

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. Januar 2012 (05.01.2012)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 2012/000861 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

G01N 33/574 (2006.01) C12N 15/115 (2010.01)
A61K 51/04 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP201 1/060421

(22) Internationales Anmeldedatum:
22. Juni 2011 (22.06.2011)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2010 026 066.5 30. Juni 2010 (30.06.2010) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Wittelsbacherplatz 2, 80333 München (DE). MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Hofgartenstr. 8, 80539 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KOLB, Hartmuth C. [DE/US]; 6413 Pacific Avenue, Playa Del Rey, CA 90293 (US). KRÜGER, Ursus [DE/DE]; Krampnitz Weg 11, 14089 Berlin (DE). LADE, Oliver [DE/DE]; Hohenheimer Straße 9, 13465 Berlin (DE). STECKENBORN, Arno [DE/DE]; Stadtrandstr. 467B, 13589 Berlin (DE). WEIL, Tanja [DE/SG]; Hinter dem Brot, 89073 Ulm (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT; Postfach 22 16 34, 80506 München (DE).

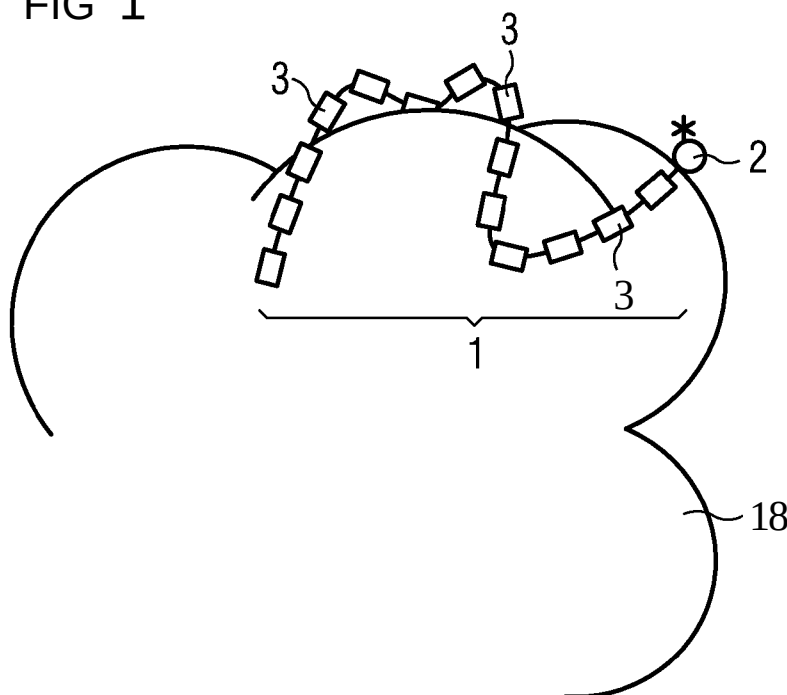
(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: "C-LABELLED APTAMER FOR DETECTING A DISEASED TISSUE

(54) Bezeichnung : "C-MARKIERTES APTAMER ZUR DETEKTION EINES KRANKHAFTEN GEWEBES

FIG 1



(57) Abstract: There is described the use of an aptamer (1) for the preparation of an agent for detecting a diseased tissue (18). The aptamer (1) binds to the diseased tissue (18) and is coupled to an amino acid (2) which, in turn, includes an ¹¹C carbon atom. There is furthermore described a radiopharmaceutical for locating a tumour (18), which radiopharmaceutical comprises such an aptamer (i).

(57) Zusammenfassung: Es wird die Verwendung eines Aptamers (1) zur Herstellung eines Agens zur Detektion eines krankhaften Gewebes (18) beschrieben. Das Aptamer (1) bindet dabei an das krankhafte Gewebe (18) und ist an eine Aminosäure (2) gekoppelt, die wiederum ein ¹¹C-Kohlenstoffatom aufweist. Ferner wird ein Radiopharmakon zur Lokalisation eines Tumors (18) beschrieben, das ein solches Aptamer (1) umfasst.



SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, *f* r
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS,
IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz
V
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderun-
gen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)

Beschreibung

¹¹C-markiertes Aptamer zur Detektion eines krankhaften Gewebes

5

Die Erfindung betrifft die Verwendung eines Aptamers zur Herstellung eines Agens zur Detektion eines krankhaften Gewebes. Sie betrifft ferner ein Radiopharmakon zur Lokalisation eines krankhaften Gewebes, das ein solches Aptamer umfasst.

10

In der modernen Diagnostik werden zur Charakterisierung von Krankheiten vor allem biochemische Analysen von Blut, anderen Körperflüssigkeiten und Gewebeproben eingesetzt. Dabei wird die Anwesenheit und Menge von Molekülen untersucht, die für eine bestimmte Krankheit typisch sind. Neben Fremdstoffen werden auch körpereigene Stoffe nachgewiesen, die beispielsweise nur bei einer Infektion durch Viren oder Bakterien gebildet werden. Insbesondere Tumorzellen bilden häufig große Mengen bestimmter Proteine, insbesondere zelluläre Rezeptoren, deren Expression für eine Tumorart spezifisch ist. Viele der Proteine, die speziell von krankhaften Zellen gebildet werden, sind Oberflächenmoleküle, die in der Membran der erkrankten Zellen verankert werden. Diese Oberflächenmoleküle können mit entsprechenden diagnostischen Verfahren nachgewiesen werden. Dazu werden üblicherweise Zellen aus Gewebe- oder Blutproben mit Antikörpern untersucht, die an bestimmte, für eine Krankheit spezifische Oberflächenmoleküle binden. Durch derartige *in vitro* Untersuchungen kann das Vorliegen einer Krankheit diagnostiziert werden. Es ist aber nicht möglich, auch den genauen Ort des erkrankten Gewebes festzustellen. Zu diesem Zweck werden in der Regel bildgebende Verfahren, wie beispielsweise Röntgen, Ultraschall und Kernspintomographie verwendet. Mit ihnen lassen sich vor allem ektopische Zellansammlungen, wie etwa Tumore, oder Schwellungen einzelner Or-

gane lokalisieren. Zeigt ein krankhaftes Gewebe jedoch keine deutlichen morphologischen Auffälligkeiten, oder ist es verhältnismäßig klein, kann es bei traditionellen Untersuchungen leicht übersehen werden.

5

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde ein Agens bereitzustellen, mit dem ein krankhaftes Gewebe spezifisch und unabhängig von seiner Größe detektiert werden kann. Diese Aufgabe wird durch die Verwendung eines Aptamers zur Herstellung eines Agens zur Detektion eines krankhaften Gewebes gelöst. Indem das Aptamer an das krankhafte Gewebe bindet und an eine Aminosäure gekoppelt ist, die wiederum ein ^{11}C -Kohlenstoffatom aufweist, können selbst wenige Zellen eines krankhaften Gewebes an Hand des radioaktiven Signals lokalisiert werden.

15

Der Begriff "Aptamer" bezeichnet kurze, einzelsträngige Nukleinsäure-Oligomere, die sowohl RNA als auch DNA Moleküle umfassen können. In Abhängigkeit von ihrer jeweiligen Sequenz bilden Aptamere vielfältige Strukturen und binden an Zielmoleküle der verschiedensten Stoffklassen. Dabei kommt es zu einer spezifischen Strukturkompatibilität zwischen einem Aptamer und seinem Zielmolekül, ähnlich einer Antigen-Antikörper-Bindung. Die Strukturkompatibilität der Moleküle erfolgt über elektrostatische Wechselwirkungen, ionische Bindungen, van-der-Waals Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken und sog. Stacking Interactions zwischen den aromatischen Ringen der Basen der Nukleinsäuren. Aptamere, die ein bestimmtes Zielmolekül binden, werden durch *in vitro* Selektionsverfahren und Amplifikationstechniken, sog. SELEX-Prozesse (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) identifiziert und produziert. Aptamere umfassen regelmäßig 8 bis 220 Nukleotide, vorzugsweise 20 bis 60 Nukleotide. Es können aber auch Aptamere mit bis zu 500 Nukleotiden verwendet werden. Sie

20

25

30

können synthetisch hergestellt oder durch enzymatischen Abbau genomischer DNA gewonnen werden (Kulbachinskiy AV, 2007) .

Unter Verwendung umfangreicher Aptamer Bibliotheken können
5 Aptamere identifiziert werden, die ein spezifisches Zielmole-
kül binden. Dabei kann es sich sowohl um größere Biomoleküle,
beispielsweise Proteine, als auch um einzelne chemische Ele-
mente handeln. Darüber hinaus binden Aptamere nahezu alle
Stoffklassen, so dass auch Aptamere identifiziert werden kön-
10 nen, die spezielle Proteinmodifikationen, wie beispielsweise
Fettsäure- oder Zuckermodifikationen erkennen und binden.

Jede Zelle trägt auf ihrer Oberfläche, verankert in ihrer
Zellmembran, eine Vielzahl unterschiedlicher Moleküle, wobei
15 die meisten zur Stoffklasse der Proteine gehören. Neben Mole-
külen mit grundlegenden biologischen Funktionen, die in nahe-
zu jeder Zelle vorkommen, werden viele Moleküle nur von Zel-
len eines bestimmten Gewebes oder eines bestimmten Zelltyps
exprimiert. Außerdem bilden Zellen, die von Krankheitserre-
20 gern befallen sind oder gestörte Zellfunktionen aufweisen,
wie beispielsweise Tumorzellen, eigene Moleküle. Viele dieser
krankheitsspezifischen Moleküle sind membranständig und kön-
nen auf der Oberfläche der jeweiligen Zelle nachgewiesen wer-
den. Indem ein Aptamer gewählt wird, das mit einem, für ein
25 krankhaftes Gewebe kennzeichnenden Molekül interagiert, bin-
det das Aptamer spezifisch an das krankhafte Gewebe. Vorzugs-
weise wird das Aptamer dabei so gewählt, dass die Bindung
zwischen dem Aptamer und dem Zielmolekül einen linearen Koef-
fizient, sog. K_D -Wert, von ≤ 100 nM, bevorzugt von ≤ 10 nM,
30 am meisten bevorzugt von 7,5 nM aufweist. Mit einem solchen
Aptamer können selbst wenige Zellen eines krankhaften Gewebes
spezifisch nachgewiesen werden.

Der Begriff "krankhaftes Gewebe" bezeichnet Zellen, Teile von Organen oder ganze Organe, die ihre physiologische Funktion nicht oder nicht in vollem Umfang erfüllen. Dazu zählen beispielsweise mit Viren oder Bakterien infizierte Zellen, hypertrophes Gewebe, entzündete Gewebe und Organe, hyperplastisches und neoplastisches Gewebe, etwa Geschwüre, Tumore und Karzinome. Krankhafte Zellen bilden häufig Proteine, deren Expression für eine bestimmte Erkrankung kennzeichnend ist, beispielsweise weil sie vom genetischen Material eines Virus oder eines Bakteriums abstammen. Handelt es sich bei diesen Molekülen um Zelloberflächenmoleküle, werden sie auf der Zellmembran verankert. Indem das Aptamer speziell ein Oberflächenmolekül eines krankhaften Gewebes bindet, ermöglicht es eine zuverlässige Lokalisation dieses Gewebes.

Um das an ein Gewebe gebundene Aptamer zu detektieren, wird das Aptamer an eine Aminosäure gekoppelt, die wiederum ein ^{11}C -Kohlenstoffatom aufweist. Beim Zerfall des ^{11}C -Kohlenstoffisotops werden Positronen, die auch als β^+ -Strahlung bezeichnet werden, gebildet. Stoßen die Positronen auf ein Elektron, bilden sie zwei Photonen, die sich in einem Winkel von 180° , also genau in entgegengesetzter Richtung, voneinander entfernen. Die Photonen können detektiert und daraus die Position der Positronenemission, bzw. des ^{11}C -Kohlenstoffatoms, berechnet werden. Des Weiteren kann auch die Menge an Aptameren, die sich an einer bestimmten Stelle befindet, quantifiziert werden. Die Kopplung einer Aminosäure mit einem ^{11}C -Kohlenstoffatom an das erfindungsgemäß verwendete Aptamer ermöglicht es, sowohl das Vorhandensein, als auch die Position des Aptamers nachzuweisen und abzubilden. Zur Herstellung einer ^{11}C -markierten Aminosäure und zur Kopplung der Aminosäure an das Aptamer sind insbesondere die Verfahren, die in den Patentanmeldungen DE 10 2009 035 648.7, und DE 10 2009 035 645.2 beschrieben werden, geeignet.

Die Markierung des Aptamers mit einem ^{11}C -Kohlenstoffatom über eine Aminosäure ist insbesondere vorteilhaft, weil dadurch keine der üblichen Komplexbildner, wie Diethylen-
5 aminpentaacetat (DTPA), 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA) verwendet werden müssen. Der entstehende Komplex aus Aptamer und Aminosäure umfasst körpereigene Moleküle, wodurch er für den Organismus besonders verträglich ist. Sowohl das Aptamer und seine einzelnen Nuk-
10 leinsäuren, als auch die Aminosäure sind nicht toxisch. Sie können natürlich verstoffwechselt, abgebaut und ausgeschieden werden. Durch die Verwendung eines integrierten ^{11}C -Kohlenstoffatoms kann außerdem vermieden werden, dass ein radioaktiver Fremdstoff, wie beispielsweise ^{18}F Fluor, ^{133}Xe Xenon,
15 oder ^{68}Ga Gallium, in den Organismus eingebracht werden muss.

Ein weiterer Vorteil des über eine Aminosäure mit ^{11}C -Kohlenstoff markierten Aptamers liegt in dem günstigen Signal/Hintergrund Verhältnis während der Detektion des Aptamers. Das Aptamer bindet an das krankhafte Gewebe, wohingegen
20 freie, ungebundene Aptamere rasch verstoffwechselt und aus dem Organismus ausgeschieden werden, weil sie von endogenen Enzymen zügig abgebaut werden. Dadurch entsteht ein starkes und spezifisches Signal an der Position des krankhaften Gewebes, und das Hintergrundsignal wird minimiert.

In einer vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung ist das Agens ein Radiopharmakon. Der Begriff "Radiopharmaka" bezeichnet Arzneimittel, die Radionuklide enthalten, deren
30 Strahlung zur Diagnostik und Therapie verwendet wird. Die wichtigsten Anwendungsgebiete sind dabei die Onkologie, Kardiologie und Neurologie, aber auch die Arzneimittelforschung. Als Radionuklide werden Gamma- bzw. Beta-Strahlen emittierende Nuklide, zum Beispiel ^{133}Xe Xenon, "Technetium, ^{68}Ga Gallium,

und ^{18}F Fluor, verwendet. Sie werden üblicherweise über Kom-
plexbildner wie DTPA, DOTA oder Ethylendiamintetraacetat
(EDTA) an Mono- oder Polysaccharide gebunden. Die Nuklide
werden, je nach der Art ihrer Strahlung, mittels Szintigra-
5 phie, Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) oder
Positronen-Emissions-Tomographie (PET) detektiert. Aufgrund
ihrer unphysiologischen Bestandteile können herkömmliche Ra-
diopharmaka jedoch Nebenwirkungen, wie anaphylaktische oder
allergische Reaktionen, im Körper eines Patienten verursa-
10 chen. Die Verwendung eines Aptamers aus körpereigenen Nuk-
leinsäuren reduziert diese Gefahr deutlich, weil weder das
Aptamer selbst, noch seine Abbauprodukte toxisch sind. Zudem
ist Kohlenstoff, im Gegensatz zu Technetium oder Xenon, ein
im Körper vorkommendes Element, das natürlich verstoff wech-
15 selt werden kann.

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung ist die
Aminosäure Glycin, Alanin, Valin oder Serin. Die Verwendung
einer dieser Aminosäuren, um das ^{11}C -Kohlenstoff isotop an das
20 Aptamer zu koppeln, ist besonders vorteilhaft, weil diese
Aminosäuren verhältnismäßig klein sind und keine reaktiven
Seitenketten aufweisen. Sie beeinflussen daher weder die Kon-
formation noch die Bindungsaffinität des Aptamers, und die
Spezifität des Aptamers für sein Zielmolekül bleibt erhalten.

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung ist die
Aminosäure über eine Peptidbindung an eine freie Aminogruppe
eines Nukleotids des Aptamers gekoppelt. Dadurch können her-
kömmliche Peptidsyntheseverfahren, wie beispielsweise eine
30 Festphasensynthese, zur Koppelung der Aminosäure an das Aptamer
verwendet werden. Die Herstellung des Komplexes ist daher
ohne aufwendige zusätzliche Syntheseverfahren möglich, wo-
durch der technische und finanzielle Aufwand reduziert wird.
Des Weiteren kann der Komplex aus Aptamer und Aminosäure di-

rekt nach dem Anbringen der ^{11}C -markierten Aminosäure verwendet werden kann. ^{11}C -Kohlenstoff hat eine Halbwertszeit von nur ca. 20 Minuten, so dass die Strahlungsdosis desto höher gewählt werden muss, je mehr Zeit zwischen der Synthese des Komplexes und seiner Verwendung liegt. Wird die Aminosäure mit der ^{11}C -Markierung im letzten Schritt der Synthese angebracht, kann das Aptamer anschließend sofort verwendet werden. Auf diese Weise wird die Zeitspanne zwischen der Verarbeitung des ^{11}C -Kohlenstoffs und dem Einsatz des Aptamers reduziert, so dass der Strahlungsverlust während der Herstellung des Komplexes minimiert wird. Deshalb kann die Strahlungsdosis, die bei der Verarbeitung des ^{11}C -Kohlenstoffs eingesetzt werden muss um eine bestimmte Strahlungsstärke des Produkts zu gewährleisten, entsprechend geringer sein. Die Herstellung wird dadurch kostengünstiger und die Strahlenbelastung für das technische Personal, welches das Agens herstellt, verringert.

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung ist das ^{11}C -Kohlenstoffatom das Carbonylkohlenstoffatom der Peptidbindung. Die Peptidbindung liegt verhältnismäßig geschützt im Inneren des Komplexes aus Aptamer und Aminosäure. Dadurch ist gewährleistet, dass das ^{11}C -Kohlenstoffatom nicht von der Aminosäure abgespalten wird, wie es etwa bei einer exponierten Seitenkette der Aminosäuren möglich wäre.

In einer vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung ist die Aminosäure eine D-Aminosäure. Mit Ausnahme des Glycins besitzen alle Aminosäuren an ihrem alpha-C-Kohlenstoffatom ein chirales Zentrum und können daher als Konfigurationsisomere, nämlich als D- oder L-Aminosäure, vorliegen. Endogene Peptide und Proteine sind weitgehend aus Aminosäuren in L-Konfiguration aufgebaut. Zudem arbeiten die meisten natürlichen Proteasen und Peptidasen stereoselektiv und verstoffwechseln

hauptsächlich L-Aminosäuren. Daher dauert der Abbau von D-Aminosäuren durch körpereigene Enzyme länger als der von L-Aminosäuren. Dieser Umstand kann verwendet werden, um die Halbwertszeit des Komplexes aus Aptamer und einer Aminosäure zu verlängern, indem statt einer L-Aminosäure eine D-Aminosäure verwendet wird (Neundorff I et al., 2008). Dadurch kann die Zeit bis die Aminosäure von dem Aptamer, durch proteolytischen Verdau, abgespalten wird, positiv beeinflusst werden. Eine weitere Möglichkeit, die Abspaltung zu verzögern, besteht darin, eine nicht natürliche Aminosäure zu verwenden. Die nicht natürlichen Aminosäuren werden langsamer verstoffwechselt, weil die körpereigenen proteolytischen Enzyme speziell an den Abbau natürlicher Aminosäuren angepasst sind. Darüber hinaus sind auch andere chemische Modifikationen der Aminosäure möglich. Beispielsweise kann die endständige Aminogruppe der Aminosäure durch eine Isonitrilgruppe ersetzt werden. Eine solche Modifikation reduziert die von der Aminogruppe vermittelte Interaktion mit proteolytischen Enzymen, ohne die Bindungsspezifität zu verändern.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Radiopharmakon zur Lokalisation eines Tumors, das ein Aptamer umfasst. Indem das Aptamer an den Tumor bindet und an eine Aminosäure gekoppelt ist, die wiederum ein ^{11}C -Kohlenstoffatom aufweist, können selbst wenige Zellen des Tumors lokalisiert werden.

Auf Grund der Vorteile des enthaltenen Komplexes aus Aptamer und Aminosäure bietet das erfindungsgemäße Radiopharmakon ein sensitives und spezifisches Agens, um die Position eines Tumors *in vivo* zu bestimmen. Das Radiopharmakon wird dem Patienten verabreicht und die darin enthaltenen Aptamere, die an die ^{11}C -markierte Aminosäuren gekoppelt sind, verteilen sich auf Grund ihrer Größe schnell und effizient im Körper. Sie binden an den Tumor und sammeln sich an dessen Oberfläche.

Die Häufung der radioaktiv markierten Aptamere wird mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) nachgewiesen und so die genaue Position des Tumors im Körper des Patienten bestimmt.

5

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung ist die Aminosäure Glycin, Alanin, Valin oder Serin, so dass weder die Konformation noch die Bindungsaffinität des Aptamers durch die Aminosäure beeinflusst werden.

10

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung ist das ^{14}C -Kohlenstoffatom das Kohlenstoffatom der endständigen α -Carboxylgruppe der Aminosäure. Dadurch kann das ^{11}C -Kohlenstoffatom nicht von der Aminosäure abgespalten werden, wie es etwa bei einer exponierten Seitenkette der Aminosäuren möglich wäre.

15

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Radiopharmakon ein PET Biomarker. Die PET ist ein etabliertes Verfahren um die Strahlung radioaktiver Elemente zu erfassen und ihre Position zu bestimmen (Massoud TF, Gambhir SS, 2003). Mit Hilfe von ringförmig um den Patienten angeordneten Detektorgeräten werden Schnittbilder erstellt, auf denen die Zerfallsereignisse in ihrer räumlichen Verteilung im Körperinneren dargestellt werden. Die PET ermöglicht es auch, die Menge an markierten Molekülen in einem Gewebe quantitativ zu bestimmen.

20

25

Außerdem wird ein Verfahren zur Lokalisation eines krankhaften Gewebes in einem Organismus offenbart, umfassend die Schritte: a) Bereitstellen eines Aptamers, das an eine Aminosäure gekoppelt ist; b) Verabreichen des Aptamers an den Organismus; und c) Detektieren des Aptamers in dem Organismus mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Indem das Aptamer an den Tumor bindet und die Aminosäure ein

30

^{11}C -Kohlenstoff atom aufweist, kann das krankhafte Gewebe im Organismus des Patienten spezifisch lokalisiert werden.

Mit dem erfindungsgemäß verwendeten Aptamer, an das eine ^{11}C -markierte Aminosäure gekoppelt ist, wird ein krankhaftes Gewebe im Inneren eines Organismus detektiert und lokalisiert, und kann so, im Körper eines Patienten, beobachtet werden. Auf diese Weise kann beispielsweise die Größe oder Ausdehnung einer Infektion oder eines Tumors bestimmt werden. Das erfindungsgemäß verwendete Aptamer ist daher hervorragend zur Beobachtung von Verlauf und Erfolg einer Behandlung, sog. Therapiemonitoring, geeignet.

Im Folgenden werden bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung anhand der beigefügten schematischen Zeichnungen erläutert.

Figur 1 zeigt schematisch ein Aptamer 1 mit 14 Nukleotiden 3, das an ein krankhaftes Gewebe 18 gebunden ist. Das Aptamer 1 ist an eine Aminosäure 2 gekoppelt, die mit einem ^{11}C -Kohlenstoff atom radioaktiv markiert ist. Die radioaktive Markierung ist durch einen Stern (*) dargestellt.

Die spezifische Bindungsaffinität zwischen dem Aptamer 1 und dem krankhaften Gewebe 18 kommt auf Grund chemischer Wechselwirkungen zwischen dem Aptamer 1 und der Oberfläche des krankhaften Gewebes 18 zustande. Das krankhafte Gewebe 18 bildet Oberflächenmoleküle, die für die Erkrankung des Gewebes kennzeichnend sind. Aus einer Aptamer-Bibliothek wird ein Aptamer 1 identifiziert, das mit einem Oberflächenmolekül des krankhaften Gewebes 18 interagiert. Anschließend wird eine Aminosäure, die mit einem ^{11}C -Kohlenstoff atom markiert ist, an das Aptamer 1 gekoppelt. Das Aptamer 1 kann dann durch die beim Zerfall des ^{11}C -Kohlenstoff atoms abgegebenen Positronen

mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) nachgewiesen werden. Der Ort der Positronenemission entspricht dem Ort des Aptamers 1 und somit dem des krankhaften Gewebes 18, an welches das Aptamer 1 gebunden ist.

5

Das an eine ^{11}C -markierte Aminosäure 2 gekoppelte Aptamer 1 wird einem Patienten in Form eines Arzneimittels verabreicht. Es bindet an das krankhafte Gewebe 18 und sammelt sich an dessen Zellen. Diese Anhäufung wird bei einer PET sichtbar, so dass die Verteilung des Aptamer 1 bzw. die Position des krankhaften Gewebes 18 im Körper des Patienten bestimmt werden können.

10

Figur 2 zeigt eine Darstellung eines Aptamers mittels chemischer Formel. Das Aptamer hat die Sequenz SEQ ID Nr.: 1 und ist an eine ^{11}C -markierte Aminosäure, nämlich Glycin, gekoppelt.

15

Das Aptamer umfasst 70 Nukleinsäuren der folgenden Sequenz:

20

GGG AGG ACG AUG CGG ACC GAA AAA GAC CUG ACU UCU AUA CUA AGU
CUA CGU UCC CAG ACG ACU CGC CCG A .

Das 3' terminale Adenosin des Aptamers und das daran gekoppelte Glycin sind mittels Strukturformel dargestellt, die restlichen Nukleinsäuren 3 durch ihren jeweiligen Buchstaben Code. Die Sequenz des Aptamers ist auch in SEQ ID Nr.: 1 angegeben. Das Carbonylkohlenstoff atom Glycins ist ein ^{11}C -Kohlenstoff atom, dargestellt durch die Ziffer 11 oberhalb des Carbonylkohlenstoff atoms .

25

30

Das Aptamer mit der SEQ ID Nr.: 1 weist eine spezifische Bindungsaffinität zu dem Prostata spezifischen Membran Antigen (PSMA) auf. Dieses Protein wird vor allem in Prostatagewebe exprimiert und kommt in Prostatkarzinomen in besonders hohen

Mengen vor. PSMA ist ein Membranprotein, das in gesunden Prostatazellen aber in einer besonderen zytoplasmatischen Form vorliegt. Bei Prostatakarzinomen ist es vor allem auf der Zellmembran der Tumorzellen lokalisiert.

5

Das Aptamer 1 wird anhand seiner Bindungsspezifität zu PSMA mit SELEX Verfahren aus einer Aptamer-Bibliothek ausgewählt und amplifiziert. Anschließend wird die ¹¹C-markierte Aminosäure 2 mit einem herkömmlichen Peptidsyntheseverfahren an das Aptamer 1 gekoppelt. Das Aptamer 1 wird dem Patienten verabreicht und so das Prostatakarzinom mittels PET dargestellt. Auf diese Weise können auch Metastasen, die ebenfalls membranständiges PSMA exprimieren, lokalisiert werden.

15 Figur 3 zeigt eine schematische Darstellung (stark vereinfacht nach Faller A, Schünke M, Der Körper des Menschen, Thieme, 2008) eines Blutkreislaufsystems 10 eines Organismus und die Verteilung eines Aptamers 1 darin.

20 Das Blutkreislaufsystem 10 umfasst verschiedene schematisch dargestellte Organe, wie Lunge 12, Herz 13, Leber 14, Darm 15 und Niere 16 und die Hauptadern 11, welche diese Organe verbinden. Das Aptamer 1 ist durch Dreiecke entlang der Adern 11 dargestellt. Die Abbauprodukte 17 des Aptamers 1 sind durch
25 einzelne Striche innerhalb der Umrisse der Niere 16 dargestellt. Links der Mitte des Blutkreislaufsystems 10 ist zusätzlich ein krankhaftes Gewebe 18, zum Beispiel ein Tumor oder eine Entzündung, dargestellt, an das vermehrt Aptamere 1 angelagert sind.

30

Die Verteilung des Aptamers 1 im Blutkreislaufsystem 10 umfasst vier Phasen, die entlang der Darstellung von oben nach unten aufgeführt sind.

Phase I: Das Aptamer 1 wird in das Blutkreislaufsystem 10 des Organismus injiziert.

5 Phase II: Über das Blutkreislaufsystem 10 wird das Aptamer 1 in die Organe 12, 13, 14, 15, und 16 des Organismus transportiert.

Phase III: Das zirkulierende Aptamer 1 bindet spezifisch an das krankhafte Gewebe 18.

10

Phase IV: Nicht gebundenes Aptamer 1 wird schnell verstoffwechselt und enzymatisch abgebaut. Der Organismus unterscheidet nicht zwischen körpereigenen Molekülen und dem Aptamer 1, weil es aus Nukleinsäuren 3 und einer Aminosäure 2 aufgebaut ist, die den körpereigenen Molekülen entsprechen. Die Abbauprodukte 17 des Aptamer 1 und der Nukleinsäuren 3 bzw. der Aminosäure 2 sammeln sich vorwiegend in der Niere 16, von wo aus sie über die Blase und den Harnleiter ausgeschieden werden.

20

Referenzen :

Faller A, Schünke M; Der Körper des Menschen; Thieme-Verlag; 2008

5

Javier DJ, Nitin N, Levy M, Ellington A, Richards-Kortum R; Aptamer-targeted gold nanoparticles as molecular-specific contrast agents for reflectance imaging; Bioconjug Chem. 2008 Jun; 19(6) :1309-12 .

10

Kulbachinskiy AV; Methods for selection of aptamers to protein targets; Biochemistry (Mosc); 2007 Dec; 72 (13) :1505-18 .

15

Massoud TF, Gambhir SS; Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light; Genes Dev. 2003 Mar 1; 17 (5) :545-80 .

20

Neundorff I, Rennert R, Franke J, Közle I, Bergmann R; Detailed analysis concerning the biodistribution and metabolism of human calcitonin-derived cell-penetrating peptides; Bioconjug Chem. 2008 Aug; 19 (8) :1596-603 .

Patentansprüche

1. Verwendung eines Aptamers (1) zur Herstellung eines Agens zur Detektion eines krankhaften Gewebes (18),
5 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
 dass das Aptamer (1) an das krankhafte Gewebe (18) bindet, an eine Aminosäure (2) gekoppelt ist und die Aminosäure (2) ein ¹¹C-Kohlenstoffatom aufweist, wobei die Aminosäure (2) über eine Peptidbindung an eine freie
10 Aminogruppe eines Nukleotids (3) des Aptamers (1) gekoppelt ist.
2. Verwendung eines Aptamers (1) nach Anspruch 1,
 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
15 dass das Agens ein Radiopharmakon ist.
3. Verwendung eines Aptamers (1) nach Anspruch 1 oder 2, d
 a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
 dass die Aminosäure (2) ausgewählt ist aus der Gruppe
20 bestehend aus Glycin, Alanin, Valin und Serin.
4. Verwendung eines Aptamers (1) nach einem der vorangehenden Ansprüche,
 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
25 dass das ¹¹C-Kohlenstoffatom das Carbonylkohlenstoffatom der Peptidbindung ist.
5. Radiopharmakon zur Lokalisation eines Tumors (18) umfassend ein Aptamer (1),
30 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
 dass das Aptamer (1) an den Tumor (18) bindet, an eine Aminosäure (2) gekoppelt ist und die Aminosäure (2) ein ¹¹C-Kohlenstoffatom aufweist, wobei die Aminosäure (2)

über eine Peptidbindung an eine freie Aminogruppe eines Nukleotids (3) des Aptamers (1) gekoppelt ist.

6. Radiopharmakon nach Anspruch 5,

5 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
dass die Aminosäure (2) ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Glycin, Alanin, Valin und Serin.

7. Radiopharmakon nach Anspruch 5 oder 6,

10 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
dass das ¹¹C-Kohlenstoff atom das Kohlenstoff atom der endständigen α -Carboxylgruppe der Aminosäure (2) ist.

8. Radiopharmakon nach einem der Ansprüche 5 bis 7,

15 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
dass es ein Positronen-Emissions-Tomographie (PET) Bio-marker ist.

FIG 1

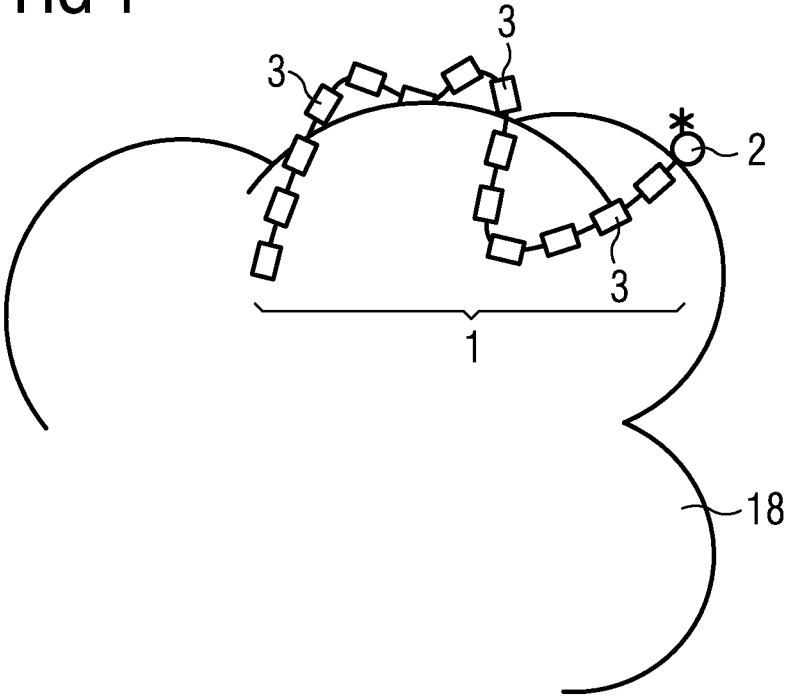


FIG 2

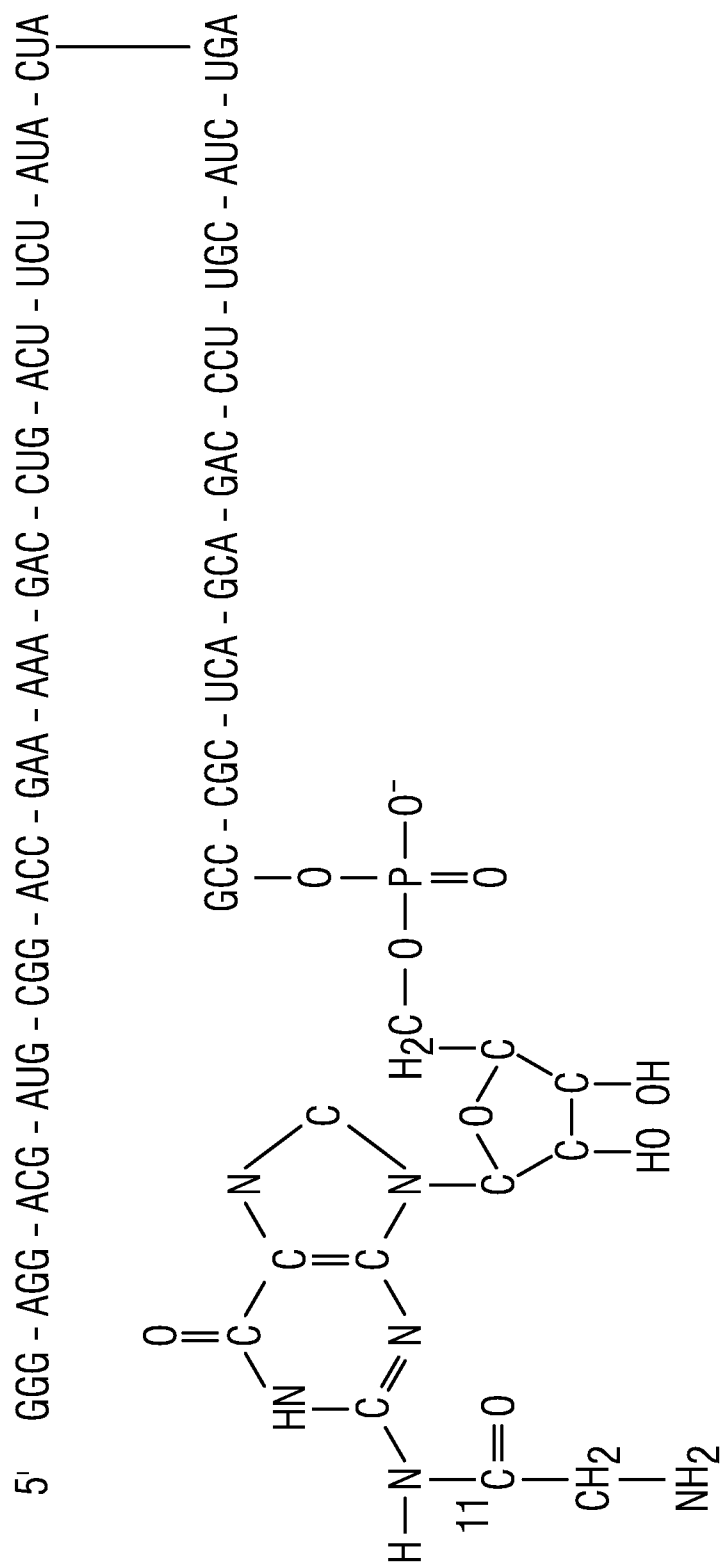
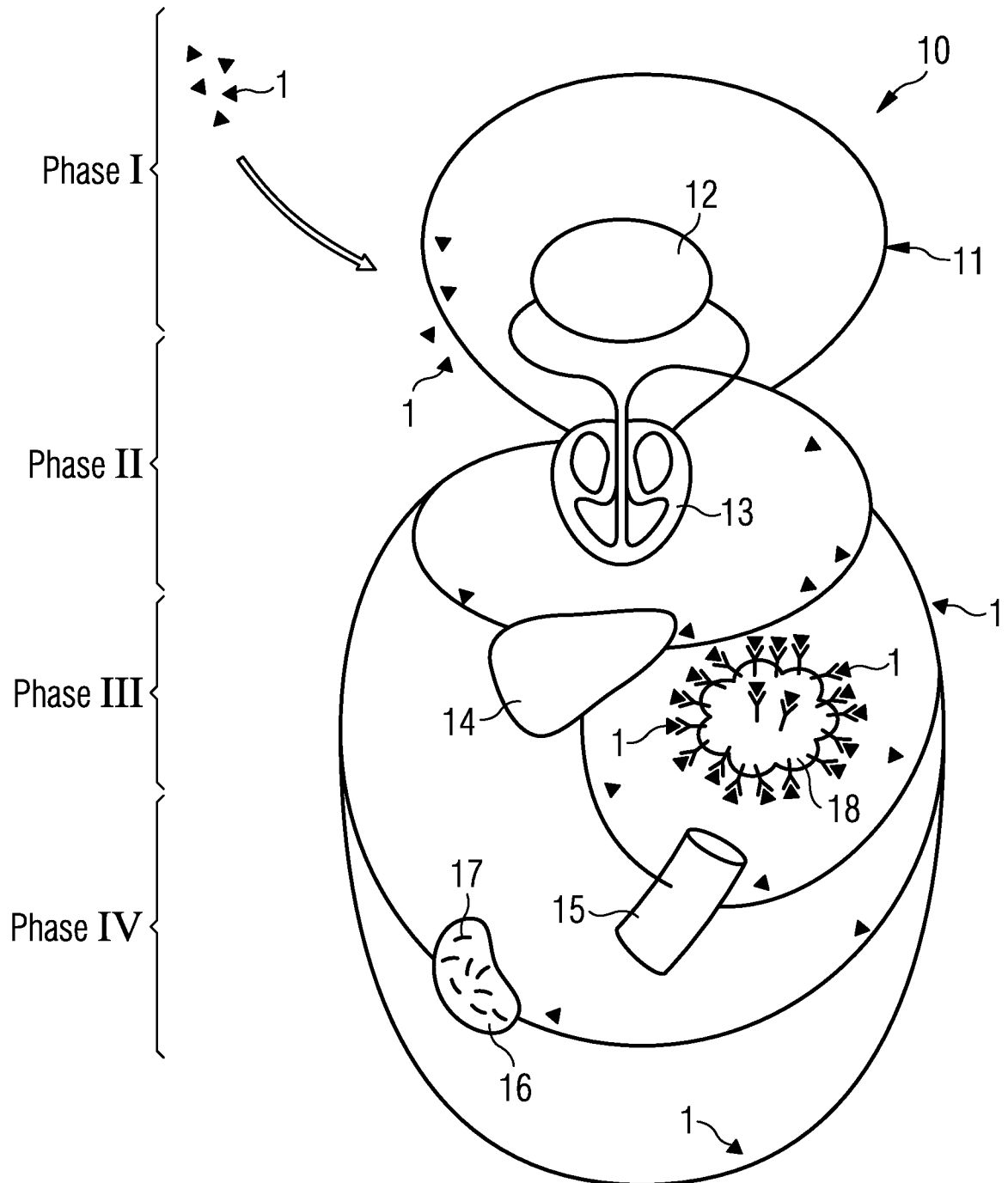


FIG 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/060421

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/574 A61K51/04 A61K31/7088 C12N15/115 C12Q1/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national Classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (Classification System followed by Classification Symbols) G01N A61K C12N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal , BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
X	KOBORI N ET AL: "VISUALIZATION OF MRNA EXPRESSION IN CNS USING 11C-LABELED PHOSPHOROTHIOATE OLIGODEOXYNUCLEOTIDE", NEUROREPORT, LI PPINCOTT W LLIAMS & W LKINS, US, vol . 10, no. 14, 29 September 1999 (1999-09-29) , pages 2971-2974, XP009014077 , ISSN: 0959-4965 , DOI : 10.1097/00001756-199909290-00018 abstract; figure 1 page 2973, left-hand column, paragraph]. - right-hand column, paragraph 3 -----	1-8
A	US 2007/041901 A1 (DIENER JOHN L [US] ET AL) 22 February 2007 (2007-02-22) sequence 168 ----- -/- .	1-8
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general State of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 November 2011		Date of mailing of the international search report 06/12/2011
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Fleimann, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/060421

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
A	YOUNES C K ET AL: "Label led oligonucleotides as radiopharmaceuticals: Pitfalls, Problems and perspectives", CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 8, no. 16, 1 July 2002 (2002-07-01), pages 1451-1466, XP009154303, ISSN: 1381-6128 the whole document -----	1-8
A	JOHNSTRÖM P ET AL: "¹¹C-label led glycin synthesis and preliminary report on its use in the investigation of intracranial tumours using positron emission tomography.", INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION APPLICATIONS AND INSTRUMENTATION. PART A, APPLIED RADIATION AND ISOTOPES 1987 LNKPUBMED:2822628, vol. 38, no. 9, 1987, pages 729-734, XP9014077, ISSN: 0883-2889 abstract -----	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/060421

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2007041901	AI	22-02-2007	NONE

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. G01N33/574 A61K51/04 A61K31/7088 C12N15/115 C12Q1/68 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) G01N A61K C12N C12Q		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal , BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KOBORI N ET AL: "VISUALIZATION OF MRNA EXPRESSION IN CNS USING 11C-LABELED PHOSPHOROTHIOATE OLIGODEOXYNUCLEOTIDE", NEUROREPORT, LI PPINCOTT W LLIAMS & W LKINS, US, Bd. 10, Nr. 14, 29. September 1999 (1999-09-29) , Seiten 2971-2974, XP009014077 , ISSN: 0959-4965 , DOI : 10.1097/00001756-199909290-00018 Zusammenfassung; Abbi ldung 1 Seite 2973, linke Spal te, Absatz 1 - rechte Spal te, Absatz 3 -----	1-8
A	US 2007/041901 AI (DI ENER JOHN L [US] ET AL) 22. Februar 2007 (2007-02-22) Sequenz 168 ----- -/- .	1-8
☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er- scheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
24. November 2011		06/12/2011
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Fl ei tmann , J

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	YOUNES C K ET AL: "Label led oligonucl eoti des as radi opharmaceuti cal s: Pitfal ls, Probl ems and perspecti ves", CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, NL, Bd. 8, Nr. 16, 1. Jul i 2002 (2002-07-01) , Sei ten 1451-1466, XP009154303 , ISSN: 1381-6128 das ganze Dokument -----	1-8
A	JOHNSTRÖM P ET AL: "11C-label led glyci ne: synthesi s and prel imi nary report on its use in the investi gati on of intracrani al tumours usi ng posi tron emi ssi on tomography. ", INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION APPLICATIONS AND INSTRUMENTATION. PART A, APPLI ED RADIATION AND ISOTOPES 1987 LNKD-PUBMED:2822628, Bd. 38, Nr. 9, 1987 , Sei ten 729-734, XP9014077 , ISSN: 0883-2889 Zusammenfassung -----	1-8

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2011/060421

Im Recherchenbericht
angeführtes Patentdokument

Datum der
Veröffentlichung

Mitglied(er) der
Patentfamilie

Datum der
Veröffentlichung

US 2007041901 AI 22-02-2007 KEINE
