



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 32 879 T2** 2004.02.19

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 630 265 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 32 879.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US93/02320**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 911 556.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 93/017719**

(86) PCT-Anmeldetag: **12.03.1993**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **16.09.1993**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.12.1994**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **16.04.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.02.2004**

(51) Int Cl.7: **A61K 51/00**

A61K 51/08, A61K 103/10

(30) Unionspriorität:

851074 13.03.1992 US

(73) Patentinhaber:

Diatide, Inc., Londonderry, N.H., US

(74) Vertreter:

Dörries Frank-Molnia & Pohlman, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(72) Erfinder:

DEAN, T., Richard, Bedford, US; LEES, S., Robert, Brookline, US; BUTTRAM, Scott, Derry, US; LISTER-JAMES, John, Bedford, US

(54) Bezeichnung: **TECHNETIUM-99-MARKIERTE PEPTIDE ZUR VISUALISIERUNG VOM ENTZUENDUNGEN**

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

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

Beschreibung

1. Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft radiodiagnostische Mittel und Reagenzien zur Herstellung solcher Mittel, sowie Methoden zur Herstellung von radioaktiv markierten radiodiagnostischen Mitteln. Insbesondere betrifft die Erfindung mit Technetium-99m (Tc-99m) markierte Mittel, Verfahren und Kits zur Anfertigung solcher Mittel, und die Verwendung solcher Mittel zur Abbildung von Infektionsherden und Entzündungsherden im Körper eines Säugetiers.

2. Stand der Technik

[0002] Eine Vielzahl verschiedener Radionukleide einschließlich ^{67}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Tc-99m), ^{111}In , ^{123}I , ^{125}I , ^{169}Yb oder ^{186}Re sind als für das Radioimaging geeignet bekannt. Die Empfindlichkeit von Verfahren zur Bilddarstellung, bei denen radioaktiv markierte Peptide zur Anwendung kommen, ist wesentlich höher als bei anderen im Stand der Technik bekannten Verfahren, da durch die spezifische Bindung des radioaktiven Peptids das radioaktive Signal an der Stelle von Interesse, beispielsweise einem Entzündungsherd, konzentriert wird.

[0003] Es besteht ein klinischer Bedarf, den Ort und/oder das Ausmaß von fokalen bzw. lokalisierten Infektionsherden bestimmen zu können. Bei einer beträchtlichen Anzahl von Fällen können solche Herde (z. B. ein Abszess) durch herkömmliche Diagnosemethoden (wie körperliche Untersuchung, Röntgenbilder, CT und Ultraschall) nicht identifiziert werden. In einigen Fällen kann man auf eine Biopsie zurückgreifen, doch wird dies vorzugsweise vermieden, wenigstens bis zu dem Zeitpunkt, wo es notwendig ist, um das für einen Abszess an einem bekannten Ort verantwortliche Pathogen zu identifizieren. Die Identifikation einer Stelle einer solchen „okkulten“ Infektion ist wichtig, da eine schnelle Lokalisierung des Problems für effektive therapeutische Eingriffe kritisch ist.

[0004] Auf dem Gebiet der Nuklearmedizin lassen sich gewisse pathologische Zustände durch die Abbildung der internen Verteilung von verabreichten, radioaktiv markierten Tracer-Verbindungen (d. h. Radiotracer bzw. Radiopharmazeutika), die sich spezifisch am Krankheitsherd ansammeln, lokalisieren, bzw. das Ausmaß solcher Zustände kann bestimmt werden. Ein Abszess kann jedoch durch eines von vielen möglichen Pathogenen verursacht werden, so daß ein für ein bestimmtes Pathogen spezifischer, Radiotracer nur beschränkt einsetzbar wäre. Andererseits sind Infektionen fast ausnahmslos von Entzündungen begleitet, bei denen es sich um eine allgemeine Antwort des Körpers auf eine Gewebsverletzung handelt. Daher kann man erwarten, daß sich ein für Entzündungsherde spezifischer Radiotracer bei der Lokalisierung von durch ein beliebiges Pathogen verursachten Infektionsherden als nützlich erweisen würde.

[0005] Eines der mit Entzündungen verbundenen Hauptphänomene ist die Ansammlung von Leukozyten (weißen Blutkörperchen), normalerweise Monozyten und neutrophilen Zellen, am Entzündungsherd. Ein für Leukozyten spezifischer Radiotracer würde sich bei dem Nachweis von Leukozyten, an der Stelle einer lokalisierten Infektion als nützlich erweisen. Bei den gegenwärtig zugelassenen nuklearmedizinischen Verfahren zur Abbildung von Infektionsherden werden entweder mit Indium-111 markierte Leukozyten (^{111}In -WBC) (siehe z. B. Peters, 1992, J. Nucl. Med. 33: 65–67) oder Gallium-67- ^{67}Ga -Citrat (siehe z. B. Ebright et al., 1982, Arch. Int. Med. 142: 246–254) verwendet.

[0006] Bei der Verwendung von mit ^{111}In markierten weißen Blutkörperchen besteht ein Hauptnachteil darin, daß die Herstellung des Radiotracers die sterile Entnahme von autologem Blut, die sterile Isolierung der Leukozyten aus dem Blut, das sterile Markieren der Leukozyten unter Bedingungen, bei denen die Zellen nicht beschädigt werden (da beschädigte weiße Blutkörperchen bei der Reinjektion durch das reticuloendotheliale System, aufgenommen werden), und die Rückführung (Reinjektion) der (jetzt markierten) Leukozyten in dem Patienten erfordert. Darüberhinaus kann es sein, daß für eine optimale Abbildung eine Wartezeit von 12 bis 48 Stunden zwischen Injektion und Abbildung eingehalten werden muß. Durch Tc-99m markierte Leukozyten läßt sich diese Wartezeit zwar verkürzen (siehe z. B. Vorne et al., 1989, J. Nucl. Med. 30: 1332–1336), es ist jedoch immer noch erforderlich, die Leukozyten außerhalb des Körpers zu markieren. Bei bevorzugten Radiotracern würde es nicht nötig sein, autologe Blutkomponenten zu entnehmen und zu manipulieren.

[0007] ^{67}Ga -Citrat läßt sich durch intravenöse Injektion verabreichen. Diese Verbindung ist jedoch nicht für Infektions- bzw. Entzündungsherde spezifisch. Außerdem muß häufig eine Wartezeit von bis zu 72 Stunden zwischen der Injektion des Radiotracers und der Abbildung eingehalten werden. Zusätzlich sind die γ - (gamma)-Emissionsenergien von ^{67}Ga für herkömmliche Gammakameras nicht besonders gut geeignet.

[0008] Radiomarkierte monoklonale und polyklonale Antikörper gegen menschliche Leukozyten (einschließlich Monozyten, neutrophilen Zellen, Granulozyten und anderen) sind bereits entwickelt worden. Mit Tc-99m markierte monoklonale Antikörper gegen Granulozyten (siehe z. B. Lind et al., 1990, J. Nucl. Med. 31: 417–473) und mit ^{111}In markiertes, nicht spezifisches humanes Immunglobulin (siehe z. B. LaMuraglia et al., 1989, J.

[0009] Vasc. Surg. 10: 20–28) sind für den Nachweis von Entzündungen als Sekundärreaktion auf eine Infektion getestet worden. Mit ^{111}In markiertes IgG hat die gleichen Nachteile wie mit ^{111}In markierte weiße Blutkörperchen, da jeweils 24–48 Stunden zwischen der Injektion und einer optimalen Abbildung verstreichen müssen. Darüber hinaus sind alle radioaktiv markierten Antikörper schwierig herzustellen und müssen als biologische Produkte langwierige Genehmigungsverfahren der Zulassungsbehörden durchlaufen.

[0010] Als routinemäßig verwendete Radiopharmazeutika werden kleine, leicht zu synthetisierende Moleküle bevorzugt. Es besteht ein eindeutiger Bedarf an kleinen synthetischen Molekülen, die einem Patienten direkt injiziert werden können und die Infektions- und Entzündungsherde abbilden, indem sie sich an Stellen lokalisierenden, an denen sich Leukozyten angesammelt haben.

[0011] Eine Klasse von Verbindungen, von denen bekannt ist, daß sie sich an Leukozyten binden, sind chemotaktische Peptide, die Leukozyten dazu anregen, einen Peptid-Konzentrationsgradienten hinaufzuwandern (siehe Wilkinson, 1988, Meth. Enzymol. 162: 127–132). Diese Verbindungen binden sich mit hoher Affinität an Rezeptoren auf der Oberfläche von Leukozyten. Diese Peptide stammen aus einer Reihe von Quellen einschließlich Komplementfaktoren, Bakterien, Tuftsins, Elastin, Fibrinopeptid B, Fibrinogen B β , Blutplättchenfaktor 4 und anderen. Von diesen chemotaktischen Verbindungen abgeleitete kleine synthetische Peptide würden als Radiotracer zur Abbildung von Entzündungsherden in vivo von großem Nutzen sein.

[0012] Radioaktiv markierte Peptide sind aus dem Stand der Technik bekannt.

[0013] Das US-Patent Nr. 4,986,979 betrifft die Verwendung von radioaktiv markierten, chemotaktischen Formylpeptiden zur radioaktiven Markierung von Leukozyten außerhalb des Körpers über ein Photoaffinity-Label.

[0014] EPC 90108734.6 betrifft Konjugate aus chemotaktischen Peptiden und mit ^{111}In markiertem DTPA.

[0015] PCT WO90/10463 betrifft die Verwendung von radioaktiv markierten, chemotaktischen Formylpeptiden zur radioaktiven Markierung von Leukozyten außerhalb des Körpers über ein Photoaffinity-Label.

[0016] Zoghbi et al. offenbaren in J. Nucl. Med. 22: 32 (Abst) von Bakterien abgeleitete, chemotaktische Formylpeptidfaktoren, die an mit ^{111}In markiertes Transferrin gekoppelt sind.

[0017] Jiang et al., 1982, offenbaren in Nuklearmedizin 21: 110–113 ein chemotaktisches, formyliertes Peptid, das mit ^{125}I radioaktiv markiert ist.

[0018] Fischman et al., 1991, J. Nucl. Med. 32: 482–491 betrifft Konjugate aus chemotaktischem Formylpeptid und mit ^{111}In markiertem DTPA.

[0019] Die Verwendung von Chelatoren für die radioaktive Markierung von Polypeptiden sowie Verfahren zur Markierung von Peptiden und Polypeptiden mit Tc-99m sind im Stand der Technik bekannt und in der ebenfalls anhängigen US-Patentanmeldung mit den Seriennummern 07/653,012, 07/807,062, 07/871,282 und 07/893,981 offenbart, die hiermit durch Verweis Bestandteil der vorliegenden Anmeldung sind.

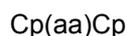
KURZE DARSTELLUNG DER ERFINDUNG

[0020] Die vorliegende Erfindung stellt Mittel zur szintigraphischen Abbildung zur Verfügung, bei denen es sich um mit Tc-99m radioaktiv markierte Peptidreagenzien handelt. Die erfindungsgemäßen Peptidreagenzien umfassen spezifisch bindende Peptide, die Leukozyten binden, kovalent gebunden an eine einen radioaktiven Tc-99m-Marker bindende Komponente.

[0021] Gemäß einem ersten Aspekt der Erfindung werden Reagenzien zur Herstellung von szintigraphischen bilderzeugenden Mitteln zur Abbildung von Entzündungsherden im Körper eines Säugetieres, umfassend ein Peptid, das sich an Leukozyten bindet und eine zwischen 3 und 100 Aminosäuren umfassende Aminosäuresequenz und eine einen radioaktiven Tc-99m-Marker bindenden Einheit aufweist, bereitgestellt.

[0022] Die erfindungsgemäßen radioaktiv markierten Peptidreagenzien umfassen ein spezifisch bindendes Peptid, das sich an Leukozyten bindet, und eine einen radioaktiven Tc-99m-Marker bindenden Einheit der Formel:

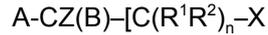
I.



wobei Cp für ein geschütztes Cystein und (aa) für eine Aminosäure steht, und wobei die den radioaktiven Marker bindende Einheit kovalent mit dem spezifisch bindenden Peptid verbunden ist. Bei einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Aminosäure um Glycin. Bei einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist die den radioaktiven Marker bindende Einheit über eine oder mehrere Aminosäuren mit dem spezifischen Peptid verbunden.

[0023] Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung Peptidreagenzien bereit, die eine einen radioaktiven Tc-99m-Marker bindende Einheit der folgenden Struktur aufweisen:

II.

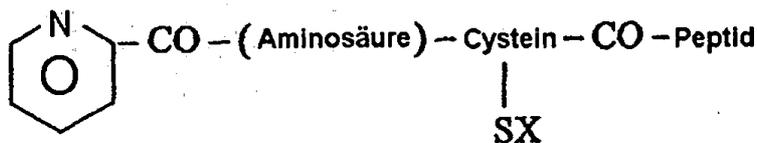


wobei A für H, HOOC, H₂NOC, (Peptid)-NHOC, (Peptid)-OOC oder R⁴ steht; B für N, SH, -NHR³, -N(R³)-(Peptid) oder R⁴ steht; Z für H oder R⁴ steht; X für H, SH, -NHR³, -N(R³)-(Peptid) oder R⁴ steht; R¹, R², R³ und R⁴ unabhängig voneinander für H oder niederes geradkettiges oder verzweigtes oder cyclisches Alkyl stehen; n für 0, 1 oder 2 steht; und: (1) wenn B für -NHR³ oder -N(R³)-(Peptid) steht, X für SH und n für 1 oder 2 steht; (2) wenn X für -NHR³ oder -N(R³)-(Peptid) steht, B für SH und n für 1 oder 2 steht; (3) wenn B für H oder R⁴ steht, A für HOOC, H₂NOC, (Peptid)-NHOC oder (-Peptid)-OOC, X für SH und n für 0 oder 1 steht; (4) wenn A für H oder R⁴ steht, im Fall, daß B für SH steht, X für -NHR³ oder -N(R³)-(Peptid) steht, und, im Fall, daß X für SH steht, B für -NHR³ oder -N(R³)-(Peptid) steht; (5) wenn X für H oder R⁹ steht, A für HOOC, H₂NOC, (Peptid)-NHOC oder (Peptid)-OOC und B für SH steht; (6) wenn Z für Methyl steht, X für Methyl, A für HOOC, H₂NOC, (Peptid)-NHOC oder (Peptid)-OOC, B für SH und n für 0 steht; und (7) wenn B für SH und X für SH steht, n nicht für 0 steht; und wobei die Thioleinheit in reduzierter Form vorliegt.

[0024] Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung werden Reagenzien zur Herstellung von szintigraphischen bilderzeugenden Mitteln zur Abbildung von Entzündungsherden im Körper eines Säugetieres bereitgestellt, die ein Peptid umfassen, das sich an Leukozyten bindet und eine zwischen 3 und 100 Aminosäuren umfassende Aminosäuresequenz und eine einen radioaktiven Tc-99m-Marker bindende Einheit, die einen elektrochemisch neutralen Tc-99m-Komplex bildet, aufweist.

[0025] Gemäß noch einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung Reagenzien bereit, die Peptide umfassen, die sich an Leukozyten binden und kovalent mit einer einen radioaktiven Te-99m-Marker bindenden Einheit der folgenden Struktur:

III.



verbunden sind [im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden radioaktive Marker bindende Einheiten dieser Struktur als auf Picolinsäure (Pic) basierende Einheiten bezeichnet];
oder

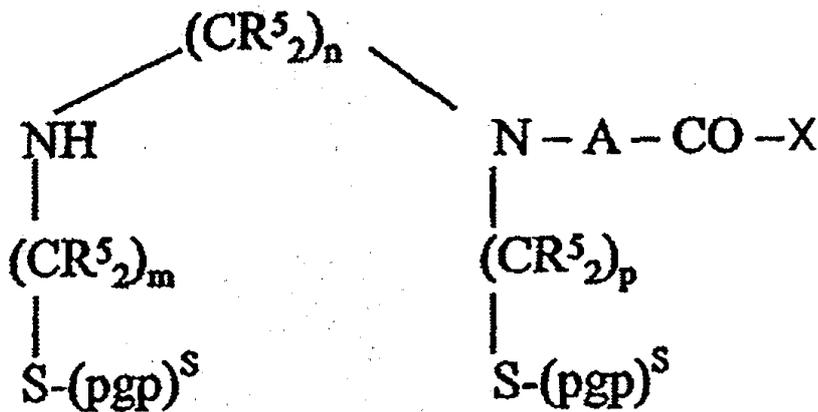
IV.



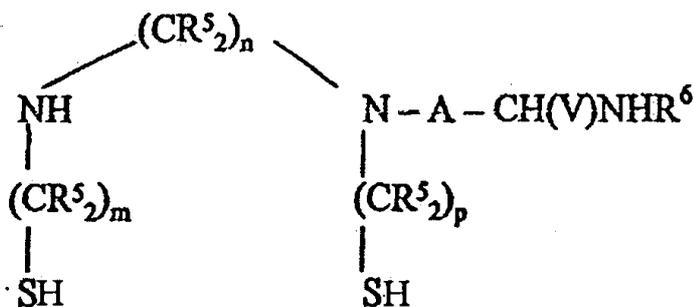
[im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden radioaktive Macker bindende Einheiten dieser Struktur als auf Picolylamin (P ca) basierende Einheiten bezeichnet]; wobei X für H oder eine Schutzgruppe steht; (Aminosäure) für eine beliebige Aminosäure steht; die den radioaktiven Tc-99m-Macker bindende. Einheit kovalent mit dem Peptid verbunden ist und der Komplex aus der den radioaktiven Macker bindenden Einheit und Tc-99m elektrisch neutral ist. Bei einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Aminosäure um Glycin und bei X um eine Acetamidomethyl-Schutzgruppe. Bei weiteren bevorzugten Ausführungsformen ist das Peptid über eine Aminosäure, ganz besonders bevorzugt Glycin, kovalent mit der den radioaktiven Tc-99m-Macker bindenden Einheit verbunden.

[0026] Bei noch einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden Reagenzien zur Herstellung von szintigraphischen bilderzeugenden Mitteln zur Abbildung von Stellen im Körper eines Säugetieres bereitgestellt, die ein spezifisch bindendes Peptid und eine kovalent mit dem Peptid verbundene, einen radioaktiven Tc-99m-Marker bindende Bisaminobisthiol-Einheit umfassen. Die einen radioaktiven Tc-99m-Marker bindende Bisaminobisthiol-Einheit bei dieser Ausführungsform der Erfindung hat eine aus der aus den folgenden Formeln bestehenden Gruppe ausgewählte Formel:

V.



wobei die Reste R^5 jeweils unabhängig voneinander für H, CH_3 oder C_2H_5 stehen; die Reste $(\text{pgp})^s$ jeweils unabhängig voneinander für eine Thiol-Schutzgruppe oder H stehen; m, n und p unabhängig voneinander für 2 oder 3 stehen; A für geradkettiges oder cyclisches niederes Alkyl, Aryl, Heterocyclyl, Kombinationen oder substituierte Derivate davon steht; und X für ein Peptid steht;
VI.



wobei die Reste R^5 jeweils unabhängig voneinander für H, niederes Alkyl mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, Phenyl oder durch niederes Alkyl oder niederes Alkoxy substituiertes Phenyl stehen; m, n und p unabhängig voneinander für 1 oder 2 stehen; A für geradkettiges oder cyclisches niederes Alkyl, Aryl, Heterocyclyl, oder Kombinationen oder substituierte Derivate davon steht; V für H oder $-\text{CO}-\text{Peptid}$ steht; R^6 für H oder ein Peptid steht; mit der Maßgabe, daß, wenn V für H steht, R^6 für ein Peptid steht, und daß, wenn R^6 für H steht, V für ein Peptid steht. [Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden radioaktive Macker bindende Einheiten dieser Struktur als „BAT“-Einheiten bezeichnet]. Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist das Peptid über eine Aminosäure, ganz besonders bevorzugt Glycin, kovalent mit der den radioaktiven Tc-99m-Macker bindenden Einheit verbunden.

[0027] Die erfindungsgemäßen spezifisch bindenden Peptide können weiterhin mit einer polyvalenten Verbindungseinheit kovalent verbunden sein. Erfindungsgemäße polyvalente Verbindungseinheiten bestehen aus wenigstens 2 identischen Gruppen mit Verbindungsfunktion, die dazu in der Lage sind, kovalent an spezifisch bindende Peptide oder Tc-99m-bindende Einheiten zu binden. Bevorzugte Gruppen mit Verbindungsfunktion sind primäre oder sekundäre Amine, Hydroxylgruppen, Carbonsäuregruppen oder thiolreaktive Gruppen. Bei bevorzugten Ausführungsformen bestehen die polyvalenten Verbindungseinheiten aus Bissuccinimidylmethylether (BSME), 4-(2,2-Dimethylacetyl)benzoesäure (DMAB) und Tris(succinimidylethyl)amin (TSEA).

[0028] Die Erfindung umfaßt Mittel zur szintigraphischen Bilddarstellung, bei denen es sich um Komplexe aus den erfindungsgemäßen Reagenzien und Tc-99m handelt, und Verfahren zur radioaktiven Markierung der erfindungsgemäßen Reagenzien mit Tc-99m. Die durch die Erfindung bereitgestellten radioaktiv markieren Komplexe werden gebildet, indem man die erfindungsgemäßen Reagenzien in Gegenwart eines Reduktionsmittels mit Tc-99m umsetzt. Zu den bevorzugten Reduktionsmitteln gehören das Dithionion, das Zinn-(II)-ion und das Eisen-(II)-ion, jedoch ist diese Aufzählung nicht hierauf beschränkt. Erfindungsgemäße Komplexe werden weiterhin bei der Markierung der erfindungsgemäßen Reagenzien mit Tc-99m durch Ligandenaustausch eines zuvor reduzierten Tc-99m-Komplexes gebildet.

[0029] Die Erfindung stellt weiterhin Kits zur Herstellung von Mitteln für die szintigraphische Bilddarstellung bereit, bei denen es sich um die mit Tc-99m radioaktiv markierten erfindungsgemäßen, Reagenzien handelt. Die Kits zur Markierung der durch die Erfindung bereitgestellten Reagenzien bestehen aus einem verschlos-

senen Fläschchen, das eine vorgegebene Menge eines erfindungsgemäßen Reagens und eine für die Markierung des Reagens mit Tc-99m ausreichende Menge an Reduktionsmittel enthält.

[0030] Die vorliegende Erfindung stellt Verfahren zur Herstellung von erfindungsgemäßen Peptidreagenzien durch chemische in-vitro-Synthese bereit. Bei einer bevorzugten Ausführungsform werden die Peptide durch Festphasenpeptidsynthese synthetisiert.

[0031] Die vorliegende Erfindung stellt die Verwendung von Mitteln zur szintigraphischen Bilddarstellung, bei denen es sich um mit Tc-99m markierte Reagenzien handelt, zur Abbildung von Entzündungsherden im Körper eines Säugetieres, durch die in-vivo-Aufnahme von gammaszintigraphischen Bildern bereit. Bei diesen Verfahren verabreicht man eine diagnostisch wirksame Menge des erfindungsgemäßen, mit Tc-99m markierten Reagens und weist die durch den am Entzündungsherd im Körper des Säugetiers angereicherten Tc-99m-Marker emittierte Gammastrahlung nach.

[0032] Besondere bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung sind aus der folgenden, ausführlicheren Beschreibung bestimmter bevorzugter Ausführungsformen und den Ansprüchen ersichtlich.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0033] **Abb. 1** zeigt eine gammaszintigraphische Aufnahme eines weißen Neuseelandkaninchens, das wie in Beispiel 3 beschrieben behandelt wurde.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0034] Die vorliegende Erfindung stellt Reagenzien zur Herstellung: von mit Tc-99m radioaktiv markierten Mitteln zur szintigraphischen Bilddarstellung für die Abbildung von Targetstellen im Säugetierkörper bereit. Die Reagenzien umfassen ein spezifisch bindendes Peptid, das sich an Leukozyten bindet und kovalent mit einer "einen radioaktiven Tc-99m-Marker komplexierenden Gruppe verbunden ist.

[0035] Die Peptide der vorliegenden Erfindung binden sich an Leukozyten, vorzugsweise an Monozyten und neutrophile Zellen und ganz besonders bevorzugt an neutrophile Zellen. Im Rahmen der Erfindung sind unter dem Ausdruck „bindet sich an Leukozyten“ zu verstehen, daß die Peptide der vorliegenden Erfindung dazu in der Lage sind, sich an Infektions- bzw. Entzündungsherden im Körper eines Säugetiers anzureichern, wodurch der Nachweis solcher Herde durch Gammaszintigraphie ermöglicht wird.

[0036] Bei den Cp(aa)Cp-enthaltenden Peptiden ist Cp ein geschütztes Cystein, wobei die S-Schutzgruppen gleich oder verschieden sind und beispielsweise aus der folgenden Gruppe ausgewählt (jedoch nicht darauf beschränkt) sind:

-CH₂-Aryl (Aryl ist Phenyl oder Alkyl- oder Alkyloxysubstituiertes Phenyl);

CH-(Aryl)₂, (Aryl ist Phenyl oder Alkyl- oder Alkyloxysubstituiertes Phenyl);

C-(Aryl)₃, (Aryl ist Phenyl oder Alkyl- oder Alkyloxysubstituiertes Phenyl);

-CH₂-(4-Methoxyphenyl);

-CH-(4-Pyridyl)(phenyl)₂;

-C(CH₃)₃;

-9-Phenylfluorenyl;

-CH₂NHCOR (R ist unsubstituiertes oder substituiertes Alkyl oder Aryl);

-CH₂NHCOOR (R ist unsubstituiertes oder substituiertes Alkyl oder Aryl);

-CONHR (R ist unsubstituiertes oder substituiertes Alkyl oder Aryl);

-CH₂-S-CH₂-Phenyl Die bevorzugte Schutzgruppe weist die Formel -CH₂NHCOR auf, wobei R für kurzkettiges Alkyl mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen, Phenyl oder Phenyl substituiert mit kurzkettigem Alkyl, Hydroxyl, kurzkettigem Alkoxy, Carboxy, oder kurzkettigem Alkoxy-carbonyl substituiertes Phenyl steht.

[0037] Bei der Markierung mit Tc-99m handelt es sich um einen Vorteil der vorliegenden Erfindung, da dieses Isotop dank seiner nuklearen und radioaktiven Eigenschaften ein ideales Mittel für die szintigraphische Bilddarstellung ist. Das Isotop weist eine Einzelphotonenenergie von 140 keV und eine radioaktive Halbwertszeit von ungefähr 6 Stunden auf und ist leicht über einen ⁹⁹Mo-^{99m}Tc-Generator verfügbar. Andere im Stand der Technik bekannte Radionuklide haben wesentlich längere Halbwertszeiten (beispielsweise ¹¹¹In mit einer Halbwertszeit von 67,4 Stunden) oder sind toxisch (beispielsweise ¹²⁵I).

[0038] Die spezifisch bindenden, peptidhaltigen Ausführungsformen der Erfindung bestehen jeweils aus einer Abfolge von Aminosäuren. Bei den jeweiligen in den erfindungsgemäßen Peptiden enthaltenen Aminosäuren kann es sich um natürliche oder andere L- oder D-Aminosäuren handeln, wobei D-Aminosäuren mit einem tiefgestellten D gekennzeichnet sind. Zu den durch die vorliegende Erfindungen bereitgestellten Reagenzien gehören die folgenden Verbindungen, wobei diese Aufzählung jedoch nicht hierauf beschränkt ist.

Leukozytenbindende Peptide

<i>formyl</i> .MLFC _{A₁₋₂₅} GC _{A₁₋₂₅}	<i>acetyl</i> .C _{A₁₋₂₅} GC _{A₁₋₂₅} .Aca.(VPGVG) ₄ amid
C _{A₁₋₂₅} GC _{A₁₋₂₅} (VGVAPG) ₃	(<i>acetyl</i> .CC _{A₁₋₂₅} GC _{A₁₋₂₅} PLYKKIHKLLLES) ₂ .BSMB
<i>formyl</i> .MILFC _{A₁₋₂₅} GC _{A₁₋₂₅}	<i>acetyl</i> .CGGGPLYKKIHKLLLES
C _{A₁₋₂₅} GC _{A₁₋₂₅} TKPR	Pic.GC(VGVAPG) ₄ amid
<i>formyl</i> .MLFC _{A₁₋₂₅} G.Pica	pGlu.GVNDNEEGFFSARGGCamid
<i>formyl</i> .Nle.LF.Nle.YKC _{A₁₋₂₅} GC _{A₁₋₂₅}	<i>acetyl</i> .(LKKL) ₃ C _{A₁₋₂₅} GC _{A₁₋₂₅} amid
Pic.GC _{A₁₋₂₅} (VGVAPG) ₄ amid	[BAT].GGPLYKKIHKLLLES
Pic.GC _{A₁₋₂₅} (VPGVG) ₄ amid	<i>formyl</i> .MLFK.[BAT].amid
Pic.GC _{A₁₋₂₅} PLYKKIHKLLLES	<i>formyl</i> .Thp.LF.[BAM]
C _{A₁₋₂₅} GC _{A₁₋₂₅} GGPLYKKIHKLLLES	<i>formyl</i> .MLFK.[BAT]
pGlu.GVNDNEEGFFSARC _{A₁₋₂₅} GC _{A₁₋₂₅} amid	[BAT].(VPGVG) ₄ amid
(VPGVG) ₄ GGC _{A₁₋₂₅} GC _{A₁₋₂₅} amid	<i>formyl</i> .MLFK.[BAT].KKKKKamid
(VGVAPG) ₃ GGC _{A₁₋₂₅} GC _{A₁₋₂₅} amid	<i>formyl</i> .MLFK.[BAT].GSGSamid
<i>acetyl</i> .C _{A₁₋₂₅} GC _{A₁₋₂₅} GGG(VPGVG) ₄ amid	<i>formyl</i> .MLFK.[BAT].B

Leukozytenbindende Peptide (Fortsetzung)

formyl.MLFK.[BAT].EGE*formyl*.MLF(NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH)Pic.GC_{Mob}*formyl*.M.DpgF.[BAM]*(acetyl*.CKKC_{Acm}GC_{Acm}PLYKKIHKLLLES)₂.BSME[BAT].(VGVAPG)₃amid

[BAT].GHRPLDKKREEAPSLRPAPPPISGGGYRamid

[DTPA].C_{Acm}GC_{Acm}PLYKKIHKLLLES*acetyl*.KKKKKC_{Acm}GC_{Acm}GGPLYKKIHKLLLES

[BAT].KKLLKKLYKKIHKLLLES

(formyl.MLFK.[BAT].GGC_{Acm}GC_{Acm}GGC.amid)₂.BSME*acetyl*.CKKC_{Acm}GC_{Acm}PLYKKIHKLLLESPic.GC_{Acm}GHRPLDKKREEAPSLRPAPPPISGGGYRamid*(acetyl*CGC_{Acm}GC_{Acm}GGPLYKKIHKLLLES)₂.BSME*(formyl*MLFKGGC_{Acm}GC_{Acm}GGC.amid)₂.BSME

[Einbuchstabenabkürzungen für Aminosäuren finden sich in G. Zubay, *Biochemistry* (2. Auflage), 1988 (MacMillan Publishing: New York), S. 33; Dpg = Dipropylglycin; pGlu = pyro-Glutaminsäure; Nle = Norleucin; Acm = Acetamidomethyl; Mob = 4-Methoxybenzyl; Aca = ϵ -Aminocapronsäure; Pic = Picolinsäure; Pica = Picolylamin (2-(Aminomethyl)pyridin); [BAT] = N⁶,N⁹-Bis(2-Methyl-2-mercaptopropyl)-6,9-diazanonansäure; Thp = 4-Aminotetrahydrothiopyran-4-carbonsäure; [BAM] = N⁶,N⁹-Bis(2-methyl-2-mercaptopropyl)-1,6,9-triazanonansäure; BSME = Bissuccinimidylmethylether; DTPA = Diethylentriaminpentaessigsäure; Peptide sind über die freie Thioleinheit des ungeschützten Cysteinrests (C) im jeweiligen Peptid mit BSME-Linkern verbunden)

[0039] Die Peptide der vorliegenden Erfindung können in vitro chemisch synthetisiert werden. Im allgemeinen lassen sich die Peptide der vorliegenden Erfindung vorteilhaft in einem Aminosäuresynthesizer darstellen. Die erfindungsgemäßen Peptide lassen sich darstellen, indem man bei der chemischen in-vitro-Synthese unter Anwendung von dem Fachmann gut bekannten Vorschriften die komplexierende Gruppe kovalent mit dem Peptid verbindet. Solche bei der Synthese kovalent mit der komplexierenden Gruppe verbundenen Peptide sind vorteilhaft, da sie in ihnen spezifische Stellen für eine kovalente Anbindung festlegen lassen.

[0040] Die erfindungsgemäßen, den radioaktiven Macker bindenden Einheiten lassen sich während der Peptidsynthese in das target-spezifische Peptid einführen. Bei Ausführungsformen, die Picolinsäure [(Pic); z. B. Pic-Gly-Cys(Schutzgruppe)-] enthalten, kann die den radioaktiven Marker bindende Einheit als letzter (d. h. aminoterminaler) Rest in der Synthese synthetisiert werden. Darüber hinaus kann die picolinsäurehaltige, den, radioaktiven Macker bindende Einheit zweckmäßigerweise kovalent mit der ϵ -Aminogruppe von Lysin verbunden werden, wodurch man, zum Beispiel α N(Fmoc)-Lys- ϵ N[Pic-Gly-Cys(Schutzgruppe)] erhält, welches in einer beliebigen Position in die Peptidkette eingebaut werden kann. Die Sequenz ist besonders vorteilhaft, da sie auf einfache Weise den Einbau in das targetbindende Peptid ermöglicht.

[0041] In ähnlicher Weise läßt sich während der Synthese die picolylamin- (Pica-)haltige, den radioaktiven Macker bindende Einheit [-Cys(Schutzgruppe)-Gly-Pica] darstellen, indem man die Sequenz [-Cys(Schutzgruppe)-Gly-] in den Carboxyterminus der Peptidkette einbaut. Nach der Abspaltung des Peptids vom Harz wird der Carboxyterminus aktiviert und an Picolylamin gekuppelt. Bei diesem Syntheseweg ist es erforderlich, daß reaktive Seitenkettenfunktionalitäten maskiert (geschützt) bleiben und während der Konjugation des Picolylamins nicht reagieren.

[0042] Beispiele kleiner synthetischer Peptide, die die Pic-Gly-Cys- und Cys-Gly-Pica-Chelatoren enthalten, sind in den Beispielen unten angeführt. Die vorliegende Erfindung stellt den Einbau dieser Chelatoren in praktisch alle beliebigen Peptide bereit, die sich in vivo spezifisch an Leukozyten binden, was ein radioaktiv markiertes Peptid gibt, in dem Tc-99m als neutraler Komplex gehalten wird.

[0043] Die vorliegende Erfindung stellt weiterhin spezifisch bindende, kleine synthetische Peptide bereit, in die Bisaminbisthiol- (BAT- oder BAM-)Chelatoren eingebaut sind, die mit Tc-99m markiert werden können. Die vorliegende Erfindung stellt den Einbau dieser Chelatoren in praktisch alle beliebigen Peptide bereit, die sich in vivo spezifisch an Leukozyten binden, was ein radioaktiv markiertes Peptid gibt, in dem Tc-99m als neutraler Komplex gehalten wird. Ein Beispiel eines kleinen synthetischen Peptids, das einen BAT-Chelator als eine einen radioaktiven Marker bindende Einheit enthält, ist unten in den Beispielen angeführt.

[0044] Die erfindungsgemäßen spezifisch bindenden Peptide können auch kovalent an eine polyvalente Verbindungseinheit gebunden werden. Die von der Erfindung bereitgestellten polyvalenten Verbindungseinheiten bestehen aus wenigstens 2 Verbindungsfunktionellen Gruppen, die dazu in der Lage sind, sich kovalent an thrombozytenspezifische Einheiten zu binden, einschließlich geradkettiger und cyclischer Peptide. Zu diesen funktionellen Gruppen gehören primäre und sekundäre Amine, Hydroxylgruppen, Carbonsäuregruppen und thiolreaktive Gruppen, jedoch ist diese Aufzählung nicht hierauf beschränkt. Polyvalente Verbindungseinheiten bestehen aus vorzugsweise wenigstens 3 funktionellen Gruppen, die dazu in der Lage sind, sich kovalent an thrombozytenspezifische Einheiten zu binden, einschließlich geradkettiger und cyclischer Peptide. Zu den be-

vorzugten polyvalenten Verbindungseinheiten gehören Aminosäuren wie Lysin, Homolysin, Ornithin, Asparaginsäure und Glutaminsäure; geradkettige und cyclische Amine und Polyamine; Polycarbonsäuren; aktivierte Thiole; und thiolreaktive Reagenzien wie Di- und Trimaleimide. Weiterhin sind Ausführungsformen bevorzugt, bei denen die polyvalenten Verbindungseinheiten aus einer Vielzahl von polyvalenten Verbindungseinheiten bestehen, die unter Bildung einer verzweigten polyvalenten Verbindungseinheit kovalent miteinander verbunden sind. Zu den ganz besonders bevorzugten Verbindungseinheiten gehören Bissuccinimidylethylether, Tris(succinimidylethyl)amin, 4-(2,2-Dimethylacetyl)benzoesäure (DMBA) und deren Derivate.

[0045] Bei der Bildung eines Komplexes von radioaktivem Technetium mit den Reagentien der vorliegenden Erfindung wird der Technetiumkomplex, vorzugsweise ein Salz von Tc-99m-Perotechnetat, in Gegenwart eines Reduktionsmittels mit dem erfindungsgemäßen Reagens umgesetzt. Bevorzugte Reduktionsmittel sind Dithionitionen, Zinn(II)-Ionen und Eisen(II)-Ionen; das am meisten bevorzugte Reduktionsmittel ist Zinn(II)chlorid. Die zur Herstellung solcher Komplexe erforderlichen Mittel werden zweckmäßigerweise in einem Kit zur Verfügung gestellt, das ein verschlossenes Vial umfaßt, das eine vorbestimmte Menge eines zu markierenden, erfindungsgemäßen Reagens und eine zur Markierung des Reagens mit Tc-99m ausreichende Menge an Reduktionsmittel enthält.

[0046] Alternativ dazu kann man den Komplex auch durch Umsetzung eines erfindungsgemäßen Reagens mit einem zuvor gebildeten, labilen Komplex von Technetium und einer anderen, als Transferligand bezeichneten Verbindung bilden. Dieses Verfahren wird als Ligandenaustausch bezeichnet und ist dem Fachmann wohlbekannt. Der labile Komplex kann zum Beispiel unter Verwendung von Transferliganden wie Tartrat, Citrat, Gluconat oder Mannit gebildet werden. Die im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung brauchbaren Tc-99m-Perotechnetatsalze schließen die Alkalisalze wie z. B. das Natriumsalz, und die Ammoniumsalze und niederen Alkylammoniumsalze ein.

[0047] Die Umsetzung der Peptide der vorliegenden Erfindung mit Tc-perotechnetate bzw. dem zuvor gebildeten labilen Tc-99m-Komplex läßt sich in wäßrigem Medium bei Raumtemperatur durchführen. Wird ein anionischer Komplex mit einer Ladung von $[-1]$ in dem wäßrigen Medium in Form eines Salzes mit einem geeigneten Kation wie einem Natriumkation, Ammoniumkation, niederen Mono-, Di- oder Trialkylammoniumkation usw. gebildet. Erfindungsgemäß läßt sich ein beliebiges herkömmliches Salz mit einem pharmazeutisch unbedenklichen Kation verwenden.

[0048] Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird ein Kit zur Darstellung von mit Technetium-99m markierten Peptiden zur Verfügung gestellt. Die erfindungsgemäßen Peptide können unter Anwendung von dem Fachmann wohlbekannten Methoden und Mitteln, die unten beschrieben sind, chemisch synthetisiert werden. Ruf diese Weise hergestellte Peptide umfassen zwischen 3 und 100 Aminosäurereste und sind kovalent mit einer radioisotopen komplexifizierenden Einheit verbunden, wobei die komplexifizierende Gruppe ein Radioisotop bindet. Eine geeignete Menge Peptid wird in ein Vial gegeben, das ein Reduktionsmittel wie z. B. Zinn(II)-Chlorid in einer Menge enthält, die zur Markierung des Peptids mit Tc-99m ausreichend ist. Dabei kann auch eine geeignete Menge eines der beschriebenen Transferliganden (wie z. B. Tartrat, Citrat, Gluconat oder Mannit) vorliegen. Erfindungsgemäße, mit Technetium-99m markierte Peptide können durch Zugabe einer geeigneten Menge an Tc-99m oder Tc-99m-Komplex in die Vials und Umsetzung unter den nachfolgend in Beispiel 2 beschriebenen Bedingungen hergestellt werden.

[0049] Die durch die vorliegende Erfindung bereitgestellten radioaktiv markierten Peptide weisen eine geeignete Menge Radioaktivität auf. Bei der Darstellung von radioaktiven anionischen Tc-99m-Komplexen werden im allgemeinen bevorzugt radioaktive Komplexe in Lösungen gebildet, die Radioaktivität in Konzentrationen von ungefähr 0,01 M Millicurie (mCi) bis 100 mCi pro ml enthalten.

[0050] Die durch die vorliegende Erfindung bereitgestellten, mit Technetium markierten Peptide können zur Abbildung von Entzündungsherden einschließlich Geschwüren und okkulten Infektionsherden verwendet werden. Die durch die vorliegende Erfindung bereitgestellten, mit Tc-99m markierten Peptide lassen sich auch zum Sichtbarmachen von durch Gewebeischämie verursachten Entzündungsherden, einschließlich Erkrankungen wie Reizkollon und Arthritis, anwenden. Gemäß der vorliegenden Erfindung werden die mit Technetium-99m markierten Peptide bzw. anionischen Komplexe entweder als Komplex oder als Salz mit einem pharmazeutisch unbedenklichen Kation als injizierbare Einzeldosis verabreicht. Erfindungsgemäß kann man nach der radioaktiven Markierung zur Herstellung der injizierbaren Lösung zur diagnostischen Abbildung verschiedener Organe, Tumore und dergleichen einen beliebigen der dem Fachmann bekannten herkömmlichen Träger wie sterile Kochsalzlösung oder Plasma verwenden. Im allgemeinen weist die zu verabreichende Einzeldosis eine Radioaktivität von ungefähr 0,01 mCi bis ungefähr 100 mCi, vorzugsweise von 1 mCi bis 20 mCi, auf. Die als Einzeldosis zu injizierende Lösung hat ein Volumen von ungefähr 0,01 ml bis ungefähr 10 ml. Nach der intravenösen Verabreichung kann die Abbildung des Organs bzw. Tumors in vivo innerhalb von wenigen Minuten durchgeführt werden. Falls gewünscht, kann die Abbildung jedoch auch erst nach einigen Stunden oder noch länger nach Injektion des radioaktiv markierten Reagens in den Patienten durchgeführt werden. In den meisten Fällen wird sich eine zur Aufnahme von Szintiphotos ausreichende Menge der verabreichten Dosis innerhalb von ungefähr 0,1 Stunden in der abzubildenden Gegend angereichert haben. Erfindungsgemäß kann man jede

herkömmliche Methode zur szintigraphischen Abbildung für diagnostische Zwecke einsetzen.

[0051] Die von der Erfindung bereitgestellten, mit Technetium markierten Peptide und Komplexe können intravenös in einem beliebigen herkömmlichen Medium zur intravenösen Injektion, wie z. B. einem wässrigen Kochsalzmedium, oder im Blutplasmamedium, verabreicht werden. Ein solches Medium kann weiterhin herkömmliche pharmazeutische Adjuvantien enthalten, wie beispielsweise pharmazeutisch unbedenkliche Salze zum Einstellen des osmotischen Drucks, Puffer, Konservierungsstoffe und dergleichen. Zu den bevorzugten Medien gehören normale Kochsalzlösung und Plasma.

[0052] Die Verfahren zur Herstellung und Markierung dieser Verbindungen sind ausführlicher in den folgenden Beispielen dargestellt. In diesen Beispielen werden gewisse Aspekte des oben beschriebenen Verfahrens und vorteilhafte Ergebnisse erläutert. Diese Beispiele dienen lediglich zur Erläuterung und stellen keine Einschränkung der Erfindung dar.

BEISPIEL 1

Festphasen-Peptidsynthese

[0053] Die Festphasen-Peptidsynthese (FPPS) wurde im 0,25-Millimol(mMol)-Maßstab mit einem Applied Biosystems Model 431A-Peptidsynthesizer durchgeführt, wobei das Amino-Ende mit 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) geschützt wurde, die Kupplung mit Dicyclohexylcarbodiimid/Hydroxybenzotriazol oder 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat/Hydroxybenzotriazol (HBTU/HOBT) durchgeführt wurde und ein p-Hydroxymethylphenoxy-methylpolystyrol(HMP)-Harz für Säuren am Carboxylende bzw. ein Rink-Amidharz für Amide am Carboxyl-Ende eingesetzt wurde. Harzgebundene Produkte wurden routinemäßig mittels 1,5-3 h langer Behandlung mit einer aus Trifluoressigsäure Wasser, Thioanisol, Ethandithiol und Triethylsilan im Verhältnis von 100 : 5 : 5 : 2,5 : 2 bestehenden Lösung bei Raumtemperatur abgespalten. N- α -Formylgruppen wurden gegebenenfalls entweder durch 2stündige Behandlung des freien N-Terminus eines an das Harz gebundenen Peptids mit Ameisensäureanhydrid in Dichlormethan bei 0°C oder durch Behandeln des abgespaltenen, entschützten Peptids mit Essigsäureanhydrid in 98%iger Ameisensäure eingeführt. N- α -Acetylgruppen wurden gegebenenfalls durch 30minütige Behandlung der freien N-terminalen Aminosäure des harzgebundenen Peptids mit 20% (v/v) Essigsäureanhydrid in NMP eingeführt. Die „Pica“-Gruppe wurde gegebenenfalls durch Konjugieren von Picolylamin mit einer Peptidvorstufe unter Anwendung von Diisopropylcarbodiimid und N-Hydroxysuccinimid eingeführt. N-terminale [BAT]-Gruppen wurden gegebenenfalls durch Behandlung der freien N-terminalen Aminogruppen des Peptids mit N⁶,N⁹-Bis(2-methyl-2-triphenylmethylthiopropyl)-N⁶-(t-butoxycarbonyl)-6,9-diazanonansäure-Nhydroxysuccinimidester eingeführt.

[0054] BSME-Addukte wurden gegebenenfalls durch Umsetzung von Pept den, die einen einzelnen Thiol enthielten (5 bis 50 mg/ml in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8) mit 0,5 Moläquivalenten BMME (Bismaleimido-methylether), vorgelöst bei Raumtemperatur in Acetonitril, über ungefähr 1 bis 18 Stunden, dargestellt. Die Lösung wurde eingeeengt und das Produkt wurde durch HPLC gereinigt.

[0055] Die rohen Peptide wurden durch präparative Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) unter Verwendung einer Waters Delta-Pak C18-Säule und Gradientenelution mit 0,1% TFR in Wasser, modifiziert mit Acetonitril, gereinigt. Nach der Elution von der Säule wurde das Acetonitril aus den eluierten Fraktionen abgedampft, und die Fraktionen wurden dann lyophilisiert. Die Identität des jeweiligen Produktes wurde durch Fast Atom Bombardment-Massenspektroskopie (FABMS) oder Elektrospray-Massenspektroskopie (ESMS) bestätigt.

BEISPIEL 2

Allgemeines Verfahren zur radioaktiven Markierung mit Tc-99m

[0056] 0,1 mg eines wie in Beispiel 1 hergestellten Peptids wurden in 0,1 ml 0,05 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) gelöst. Tc-99m-Gluceptat wurde durch Rekonstitution eines Glucoscan-Vials (E.I. DuPont de Nemours, Inc.) mit 1,0 ml Tc-99m-Natriumpertechnetat, enthaltend bis zu 200 mCi, und anschließendes Stehenlassen bei Raumtemperatur für 15 Minuten dargestellt. 25 μ l Tc-99m-Gluceptat wurden dann zum Peptid gegeben, und nach 15-bis 30minütiger Reaktion bei Raumtemperatur oder 100°C wurde die Mischung über einen 0,2- μ m-Filter filtriert.

[0057] Die Reinheit des mit Tc-99m markierten Peptids wurde durch HPLC unter Anwendung einer analytischen Vydak 218TP54- (RP-18, 5 Mikron, 220 \times 4,6 mm) oder Waters Delta-Pak- (RP-18, 5 Mikron, 150 \times 3,9 mm) Säule und Elution wie in der Fußnote zu Tabelle 1 beschrieben bestimmt. Radioaktive Komponente wurden durch einen radiometrischen in-line-Detektor, der mit einem integrierenden Rekorder verbunden war, nachgewiesen. Unter diesen Bedingungen eluieren Tc-99m-Gluceptat und Tc-99m-Natriumpertechnetat zwi-

schen 1 und 4 Minuten, während das mit Tc-99m markierte Peptid erst sehr viel später eluiert.

[0058] Die folgende Tabelle veranschaulicht gelungene Tc-99m-Markierungen von nach Beispiel 1 dargestellten Peptiden unter Verwendung des hier beschriebenen Verfahrens. Besondere Anwendungen der Methode sind wie folgt: HPLC-Methoden (in der folgenden Tabelle durch hochgestellte Zahlen nach R_f angegeben):

Methode 1: Brownlee-Säule 100% A bis 100% B_{70} in 10 min

Methode 2: Vydak-Säule 100% A bis 100% B_{90} in 10 min

Methode 3: Vydak-Säule 100% A bis 100% B_{70} in 10 min

Methode 4: Waters-Säule 100% A bis 100% B_{90} in 10 min

Methode 5: Waters-Säule 100% A bis 100% B_{90} in 20 min

wobei: Lösungsmittel A = 0,1% CF_3COOH/H_2O

Lösungsmittel B_{70} = 0,1% $CF_3COOH/70\% CH_3CN/H_2O$

Lösungsmittel B_{90} = 0,1% $CF_3COOH/90\% CH_3CN/H_2O$

Lösungsmittel-Fließgeschwindigkeit = 1 ml/min

[0059] Vydak-Säule = 218TP54 RP-18, 5 μ , 220 mm \times 4,6 mm analytische Säule

Brownlee-Säule = Spheri-5, RP-18, 5 μ , 220 mm \times 4,6 mm Säule

Waters-Säule = DeltaPak RP-18, 5 μ , 150 mm \times 3,9 mm analytische Säule

<u>Peptidreagenzien</u>	<u>FABMS MH⁺</u>	<u>radiochemische Ausbeute</u>	<u>HPLC R_f(min)</u>
$C_{Mob}GC_{Acm} PLYKKIKKLLLES$	2028	97%	gebunden
<i>formyl</i> . $MLFC_{Acm}GC_{Acm}$	843	100%	11.1,11.9 ¹
$C_{Acm}GC_{Acm}(VGVAPG)_3$ amid	1865	100%	17.7 ¹
<i>formyl</i> . $MIFLC_{Acm}GC_{Acm}$	957	100%	11.4 ¹
$C_{Acm}GC_{Acm}TKPR$	906.5	100%	16.1 ¹
<i>formyl</i> . $MLFC_{Acm}G.Pica$	760	100%	10.9,12.2 ¹
<i>formyl</i> . $Nle.LF.Nle.YKC_{Acm}GC_{Acm}$	1230	97%	15.6-16.8 ²
$Pic.GC_{Acm}(VGVAPG)_3$ amid	1795	92%	12.4 ²
$Pic.GC_{Acm}(VPGVG)_3$ amid	1992	100%	12.0 ¹
$Pic.GC_{Acm} PLYKKIKKLLLES$	1910	81%	12.9,13.3 ³
$C_{Acm}GC_{Acm}GGPLYKKIKKLLLES$	2093	96%	12.6 ³
<i>p</i> $Gl u.GVNDNEEGFFSARC_{Acm}GC_{Acm}$ amid	1957	95%	16.3,16.7 ³
$PicGC_{Acm}GHRPLDKKREEAPSLRPAPPISGGYR$	3377	94%	11.3 ³
$(VPGVG)_3GGGC_{Acm}GC_{Acm}$ amid	2231	67%	11.2,11.5 ³
$(VGVAPG)_3GGGC_{Acm}GC_{Acm}$ amid	2035	33%	10.6 ³
$Ac.C_{Acm}GC_{Acm}GGG(VPGVG)_3$ amid	2275	97%	9.6,9.9 ³
$Ac.C_{Acm}GC_{Acm}.Aca.(VPGVG)_3$ amid	2216	76%	11.6,12.3 ³

<u>Peptidreagenzien</u>		FABMS MH ⁺	radiochemische Ausbeute	HPLC R _d (min)
Ac.CGGGPLYKKIkkLLES		1889	83 %	14.1-21.8 ²
Pic.GC(VGVAPG) ₃ amid		1724	100 %	17.4 ²
pGlu.GVNDNEBGFSSARGGCamid		1768 [*]	94 %	16.6,12.4 ²
Ac.(LKKL) ₃ GC _{Acm} amid		2878	63 %	17.0-18.0 ²
[BAT]GGPLYKKIkkLLES		2006	94 %	9.5 ⁴
[BAT]GHRPLDKKREEAPSLRPAPPISGGGYRamid		3357	93 %	10.4,11.6 ²
formyl.MLFK.[BAT].amid		884	99 %	12.6 ²
formyl.Thp.LF.[BAM]		775 ^{**}	99 %	13.3,13.6 ²
Ac.KKKKCC _{Acm} GC _{Acm} GGPLYKKIkkLLES		2776	98 %	10.2,11.3 ⁴
formyl.MLFK.[BAT]		884	96 %	11.9,13.7 ²
[BAT].(VPGVG) ₄ amid		1974	96 %	11.9,12.8 ⁴
formyl.MLFK.[BAT].KKKKKamid		1524	96 %	11.7,12.2 ⁴
formyl.MLFK.[BAT].GSGSamid		1315	97 %	11.9,12.8 ⁴
formyl.MLFK.[BAT].E		1013	99 %	12.3 ⁴
formyl.M.Dpg.F.[BAM]		1354	98 %	13.7 ⁴
formyl.MLFK.[BAT].EGE		1200	98 %	12.1 ⁴

<u>Peptidreagenzien</u>	FABMS MH⁺	radiochemische <u>Ausbeute</u>	HPLC R_t(min)
(<i>formyl</i>).MLFK.[BAT].GGC _{Ac} GC _{Ac} GGCamid) ₂ BSME	3477	99%	11.9, 12.4 ⁴
(Ac.CC _{Ac} GC _{Ac} PLYKKIkkLLES) ₂ BSME	4483	98%	11.6 ⁴
[DTPA]C _{Ac} GC _{Ac} PLYKKIkkLLES	2468	91%	11.4-14.0 ⁴
(Ac.CKkC _{Ac} GC _{Ac} PLYKKIkkLLES) ₂ BSME			
(Ac.CGC _{Ac} GC _{Ac} GGPLYKKIkkLLES) ₂ BSME	4825 [*]	99%	16.2 ⁴
(<i>formyl</i>).MLFK.GGC _{Ac} GC _{Ac} GGCamid) ₂ BSME	2839 [*]		
[BAT].(VGVAPG) ₃ amid	1778	98%	11.4 ⁴
Ac.C _{Ac} GC _{Ac} QAPLYKKIkkLLES	2220	100%	16.6 ⁵
[BAT].KkLLKkLYKKIkkLLES	2533	99%	gebunden ⁴

Ac = Acetyl; andere Abkürzungen wie in der Tabelle zu den „Leukozytenbindenden Peptiden“ oben

* ESMS-Daten (M); ** FABMS-Daten (MNa⁺)

BEISPIEL 3

Szintigraphische Bilderzeugung und biologische Verteilung von Tc-99m-markierten Peptiden

[0060] Zum Nachweis der Wirksamkeit der wie oben zur Verfügung gestellten Tc-99m-markierten Peptidreagenzien wurden weiße Neuseelandkaninchen intramuskulär in der linken Wade mit einem wirksamen E. coli-Stamm injiziert. Nach 24 h wurden die Tiere durch i. m. Injektion von Ketamin und Xylazin beruhigt und dann i. v. mit Tc-99m-markiertem Peptid ($\leq 150 \mu\text{g}$, 2–10 mCi) injiziert. Die Tiere wurden auf dem Rücken in das Gesichtsfeld einer Gammakamera (LEAP-Kollimator/auf den Photopeak von Tc-99m eingestellt) gelegt und über die erste Stunde nach der Injektion abgebildet, und dann über die nächsten drei Stunden nach der Injektion jeweils in Abständen von, ungefähr 1 h. Zwischen den Bildaufnahmen konnten sich die Tiere erholen und wurden dann gegebenenfalls wieder betäubt.

[0061] Nach Aufnahme des letzten Bildes wurden die Tiere jeweils durch eine Überdosis von Phenobarbital i.v. getötet und zur Entnahme von Blutproben und Proben von infiziertem Muskelgewebe und Kontrollmuskelgewebe seziiert. Die Gewebeproben wurden gewogen und zusammen mit einer standardisierten Menge der injizierten Dosis in einem Gammazähler gemessen, und die in den Geweben verbliebene prozentuale injizierte Dosis (pro Gramm Gewebe) wurde bestimmt. Für jedes Peptid wurden die prozentualen Verhältnisse von injizierter Dosis pro Gramm infiziertem Muskelgewebe im Vergleich zu nicht infiziertem Muskelgewebe und von infiziertem Muskelgewebe im Vergleich zu Blut berechnet. Diese Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Szintigraphische Photos des gesamten Körpers und Bilder der Läufe eines mit einem erfindungsgemäßen, mit Tc-99m markierten Reagens mit der Formel

acetylKKKKKC_{Ac^m}GC_{Ac^m}GGPLYKKIIKKLLES

injizierten Kaninchens sind in **Abb. 1** gezeigt.

<u>Peptidreagenzien</u>	Infizierter Muskel (%ID/g)	Kontroll-muskel (%ID/g)	Verhältnis infiziert/Kontrolle	Blut (%ID/g)	Verhältnis infiziert/Blut
Ac.C _{Acm} GC _{Acm} GGG(VPGVG) ₄ amid	0,0306	0,0077	3,97	0,049	0,63
Ac.CGGGPLYKIKIKLLES	0,0235	0,0050	4,70	0,032	0,74
formyl.MLFK.[BAT] amid	0,0215	0,0028	7,68	0,006	3,58
pGlu.GVNDNEEGFFSARC _{Acm} GC _{Acm} amid	0,0165	0,0029	5,68	0,024	0,68
formyl.M.Dpg.F.[BAM]	0,0106	0,0007	15,14	0,003	3,53
PicGC(VGVAPG) ₃ amid	0,0106	0,0019	5,58	0,015	0,69
(Ac.CC _{Acm} GC _{Acm} PLYKIKIKLLES) ₂ BSME	0,0082	0,0011	7,45	0,010	0,84
C _{Acm} GC _{Acm} (VGVAPG) ₃ amid	0,0067	0,0017	3,94	0,011	1,69
C _{Acm} GC _{Acm} TKPR	0,0060	0,0025	2,40	0,003	2,07
Ac.KKKKCC _{Acm} GC _{Acm} GGPLYKIKIKLLES	0,0061	0,0019	5,60	0,006	0,93
formyl.Thp.LF.[BAM]	0,0048	0,0010	4,80	0,006	0,83
[BAT].(VPGVG) ₄ amid	0,0032	0,0006	5,33	0,002	1,68
[BAT].GGPLYKIKIKLLES	0,0021	0,0003	7,00	0,004	0,50

(%ID/g) = Prozent der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe; andere Abkürzungen wie in den vorhergehenden Tabellen.

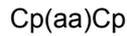
[0062] Es versteht sich, daß in der vorhergehenden Offenbarung bestimmte spezifische Ausführungsformen der Erfindung hervorgehoben werden, und daß alle entsprechenden Modifikationen bzw. Alternativen dem Sinn der Erfindung entsprechen und in deren Schutzbereich der Erfindung, so wie er in den beigefügten An-

sprüchen definiert ist, fallen.

Patentansprüche

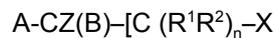
1. Reagens zur Herstellung eines szintigraphischen bilderzeugenden Mittels zur Abbildung von Entzündungsherden im Körper eines Säugetieres, umfassend ein Peptid, das sich spezifisch an Leukozyten bindet und kovalent mit einer einen radioaktiven Technetium-99m-Marker bindenden Einheit verbunden ist, wobei die den radioaktiven Technetium-99m-Marker bindende Einheit eine aus:

I.



wobei Cp für ein geschütztes Cystein und (aa) für eine Aminosäure steht;

II.



wobei A für H, HOOC, H₂NOC, (Peptid)-NHOC, (Peptid)-OOC oder R⁴ steht;

B für H, SH, -NHR³, -N(R³) – (Peptid) oder R⁴ steht;

X für H, SH, -NHR³, -N(R³) – (Peptid) oder R⁴ steht;

Z für H oder R⁴ steht;

R¹, R², R³ und R⁴ unabhängig voneinander für N oder niederes geradkettiges oder verzweigtes oder cyclisches Alkyl stehen;

n für 0, 1 oder 2 steht;

und, wenn B für -NHR³ oder -N(R³) – (Peptid) steht, X für SH und n für 1 oder 2 steht; wenn X für -NHR³ oder -N(R³) – (Peptid) steht, B für SH und n für 1 oder 2 steht;

wenn B für H oder R⁴ steht, A für HOOC, H₂NOC, (Peptid)-NHOC oder (Peptid)-OOC, X für SH und n für 0 oder 1 steht;

wenn A für H oder R⁴ steht, im Fall, daß B für SH steht, X für -NHR³ oder -N(R³)-(Peptid) steht, und, im Fall, daß X für SH steht, B für -NHR³ oder -N(R³) – (Peptid) steht;

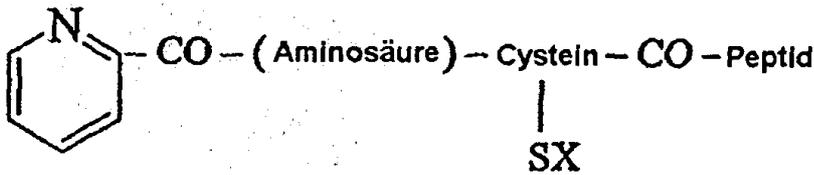
wenn X für H oder R⁴ steht, A für HOOC, H₂NOC, (Peptid)-NHOC oder (Peptid)-OOC und B für SH steht;

wenn Z für Methyl steht, X für Methyl, A für HOOC, H₂NOC, (Peptid)-NHOC oder (Peptid)-OOC, B für SH und n für 0 steht;

wenn B für SH und X für SH steht, n nicht für 0 steht;

und wobei die Thioleinheit in reduzierter Form vorliegt;

III.

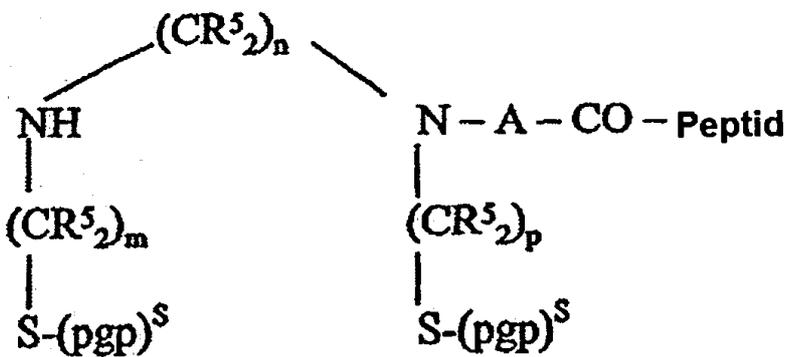


IV.



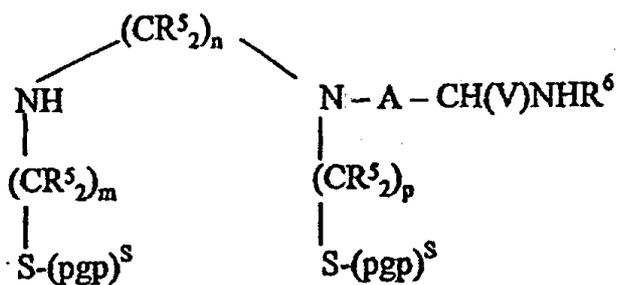
wobei X = H oder eine Schutzgruppe;
 (Aminosäure) = eine beliebige Aminosäure;

V.



wobei die Reste R^5 jeweils unabhängig voneinander für H, CH_3 oder C_2H_5 stehen;
 die Reste $(\text{pgp})^s$ jeweils unabhängig voneinander für eine Thiol-Schutzgruppe oder H stehen;
 m, n und p unabhängig voneinander für 2 oder 3 stehen;
 A = geradkettiges oder cyclisches niederes Alkyl, Aryl, Heterocyclyl, Kombinationen oder substituierte Derivate davon;

VI.



wobei die Reste R⁵ jeweils unabhängig voneinander für H, niederes Alkyl mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, Phenyl oder durch niederes Alkyl oder niederes Alkoxy substituiertes Phenyl stehen;

m, n und p unabhängig voneinander für 1 oder 2 stehen;

A = geradkettiges oder cyclisches niederes Alkyl, Aryl, Heterocyclyl, oder Kombinationen oder substituierte Derivate davon;

V = H oder -CO-Peptid;

R⁶ = H oder Peptid;

und wobei, wenn V = H, R⁶ – Peptid und, wenn R⁶ = H, V = -CO-Peptid, und wobei die den radioaktiven Marker bindende Einheit einen Komplex mit einem Radioisotop bildet und der Komplex elektrisch neutral ist;

ausgewählte Formel aufweist,

mit der Maßgabe, daß, wenn die den radioaktiven Technetium-99m-Marken bindende Einheit die Formel Cp(aa)Cp aufweist, wobei Cp für geschütztes Cystein und (aa) für eine Aminosäure steht, das spezifisch bindende Peptid nicht die Aminosäuresequenz

– PLYKKIICKLLES;

– formyl.Nle.LF.Nle.YK;

– formyl.MIFL;

– formyl.MLFK;

– formyl.MLFI;

– formyl.MFIL;

– formyl.MFLI;

– formyl.MLIF;

– formyl.MILF;

– formyl MLF;

– VGVAPG;

– VGVAPGVGVAPGVGVAPG;

– VPGVGVPGVGVPGVGVPGVG;

– TKPR;

enthält.

2. Reagens nach Anspruch 1, wobei das spezifisch bindende Peptid und die den radioaktiven Technetium-99m-Marker bindende Einheit über eine oder mehrere Aminosäuren kovalent verbunden sind.

3. Reagens nach Anspruch 1, wobei das Peptid aus der aus Plättchenfaktor 4, einem Derivat von Plättchenfaktor 4, formylMLF, formylNle.LF.Nle, einem Derivat von formylMLF, einem Derivat von formylNle.LF.Nle, Tuftsin, einem Derivat von Tuftsin, Fibrinopeptid B, der β -Kette von Fibrinogen B, einem Derivat von Fibrinopeptid B und einem Derivat der β -Kette von Fibrinogen B ausgewählt ist.

4. Reagens nach Anspruch 3 mit einer Formel ausgewählt aus der aus:

Pic.GC_{Acem}PLYKKIIKKLLLES;
***acetyl*.CGGGPLYKKIIKKLLLES;**
[BAT].GGPLYKKIIKKLLLES;
***acetyl*.KKKKKC_{Acem}GC_{Acem}GGPLYKKIIKKLLLES;**
[DTPA].C_{Acem}GC_{Acem}PLYKKIIKKLLLES;
[BAT].KKLLKKLYKKIIKKLLLES;
***Ac*.C_{Acem}GC_{Acem}QAPLYKKIIKKLLLES;**

***formyl*.MLFC_{Acem}GPica;**
***formyl*.MLFK.[BAT].Amid;**
***formyl*.Thp.LF.[BAM];**
***formyl*.MLFK.[BAT];**
***formyl*.MLFK.[BAT].KKKKK.Amid;**
***formyl*.MLFK.[BAT].GSGS.Amid;**
***formyl*.MLFK.[BAT].E;**
***formyl*.M.Dpg.F.[BAM];**
***formyl*.MLFK.[BAT].EGE;**

C_{Acem}GC_{Acem}(VGVAPG)₃Amid;
Pic.GC_{Acem}(VGVAPG)₃Amid;
Pic.GC_{Acem}(VPGVG)₄Amid;
(VPGVG)₄GGGC_{Acem}GC_{Acem}Amid;
(VGVAPG)₃GGGC_{Acem}GC_{Acem}Amid;
***acetyl*.C_{Acem}GC_{Acem}GGG(VPGVG)₄Amid;**
***acetyl*.C_{Acem}GC_{Acem}.Aca.(VPGVG)₄Amid;**
Pic.GC(VGVAPG)₃Amid;
[BAT].(VGVAPG)₃Amid;
[BAT].(VPGVG)₄Amid;

***p*Glu.GVNDNEEGFFSARC_{Acem}GC_{Acem}Amid;**
***p*Glu.GVNDNEEGFFSARGGC.Amid;**
Pic.GC_{Acem}GHRPLDKKREEAPSLRPAPPISGGGYR;
[BAT].GHRPLDKKREEAPSLRPAPPISGGGYR.Amid .

bestehenden Gruppe.

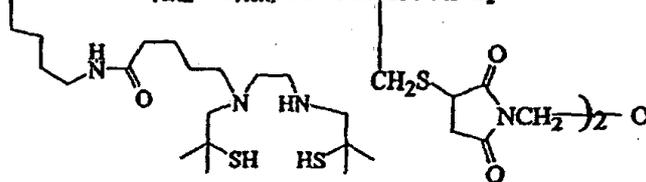
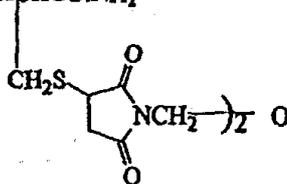
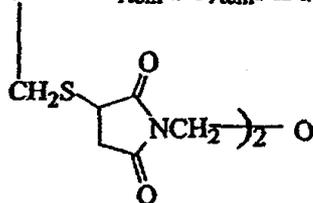
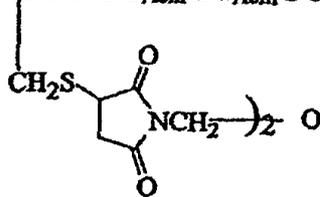
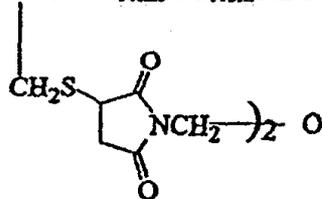
5. Reagens nach Anspruch 1, enthaltend

- a) eine Vielzahl von Leukozyten bindenden Peptiden;
- b) eine Vielzahl von radioaktiven Technetium-99m-Marker bindenden Einheiten; und

c) eine polyvalente Verbindungseinheit;

wobei die polyvalente Verbindungseinheit kovalent mit der Vielzahl an Peptiden, den den radioaktiven Technetium-99m-Marker bindenden Einheiten oder beiden verbunden ist, so daß man ein multimeres polyvalentes Reagens erhält, wobei das Molekulargewicht des multimeren polyvalenten Reagens weniger als etwa 2000 Dalton beträgt; wobei die polyvalente Verbindungseinheit aus der aus Bis-succinimidylmethylether, 4-(2,2-Dimethylacetyl)benzoesäure; Tris(succinimidylethyl)amin, einem Derivat von Bis-succinimidylmethylether, einem Derivat von 4-(2,2-Dimethylacetyl)benzoesäure und einem Derivat von Tris(succinimidylethyl)amin bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

6. Reagens nach Anspruch 5, mit einer Formel ausgewählt aus der aus:



bestehenden Gruppe.

7. Szintigraphisches bilderzeugendes Mittel, umfassend das Reagens nach einem der Ansprüche 1 bis 6, radioaktiv mit Technetium-99m markiert.

8. Komplex, gebildet durch (a) Umsetzung eines Reagens nach einem der Ansprüche 1 bis 6 mit Technetium-99m in Gegenwart eines Reduktionsmittels, vorzugsweise eines aus der aus einem Dithionion, einem Zinn(II)-Ion und einem Eisen(II)-Ion bestehenden Gruppe, oder (b) Markieren des Reagens nach einem der Ansprüche 1 bis 6 mit Technetium-99m durch Ligandenaustausch eines vorreduzierten Technetium-99m-Komplexes.

9. Kit zur Herstellung einer radiopharmazeutischen Zubereitung, wobei das Kit ein verschlossenes Vial mit einer vorbestimmten Menge eines Reagens nach einem der Ansprüche 1 bis 6 und eine zur Markierung des Reagens mit Technetium-99m ausreichende Menge eines Reduktionsmittels enthält.

10. Verfahren zur Herstellung eines Reagens nach Anspruch 1, bei dem man das Reagens chemisch in vitro synthetisiert, wobei das spezifisch bindende Peptid vorzugsweise durch Festphasenpeptidsynthese synthetisiert wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10, bei dem die den radioaktiven Marker bindende Einheit während der chemischen in-vitro-Synthese kovalent mit dem spezifisch bindenden Peptid verbunden wird; wobei die den radioaktiven Marker bindende Einheit vorzugsweise während einer Festphasenpeptidsynthese kovalent mit dem spezifisch bindenden Peptid verbunden wird.

12. Verfahren zum Markieren eines Reagens nach Anspruch 1, bei dem man das Reagens in Gegenwart eines Reduktionsmittels, das vorzugsweise aus der aus einem Dithionion, einem Zinn(II)-Ion und einem Eisen(II)-Ion bestehenden Gruppe ausgewählt ist, mit Technetium-99m umsetzt.

13. Komplex nach Anspruch 8 zur Verwendung bei der Abbildung von Entzündungsherden im Körper eines Säugetieres.

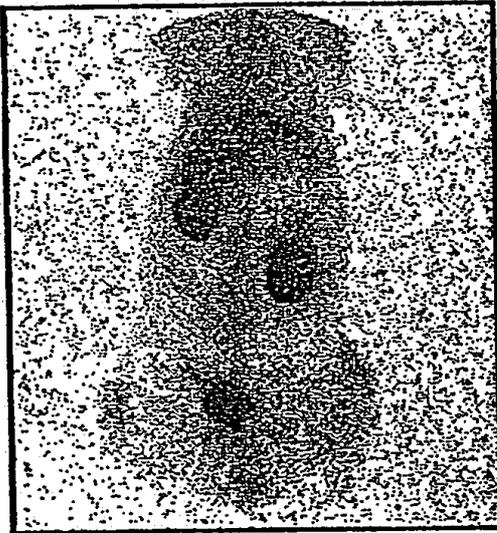
14. Verwendung der Reagens nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung eines Diagnostikums für die Abbildung von Entzündungsherden im Körper eines Säugetieres.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

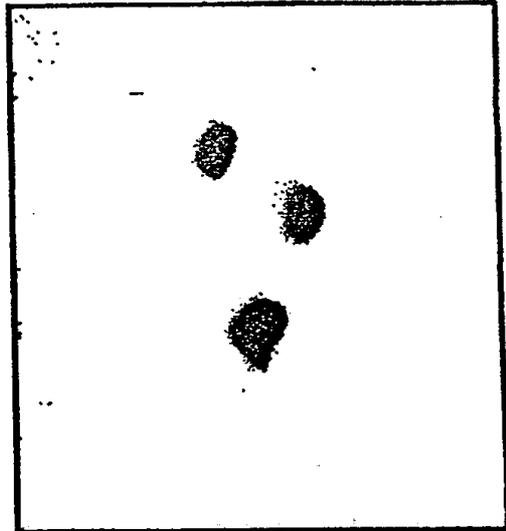
Anhängende Zeichnungen

Oberer Torso

30 Minuten



4 Stunden

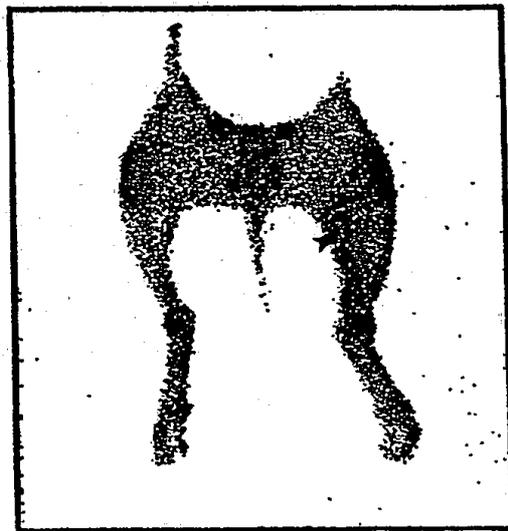


Unterschenkel (Infektion im linken Bein)

30 Minuten



4 Stunden



FIGUR 1