

(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 2012/000865 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
G01N 33/534 (2006.01)

Berlin (DE). STECKENBORN, Arno [DE/DE]; Stadt-
randstr. 467B, 13589 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP201 1/060447

(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,
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.

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

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2010 026 061.4 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). UNI-
VERSITÄT KASSEL [DE/DE]; Mönchebergstr. 19,
34125 Kassel (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
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,
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

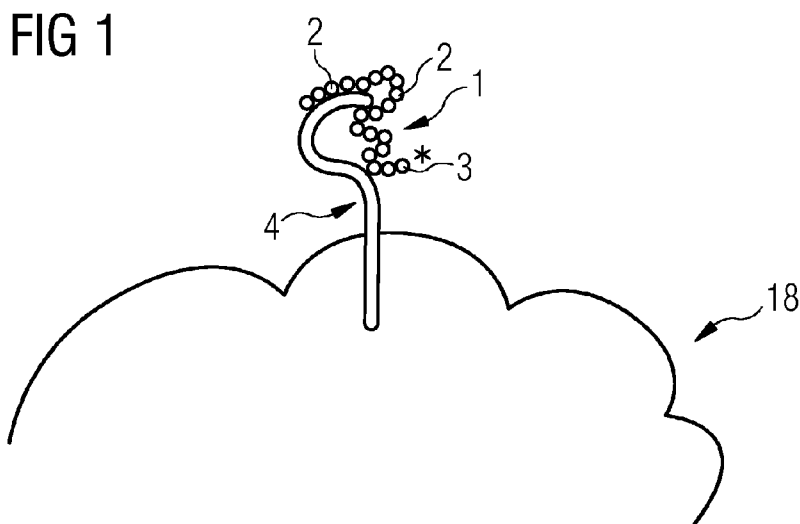
(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HERBERG, Fried-
rich [DE/DE]; Heinrich Schütz Allee 155, 34134 Kassel
(DE). KOLB, Hartmuth, C. [DE/US]; 6413 Pacific Ave-
nue, Playa Del Rey, CA 90293 (US). KRÜGER, Ursus
[DE/DE]; Krampnitzer Weg 11, 14089 Berlin (DE).
LADE, Oliver [DE/DE]; Hohenheimer Straße 9, 13465

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: 11C-MARKED PEPTIDE FOR DETECTING A TUMOR THAT EXPRESSES AN HER2/NEU RECEPTOR

(54) Bezeichnung : 11C-MARKIERTES PEPTID ZUR DETEKTION EINES TUMORS, DER EINEN HER2/NEU-REZEPTOR
EXPRIMIERT



(57) Abstract: The invention relates to the use of a peptide (1) for producing an agent for detecting a tumor (18) that expresses an HER2/neu receptor (4). The peptide (1) bonds to the HER2/neu receptor (4) and has an ¹¹C carbon atom. The invention further relates to a radiopharmaceutical for locating a tumor (18) that expresses an HER2/neu receptor (4). Said radiopharmaceutical comprises a peptide (1) that bonds to the HER2/neu receptor (4) and has an ¹¹C carbon atom.

(57) Zusammenfassung: Es wird die Verwendung eines Peptids (1) zur Herstellung eines Agens zur Detektion eines Tumors (18), der einen Her2 /neu-Rezeptor (4) exprimiert, beschrieben. Das Peptid (1) bindet an den Her2 /neu-Rezeptor (4) und weist ein ¹¹C-Kohlenstoffatom auf. Ferner wird ein Radiopharmakon zur Lokalisation eines Tumors (18), der einen Her2 /neu-Rezeptor (4) exprimiert, beschrieben. Dieses umfasst ein Peptid (1), das an den Her2 /neu-Rezeptor (4) bindet und ein ¹¹C-Kohlenstoffatom aufweist.



WO 2012/000865 A1

Veröffentlicht.

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz V
- mit dem $g_{eq_{Uenz}P_{r0}f_{k0}iif_ei}$ der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)

Beschreibung

¹¹C-markiertes Peptid zur Detektion eines Tumors, der einen Her2/neu-Rezeptor exprimiert

5

Die Erfindung betrifft die Verwendung eines Peptids zur Herstellung eines Agens zur Detektion eines Tumors, der einen Her2/neu-Rezeptor exprimiert. Sie betrifft ferner ein Radiopharmakon, das ein solches Peptid umfasst, zur Lokalisation eines Tumors, der einen Her2/neu-Rezeptor exprimiert.

In der modernen Krebsdiagnostik werden sowohl biochemische Analysen von Blut und anderen Körperflüssigkeiten, als auch bildgebende Verfahren zum Nachweis von Tumoren eingesetzt. Traditionell werden Röntgen, Ultraschall und Kernspintomographie verwendet, um ektopische Zellansammlungen zu lokalisieren. Neuere Verfahren nutzen dazu die erhöhte Stoffwechselaktivität von Tumorzellen im Vergleich zu gesundem Gewebe. Dabei werden dem Patienten radioaktiv markierte Zuckermoleküle injiziert, die sich in den Tumorzellen ansammeln. Anschließend wird die radioaktive Strahlung dieser Moleküle, beispielsweise mit einer Gamma Kamera, zur sogenannten Szintigraphie, aufgenommen und die Position des Tumors festgestellt. Biochemisch werden Krebserkrankungen an Hand von Tumorspezifischen Molekülen nachgewiesen. Dabei wird die Anwesenheit und Menge dieser Stoffe in Blut- oder Gewebeproben des Patienten bestimmt. Neben löslichen Stoffen, die in die Körperflüssigkeiten abgegeben werden, produzieren Tumorzellen aber auch Moleküle, die an ihrer Zelloberfläche verankert bleiben. Dabei handelt es sich vor allem um Zellrezeptoren, wie beispielsweise Rezeptoren des Epidermalen Wachstumsfaktors, des Insulinähnlichen Wachstumsfaktors oder des Wachstumshormons. An Hand dieser Oberflächenmoleküle ist ein bio-

chemischer Nachweis von Tumorzellen *in vivo* möglich, indem sie mit bildgebenden Verfahren sichtbar gemacht werden.

Der Her2/neu-Rezeptor, auch als ErbB2 bezeichnet, wird von einer großen Anzahl verschiedener Krebsarten exprimiert. Er gehört zur Familie der Epidermalen Wachstumsfaktoren (epidermal growth factor, EGF)-Rezeptoren. Im Gegensatz zu anderen Rezeptoren dieser Familie bindet der Her2/neu-Rezeptor selbst keine Liganden, sondern bildet Heterodimere mit anderen EGF-Rezeptoren, nachdem diese durch Liganden gebunden wurden. Der Her2/neu-Rezeptor trägt dadurch zur Verstärkung des, über die Tyrosin-Kinase Funktion der EGF-Rezeptoren vermittelten, intrazellulären Signals bei, das durch die Bindung des Liganden ausgelöst wird. Um Her2/neu-Rezeptoren *in vivo* nachzuweisen, wurden geeignete Liganden radioaktiv markiert, so dass sie mittels Szintigraphie/Positronen-Emissions-Tomographie (PET) im Körper des Patienten detektiert werden konnten. Dazu wurden sie über große Chelatormoleküle, beispielsweise 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA), mit Radionukliden versehen (Smith-Jones PM et al., 2006). Die Herstellung solcher radioaktiv-markierter Moleküle ist jedoch sehr aufwendig, da die drei Komponenten, Ligand, Chelator und Radionuklid, erst individuell bereitgestellt und anschließend verbunden werden müssen. Darüber hinaus verursachen herkömmliche radioaktiv-markierte Her2/neu-Rezeptor-Liganden durch ihre körperfremden radioaktiven Elemente und chemischen Chelatormoleküle bei vielen Patienten Nebenwirkungen, wie Unwohlsein oder Allergien.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein kostengünstiges und für den Patienten gut verträgliches Agens zur Detektion eines Tumors, der einen Her2/neu-Rezeptor exprimiert, bereitzustellen. Diese Aufgabe wird durch die Verwendung eines Peptids zur Herstellung eines Agens zur Detektion

eines Tumors, der einen Her2/neu-Rezeptor exprimiert, gelöst. Indem ein Peptid, das an den Her2/neu-Rezeptor bindet und ein ¹¹C-Kohlenstoffatom aufweist, verwendet wird, kann das Agens kostengünstig hergestellt und in dem Organismus, in dem der Tumor nachgewiesen wird, gut verstoffwechselt werden.

Der Begriff "Peptid" bezeichnet eine organische Verbindung aus mindestens zwei, über eine Peptidbindung verknüpften, Aminosäuren. Er umfasst dabei sowohl Oligopeptide aus bis zu ca. zehn Aminosäuren, Polypeptide aus bis zu ca. 50 Aminosäuren als auch Proteine von bis zu 150 Aminosäuren, unabhängig von deren Primär-, Sekundär- oder Tertiärstruktur. Dabei sind sowohl natürlich vorkommende als auch biotechnologisch oder synthetisch hergestellte Verbindungen umfasst. Das erfindungsgemäß verwendete Peptid wird so gewählt, dass es an den Her2/neu-Rezeptor bindet. Geeignet sind dazu Antikörper und deren Fragmente, wie beispielsweise Trastuzumab, Affibodies (US 2010/0048868), Nanobodies (WO 2009/068625) und andere Polypeptide (wie in WO 2009/080810 beschrieben), die an den Her2/neu-Rezeptor binden. Durch ihre spezifische Bindung an den Her2/neu-Rezeptor können die Peptide zum Nachweis von Tumoren eingesetzt werden, die den Her2/neu-Rezeptor bilden. Vorzugsweise wird das Peptid dabei so gewählt, dass die Bindung zwischen dem Peptid und dem Her2/neu Rezeptor einen linearen Koeffizienten, sog. KD-Wert, von ≤ 100 nM, bevorzugt von ≤ 10 nM, am meisten bevorzugt von 7,5 nM aufweist. Das Peptid selbst ist aus Aminosäuren, das heißt aus körpereigenen bzw. körperähnlichen Molekülen aufgebaut, so dass es für den Patienten sehr gut verträglich ist. Es ist nicht toxisch und kann natürlich verstoffwechselt, abgebaut und ausgeschieden werden.

Der Begriff "Tumor" bezeichnet eine örtliche Zunahme des Volumens eines Gewebes, etwa durch eine entzündliche Anschwel-

lung oder eine spontane, ungehemmte Neubildung von Zellen. Tumorzellen exprimieren häufig bestimmte Rezeptormoleküle, die auf der Zelloberfläche sitzen und von spezifischen Liganden gebunden werden. Zu diesen Rezeptoren gehören auch

5 Her2/neu-Rezeptoren, die unter anderem in Mammakarzinomen stark exprimiert werden. Viele der Tumore, die den Her2/neu-Rezeptor exprimieren, zeigen ein aggressiv invasives Verhalten, was zu einer entsprechend ungünstigen Krankheitsprognose führt. In den meisten Fällen geht die extrem erhöhte Expres-

10 sion des Her2/neu-Rezeptors auf eine Amplifikation des Her2/neu Gens (c-erbB2) in Tumorzellen zurück. Her2/neu-Rezeptor exprimierende Tumorzellen können daher, mittels des erfindungsgemäß verwendeten Peptids, gut von gesundem Gewebe unterschieden werden, da die Tumorzellen wesentlich größere

15 Mengen an Her2/neu-Rezeptoren tragen und deshalb auch mehr Peptide an sie binden. Das ermöglicht eine zuverlässige Lokalisation des Tumors.

Die Detektion des Peptids und des daran gebundenen Her2/neu-Rezeptors erfolgt über ein integriertes ^{11}C -Kohlenstoffatom.

20 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, von einander entfernen. Die Photonen können

25 detektiert und daraus die Position der Positronenemission, bzw. des ^{11}C -Kohlenstoffatoms, berechnet werden. Die Integration eines ^{11}C -Kohlenstoffatoms in das erfindungsgemäß verwendete Peptid, ermöglicht es, die Verwendung chemischer, kör-

30 perfremder Stoffe zu vermeiden. Durch den direkten Einbau des ^{11}C -Kohlenstoffisotops in das Peptid ist die radioaktive Markierung ohne Komplexbildner, wie Diethylentriaminpentaacetat (DTPA), 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA) oder Ethylendiamintetraacetat (EDTA), möglich.

Außerdem kann vermieden werden, dass ein radioaktiver Fremd-Stoff, wie beispielsweise ¹⁸Fluor, ¹³³Xenon, oder ⁶⁸Gallium, in den Organismus eingebracht werden muss. Zur Herstellung eines erfindungsgemäß zu verwendenden Peptids sind insbesondere die Verfahren, die in den Patentanmeldungen DE 10 2009 035 648.7 und DE 10 2009 035 645.2 beschrieben werden, geeignet. Somit kann durch die erfindungsgemäße Verwendung des Peptids sowohl des Vorhandensein, als auch die Position des Her2/neu-Rezeptors nachgewiesen und abgebildet werden. Des Weiteren kann auch die Menge an Peptiden, die sich an einer bestimmten Stelle befindet, quantifiziert werden.

Ein weiterer Vorteil des direkt mit ¹¹C markierten Peptids liegt in dem günstigen Signal/Hintergrund Verhältnis während der Detektion. Das Peptid bindet spezifisch an den Her2/neu-Rezeptor und bildet mit diesem einen stabilen Komplex. Freie, ungebundene Peptide werden dagegen rasch verstoffwechselt und aus dem Organismus ausgeschieden, weil sie von endogenen Enzymen zügig abgebaut werden können. Dadurch entsteht ein starkes und spezifisches Signal an der Position des Her2/neu-Rezeptors, und das Hintergrundsignal wird minimiert.

In einer vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung weist das Peptid mindestens eine D-Aminosäure auf. Mit Ausnahme des Glycins, besitzen Aminosäuren an ihrem alpha-C-Kohlenstoffatom ein chirales Zentrum und können daher als Konfigurationsisomere, nämlich als D- oder L-Aminosäure, vorliegen. Körpereigene 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 eines Proteins oder Peptids zu ver-

längern, indem neben L-Aminosäuren auch D-Aminosäuren verwendet werden (Neundorf I et al., 2008). Dadurch kann die pharmakologische Clearance, also die Zeit bis das Peptid aus dem Organismus ausgeschieden wird, positiv beeinflusst werden.

- 5 Bei dem Austausch einzelner L-Aminosäuren gegen ihre D-Konfiguration ist jedoch darauf zu achten, dass die Bindungsspezifität des Peptids nicht verändert wird. Eine weitere Möglichkeit, die pharmakologische Clearance des Peptids zu beeinflussen, besteht darin einzelne der Aminosäuren des Peptids durch nicht natürliche Aminosäuren mit ähnlichen chemischen Eigenschaften zu ersetzen. Die nicht natürlichen Aminosäuren werden langsamer verstoffwechselt, weil die körpereigenen proteolytischen Enzyme speziell an den Abbau natürlicher Aminosäuren angepasst sind. Bei der Modifizierung des Peptids sollten die nicht natürlichen Aminosäuren jedoch so gewählt werden, dass die Bindungsaffinität des Peptids nicht verändert wird. Darüber hinaus sind auch andere chemische Modifikationen einzelner Aminosäuren des Peptids möglich, um die Halbwertszeit des Peptids gezielt zu beeinflussen. Beispielsweise kann die endständige Aminogruppe des Peptids durch eine Isonitrilgruppe ersetzt werden. Eine solche Modifikation reduziert die, von der Aminogruppe vermittelte, Interaktion mit proteolytischen Enzymen, ohne die Bindung zwischen dem erfindungsgemäß verwendeten Peptid und dem Her2/neu-Rezeptor zu verändern.
- 10
15
20
25

- In einer vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung ist das Agens ein Radiopharmakon. Der Begriff "Radiopharmaka" bezeichnet Arzneimittel, die Radionuklide enthalten, deren 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 ¹³³Xenon, "Technetium, ⁶⁸Gallium,
- 30

und ¹⁸Fluor, verwendet. Sie werden üblicherweise über Kom-
plexbildner wie DOTA, DTPA oder EDTA an Mono- oder Polysac-
charide gebunden. Die Nuklide werden, je nach der Art ihrer
Strahlung, mittels Szintigraphie, Single Photon Emission Com-
puted Tomography (SPECT) oder Positronen-Emissions-
Tomographie (PET) detektiert. Aufgrund ihrer unphysiologi-
schen Bestandteile können herkömmliche Radiopharmaka jedoch
Nebenwirkungen, wie anaphylaktische oder allergische Reaktio-
nen, im Körper eines Patienten verursachen. Die Verwendung
eines Peptids aus körpereigenen Aminosäuren reduziert diese
Gefahr deutlich, weil weder das Peptid selbst, noch seine Ab-
bauprodukte toxisch sind. Zudem ist Kohlenstoff, im Gegensatz
zu Technetium oder Xenon, ein im Körper vorkommendes Element,
das natürlich verstoffwechselt werden kann.

In einer bevorzugten Ausführungsform exprimiert der Tumor er-
höhte Mengen des Her2/neu-Rezeptors. Im Vergleich zu gesundem
Gewebe tragen die Zellen verschiedener Tumore besonders hohe
Mengen an Her2/neu-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Zu diesen
zählen zum Beispiel Lungen-, Brust-, und Ovarkrebs, Karzino-
me, wie beispielsweise das Mammakarzinom, sowie Tumore des
Gastro-Intestinal-Trakts.

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung ist das
¹³C-Kohlenstoffatom das Carbonylkohlenstoffatom einer Amino-
säure. Die Carbonylgruppen sind Teil der Peptidbindungen zwi-
schen den Aminosäuren und liegen im Inneren des Peptids. Da-
durch ist gewährleistet, dass das ¹³C-Kohlenstoffatom nicht
vom Peptid abgespalten wird, wie es etwa bei einer Seitenket-
te einer der Aminosäuren möglich wäre.

Gemäß einer weiter bevorzugten Ausführungsform der Erfindung
ist das ¹³C-Kohlenstoffatom das Carbonylkohlenstoffatom der
N-terminalen Aminosäure des Peptids. Diese Ausführungsform

ist besonders bevorzugt, weil das Peptid direkt 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 Strahlungs-dosis desto höher gewählt werden

5 muss, je mehr Zeit zwischen der Synthese des Peptids und seiner Verwendung liegt. Wird die ^{11}C -Markierung mit der N-terminalen Aminosäure und damit im letzten Schritt der Synthese angebracht, kann das Peptid sofort nach seiner Synthese

verwendet werden. Auf diese Weise wird die Zeitspanne zwischen der Verarbeitung des ^{11}C -Kohlenstoffs und dem Einsatz

10 des Peptids reduziert, so dass der Strahlungsverlust während der Herstellung des Peptids minimiert wird. Deshalb kann die Strahlendosis, die bei der Verarbeitung des ^{11}C -Kohlenstoffs eingesetzt werden muss um eine bestimmte Strahlungsstärke des

15 Produkts zu gewährleisten, entsprechend geringer sein. Die Herstellung wird dadurch kostengünstiger und die Strahlenbelastung für das technische Personal, welches das Peptid herstellt, verringert.

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Radiopharmakon, das ein Peptid mit einem ^{11}C -Kohlenstoffatom umfasst, zur Lokalisation eines Tumors, der einen Her2/neu-Rezeptor exprimiert. Indem ein Peptid, das an den Her2/neu-Rezeptor bindet und ein ^{11}C -Kohlenstoffatom aufweist, verwendet wird, ist das

25 Radiopharmakon für den Patienten gut verträglich und kann kostengünstig produziert werden.

Das erfindungsgemäße Radiopharmakon bietet daher ein wirtschaftlich und medizinisch vorteilhaftes Agens, um die Position eines Tumors, der einen Her2/neu-Rezeptor exprimiert, *in vivo* zu bestimmen. Nachdem das Radiopharmakon einem Patienten verabreicht wurde, verteilen sich die darin enthaltenen Peptide in dessen Körper und binden spezifisch an Her2/neu-Rezeptoren. Dadurch sammeln sie sich an den Zellen des Tumors

wo sie durch das radioaktive Signal des ^{11}C -Kohlenstoffatoms nachgewiesen werden. Auf diese Weise wird die Position des Tumors im Körper des Patienten bestimmt.

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform exprimiert der Tumor, im Vergleich zu gesundem Gewebe, erhöhte Mengen des Her2/neu-Rezeptors, wie es für verschiedene Tumorarten beobachtet wurde.
- 10 Gemäß einer vorteilhaften Ausführungsform ist das ^{11}C -Kohlenstoffatom ein Carbonylkohlenstoffatom einer Aminosäure, bevorzugt das Carbonylkohlenstoffatom der N-terminalen Aminosäure des Peptids.
- 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
- 20 werden Schnittbilder erstellt, auf denen die Zerfallseignisse in ihrer räumlichen Verteilung im Körperinneren dargestellt werden. Im Gegensatz zu den bisher üblichen Szintigraphie-Verfahren ist durch die ringförmige Anordnung der PET-Detektoren eine exaktere räumliche Lokalisation der Positronenemission und damit eine wesentlich genauere und detaillierter
- 25 Abbildung des Tumors möglich. Die PET ermöglicht es auch, die Menge an markierten Molekülen in einem Gewebe quantitativ zu bestimmen.
- 30 Außerdem wird ein Verfahren zur Lokalisation eines Tumors, der einen Her2/neu-Rezeptor exprimiert, in einem Organismus, offenbart, umfassend die Schritte, a) Bereitstellen eines Peptids, b) Verabreichen des Peptids an den Organismus und c) Detektieren des Peptids in dem Organismus mittels Positronen-

Emissions-Tomographie (PET) . Dabei bindet das Peptid an den Her2/neu-Rezeptor und weist ein ^{11}C -Kohlenstoffatom auf.

Mit dem erfindungsgemäß verwendeten Peptid wird ein Her2/neu-Rezeptor im Inneren eines Organismus detektiert und lokalisiert, so dass die Verteilung des Her2/neu-Rezeptors im Körper eines Patienten beobachtet werden kann. Auf diese Weise kann beispielsweise die Größe oder Ausdehnung einer Infektion oder eines Tumors, der den Her2/neu-Rezeptor exprimiert, bestimmt werden. Das erfindungsgemäß verwendete Peptid 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 die Bindung zwischen einem Peptid 1 und einem Her2/neu-Rezeptor 4 .

Das Peptid 1 umfasst 19 Aminosäuren 2, von denen die N-terminale Aminosäure 3 mit einem ^{11}C -Kohlenstoffatom radioaktiv markiert ist. Die radioaktive Markierung ist durch einen Stern (*) dargestellt. Ein Teil des Peptids 1 ist an den Her2/neu-Rezeptor 4 angelagert, der sich auf der Oberfläche eines Tumors 18 befindet.

Das ^{11}C -markierte Peptid 1 bindet spezifisch an den Her2/neu-Rezeptor 4, nicht aber an andere Moleküle. Das Peptid 1 kann daher zur Detektion des Her2/neu-Rezeptors 4 verwendet werden. Die beim Zerfall des ^{11}C -Kohlenstoffatoms abgegebenen Positronen werden mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) nachgewiesen. Der Ort der Positronenemission entspricht dem Ort des Peptids 1 und des daran gebundenen Her2/neu-

Rezeptors 4. Das Peptid 1 kann daher zur Bestimmung der Position eines Tumors 18 verwendet werden, der den Her2/neu-Rezeptor 4 bildet.

- 5 Zur Lokalisation eines Tumors 18 im Rahmen einer Krebsdiagnose wird einem Patienten ein Radiopharmakon verabreicht, welches das ^{11}C -markierte Peptid 1 enthält. Das Peptid 1 bindet spezifisch an den Her2/neu-Rezeptor 4 und sammelt sich so an dem Tumor 18, dessen Zellen den Her2/neu-Rezeptor 4 bilden.
- 10 Diese Anhäufung wird durch PET abgebildet und die Verteilung des Her2/neu-Rezeptors 4 bzw. die Lokalisation des Tumors 18 im Körper des Patienten bestimmt. Auf diese Art lassen sich auch neu gebildete Metastasen, die den Her2/neu-Rezeptor tragen, mittels PET identifizieren. Außerdem kann die Medikation
- 15 eines Tumortheraeutikums, zum Beispiel Wirkstoffmenge und Verabreichungsplan, entsprechend der Position, Größe und Verteilung des Tumors 18 angepasst werden.

Figur 2 zeigt eine Darstellung eines Peptids mit der Sequenz

20 SEQ ID Nr.: 1 mittels chemischer Formel.

Das Peptid der SEQ ID Nr.: 1 umfasst 35 Aminosäuren 2 der folgenden Sequenz :Homocystein-Prolin-Asparaginsäure-Asparaginsäure-Tyrosin-Isoleucin-Serin-Arginin-Isoleucin-

25 Lysin-Alanin- Arginin-Lysin-Glutamin-Glutamin-Asparagin-Asparagin-Leucin-Asparagin- Prolin-Asparaginsäure-Leucin-Alanin-Alanin-Glutaminsäure-Tryptophan-Tyrosin-Arginin-Asparagin-Arginin-Methionin-Glutaminsäure-Lysin-Asparagin-Homocystein .

30

Die N-terminalen Aminosäuren 2 Prolin und Homocystein sind mittels Strukturformel dargestellt, die folgenden Aminosäuren 2 durch ihren jeweiligen Drei-Buchstaben Code. Die Aminosäure Homocystein ist mit Cys_H bezeichnet. Die Sequenz des Peptids

ist auch in SEQ ID Nr.: 1 angegeben. Das Carbonylkohlenstoff -
atom des N-terminalen Homocysteins ist ein ^{11}C -
Kohlenstoff atom, dargestellt durch die Ziffer 11 oberhalb des
Carbonylkohlenstoff atoms .

5

Das Peptid 1 wird mit herkömmlichen Proteinsyntheseverfahren
hergestellt und die ^{11}C -markierte N-terminale Aminosäure 3 im
letzten Schritt hinzu gefügt, weil die Halbwertszeit des ^{11}C -
Kohlenstoff isotops bei nur ca. 20 Minuten liegt. Dadurch,
10 dass die Peptidsynthese mit der ^{11}C -markierten Aminosäure ab-
geschlossen wird, kann das Peptid 1 nach der radioaktiven
Markierung sofort verwendet werden.

Die SEQ ID Nr.: 1 entspricht dem Her2/neu-Rezeptor-bindenden
15 2-Helix Protein MUT-DS (Ren G et al., 2009). Das Peptid der
Sequenz SEQ ID Nr.: 1 gehört zu den sogenannten Affibodies.
Dabei handelt es sich um künstliche Peptide oder Proteine,
die von einer der IgG bindenden Domänen des Proteins A des
Bakteriums *Staphylococcus aureus* abgeleitet sind. Sie umfas-
20 sen regelmäßig 3 alpha-Helices und sind ca. 7 kDa groß. Sie
lösen keine immunologischen Reaktionen aus und sind deshalb
als Biomoleküle zur Herstellung eines Radiopharmakons geeig-
net. Um einen Her2/neu-Rezeptor bindenden Affibody zu finden,
werden entsprechende Bibliotheken mittels der Phagen-Display-
25 Technologie gescreent (Wikman M et al., 2004) . Für die Ver-
wendung zur Herstellung eines Radiopharmakons werden kleine
Moleküle, die eine bessere Verteilung und Clearance im Körper
zeigen, bevorzugt. Daher umfasst das Peptid der Sequenz SEQ
ID Nr.: 1 nur die zwei, an der Bindung an den Her2/neu-
30 Rezeptor 4 tatsächlich beteiligten alpha-Helices (Ren G et
al., 2009) .

Das Peptid 1 bindet spezifisch an den Her2/neu-Rezeptor 4,
der in große Mengen von einigen Tumorzellen gebildet wird,

und es wird dazu verwendet, diese Tumorzellen zu lokalisieren. Eine Markierung mittels ^{11}C -Kohlenstoff ist dabei besonders geeignet, weil sie die physiologische Struktur des Peptids 1 nicht beeinflusst und weder die Verteilung im Gewebe
5 noch die Verträglichkeit des Peptids 1 beeinträchtigt.

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

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 Peptid 1 ist durch Dreiecke entlang der Adern 11
15 dargestellt. Die Abbauprodukte 17 des Peptids 1 sind durch einzelne Striche innerhalb der Umrisse der Niere 16 dargestellt. Links der Mitte des Blutkreislaufsystems 10 ist zusätzlich ein Tumor 18 dargestellt, an den vermehrt Her2/neu-Rezeptoren 4 und daran Peptide 1 angelagert sind.
20

Die Verteilung des Peptids 1 im Blutkreislaufsystem 10 umfasst vier Phasen, die entlang der Darstellung von oben nach unten aufgeführt sind.
25

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

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

Phase III: Das zirkulierende Peptid 1 bindet spezifisch an den Her2/neu-Rezeptor 4 und sammelt sich an dem Tumor 18, weil dieser den Her2/neu-Rezeptor 4 produziert.

- 5 Phase IV: Nicht gebundenes Peptid 1 wird schnell verstoffwechselt und enzymatisch abgebaut. Der Organismus unterscheidet nicht zwischen eigenen Peptiden und dem Peptid 1, weil es aus Aminosäuren 2, 3 aufgebaut ist, die den körpereigenen Molekülen entsprechen. Die Abbauprodukte 17 des Peptids 1 und
10 der Aminosäuren 2, 3 sammeln sich vorwiegend in der Niere 16 von wo aus sie über die Blase und den Harnleiter ausgeschieden werden.

Referenzen :

Cheng Z, De Jesus OP, Namavari M, De A, Levi J, Webster JM, Zhang R, Lee B, Syud FA, Gambhir SS Small-animal PET imaging of human epidermal growth factor receptor type 2 expression with site-specific 18F-labeled protein scaffold molecules; J Nucl Med, 2008 May; 49 (5) :804-13 .

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

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 .

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 .

Ren G, Zhang R, Liu Z, Webster JM, Miao Z, Gambhir SS, Syud FA, Cheng Z; A 2-helix small protein labeled with 68Ga for PET imaging of HER2 expression.; J Nucl Med. 2009 Sep;50 (9) :1492-9.

Smith-Jones PM, Solit D, Afroze F, Rosen N, Larson SM; Early tumor response to Hsp90 therapy using HER2 PET: comparison with 18F-FDG PET; J Nucl Med. 2006 May; 47 (5) :793-6 .

Wikman M, Steffen AC, Gunneriusson E, Tolmachev V, Adams GP, Carlsson J, Ståhl S; Selection and characterization of HER2/neu-binding affibody ligands; Protein Eng Des Sci. 2004 May;17 (5) :455-62.

US 2010/0048868

WO 2009/068625

WO 2009/080810

Patentansprüche

1. Verwendung eines Peptids (1) zur Herstellung eines Agens zur Detektion eines Tumors (18), der einen Her2/neu-Rezeptor (4) exprimiert,
5 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
 dass das Peptid (1) an den Her2/neu-Rezeptor (4) bindet und ein ¹¹C-Kohlenstoffatom aufweist.
- 10 2. Verwendung nach Anspruch 1,
 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
 dass das Peptid (1) mindestens eine D-Aminosäure (2) aufweist .
- 15 3. Verwendung 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 das Agens ein Radiopharmakon ist.
4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, d a
20 d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
 dass der Tumor (18), im Vergleich zu gesundem Gewebe, erhöhte Mengen des Her2/neu-Rezeptors (4) exprimiert.
5. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, d a
25 d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
 dass das ¹¹C-Kohlenstoffatom das Carbonylkohlenstoffatom einer Aminosäure (2), vorzugsweise der N-terminalen Aminosäure (3) des Peptids (1) ist.
- 30 6. Radiopharmakon zur Lokalisation eines Tumors (18), der einen Her2/neu-Rezeptor (4) exprimiert, umfassend ein Peptid (1),
 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,

dass das Peptid (1) an den Her2/neu-Rezeptor (4) bindet und ein ¹¹C-Kohlenstoffatom aufweist.

7. Radiopharmakon nach Anspruch 6,

5 dadurch gekennzeichnet,
dass der Tumor (18), im Vergleich zu gesundem Gewebe, erhöhte Mengen des Her2/neu-Rezeptors (4) exprimiert.

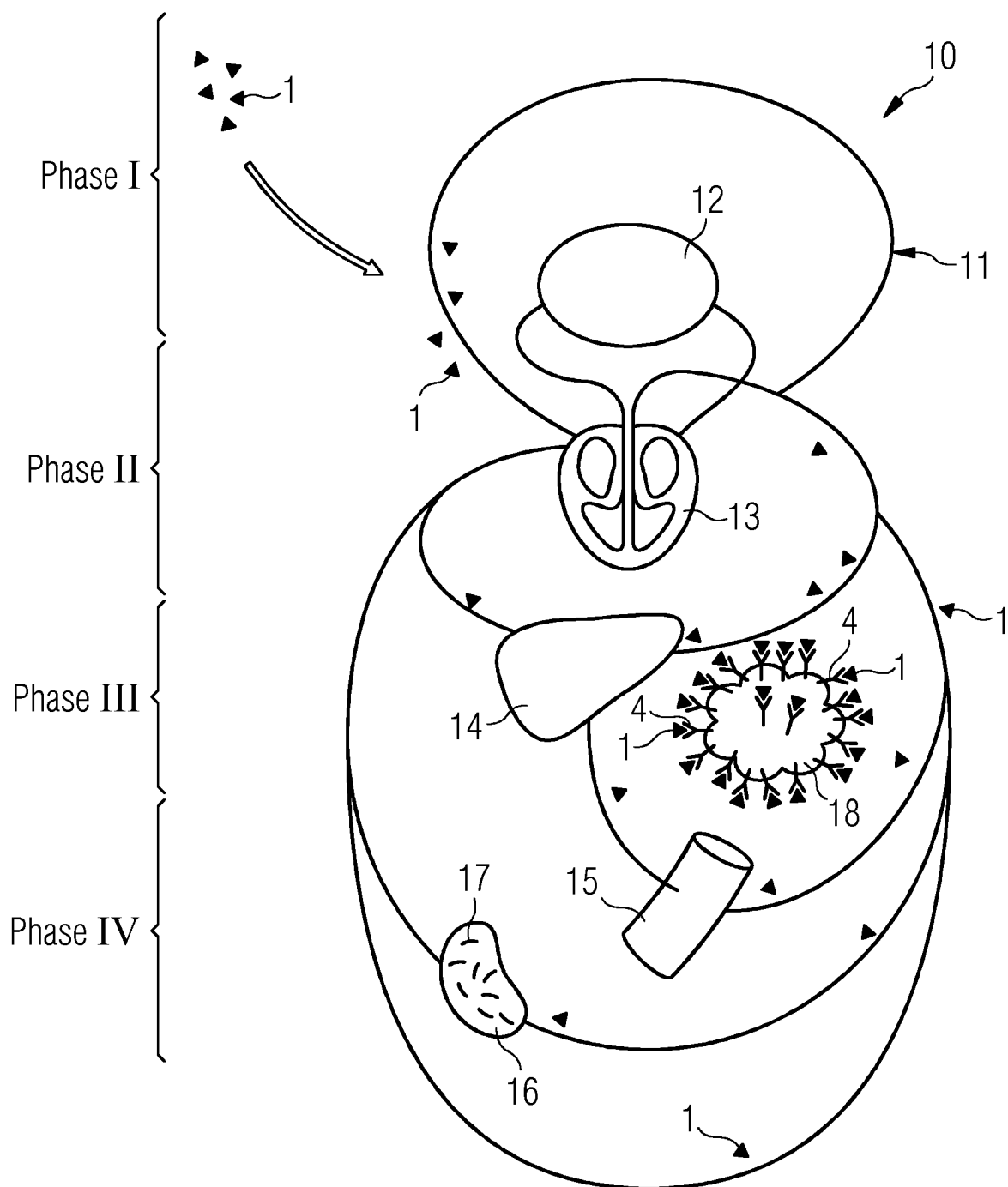
8. Radiopharmakon nach Anspruch 6 oder 7,

10 dadurch gekennzeichnet,
dass das ¹¹C-Kohlenstoffatom das Carbonylkohlenstoffatom einer Aminosäure (2), vorzugsweise der N-terminalen Aminosäure (3) des Peptids (1) ist.

15 9. Radiopharmakon nach einem der Ansprüche 6 bis 8,

dadurch gekennzeichnet,
dass es ein Positronen-Emissions-Tomographie (PET) Biomarker ist.

FIG 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/060447

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/534

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

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, CHEM ABS Data, EMBASE, INSPEC, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
Y	HARTVIG P ET AL: "Kinetics of four <11>C-1 labelled enkephalin peptides in the brain, pituitary and plasma of Rhesus monkeys", REGULATORY PEPTIDES, ELSEVIER SCIENCE BV, NL, vol. 16, no. 1, 1 December 1986 (1986-12-01) , pages 1-13 , XP023462538, ISSN: 0167-0115 , DOI: 10.1016/0167-0115 (86)90190-4 [retrieved on 1986-12-01] the whole document ----- -/-	1-9



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

7 September 2011

Date of mailing of the international search report

16/09/2011

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

Bayer, Martin

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/060447

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
Y	HENRI KSEN G ET AL: "Proof of principle for the use of HC-I labelled Peptides in tumour diagnosis with PET", EUROPEAN JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE AND MOLECULAR IMAGING, SPRINGER VERLAG, HEIDELBERG, DE, vol . 31, no. 12, 10 August 2004 (2004-08-10) , pages 1653-1657 , XP002383248, ISSN: 1619-7070, DOI : 10. 1007/S00259-004-1582-1 the whole document -----	1-9
Y	wo 01/83693 A2 (GLAXO GROUP LTD [GB] ; SCHATZ PETER JOSEPH [US] ; CHEN MIN JIA [US] ; P I P) 8 November 2001 (2001-11-08) Claims 1-17 exempl e 48 -----	1-9
Y	wo 2006/017619 A2 (UNIV CALI FORNIA [US] ; SUTCLIFFE-GOULDEN JULI E [US] ; MARSHALL JOHN [GB]) 16 February 2006 (2006-02-16) Claims 1-91 exempl es 1-4 -----	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/060447

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0183693	A2	08-11-2001	AU 5919501 A	12-11-2001

WO 2006017619	A2	16-02-2006	NONE	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. G01N33/534
ADD.

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
G01N

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, CHEM ABS Data, EMBASE, INSPEC, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	HARTVIG P ET AL: "Kinetics of four <11>C-labeled enkephalin peptides in the brain, pituitary and plasma of Rhesus monkeys", REGULATORY PEPTIDES, ELSEVIER SCIENCE BV, NL, Bd. 16, Nr. 1, 1. Dezember 1986 (1986-12-01) , Seiten 1-13 , XP023462538, ISSN: 0167-0115 , DOI : 10.1016/0167-0115 (86)90190-4 [gefunden am 1986-12-01] das ganze Dokument ----- -/- .	1-9



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

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

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

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

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

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

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

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf 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

7. September 2011

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

16/09/2011

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

Bayer, Marti n

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	HENRI KSEN G ET AL: "Proof of principle for the use of HC-l abel led Pepti des in tumour diagnosi s wi th PET", EUROPEAN JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE AND MOLECULAR IMAGING, SPRINGER VERLAG, HEIDELBERG, DE, Bd. 31, Nr. 12, 10. August 2004 (2004-08-10) , Sei ten 1653-1657 , XP002383248, ISSN: 1619-7070, DOI : 10. 1007/S00259-004-1582-1 das ganze Dokument -----	1-9
Y	wo 01/83693 A2 (GLAXO GROUP LTD [GB] ; SCHATZ PETER JOSEPH [US] ; CHEN MIN JIA [US] ; PI P) 8. November 2001 (2001-11-08) Ansprüche 1-17 Bei spi el 48 -----	1-9
Y	wo 2006/017619 A2 (UNIV CALI FORNIA [US] ; SUTCLI FFE-GOULDEN JULI E [US] ; MARSHALL JOHN [GB]) 16. Februar 2006 (2006-02-16) Ansprüche 1-91 Bei spi ele 1-4 -----	1-9

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2011/060447

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung	
WO 0183693	A2	08-11-2001	AU 5919501 A	12-11-2001

WO 2006017619	A2	16-02-2006	KEINE	
