенную группу, которая стоит в любом месте, но
 предпочтительно у С-конца и у более высокого (положения), чем у. Присоединенная

группа предпочтительно представляет собой амин лизин.

Эксендин-4(z-k)A¹⁻⁴⁰

при этом охватывают производные эксендина-4 различной длины, в которых z представляет собой число от 1 до 38, но меньше k, которое может означать число от 2 до 39. A представляет собой присоединенную группу, которая стоит в любом месте, но предпочтительно у С-конца и у более высокого (положения), чем у. Присоединенная группа предпочтительно представляет собой амин лизин.

В частности, предпочтительны производные пептидов:

1. MC 10: (DTPA-Lys³⁷)GLP-1(7-36)амид

2. MC 13: (DTPA-Lys⁴⁰)эксендин-3 амид

3. MC 11: (DTPA-Lys⁴⁰)эксендин-4 амид

Синтез осуществляли, например, через фирму Peptide Specialty Laboratories GmbH по способу Merrifield и очищали ВЭЖХ.

MC 10 (DTPA-Lys³⁷)GLP1(7-36)амид состоит из аминокислот 7-36 GLP-1 и содержит у С-конца в качестве аминокислоты со свободной аминогруппой предпочтительно лизин в положении 37, а также хелатирующий агент DTPA.

MC 13 (DTPA-Lys⁴⁰)эксендин-3 амид состоит из общей аминокислотной последовательности эксендина-3 и содержит у С-конца в качестве аминокислоты со свободной аминогруппой предпочтительно лизин в положении 40, а также хелатирующий агент DTPA.

MC 11 (DTPA-Lys⁴⁰)эксендин-4 амид состоит из общей аминокислотной последовательности эксендина-4 и содержит у С-конца в качестве аминокислоты со свободной аминогруппой предпочтительно лизин в положении 39, а также хелатирующий агент DTPA.

Согласно изобретению были получены следующие химерные пептиды из GLP-1(1-37) и эксендина-3 или эксендина-4.

GLP-1(x-y)эксендин-3(z-k)A¹⁻⁷⁵

GLP-1(x-y)эксендин-4(z-k)A¹⁻⁷⁵

Эксендин-3(z-k)GLP-1(x-y)A¹⁻⁷⁵

Эксендин-4(z-k)GLP-1(x-y)A¹⁻⁷⁵

Причем (буквы) означают:

x=аминокислоты 1-36 аминокислотной последовательности GLP-1

y=аминокислоты 2-37 аминокислотной последовательности GLP-1

z=аминокислоты 1-38 аминокислотной последовательности эксендина-3 или эксендина-4

k=аминокислоты аминокислотной последовательности 2-39 эксендина-3 или эксендина-4

A=присоединенная группа, состоящая из одной или более аминокислот или их производных в качестве сигнальной молекулы как таковой, или для связывания или стабилизации. (группа) A предпочтительно локализована у С-конца и предпочтительно представляет собой, например, лизин или, в качестве альтернативы, другую аминокислоту со свободной аминогруппой, такую как, например, орнитин, или органическую группу со свободной аминогруппой, к которой присоединяется хелатирующий агент для мечения радионуклидами или MRT-контрастным средством, флуоресцирующим красителем или химиотерапевтическим средством. Хелатирующий агент представляет собой, например, DTPA (диэтиленetriаминопентауксусную кислоту, в качестве альтернативы N,N-бис(2-[бис(карбоксиметил)амино]этил)глицин),

в качестве альтернативы DOTA (1,4,7,10-тетраазаациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту, NYNIC (6-гидразинопиридин-3-карбоновую кислоту, MAG3 (меркаптоацетилглицилглицилглицин), N4 (1,4,8,11-тетраазаундекан) и известные производные всех названных хелатирующих агентов.

Верхний индекс означает, у какого положения аминокислотной последовательности альтернативно может находиться присоединенная группа.

GLP-1(x-y)эксендин-3(z-k)A¹⁻⁷⁵

при этом охватывает химерные пептиды из GLP-1 и эксендина-3, в которых аминокислоты с 1 по 36 происходят от GLP-1 и последующие аминокислоты с 1 по 39 от эксендина-3. (Группа) А представляет собой присоединенную группу, которая стоит в любом месте, но предпочтительно у С-конца, и в большинстве случаев является аминокислотой из GLP-1 и эксендина-3, предпочтительно амином лизином.

GLP-1(x-y)эксендин-4(z-k)A¹⁻⁷⁵

при этом охватывает химерные пептиды из GLP-1 и эксендина-4, в которых аминокислоты с 1 по 36 происходят от GLP-1 и последующие аминокислоты с 1 по 39 от эксендина-4. (Группа) А представляет собой присоединенную группу, которая стоит в любом месте, но предпочтительно у С-конца, и в большинстве случаев является аминокислотой из GLP-1 и эксендина-4, предпочтительно амином лизином.

Эксендин-3(z-k)GLP-1(x-y)A¹⁻⁷⁵

при этом охватывает химерные пептиды из эксендина-3 и GLP-1, причем z может означать числа от 1 до 38, но меньше k, которое может означать число от 2 до 39. (Группа) А представляет собой присоединенную группу, которая стоит в любом месте, но предпочтительно у С-конца, и в большинстве случаев выше у.

Присоединенная группа предпочтительно представляет собой амин лизин.

Эксендин-4(z-k)GLP-1(x-y)A¹⁻⁷⁵

при этом охватывает химерные пептиды из эксендина-4 и GLP-1, причем z может означать числа от 1 до 38, но меньше k, которое может означать число от 2 до 39. (Группа) А представляет собой присоединенную группу, которая стоит в любом месте, но предпочтительно у С-конца, и в большинстве случаев выше у.

Присоединенная группа предпочтительно представляет собой амин лизин.

Например, химерный пептид GLP-1(x-y)эксендин-3(z-k)A¹⁻⁷⁵ или GLP-1(x-y)эксендин-4(z-k)A¹⁻⁷⁵ представляет собой пептид MC12, состоящий из GLP-1(7-36)эксендин(33-39)Lys-амида (синтез на фирме Specialty Laboratories GmbH по способу Merrifield и очистка ВЭЖХ).

MC12: (Ser³⁷, Gly³⁸, Ala³⁹, Pro⁴⁰, Pro⁴¹, Pro⁴², Ser⁴³, DTPA-Lys⁴⁴-амид)GLP1(7-36)

MC12 состоит из всей аминокислотной последовательности GLP-1(7-36) и у С-конца содержит амин, предпочтительно лизин, в положении 44, а также хелатирующий агент DTPA, а также дополнительную цепь из 7 аминокислот от эксендина(33-39)Lys-амида. Этим представлен химерный пептид GLP-1(7-36)эксендин(33-39)Lys-амид.

Специалисту очевидно, что при этом (могут быть) представлены производные пептидов из GLP-1, эксендина-3 и эксендина-4, а также химерные пептиды различной длины из GLP-1, эксендина-3 и эксендина-4, в основе которых лежат различные комбинации аминокислотных последовательностей из GLP-1, эксендина-3 и эксендина-4.

Предложенные производные пептидов GLP-1, эксендина-3 и эксендина-4, а также химерные пептиды из GLP-1, эксендина-3 и эксендина-4, которые модифицированы амином у С-конца, а N-концом могут связываться с GLP-1-рецептором, включают в себя также молекулы, аминокислотные последовательности которых отличаются от

описанных пептидов GLP-1, эксендина-3 и эксендина-4 по одному или нескольким положениям и имеют более высокую степень гомологии указанных последовательностей. Гомология означает при этом идентичность последовательностей по меньшей мере на 40%, в частности, идентичность по меньшей мере на 60%, предпочтительно на 80% и особенно предпочтительно на 90%. Отклонения от вышеописанных аминокислотных последовательностей при этом могут возникнуть в результате удаления, замещения и/или внедрения.

Сверх того были получены предложенные химерные пептиды из GLP-1, эксендина-3 или эксендина-4 также без модифицирования С-конца и при этом найдено их применение, особенно при получении средства для терапии диабета.

GLP-1(х-у)эксендин-3(z-k)

GLP-1(х-у)эксендин-4(z-k)

Эксендин-3(z-k)GLP-1(х-у)

Эксендин-4(z-k)GLP-1(х-у)

MC20:(Ser³³,Gly³⁴,Ala³⁵,Pro³⁶,Pro³⁷,Pro³⁸,Ser³⁹)эксендинGLP-1(7-36)

MC20 состоит из всей аминокислотной последовательности GLP-1(7-36) и содержит у С-конца цепь из 7 аминокислот эксендина (33-39). При этом представлен не модифицированный химерный пептид GLP-1(7-36)эксендин(33-39).

Мечение производных пептидов и химерных пептидов

Предложенные производные пептидов и химерные пептиды для получения средства для диагностики и терапии доброкачественных и злокачественных заболеваний, при которых играет роль экспрессия рецепторов GLP-1, растворяли в подходящем стабилизирующем буферном растворе, например, для стабилизации металла, предпочтительно в 0,5 М ацетате натрия, pH 5,4, в концентрации около 10⁻³ М. В качестве альтернативы для стабилизации флуоресцирующих красителей предпочтителен буферный раствор из ацетата аммония, для стабилизации химиотерапевтических средств и контрастных средств физиологический буферный раствор.

Мечение осуществляют взаимодействием присоединенной группы А с радионуклидами, контрастными средствами MRT, флуоресцирующими красителями или химиотерапевтическими средствами. При этом для каждого вида применения *in vitro* или *in vivo* используют различные варианты.

В качестве радионуклидов для ковалентного или комплексного связывания использовали:

Нуклид	Способ применения	t _{1/2} [ч]	Испускаемые лучи	Энергия [keV]	Вид связывания
F-18	PET	1,8	β ⁺	634	ковалентное
Cu-64	PET	12,7	β ⁺	1673	комплексное
Cu-67	Терапия	61,8	β ⁻ γ	391 184	комплексное
Ga-67	SPECT	79,2	γ	93/184/300	комплексное
Ga-68	PET	1,1	β ⁺	2921	комплексное
Y-86	PET	14,8	β ⁺ γ	1220 1076/1153	комплексное
Y-90	Терапия	64,1	β ⁻	2280	комплексное
To-99m	SPECT	6	γ	140	комплексное
In-111	SPECT	67,2	γ	171/245	комплексное
I-123	SPECT	13,2	γ	158	ковалентное
I-124	PET	101	β ⁺ γ	2137/1534 602	ковалентное

5	I-131	Терапия	192	γ β^-	364 606	ковалентное
	Lu-177	Терапия	158	γ β^-	208 112/208	комплексное
	Re-186	Терапия	88,8	γ β^-	137 1071	комплексное
	Re-188	Терапия	17	γ β^-	155/477/632 1965/2120	комплексное
10	Pt-193m	Терапия	104	γ оже- e^-	135	комплексное
	Pt-195m	Терапия	96	γ оже- e^-	98	комплексное
15	Ac-225	Терапия	240	γ α	99, 150	комплексное
	At-211	Терапия	7,2	γ оже- e^-	687	комплексное ковалентное
	Bi-213	Терапия	0,76	α	440	комплексное
20	Sm-153	Терапия	46	γ β^-	103	комплексное
	Er-169	Терапия	226	β^-	100	комплексное

25 ПЕТ (позитронная эмиссионная томография), SPECT (компьютерная томография
единичных протонов)

В качестве флуоресцирующего красителя/хромофора использовали, например:
флуоресцеин, родамин, кумарин, пирен (каскадный синий (cascadblau)), люцифер
желтый (lucifergelb), фикобилипротеин (phycobiliprotein), цианин,
30 алексафтор (alexafluoro), орегон зеленый (oregongruen), тексафирин красный (texasrot),
кумарин и их производные.

Хелатирующими агентами являются, например, ДТРА
(диэтилентриаминпентауксусная кислота, N,N-бис(2-[бис(карбоксиметил)амино]
этил)глицин), DOTA (1,4,7,10-тетраазамакрододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота),
35 HYNIC (6-гидразинопиридин-3-карбоновая кислота), MAG3
(меркаптоацетилглицилглицилглицин), N4 (1,4,8,11-тетраазаундекан) или производные
всех указанных хелатирующих агентов.

Контрастными средствами MRT являются, например, гадолиний, марганец,
40 европий, медь, никель, хром, празеодим, диспрозий или гольмий или их соединения, а
также отрицательные MRT-контрастные средства, такие как, например,
перфторуглероды, а также, например, изотопы для MRT-спектроскопии, такие как F-
19, H-1, P-31, Na-19.

Отрицательные MRT-контрастные средства представляют собой контрастные
45 средства, которые гасят или сильно ослабляют, но не усиливают сигналы MRT.

Химиотерапевтические средства представляют собой, в частности, аддукторы
алкила (Alkylanzien), интеркаляторы, антиметаболиты, ингибиторы ферментов и
митотические яды (например, алкилсульфонаты, производные
50 этилиминитрозомочевина, утратившие азот, аналоги фолиевой кислоты, аналоги
пурина, аналоги пиримидина, аналоги подофиллина, таксаны, алкалоиды барвинка,
антрациклины, прочие цитостатические антибиотики, соединения платины,
производные камптотецина, различные гормоны, факторы роста, интерфероны или

интерлейкины), кроме того химиотерапевтические средства, описанные в “Onkologie 2004/05” авторами Preiss, Dornhoff, Hagmann, Schmieder в Zuckschwerdtverlag на стр. 230-267, а также другие цитостатически или цитотоксично действующие вещества.

В зависимости от рода применения предложенных производных белков и химерных белков и от полученных из них средств для диагностики и терапии доброкачественных и злокачественных заболеваний, при которых играет роль экспрессия рецепторов GLP-1, реакцию мечения проводили в двух вариантах.

Мечение для применения *in vitro* в радиотерапии

3 мкл раствора предложенного производного пептида или химерного пептида в подходящем стабилизирующем буфере, предпочтительно 0,5 М ацетате натрия, pH 5,4, с концентрацией около 10^{-3} М для мечения прибавляли к 500 мкл 0,5 М ацетата натрия, pH 5,4. При этом pH находился при 3-6. Туда же прибавляли 185 MBq $^{111}\text{InCl}_3$ (Тусо, Petten, Нидерланды) в 500 мл 0,1 М HCl и инкубировали в течение 30 минут при 37°C. Для насыщения всех участков связывания снова прибавляли 3 мкл раствора $^{nat}\text{InCl}_3$ и инкубировали еще в течение 30 минут.

Контроль качества проводили ВЭЖХ на колонке:

Колонка: CC 250/4,6 Nucleosil 120-5 C18(Machery-Nagel, Oenisingen, Швейцария)

Градиент: 0→5 мин 100% 0,05М $\text{NH}_4\text{OOCCH}_3$, pH 5,4 (буферный раствор А); 5→25 мин 100% буферный раствор А→50% буферного раствора А/50% ацетонитрила.

Контроль качества для применения *in vitro* выполняли при выходе мечения более 98%.

Таким образом получали в распоряжение радиоактивное меченое средство для диагностики и терапии доброкачественных и злокачественных заболеваний, при которых играет роль экспрессия рецепторов GLP-1, такое как, например, вводимое в клеточные и тканевые культуры поджелудочной железы.

Мечение для применения *in vivo* при радиотерапии

3 мкл раствора предложенного производного пептида или химерного пептида в подходящем стабилизирующем буфере, предпочтительно 0,5 М ацетате натрия, pH 5,4, с концентрацией около 10^{-3} М для мечения прибавляли к 500 мкл 0,5 М ацетата натрия, pH 5,4. По окончании туда же прибавляли 185 MBq $^{111}\text{InCl}_3$ (Тусо, Petten, Нидерланды) в 500 мл 0,1 М HCl и инкубировали в течение 30 минут при 37°C. Контроль качества проводили ВЭЖХ на колонке:

Колонка: CC 250/4,6 Nucleosil 120-5 C18(Machery-Nagel, Oenisingen, Швейцария)

Градиент: 0→5 мин 100% 0,05М $\text{NH}_4\text{OOCCH}_3$, pH 5,4 (буферный раствор А); 5→25 мин 100% буферный раствор А→50% буферного раствора А/50% ацетонитрила.

Контроль качества для применения *in vivo* выполняли при выходе мечения более 98%.

Таким образом получали радиоактивное меченое средство для диагностики и терапии доброкачественных и злокачественных заболеваний, при которых играет роль экспрессия рецепторов GLP-1, например, для определения опухолей у пациента.

Понятие пациент означает здесь равным образом человека и позвоночное животное. Таким образом, средство применимо в медицине и ветеринарии.

Терапевтически и диагностически действующие средства по изобретению вводят пациенту как часть фармацевтически приемлемой композиции либо перорально, ректально, парентерально, внутривенно/внутриартериально, внутримышечно, внутрисосудисто, местно (порошок, мазь или капли), либо в виде спрея.

Соответствующая дозировка в каждом случае применения для диагностики и терапии

доброкачественных и злокачественных заболеваний, при которых играет роль экспрессия рецепторов GLP-1, устанавливается врачом.

Изучение интернализации

Изучение интернализации показывает, например, перенос радиоактивно меченых *in vitro* предложенных производных пептидов и химерных белков в клетки.

В 6-луночный планшет высевали 100000 CHO-клеток, трансфицированных GLP-1-рецепторами. Клетки выращивали до сливания. Были образованы 4 группы:

Группа 1: общее связывание, промывание PBS

К 2 мл среды прибавляли меченый 100000 cpm ^{111}In пептид (10^{-15} моль) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Затем трижды промывали PBS и отделяли клетки 20 mM MOPS (3-морфолинопропансульфокислотой)+0,1% тритон-X-100 (pH 7,4). Захват в клетки измеряли на γ -счетчике. Число клеток измеряли по содержанию белка при помощи набора для определения белка из Bio-Rad (Мюнхен, Германия) на основе способа Bradford'a. Результат выражали в cpm/мкг белка.

Группа 2: неспецифическое связывание, промывание PBS

К 2 мл среды прибавляли 20 мкл 10^{-3} М раствора GLP-1 и меченый 100000 cpm ^{111}In пептид и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Затем трижды промывали PBS и отделяли клетки 20 mM MOPS (3-морфолинопропансульфокислотой)+0,1% тритон-X-100 (pH 7,4). Захват в клетки измеряли на γ -счетчике. Число клеток измеряли по содержанию белка при помощи набора для определения белка из Bio-Rad (Мюнхен, Германия) на основе способа Bradford'a. Результат выражали в cpm/мкг белка.

Группа 3: общее связывание, промывание кислотой

К 2 мл среды прибавляли 20 мкл 10^{-3} М раствора GLP-1 и меченый 100000 cpm ^{111}In пептид и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Затем промывали 1 раз 0,1 М буферным раствором ацетата натрия, pH 4, и дважды PBS и отделяли клетки 20 mM MOPS (3-морфолинопропансульфокислотой)+0,1% тритон-X-100 (pH 7,4). Захват в клетки измеряли на γ -счетчике. Число клеток измеряли по содержанию белка при помощи набора для определения белка из Bio-Rad (Мюнхен, Германия) на основе способа Bradford'a. Результат выражали в cpm/мкг белка.

Группа 4: неспецифическое связывание, промывание кислотой

К 2 мл среды прибавляли 20 мкл 10^{-4} М раствора GLP-1 и меченый 100000 cpm ^{111}In пептид и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Затем промывали 1 раз 0,1 М буферным раствором ацетата натрия, pH 4, и дважды PBS и отделяли клетки 20 mM MOPS (3-морфолинопропансульфокислотой)+0,1% тритон-X-100 (pH 7,4). Захват в клетки измеряли на γ -счетчике. Число клеток измеряли по содержанию белка при помощи набора для определения белка из Bio-Rad (Мюнхен, Германия) на основе способа Bradford'a. Результат выражали в cpm/мкг белка.

$$\text{Оценка: \%IDsB} = \frac{\text{Res3.} - \text{Res4.}}{\text{Res1.} - \text{Res2.}} * 100$$

%IdsB=% внедрения специфического связывания

	%IdsB
MC10	75±5
MC11	70±7
MC12	73±9

Результаты показывают, что происходит хороший перенос в клетки.

Изучение связывания

Изучение связывания показывает специфическое связывание радиоактивно меченых *in vivo* предложенных производных пептидов и химерных белков с GLP-1-рецепторами.

В 6-луночный планшет высевали 100000 CHO-клеток, трансфицированных GLP-1-рецепторами. Клетки выращивали до сливания. Затем прибавляли в 2 мл маркированного 100000 cpm ^{111}In пептида. Для определения связывание блокировали 20 мкл 10^{-3} М раствора GLP-1.

	% блокирования
MC10	80±3
MC11	85±3
MC12	77±6

Биораспределение *in vivo* получали на грызунах, например, на голых мышах. Для этого впрыскивали трансфицированные GLP-1 CHO-клетки голым мышам. Через 3-5 недель опухоли вырастали до величины около 300 мг. Мышам впрыскивали предложенный меченый 37 MBq ^{111}In пептид через хвостовую вену и через 4 ч измеряли мышей в γ -камере.

При этом происходило быстрое очищение через почки и поглощение почками. Более высокое поглощение происходило равным образом в опухолевой ткани, позитивной по рецепторам GLP-1, в то время как опухолевые ткани, негативные по рецепторам GLP-1, едва проявляли поглощение. Легкое поглощение также наблюдали в поджелудочной железе, другие органы не проявляли видимого поглощения.

Изучение биораспределения *ex vivo* проводили в группах по 4 мыши, при котором впрыскивали 555 kBq In-111 в хвостовую вену. Через 1, 4 и 24 ч после впрыскивания мышей убивали и извлекали органы.

Измеряли поглощение радиоактивности и органы взвешивали.

Измеряли поглощение радиоактивности и органы взвешивали. Рассчитывали % впрыснутой дозы на грамм массы органа (%i.D./g).

Результаты выглядели следующим образом:

Орган	1 ч	Станд. отклонение	4 ч	Станд. отклонение	24 ч	Станд. отклонение
Кровь	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Печень	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
Желудок	0,14	0,10	0,13	0,07	0,07	0,06
Селезенка	0,02	0,02	0,01	0,00	0,01	0,00
Поджелудочная железа	0,58	0,50	0,62	0,28	0,37	0,27
Почки	7,90	3,62	7,41	3,56	4,85	3,05
Кишечник	0,12	0,06	0,07	0,06	0,04	0,03
Легкие	0,80	0,56	0,36	0,17	0,22	0,07
Сердце	0,02	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00
Кости	0,02	0,04	0,01	0,00	0,01	0,01
Мышцы	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Опухоль -	0,03	0,03	0,02	0,01	0,01	0,00
Опухоль +	0,42	0,19	0,31	0,30	0,20	0,16

Средние значения биораспределения для 4 мышей в группе в %i.D./г. Станд. отклонение: стандартное отклонение.

Формула изобретения

1. Производные пептидов эксендина-3 (1-39), обладающие активностью глюкагон-

подобных пептидов (GLP-1), отличающиеся тем, что они содержат аминокислотную последовательность пептида

H-His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-

5 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-

16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31

10 Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂

32 33 34 35 36 37 38 39

15 причем у С-конца они модифицированы амином и обладают способностью связываться N-концом с GLP-1-рецептором,

при этом производные пептидов построены из эксендина-3 (1-39)A⁴⁰,

где А означает присоединенную группу, состоящую из аминокислоты лизина, или другой аминокислоты с одной свободной аминогруппой, или органической группы с одной свободной аминогруппой, и

20 к присоединенной группе А присоединен хелатирующий агент для мечения радионуклидами или MRT-контрастным средством, флуоресцирующим красителем или химиотерапевтическим средством.

25 2. Производные пептидов эксендина-3 по п.1, отличающиеся тем, что присоединенная группа А представляет собой аминокислоту, а именно орнитин.

3. Производные пептидов эксендина-3 по п.2, отличающиеся тем, что хелатирующий агент представляет собой N,N-бис(2-[бис(карбоксиметил)амино]-этил)глицин), DOTA (1,4,7,10-тетраазаациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту), HYNIC (6-гидразинопиридин-3-карбоновую кислоту), MAG3 (меркаптоацетил-глицилглицилглицин), N4 (1,4,8,11-тетраазаундекан) и их известные производные, предпочтительно DTPA (диэтилентриаминопентауксусную кислоту).

35 4. Производные пептидов эксендина-3 по п.1, отличающиеся тем, что мечение является связыванием с радионуклидом, MRT-контрастным средством, флуоресцирующим красителем и/или химиотерапевтическим средством.

40 5. Производные пептидов эксендина-3 по п.1, отличающиеся тем, что флуоресцирующий краситель в особенности выбран из группы, включающей флуоресцеин, родамин, кумарин, BODIPY, пирен (каскадный синий), люцифер желтый, фикобилипротеин, цианин, алексафтор, орегоновый зеленый, тексафирин красный, кумарин и их производные.

45 6. Производные пептидов эксендина-3 по п.1, отличающиеся тем, что радионуклид в особенности выбран из группы, включающей F-18, Cu-64, Cu-67, Ga-67, Ga-68, Y-86, Y-90, Tc-99m, In-111, I-123, I-124, I-131, Lu-177, Re-186, Re-188, Pt-193m, Pt-195m, Ac-225, At-211, Bi-213, Sm-153 или Er-169.

7. Производные пептидов эксендина-3 по п.1, отличающиеся тем, что MRT-контрастное средство представляет собой гадолиний, марганец, железо, европий, медь, никель, хром, празеодим, диспрозий или гольмий или их соединения, или перфторуглероды, или F-19, H-1, P-31, Na-19.

50 8. Производные пептидов эксендина-3 по п.1, отличающиеся тем, что химиотерапевтическое средство в особенности выбрано из группы, включающей алкилсульфонаты, этилимины, нитрозомочевины, производные азотистого иприта,

аналоги фолиевой кислоты, аналоги пурина, аналоги пиримидина, производные подофилина, таксаны, алкалоиды барвинка, антрациклины, прочие цитостатические антибиотики, соединения платины, производные камптотецина, гормоны, факторы роста, интерфероны или интерлейкины, или цитостатически или цитотоксически действующие вещества.

9. Производные пептидов эксендина-3 по п.1, отличающиеся тем, что мечение происходит путем присоединения радионуклидов для применения *in vitro* посредством насыщения мест связи $^{nat}\text{InCl}_3$.

10. Применение производных пептидов эксендина-3 по п.1 для получения средства для диагностики и терапии заболеваний, при которых играет роль экспрессия GLP-1.

11. Применение производных пептидов эксендина-3 по п.1 для определения плотности инсулинпродуцирующих клеток в ткани.

12. Применение производных пептидов эксендина-3 по п.1 для определения экспрессии GLP-1 - рецепторов или их плотности.

13. Средство для диагностики заболеваний, при которых играет роль экспрессия GLP-1, отличающееся тем, что оно содержит меченые производные пептидов эксендина-3 по п.1.

14. Средство для терапии заболеваний, при которых играет роль экспрессия GLP-1, отличающееся тем, что оно содержит меченые производные пептидов эксендина-3 по п.1.

15. Средство для терапии заболеваний, при которых играет роль экспрессия GLP-1, отличающееся тем, что оно содержит немеченые производные пептидов эксендина-3 по п.1.

16. Средство по п.13, отличающееся тем, что мечение представляет собой присоединение радионуклидов, MRT-контрастных средств, флуоресцирующих красителей и/или химиотерапевтических средств.

17. Применение средства по п.13 для диагностики заболеваний, при которых играет роль экспрессия GLP-1.

18. Применение средства по п.13 для диагностики нейроэндокринных опухолей (NET), в особенности инсулиномы и мелкоклеточного бронхогенного рака.

19. Применение средства по п.14 в сцинтиграфии, PET, SPECT, MRT, оптической диагностики, опосредованной рецепторами химиотерапии, опосредованной рецепторами цитостатической или цитотоксической терапии и радиопептидной терапии.

20. Применение средства по п.14 для терапии заболеваний, при которых играет роль экспрессия GLP-1.

21. Применение средства по п.14 для терапии нейроэндокринных опухолей (NET), в особенности инсулиномы и мелкоклеточного бронхогенного рака.