

P.03 01571
4338D

7089

(Neuro)peptidekhez kötött RGD (Arg-Gly-Asp) és

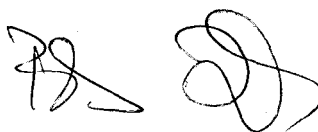
alkalmazásuk

Kivonat

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A találmány olyan vegyületekre vonatkozik, amelyek kötőaffinitással rendelkeznek mind az $\alpha v\beta 3$ receptorhoz, mind egy (neuro)peptid receptorhoz és így javított teljes affinitással rendelkeznek a tumorokra nézve, amely vegyületek legalább egy Arg-Gly-Asp aminosav szekvenciát tartalmazó első peptid-részt és egy ahhoz kapcsolt második peptid-részt tartalmaznak, adott esetben egy összekötő elem (linker) keresztül, amely második peptid-rész egy (neuro)peptid, amelyet a CCK, gasztrin, P anyag, bombesin, VIP (vazoaktív bélrendszeri peptid), PACAP (nyálkaelválasztó adenilát-cikláz aktiváló peptid), szomatosztatin és ezek analógjai közül választanak.

Nincs jellemző ábra



Dr. BOROS ISTVÁN

2003 JÚL. 03

P03 01571

4338D

7055

A2

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

(Neuro)peptidekhez kötött RGD (Arg-Gly-Asp) és
albuminok

A találmány tárgyát olyan vegyületek képezik, amelyek kötőaffinitással rendelkeznek mind az $\alpha v \beta 3$ receptorhoz, mind egy (neuro)peptid receptorhoz, különösen a szomatosztatin receptorhoz.

Az integrin $\alpha v \beta 3$ receptor túlnyomórészt az endotheliális sejtek növekedése és migrációja során expresszálódik, és érsejtek angiogén fenotípusának a markereként azonosították például a tumoros érképződés során. Magát az $\alpha v \beta 3$ integrint a tumoros sejtek szintén expresszálják. Így az $\alpha v \beta 3$ receptor potenciális célpontot jelent a tumort felkutató molekulák számára.

A receptorok tumorokban előforduló másik típusa a szomatosztatin receptorok. A jelenlétüket különféle tumorokban és immunsejteken is kimutatták klasszikus biokémiai kötődési vizsgálatokkal, így autoradiográfiával, in situ hibridizációval és RT-PCR vizsgálattal. Egy ligandum szomatosztatin receptorhoz történő kötődése leggyakrabban a ligandum/szomatosztatin receptor komplex internalizációját eredményezi.

A szomatosztatin receptorokhoz kötődő természetes ligandum a szomatosztatin, amely egy 14 vagy 28 aminosavból álló neuropeptid, amely nagy affinitással kötődik mind az 5 szomatosztatin receptor altípushoz (sst). A szomatosztatin a plazmában gyorsan lebomlik, de kifejlesztettek enzimes

lebontással szemben stabil szomatosztatin analógokat. A klinikailag legszélesebb körben alkalmazott analógok az oktreotid és a lanreotid, ezek a vegyületek nagy affinitással kötődnek a 2-es, 3-as és 5-ös szomatosztatin receptor altípusokhoz.

A találmány célja az volt, hogy a receptorok mindkét típusával szemben affinitással rendelkező ligandumokat egy vegyületben kombináljuk, hogy megjavítsuk a vegyületek tumorokkal szembeni teljes affinitását.

A találmány tárgyát ezért olyan vegyületek képezik, amelyek kötőaffinitással rendelkeznek mind az $\alpha\beta 3$ receptorhoz, mind egy (neuro)peptid receptorhoz, különösen a szomatosztatin receptorhoz, és amely vegyületek legalább egy Arg-Gly-Asp aminosav szekvenciát tartalmazó első peptid-részt, és egy ehhez kapcsolt, adott esetben egy összekötő elem (linkeren) keresztül kapcsolódó második peptid-részt tartalmaznak, amely második peptid-rész egy (neuro)peptid.

A találmány nem csak a szomatosztatinra alkalmazható, hanem más (neuro)peptidrekre is. Következésképpen, a második peptid-részt előnyösen a CCK, gasztrin, P anyag, bombezin, VIP (vazoaktív bélrendszeri peptid), PACAP (nyálkakiválasztó adenilát-cikláz aktivátor peptid), szomatosztatin és ezek analógjai közül választjuk. Az analógok lehetnek az eredeti peptid stabilitás vagy aktivitás fokozása céljából módosított változatai, vagy a peptidek olyan részei lehetnek, amelyek továbbra is megőrzik a biológiai aktivitásukat.

Előnyös kiviteli alakban a második peptid-rész egy szomatosztatin analóg, amelyet előnyösen az oktreotát, oktreotid, lantreotid, vapreotid vagy ezek származékai közül választjuk.

Az első peptid-rész egy úgynevezett RGD-peptid, amely egy olyan peptid, amely legalább egyszer tartalmazza az Arg-Gly-Asp mintázatot. Az eredeti RGD-peptid analógjai további aminosavakat, például jódbevitel céljából tirozint tartalmazhatnak. Az RGD-analóg egyik előnyös kiviteli alakjában egy további Asp van jelen a Tyr és az összekötő elem között. Ez az Asp az RGD-peptid-rész gyűrűzárására szolgál, hogy stabilabbá tegye azt.

Megfelelő összekötő elem például a lizin, amely két $-NH_2$ csoporttal rendelkezik. Az egyik $-NH_2$ csoport az RGD-peptidhez történő kapcsoláshoz használható, míg a $-COOH$ csoportot a (neuro)peptidhez történő kapcsoláshoz használjuk. A fennmaradó $-NH_2$ csoport ezután egy kelátképző anyaghoz való

kapcsoláshoz használható. A kelátképző anyagot a (radioaktív) jelzőanyaggal történő komplexképzéshez használjuk.

Az ilyen neuropeptid-RGD vegyületek radiológiai megjelölése, ami vagy közvetlenül, vagy egy kelátképző komponensen (távtartó komponenssel (spacer) vagy anélkül) keresztül történik, alkalmassá teszi a vegyületeket arra, hogy radiodiagnosztikai vagy radiogyógyászati készítményekként alkalmazzuk ezeket. A radioaktív jelzésre alkalmas izotópok a következők: ^{213}Bi , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{77}As , ^{90}Y , ^{66}Ga , ^{67}Cu , ^{169}Er , $^{114\text{m}}\text{In}$, $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{121}Sn , ^{127}Te , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{149}Tb , ^{161}Tb , ^{109}Pd , ^{165}Dy , ^{149}Pm , ^{151}Pm , ^{153}Sm , ^{157}Gd , ^{159}Gd , ^{166}Ho , ^{172}Tm , ^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Lu , ^{105}Rh , $^{103\text{m}}\text{Rh}$, $^{195\text{m}}\text{Pt}$, ^{111}Ag , ^{124}I , ^{131}I és ^{211}At , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{203}Pb , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{111}In , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{97}Ru , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{52}Fe , $^{52\text{m}}\text{Mn}$, ^{51}Cr , ^{123}I , ^{131}I , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br és ^{82}Br . Ilyen radioaktívan jelzett vegyület például az ^{111}In -DTPA-szomatosztatin analóg-RGD vegyület.

A szomatosztatin analógokhoz (vagy más (neuro)peptidekhez és azok analógjaihoz) kapcsolt RGD-peptidek, vagy az RGD-receptoron ($\alpha\text{v}\beta 3$), vagy a szomatosztatin receptorok egyikén keresztül kötődhetnek a sejtekhez, majd juthatnak a sejtbe. Így elvárható, hogy két különböző receptorhoz, azaz a (neuro)peptidhez és az $\alpha\text{v}\beta 3$ integrinhez kötődő vegyülettel megtaláljuk a vegyületet különböző célsejteken, például tumorsejteken, valamint a tumoros érképződés sejtjein. Ez elősegítheti egy nagyobb cél-háttér viszony kialakulását.

A találmány szerinti vegyületek egyik prototípusa az RGD-oktreotid. Az oktreotid egy stabil peptid (rezisztens a plazma lebontással szemben), amely a 2-es, 3-as és 5-ös szomatosztatin receptor altípusokhoz (sst) kötődik. További vegyületeket ismertetünk a példákban.

Az sst-receptorokkal vagy $\alpha\text{v}\beta 3$ -receptorokkal rendelkező szövetekkel végzett autoradiográfiai kísérletekben azt találtuk, hogy habár mindkét eredeti peptidet egy új vegyületben kombináljuk, mindkettő megőrzi a kötőaffinitását a saját receptoraihoz. Az új vegyületek kötődése a megfelelő receptorokhoz a különböző versengő analógok feleslegével blokkolható.

A találmányt a következő példákban szemléltetjük, és a találmányt nem kívánjuk ezekre a példákra korlátozni.

1. példa

Általános eljárás RGD-(neuro)peptid konjugátumok és azok megfelelő DTPA- vagy DOTA- származékainak az előállítására

A következő egy általános eljárás a találmány szerinti vegyületek előállítására.

Szilárd fázisú peptid-szintézist (SPPS) végzünk a "Pioneer" PE Biosystems típusú szintetizáló készülék segítségével, Fmoc védőcsoport stratégia alkalmazásával. Egy, a vegyület minden aminosavát tartalmazó lineáris peptidet állítunk elő 0,1 mmol mennyiségben Fmoc-AA₁ (OtBu)-PEG-PS kiindulási gyanta (PE Biosystems, 0,18 mmol/g terheléssel) alkalmazásával, ahol AA₁ a C-terminális aminosav. Az Fmoc védett aminosavakat (0,4 mmol) N-[(dimetil-amino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]-1-piridinil-metilén]-N-metil-metán-amínium-hexafluor-foszfát-N-oxid (HATU) vegyülettel aktiváljuk. Az összes aminosavat és peptid előállításához szükséges reagenseket a gyártóktól szereztük be.

A peptid hordozón amiddel végzett gyűrűzárását az "allil-blokkbontó" eljárással (Pd(PPh₃)₄, N-metil-morfolin, ecetsav, kloroform), majd ezt követő 7-azabenzotriazol-1-il-oxi-trisz(pirrolidino)-foszfónium-hexafluor-foszfáttal végzett (PyAOP) aktiválással valósítjuk meg. Ezután a védett, ciklizált peptidet tartalmazó gyantát eltávolítjuk a készülékből.

A gyantát 8 ml, 92 mg tallium-trifluor-acetátot tartalmazó dimetil-formamidban szuszpendáljuk. A keveréket 2-3 órán keresztül rázzuk, leszűrjük, egymás után 10 ml dimetil-formamiddal, 10 ml dimetil-formamid-víz (1:1) eleggyel, 10 ml dimetil-formamiddal és tetrahidrofuránnal mossuk, így a gyantához kötött, védett peptidet (III) kapunk. Ezután a gyantát két részre osztjuk.

A peptidet kivágjuk a gyantából, és 85 % trifluor-ecetsav (TFA)/5 % víz/5 % fenol/5 % tianizol eleggyel 10-12 órán keresztül történő alkalmazásával eltávolítjuk a védőcsoportot. A nyers peptidet t-butil-metil-éterrel végzett kicsapással, majd centrifugálással elkülönítjük, és 0,1 % TFA-at tartalmazó acetonitril/víz gradiens alkalmazásával fordított fázisú HPLC-vel tisztítjuk (A. oldószer: 0,1 % TFA/ H₂O, B. oldószer: 0,1 % TFA/10 % H₂O/CH₃CN; Gradiens:

2,0 percen keresztül 95 % A./5 % B. összetételnél tartjuk, ezt követően 20 perc alatt az összetételt az A. oldószertől (100 %) 50 % A.:50 % B. arányig változtatjuk).

A lizin Mtt védőcsoportját 5 % TFA/5 % triizopropil-szilán (TIPS)/90 % diklór-metán (2 x 30 perc) eleggyel végzett kezeléssel távolítjuk el. A gyantát diklór-metánnal és tetrahidrofuránnal mossuk, és DIEA-t (35 μ l, 0,2 mmol) tartalmazó dimetil-formamidban szuszpendáljuk. Egy másik edényben tri-t-butyl-DTPA-anhidridet vagy DOTA-t (112 mg, 0,2 mmol) HBTU/HOBt-t (0,2 mmol, 1,0 ml 0,2 mmol/ml oldata) és DIEA-t (35 μ l, 0,2 mmol) tartalmazó dimetil-formamidban feloldunk, hogy 5 ml oldatot kapjunk. Egy órás keverés után az aktivált DTPA-származékot hozzáadjuk az előzőleg szuszpendált gyantához.

A reakciót éjszakán át folytatjuk, mielőtt a gyantát dimetil-formamiddal és tetrahidrofuránnal mossuk.

A peptidet kivágjuk a gyantából, és 85 % TFA/5 % víz/5 % fenol /5 % tianizol elegyet 10-12 órán át alkalmazva a védőcsoportot eltávolítjuk. A nyers peptidet t-butyl-metil-éterrel végzett kicsapással, majd centrifugálással elkülönítjük és 0,1 % TFA-at tartalmazó acetonitril/víz gradiens alkalmazásával fordított fázisú HPLC-vel tisztítjuk (A. oldószert: 0,1 % TFA/H₂O, B. oldószert: 0,1 % TFA/10 % H₂O/CH₃CN; Gradiens: 2,0 percen keresztül 95 % A./5 % B. összetételnél tartjuk, ezt követően 20 perc alatt az oldószert A-ról B-re változtatjuk).

2. példa

RGD-Oktreotát (IV) és a megfelelő DTPA-származék (V) előállítása

Az 1. példában ismertetett eljárás szerint RDG-oktreotátot és a megfelelő DTPA-származékát állítottuk elő a következő reakcióvázlat szerint:

Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-DTyr(OtBu)-Asp(β -OAll)-Lys(Mtt)-DPhe-Cys(Acm)-
Tyr(OtBu)-DTrp(tBoc)-Lys(tBoc)-Thr(OtBu)-Cys(Acm)-Thr(OtBu)-O-GYANTA

(I)



Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-DTyr(OtBu)-Asp-Lys(Mtt)-Dphe-

|

|

HN—————CO

Cys(Acm)-Tyr(OtBu)-DTrp(tBoc)-Lys(tBoc)-Thr(OtBu)-Cys(Acm)-Thr(OtBu)-O-
GYANTA

(II)



Tl(OCOCF₃)₂

Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-DTyr(OtBu)-Asp-Lys(Mtt)-Dphe-

|

|

HN—————CO

Cys(Acm)-Tyr(OtBu)-DTrp(tBoc)-Lys(tBoc)-Thr(OtBu)-Cys(Acm)-Thr(OtBu)-O-
GYANTA

|

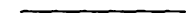
|

S—————S

(III)



85% TFA, 5% H₂O,
5% fenol, 5% tioanizol



(IV)



(V)

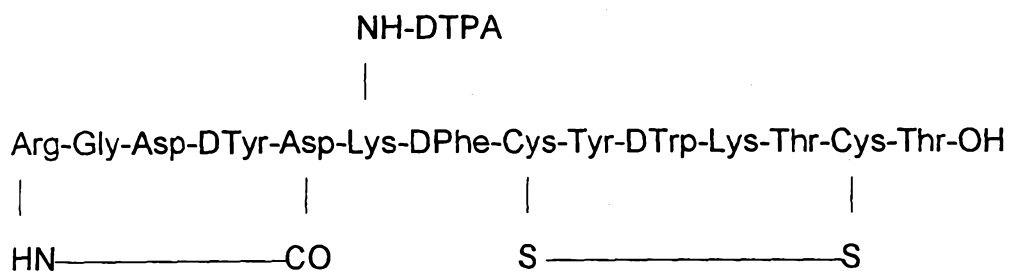
i. 5% TFA, 5% TIPS, 90% CH₂Cl₂
ii. tri-t-butyl mono DTPA anhidrid
iii. 85% TFA, 5% H₂O,
5% fenol, 5% tioanizol

RGD-oktreotát (IV):

Arg-Gly-Asp-DTyr-Asp-Lys-DPhe-Cys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH



Lys-(ϵ -DTPA) RGD-oktreotát (V):



Az RGD oktreotát konjugátum (IV) tömegspektrum adatai a következők: számított: 1766,6, mért: 884,8 ((M+2)/2).

Az RGD-oktreotát konjugátum DTPA-származékának (V) tömegspektrum adatai a következők: számított 2139,9, mért: 1071,2 ((M+2)/2).

3. példa

RGD-Oktreotid (iv) és a megfelelő DOTA-származék (v) előállítása

Az 1. példában leírt eljárás szerint egy RDG-oktreotidot és annak megfelelő DTPA-származékát állítottuk elő a következő reakcióvázlat szerint:

Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-DTyr(OtBu)-Asp(β -OAll)-Lys(Mtt)-DPhe-Cys(Acm)-Tyr(OtBu)-
DTrp(tBoc)-Lys(tBoc)-Thr(OtBu)-Cys(Acm)-Thr(ol)(OtBu)-O-GYANTA

(i)



Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-DTyr(OtBu)-Asp-Lys(Mtt)-Dphe-



Cys(Acm)-Tyr(OtBu)-DTrp(tBoc)-Lys(tBoc)-Thr(OtBu)-Cys(Acm)-Thr(ol)(OtBu)-O-
GYANTA

(ii)



Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-DTyr(OtBu)-Asp-Lys(Mtt)-Dphe-



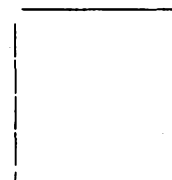
Cys(Acm)-Tyr(OtBu)-DTrp(tBoc)-Lys(tBoc)-Thr(OtBu)-Cys(Acm)-Thr(ol)(OtBu)-O-
GYANTA



(iii)



85% TFA, 5% H₂O,
5% fenol, 5% tioanizol



(iv)



(v)

i. 5% TFA, 5% TIPS, 90% CH₂Cl₂
ii. tri-t-butyl mono DTPA anhidrid
iii. 85% TFA, 5% H₂O,
5% fenol, 5% tioanizol

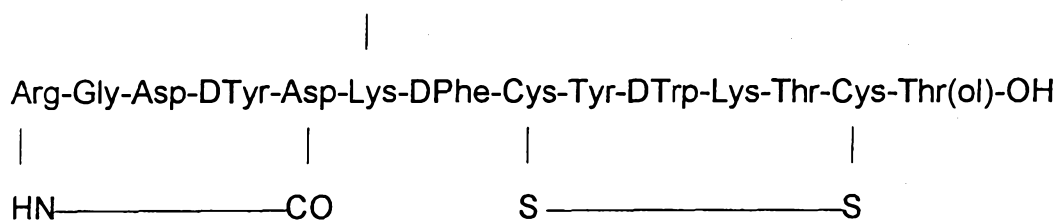
RGD-oktreotid (iv):

Arg-Gly-Asp-DTyr-Asp-Lys-DPhe-Cys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol)-OH



Lys-(ϵ -DTPA) RGD-oktreotid (v):

NH-DTPA



Szabadalmi igénypontok

1. Vegyületek, amelyek kötőaffinitással rendelkeznek mind az $\alpha\text{v}\beta 3$ receptorhoz, mind egy (neuro)peptid receptorhoz, különösen a szomatosztatin receptorhoz és következésképpen javított teljes affinitással rendelkeznek a tumorokra nézve, amely vegyületek legalább egy Arg-Gly-Asp aminosav szekvenciát tartalmazó első peptid-részt, és egy ahhoz kapcsolt második peptid-részt tartalmaznak, adott esetben egy összekötő elemen (linkeren) keresztül, amely második peptid-rész egy (neuro)peptid, amelyet a CCK, gasztrin, P anyag, bombesin, VIP (vazoaktív bélrendszeri peptid), PACAP (nyálkaelválasztó adenilát-cikláz aktiváló peptid), szomatosztatin és ezek analógjai közül választunk.

2. Az 1. igénypont szerinti vegyületek, ahol a második peptid-rész egy szomatosztatin analóg.

3. A 2. igénypont szerinti vegyületek, ahol a szomatosztatin analógot az oktreotát, oktreotid, lantreotid, vapreotid vagy ezek származékai közül választjuk.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti vegyületek, ahol az összekötő elem legalább egy lizint tartalmaz.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti vegyületek, amelyek radioaktívan jelzettek.

6. Az 5. igénypont szerinti vegyületek, ahol a radioaktív jelzésre alkalmas izotópot a ^{213}Bi , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{77}As , ^{90}Y , ^{66}Ga , ^{67}Cu , ^{169}Er , $^{114\text{m}}\text{In}$, $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{121}Sn , ^{127}Te , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{149}Tb , ^{161}Tb , ^{109}Pd , ^{165}Dy , ^{149}Pm , ^{151}Pm , ^{153}Sm , ^{157}Gd , ^{159}Gd , ^{166}Ho , ^{172}Tm , ^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Lu , ^{105}Rh , $^{103\text{m}}\text{Rh}$, $^{195\text{m}}\text{Pt}$, ^{111}Ag , ^{124}I , ^{131}I és ^{211}At , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{203}Pb , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{111}In , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{97}Ru , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{52}Fe , $^{52\text{m}}\text{Mn}$, ^{51}Cr , ^{123}I , ^{131}I , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br és ^{82}Br közül választjuk.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti vegyületek biológiailag aktív molekulaként történő alkalmazásra.

A meghatalmazott

TÜD

GÖDÖLLE, KÉKES, Mészáros & SZABÓ
Szabadalmi és Védjegy Iroda
1024 Budapest, Keleti Károly u. 13/b
Frankné dr. Machytkó Daisy
szabadalmi ügyvivő

Híves rajzlap


Dr. BOROS ISTVÁN