



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 06 100 T2 2004.07.01**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 180 121 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 06 100.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/13563**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 930 796.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/69911**

(86) PCT-Anmeldetag: **17.05.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **23.11.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **20.02.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **22.10.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **01.07.2004**

(51) Int Cl.⁷: **C07K 14/605**

C07K 14/575, A61K 38/26, A61P 3/08

(30) Unionspriorität:

| | | |
|-----------------|-------------------|-----------|
| 134406 P | 17.05.1999 | US |
| 159783 P | 15.10.1999 | US |

(73) Patentinhaber:

Conjuchem, Inc., Montreal, Quebec, CA

(74) Vertreter:

LOUIS, PÖHLAU, LOHRENTZ, 90409 Nürnberg

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**BRIDON, P., Dominique, Outremont, CA;
L'ARCHEVEQUE, Benoit, Laval, CA; EZRIN, M.,
Alan, Moraga, US; HOLMES, Darren L., Anaheim,
US; LEBLANC, Anouk, Suite 3950, Montreal,
Quebec H2X 3Y8, CA; ST. PIERRE, Serge, Ile
Bizard, CA**

(54) Bezeichnung: **LANG WIRKENDE INSULINOTROPE PEPTIDE**

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**Gebiet der Erfindung**

[0001] Die Erfindung betrifft modifizierte insulinotrope Peptide. Insbesondere betrifft die Erfindung modifizierte, glucagonartige Peptide und Exendinpeptide mit langer Wirkungsdauer zur Behandlung von Diabetes und anderen, mit insulinotropen Peptiden in Zusammenhang stehenden Krankheiten, gastrointestinalen Funktionen und mit dem Glucagonspiegel im Zusammenhang stehenden Aktivitäten.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Das insulinotrope Peptidhormon "glucagonartiges Peptid" (GLP-1) wird als mögliches therapeutisches Mittel zur Behandlung des nichtinsulinabhängigen Diabetes mellitus vom Typ II sowie von damit in Zusammenhang stehenden Stoffwechselstörungen, wie Fettleibigkeit, in Verbindung gebracht. Zu weiteren wertvollen insulinotropen Peptiden gehören Exendin-3 und Exendin-4. Obgleich GLP-1, Exendin-3 und Exendin-4 wertvolle Mittel darstellen, sind sie mit dem Nachteil einer begrenzten Wirkungsdauer in Verbindung mit kurzen in vivo-Plasmahalbwertszeiten behaftet, hauptsächlich aufgrund der raschen Serum-Clearance und des proteolytischen Abbaus. Das für den Abbau von GLP-1 verantwortliche Enzym, nämlich Dipeptidyl-peptidase IV, wurde identifiziert. Es wurden eingehende Forschungsarbeiten mit dem Ziel durchgeführt, die Peptidase zu hemmen oder GLP-1 so zu modifizieren, dass sein Abbau unter Aufrechterhaltung seiner biologischen Aktivität verlangsamt wird. Trotz dieser umfangreichen Anstrengungen konnte bisher kein aktives GLP-1 mit langer Wirkungsdauer hergestellt werden. Unter Diabetikern besteht ein enormes Bedürfnis nach verbesserten GLP-1-, Exendin-3- und Exendin-4-Peptiden.

[0003] Es besteht somit ein Bedürfnis, GLP-1, Exendin-3, Exendin-4 und andere insulinotrope Peptide so zu modifizieren, dass sie eine längere in vivo-Wirkungsdauer aufweisen, während ihre geringe Toxizität und ihre therapeutischen Vorteile beibehalten werden.

Zusammenfassende Darstellung der Erfindung

[0004] Zur Befriedigung dieser Bedürfnisse ist die vorliegende Erfindung auf modifizierte insulinotrope Peptide (ITPs) abgestellt. Die Erfindung betrifft neuartige, chemisch reaktive Derivate von insulinotropen Peptiden, die mit verfügbaren funktionellen Gruppen an zellulären Trägern, einschließlich mobilen Blutproteinen, unter Ausbildung von kovalenten Bindungen reagieren können. Speziell betrifft die Erfindung neuartige, chemisch reaktive Derivate von insulinotropen Peptiden, wie dem glucagonartigen Peptid (GLP) und Exendin-3 und Exendin-4, die mit verfügbaren funktionellen Gruppen an mobilen Blutproteinen unter Bildung von kovalenten Bindungen reagieren können. Die Erfindung betrifft ferner neuartige, chemisch reaktive Derivate oder Analoge von insulinotropen Peptiden, die mit verfügbaren funktionellen Gruppen an mobilen Blutproteinen unter Bildung von kovalenten Bindungen reagieren können.

[0005] Die vorliegende Erfindung betrifft modifizierte insulinotrope Peptide, die eine reaktive Gruppe umfassen, die mit Aminogruppen, Hydroxylgruppen oder Thiolgruppen an Blutverbindungen unter Bildung von stabilen kovalenten Bindungen reagiert.

[0006] Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein insulinotropes Hormon, das ein modifiziertes Fragment von GLP-1 umfasst, und Derivate davon, insbesondere GLP-1(7-36)-Amid. Ferner betrifft die Erfindung die therapeutische Verwendung derartiger Verbindungen und insbesondere die Verwendung von modifiziertem GLP-1(7-36)-Amid zur Behandlung von im reifen Alter einsetzenden Diabetes mellitus (Typ II-Diabetes).

[0007] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner modifizierte Exendin-3- und Exendin-4-Fragmente und die therapeutische Verwendung derartiger Verbindungen.

[0008] Insbesondere ist die Erfindung abgestellt auf: GLP-1(1-36)-Lys³⁷(ε-MPA)-NH₂; GLP-1(1-36)-Lys³⁷(ε-AAEA-AEEA-MPA)-NH₂; GLP-1(7-36)-Lys³⁷(ε-MPA)-NH₂; GLP-1(7-36)-Lys³⁷(ε-AAEA-AEEA-MPA)-NH₂; D-Ala⁸-GLP-1(7-36)-Lys³⁷(ε-MPA)-NH₂; Exendin-4(1-39)-Lys⁴⁰(ε-MPA)-NH₂; Exendin-4(1-39)-Lys⁴⁰(ε-AAEA-AEEA-MPA)-NH₂; Exendin-3(1-39)-Lys⁴⁰(ε-MPA)-NH₂; Exendin-3(1-39)-Lys⁴⁰(ε-AAEA-AEEA-MPA)-NH₂; Lys²⁶(ε-MPA)GLP-1(7-36)-NH₂; GLP-1(7-36)-EDA-MPA; und Exendin-4(1-39)-EDA-MPA.

[0009] Die Erfindung betrifft ferner Zusammensetzungen, die die Derivate der insulinotropen Peptide enthalten, und die Verwendung der Zusammensetzungen zur Behandlung von Diabetes beim Menschen.

[0010] Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Verstärkung der Expression von Insulin, das die Versorgung einer Säugetier-Pankreas-Inselzelle vom Betatyp mit einer wirksamen Menge der vorstehend beschriebenen modifizierten, insulinotropen Peptide umfasst.

[0011] Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Behandlung von in reifem Alter einsetzenden Diabetes mellitus, das die Verabreichung einer wirksamen Menge der vorstehend beschriebenen insulinotropen Peptide

an einen Patienten, der einer derartigen Behandlung bedarf, umfasst.

[0012] Die Erfindung betrifft ferner die Behandlung weiterer, mit insulinotropem Peptid in Zusammenhang stehenden Krankheiten und Zustände mit den erfindungsgemäßen modifizierten, insulinotropen Peptiden.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

Definitionen

[0013] Um ein volles Verständnis der Erfindung zu gewährleisten, werden die folgenden Definitionen gegeben.

[0014] Insulinotrope Peptide: Insulinotrope Peptide (ITPs) sind Peptide mit insulinotroper Aktivität. Insulinotrope Peptide stimulieren (oder bewirken die Stimulation) die Synthese oder Expression des Hormons Insulin. Zu derartigen Peptiden gehören Vorläufer, Analoge und Fragmente von Peptiden, die glucagonartiges Peptid, Exendin-3 und Exendin-4 und andere Peptide mit insulinotroper Aktivität umfassen.

[0015] Glucagonartiges Peptid: Glucagonartiges Peptid (GLP) und GLP-Derivate sind intestinale Hormone, die im allgemeinen die Insulinsekretion während der Hyperglykämie stimulieren, die Glucagonsekretion unterdrücken, die Biosynthese von (Pro)-insulin stimulieren und die gastrische Entleerung und Säuresekretion verlangsamen. Einige GLPs und GLP-Derivate fördern die Glucoseaufnahme durch Zellen, stimulieren jedoch nicht die Insulinexpression, wie im US-Patent 5 574 008 (auf das hier Bezug genommen wird) ausgeführt ist.

[0016] Exendin-3- und Exendin-4-Peptide: Exendin-3- und Exendin-4-Peptide und Peptidderivate sind Peptide mit 39 Aminosäuren, die zu etwa 53% homolog zu GLP-1 sind und eine insulinotrope Aktivität besitzen.

[0017] Reaktive Gruppen: Reaktive Gruppen sind chemische Gruppen, die zur Bildung einer kovalenten Bindung befähigt sind. Derartige reaktive Mittel gehen mit einem insulinotropen Peptid von Interesse eine Kuppelung oder Bindung unter Bildung eines modifizierten, insulinotropen Peptids ein. Reaktive Gruppen sind im allgemeinen in wässriger Umgebung stabil. Üblicherweise handelt es sich um Carboxyl-, Phosphoryl- oder geeignete Acylgruppen, entweder in Form von Estern oder gemischten Anhydriden, oder um eine Imidatgruppe, wobei die Möglichkeit zur Bildung einer kovalenten Bindung mit funktionellen Gruppen, wie Aminogruppen, Hydroxylgruppen oder Thiolgruppen, an der Zielstelle von mobilen Blutkomponenten besteht. Größtenteils beinhalten die Ester Phenolverbindungen oder es handelt sich um Thioester, Alkylester, Phosphatester oder dergl. Zu reaktiven Gruppen gehören Succinimidyl- und Maleinimidogruppen.

[0018] Funktionelle Gruppen: Funktionelle Gruppen sind Gruppen an Blutkomponenten, mit denen reaktive Gruppen an modifizierten, insulinotropen Peptiden unter Bildung von kovalenten Bindungen reagieren. Zu funktionellen Gruppen gehören Hydroxylgruppen zur Bindung an reaktive Esterreste; Thiolgruppen zur Bindung an Maleinimide und Maleinimidogruppen, Imidate und Thioestergruppen; Aminogruppen zur Bindung an Carboxyl-, Phosphoryl- oder Acylgruppen an reaktiven Resten und Carboxylgruppen zur Bindung an Aminogruppen. Zu derartigen Blutkomponenten gehören Blutproteine.

[0019] Verknüpfende Gruppen: Verknüpfende Gruppen sind chemische Reste, die reaktive Gruppen mit ITPS verknüpfen oder verbinden. Verknüpfende Gruppen können einen oder mehrere Alkylgruppen, wie Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl und dergl., Alkoxygruppen, Alkenylgruppen, Alkinygruppen oder Aminogruppen umfassen, die durch Alkylgruppen, Cycloalkylgruppen, polycyclische Gruppen, Arylgruppen, Polyarylgruppen, substituierte Arylgruppen, heterocyclische Gruppen und substituierte heterocyclische Gruppen substituiert sind. Verknüpfende Gruppen können auch Polyethoxyaminosäuren umfassen, wie AEA ((2-Amino)-ethoxyessigsäure) oder die bevorzugte verknüpfende Gruppe AEEA ([2-(2-Amino)-ethoxy]-ethoxyessigsäure).

[0020] Blutkomponenten: Blutkomponenten können entweder fixiert oder mobil sein. Fixierte Blutkomponenten sind nicht-mobile Blutkomponenten. Hierzu gehören Gewebe, Membranrezeptoren, interstitielle Proteine, Fibrinproteine, Kollagene, Blutplättchen, Endothelzellen, Epithelzellen und deren assoziierte Membran- und membranartige Rezeptoren, somatische Körperzellen, Skelett- und glatte Muskelzellen, neuronale Komponenten, Osteozyten und Osteoklasten sowie sämtliche Körpergewebe, insbesondere solche, die mit zirkulatorischen und lymphatischen Systemen assoziiert sind. Mobile Blutkomponenten sind Blutkomponenten, die keinen, für einen längeren Zeitraum hinweg (im allgemeinen von nicht mehr als 5 Minuten und üblicherweise nicht mehr als 1 Minute) fixierten Aufenthaltsort aufweisen. Diese Blutkomponenten sind nicht membranassoziiert und im Blut über längere Zeitspannen hinweg vorhanden. Ihre Minimalkonzentration beträgt mindestens 0,1 µg/ml. Zu mobilen Blutkomponenten gehören Serumalbumin, Transferrin, Ferritin und Immunoglobuline, wie IgM und IgG.

[0021] Die Halbwertszeit von mobilen Blutkomponenten beträgt mindestens etwa 12 Stunden.

[0022] Schutzgruppen: Schutzgruppen sind chemische Reste, die zum Schutz von Peptidderivaten gegen eine Reaktion der Derivate untereinander verwendet werden. Verschiedene Schutzgruppen sind hier und im US-Patent 5 493 007 (auf das durch Verweis Bezug genommen wird) beschrieben. Derartige Schutzgruppen umfassen Acetyl, Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc), tert.-Butyloxycarbonyl (BOC), Benzyloxycarbonyl (CBZ) und dergl. Spezielle geschützte Aminosäuren sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1
Natürliche Aminosäuren und deren Abkürzungen

| Bezeichnung | Abkürzung mit drei Buchstaben | Abkürzung mit einem Buchstaben | Geschützte Aminosäuren |
|----------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------|
| Alanin | Ala | A | Fmoc-Ala-OH |
| Arginin | Arg | R | Fmoc-Arg(Pbf)-OH |
| Asparagin | Asn | N | Fmoc-Asn(Trt)-OH |
| Asparaginsäure | Asp | D | Asp(tBu)-OH |
| Cystein | Cys | C | Fmoc-Cys(Trt) |
| Glutaminsäure | Glu | E | Fmoc-Glu(tBu)-OH |
| Glutamin | Gln | Q | Fmoc-Gln(Trt)-OH |
| Glycin | Gly | G | Fmoc-Gly-OH |
| Histidin | His | H | Fmoc-His(Trt)-OH |
| Isoleucin | Ile | I | Fmoc-Ile-OH |
| Leucin | Leu | L | Fmoc-Leu-OH |
| Lysin | Lys | K | Fmoc-Lys(Mtt)-OH |
| Methionin | Met | M | Fmoc-Met-OH |
| Phenylalanin | Phe | F | Fmoc-Phe-OH |
| Prolin | Pro | P | Fmoc-Pro-OH |
| Serin | Ser | S | Fmoc-Ser(tBu)-OH |
| Threonin | Thr | T | Fmoc-Thr(tBu)-OH |
| Tryptophan | Trp | W | Fmoc-Trp(Boc)-OH |
| Tyrosin | Tyr | Y | Boc-Tyr(tBu)-OH |
| Valin | Val | V | Fmoc-Val-OH |

[0023] Empfindliche funktionelle Gruppen: Bei einer empfindlichen funktionellen Gruppe handelt es sich um eine Gruppe von Atomen, die eine potentielle Reaktionsstelle an einem ITP-Peptid darstellt. Falls vorhanden, kann eine empfindliche funktionelle Gruppe als Befestigungsstelle für die Linker-reaktive Gruppenmodifikation gewählt werden. Zu empfindlichen funktionellen Gruppen gehören (ohne Beschränkung hierauf) Carboxyl-, Amino-, Thiol- und Hydroxylgruppen.

[0024] Modifizierte Peptide: Ein modifiziertes ITP ist ein Peptid, das durch Anbringen einer reaktiven Gruppe modifiziert worden ist und das zur Bildung eines Peptidase-stabilisierten Peptids befähigt ist, und zwar durch Konjugation mit Blutkomponenten. Die reaktive Gruppe kann am therapeutischen Peptid entweder über eine verknüpfende Gruppe oder gegebenenfalls ohne eine verknüpfende Gruppe angebracht sein. Es kommt ferner in Betracht, dass eine oder mehrere zusätzliche Aminosäuren an das therapeutische Peptid addiert sind, um das Anbringen der reaktiven Gruppe zu erleichtern.

[0025] Modifizierte Peptide können in vivo verabreicht werden, so dass die Konjugation mit Blutkomponenten in vivo erfolgt, oder sie können zunächst in vitro mit Blutkomponenten konjugiert werden und das erhaltene Peptidase-stabilisierte Peptid (gemäß der nachstehenden Definition) kann in vivo verabreicht werden. Die Ausdrücke "modifiziertes therapeutisches Peptid" und "modifiziertes Peptid" können in der vorliegenden Anmeldung in austauschbarer Weise verwendet werden.

[0026] Peptidase-stabilisiertes ITP: Ein Peptidase-stabilisiertes ITP ist ein modifiziertes Peptid, das mit einer Blutkomponente konjugiert worden ist, und zwar über eine kovalente Bindung, die zwischen der reaktiven Gruppe des modifizierten Peptids und den funktionellen Gruppen der Blutkomponente mit oder ohne eine verknüpfende Gruppe gebildet worden ist. Peptidase-stabilisierte Peptide sind in vivo in Gegenwart von Peptidasen stabiler als ein nicht-stabilisiertes Peptid. Ein Peptidase-stabilisiertes therapeutisches Peptid weist im allgemeinen eine um mindestens 10–50% verlängerte Halbwertszeit auf, verglichen mit einem nicht-stabilisierten Peptid von identischer Sequenz. Die Peptidase-Stabilität wird bestimmt, indem man die Halbwertszeit des unmodifizierten ITP in Serum oder Blut mit der Halbwertszeit eines als Gegenstück verwendeten modifizierten therapeutischen Peptids in Serum oder Blut vergleicht. Die Halbwertszeit wird bestimmt, indem man nach Verabreichung der modifizierten und nicht-modifizierten Peptide Proben von Serum oder Blut gewinnt und die Ak-

tivität des Peptids bestimmt. Zusätzlich zur Bestimmung der Aktivität kann auch die Länge des ITP durch HPLC und Massenspektrometrie bestimmt werden.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0027] Unter Berücksichtigung dieser Definitionen konzentriert sich die vorliegende Erfindung auf die Modifikation von insulinotropen Peptiden zur Verbesserung ihrer biologischen Verfügbarkeit, zur Verlängerung ihrer Halbwertszeit und zur Erweiterung ihrer Verteilung durch selektive Konjugation mit einem Proteinträger, ohne dass ihre bemerkenswerten therapeutischen Eigenschaften modifiziert werden. Beim Träger der Wahl handelt es sich erfindungsgemäß (ohne Beschränkung hierauf) um Albumin, das über freies Thiol mit einem insulinotropen Peptid, das mit einem Maleinimidrest derivatisiert ist, konjugiert ist.

1. Insulinotrope Peptide

A. GLP-1 und dessen Derivate

[0028] Bekanntlich wird das Hormon Glucagon als hochmolekulares Vorläufermolekül synthetisiert, das anschließend proteolytisch in drei Peptide gespalten wird: Glucagon, glucagonartiges Peptid 1 (GLP-1) und glucagonartiges Peptid 2 (GLP-2). GLP-1 weist in seiner unprozessierten Form 37 Aminosäuren auf, wie in SEQ ID NO: 1 dargestellt ist.

[0029] Unprozessiertes GLP-1 ist im wesentlichen unfähig zur Vermittlung der Einleitung der Insulin-Biosynthese. Das unprozessierte GLP-1-Peptid wird jedoch in der Natur in ein 31 Aminosäuren langes Peptid (7-37-Peptid) mit den Aminosäuren 7-37 von GLP-1 umgewandelt ("GLP-1(7-37)"); SEQ ID NO: 2. GLP-1(7-37) kann einer zusätzlichen Prozessierung durch proteolytische Entfernung des C-terminalen Glycins unterliegen, wodurch GLP-1(7-36) gebildet wird, das ebenfalls vorwiegend mit dem C-terminalen Rest Arginin in amidierter Form als Argininamid vorliegt (GLP-1(7-36)-Amid). Diese Prozessierung erfolgt im Darm und in wesentlich geringerem Umfang im Pankreas und führt zu einem Polypeptid mit der insulinotropen Aktivität von GLP-1(7-37).

[0030] Bei einer Verbindung wird von einer "insulinotropen Aktivität" gesprochen, wenn sie befähigt ist, die Synthese oder Expression des Hormons Insulin zu stimulieren oder diese Stimulierung hervorzurufen. Die hormonelle Aktivität von GLP-1(7-37) und GLP-1(7-36) scheint spezifisch für die pankreatischen Betazellen zu sein, wo offensichtlich die Biosynthese von Insulin induziert wird. Das erfindungsgemäße glucagonartige Peptidhormon eignet sich zur Untersuchung der Pathogenese von im reifen Alter einsetzendem Diabetes mellitus, einem Zustand, der durch Hyperglykämie gekennzeichnet ist, bei dem die Dynamik der Insulinsekretion abnormal ist. Außerdem eignet sich das glucagonartige Peptid bei der Therapie und der Behandlung dieser Krankheit und bei der Therapie und der Behandlung von Hyperglykämie.

[0031] Peptidreste (Fragmente), die aus der ermittelten Aminosäuresequenz von humanem GLP-1 ausgewählt sind, stellen den Ausgangspunkt bei der Entwicklung im Rahmen der vorliegenden Erfindung dar. Die gegenseitig austauschbaren Ausdrücke "Peptidfragment" und "Peptidrest" sollen sowohl synthetische als auch natürlich vorkommende Aminosäuresequenzen umfassen, die sich von einer natürlich vorkommenden Aminosäuresequenz ableiten.

[0032] Die Aminosäuresequenz für GLP-1 wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen angegeben (L. C. Lopez et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 80 (1983), S. 5485–5489; G. I. Bell et al., Nature, Bd. 302 (1983), S. 716–718; G. Heinrich et al., Endocrinol., Bd. 115 (1984), S. 2176–2181). Die Struktur der Präproglucagon-mRNA und die entsprechende Aminosäuresequenz davon sind bekannt. Die proteolytische Prozessierung des Vorläufer-Genprodukts Proglucagon zu Glucagon und die beiden insulinotropen Peptide wurden charakterisiert. Die hier verwendete Bezeichnung GLP-1(1-37) bezieht sich auf ein GLP-1-Polypeptid mit sämtlichen Aminosäuren von 1 (N-Terminus) bis 37 (C-Terminus). Gleichermaßen bezieht sich der Ausdruck GLP-1(7-37) auf ein GLP-1-Polypeptid mit sämtlichen Aminosäuren von 7 (N-Terminus) bis 37 (C-Terminus). Gleichermaßen bezieht sich der Ausdruck GLP-1(7-36) auf ein GLP-1-Polypeptid mit sämtlichen Aminosäuren von 7 (N-Terminus) bis 36 (C-Terminus).

[0033] Gemäß einer Ausführungsform werden GLP-1(7-36) und dessen Peptidfragmente durch herkömmliche Maßnahmen entsprechend den nachstehenden Ausführungen synthetisiert, z. B. durch die bekannte Festphasen-Peptidsynthese nach J. M. Merrifield (Chem. Soc., Bd. 85 (1962), S. 2149) und nach Stewart und Young (Solid Phase Peptide Synthesis, Freeman, San Francisco, (1969), S. 27–66) (auf diese Druckschriften wird durch Verweis Bezug genommen). Jedoch ist es auch möglich, Fragmente des Proglucagon-Polypeptids oder von GLP-1 durch Fragmentierung der natürlich auftretenden Aminosäuresequenz zu erhalten, beispielsweise unter Verwendung eines proteolytischen Enzyms. Ferner ist es möglich, die gewünschten Fragmente des Proglucagon-Peptids oder von GLP-1 unter Anwendung von rekombinanter DNA-Technik gemäß den Angaben von T. Maniatis et al. zu erhalten (Molecular Biology: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York

(1982) (auf diese Druckschrift wird durch Verweis Bezug genommen).

[0034] Die vorliegende Erfindung umfasst Peptide, die von GLP-1 ableitbar sind, z. B. GLP-1(1-37) und GLP-1(7-36). Ein Peptid wird als "von einer natürlich vorkommenden Aminosäuresequenz ableitbar" bezeichnet, wenn es durch Fragmentierung einer natürlich vorkommenden Sequenz erhalten werden kann oder wenn es auf der Grundlage der Kenntnis der Sequenz der natürlich vorkommenden Aminosäuresequenz oder des genetischen Materials (DNA oder RNA), das für diese Sequenz kodiert, erhalten werden kann.

[0035] Unter den Umfang der Erfindung fallen auch die Moleküle, die als "Derivate" von GLP-1 bezeichnet werden, wie GLP-1(1-37) und insbesondere GLP-1(7-36). Ein derartiges "Derivat" weist die folgenden Eigenschaften auf: (1) es weist eine wesentliche Homologie mit GLP-1 oder einem Fragment von GLP-1 mit ähnlicher Größe auf; (2) es ist dazu befähigt, als ein insulinotropes Hormon zu wirken; und (3) bei Anwendung von mindestens einem der hier vorgelegten Tests weist das Derivat entweder (i) eine insulinotrope Aktivität auf, die die insulinotrope Aktivität von GLP-1 übersteigt oder vorzugsweise (ii) eine insulinotrope Aktivität, die selbst dann nachgewiesen werden kann, wenn das Derivat in einer Konzentration von 10^{-10} M vorhanden ist, oder insbesondere (iii) es weist eine insulinotrope Aktivität auf, die auch dann nachgewiesen werden kann, wenn das Derivat in einer Konzentration von 10^{-11} M vorhanden ist.

[0036] Bei einem Derivat von GLP-1 wird von einer "wesentlichen Homologie mit GLP-1" gesprochen, wenn die Aminosäuresequenz des Derivats zu mindestens 80%, vorzugsweise zu mindestens 90% und insbesondere zu mindestens 95% gleich mit der Sequenz von GLP-1(1-37) ist.

[0037] Die erfindungsgemäßen Derivate umfassen GLP-1-Fragmente, die zusätzlich zum Gehalt an einer Sequenz, die im wesentlichen homolog mit der Sequenz des natürlich vorkommenden GLP-1-Peptids ist, eine oder mehrere zusätzliche Aminosäuresequenzen an ihren Amino- und/oder Carboxy-Termini aufweisen können. Somit bezieht sich die Erfindung auf Polypeptidfragmente von GLP-1, die eine oder mehrere Aminosäuren enthalten können, die in der natürlich vorkommenden GLP-1-Sequenz nicht vorhanden sind, vorausgesetzt, dass derartige Polypeptide eine insulinotrope Aktivität besitzen, die die von GLP-1 übersteigt. Bei den zusätzlichen Aminosäuren kann es sich um D-Aminosäuren oder L-Aminosäuren oder um Kombinationen davon handeln.

[0038] Die Erfindung umfasst auch GLP-1-Fragmente, die trotz ihres Gehalts an einer Sequenz, die im wesentlichen homolog mit der von natürlich vorkommendem GLP-1-Peptid ist, einen Mangel an einer oder mehreren zusätzlichen Aminosäuren an ihren Amino- und/oder Carboxy-Termini, die natürlicherweise bei einem GLP-1-Peptid auftreten, aufweisen. Somit bezieht sich die Erfindung auf Polypeptidfragmente von GLP-1, dem eine oder mehrere Aminosäuren, die normalerweise in einer natürlich vorkommenden GLP-1-Sequenz vorhanden sind, fehlen, vorausgesetzt, dass derartige Polypeptide eine insulinotrope Aktivität besitzen, die die von GLP-1 übersteigt.

[0039] Die Erfindung umfasst ferner die offensichtlichen oder trivialen Varianten der vorstehend beschriebenen Fragmente, die nicht-konsequenzielle Aminosäuresubstitutionen aufweisen (und somit Aminosäuresequenzen besitzen, die sich von denen der natürlichen Sequenz unterscheiden), vorausgesetzt, dass derartige Varianten eine insulinotrope Aktivität besitzen, die im wesentlichen identisch mit derjenigen der vorstehend beschriebenen GLP-1-Derivate ist. Zu Beispielen für offensichtliche oder triviale Substitutionen gehören die Substitution eines basischen Restes mit einem anderen basischen Rest (z. B. Arg anstelle von Lys), die Substitution von einem hydrophoben Rest anstelle eines anderen hydrophoben Restes (z. B. Leu anstelle von Ile) oder die Substitution eines aromatischen Restes durch einen anderen aromatischen Rest (z. B. Phe anstelle von Tyr) und dergl.

[0040] Zusätzlich zu diesen GLP-1-Derivaten mit insulinotroper Aktivität fallen GLP-1-Derivate, die die Glucose-Aufnahme durch Zellen stimulieren, jedoch nicht die Insulin-Expression oder -Sekretion stimulieren, unter den Umfang der Erfindung. Derartige GLP-1-Derivate sind im US-Patent 5 574 008 beschrieben.

[0041] sZu GLP-1-Derivaten, die die Aufnahme von Glucose durch Zellen, jedoch nicht die Expression oder Sekretion von Insulin stimulieren, die erfindungsgemäß Anwendung finden, gehören:

R_1 -Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Xaa-Gly-Arg- R_2 (SEQ ID NO: 3), worin R_1 ausgewählt ist unter a) H_2N ; b) H_2N -Ser; c) H_2N -Val-Ser; d) H_2N -Asp-Val-Ser; e) H_2N -Ser-Asp-Val-Ser (SEQ ID NO: 4); f) H_2N -Thr-Ser-Asp-Val-Ser (SEQ ID NO: 5); g) H_2N -Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser (SEQ ID NO: 6); h) H_2N -Thr-Phe-Thr-Ser-ASP-Val-Ser (SEQ ID NO: 7); i) H_2N -Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser (SEQ ID NO: 8); j) H_2N -Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser (SEQ ID NO: 9); oder k) H_2N -Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-ASP-Val-Ser (SEQ ID NO: 10). In diesem Peptid wird X unter Lys oder Arg und R_2 unter NH_2 , OH, Gly- NH_2 oder Gly-OH ausgewählt. Bei diesen Peptiden handelt es sich um C-terminale GLP-1-Fragmente, die keine insulinotrope Aktivität besitzen, sich aber trotzdem zur Behandlung von Diabetes und hyperglykämischen Zuständen gemäß US-Patent 5 574 008 eignen.

B. Exendin-3- und Exendin-4-Peptide

[0042] Exendin-3 und Exendin-4 sind Peptide mit 39 Aminosäuren (Unterschied an den Resten 2 und 3) mit

einer Homologie von etwa 53 % zu GLP-1 und finden Anwendung als insulinotrope Mittel.

[0043] Die Sequenz von Exendin-3 (SEQ ID No: 11) ist HSDGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGG PSS-GAPPPS.

[0044] Die Sequenz von Exendin-4 (SEQ ID No: 12) ist HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGG PSS-GAPPPS.

[0045] Die Erfindung umfasst ferner die insulinotropen Fragmente von Exendin-4, die die folgenden Aminosäuresequenzen umfassen: Exendin-4(1-31) (SEQ ID No: 13) HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPY und Exendin-4(1-31) (SEQ ID No: 14) HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGY.

[0046] Die Erfindung umfasst ferner das Inhibitorfragment von Exendin-4 mit der folgenden Aminosäuresequenz: Exendin-4(9-39) (SEQ ID No: 15) DLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS.

[0047] Weitere insulinotrope Peptide sind in den Beispielen als SEQ ID NO: 16-22 aufgeführt.

[0048] Die vorliegende Erfindung umfasst Peptide, die von den natürlich vorkommenden Exendin-3- und Exendin-4-Peptiden ableitbar sind. Ein Peptid wird als "von einer natürlich vorkommenden Aminosäuresequenz ableitbar" bezeichnet, wenn es durch Fragmentierung einer natürlich vorkommenden Sequenz erhalten werden kann oder wenn es aufgrund der Kenntnis der Sequenz der natürlich vorkommenden Aminosäuresequenz oder des genetischen Materials (DNA oder RNA), die für diese Sequenz kodiert, synthetisiert werden kann.

[0049] Unter den Umfang der vorliegenden Erfindung fallen Moleküle, die als "Derivate" von Exendin-3 und Exendin-4 bezeichnet werden. Ein derartiges "Derivat" weist die folgenden Eigenschaften auf: (1) es weist eine wesentliche Homologie mit Exendin-3 oder Exendin-4 oder einem Fragment von Exendin-3 oder Exendin-4 von ähnlicher Größe auf; (2) es ist befähigt, als insulinotropes Hormon zu wirken; und (3) unter Anwendung mindestens einer der hier bereitgestellten Tests weist das Derivat entweder (i) eine insulinotrope Aktivität auf, die die insulinotrope Aktivität von Exendin-3 oder Exendin-4 übersteigt oder es weist vorzugsweise (ii) eine insulinotrope Aktivität auf, die auch dann nachgewiesen werden kann, wenn das Derivat in einer Konzentration von 10^{-10} M vorliegt, oder es weist insbesondere (iii) eine insulinotrope Aktivität auf, die auch dann nachgewiesen werden kann, wenn das Derivat in einer Konzentration von 10^{-11} M vorliegt.

[0050] Bei einem Derivat von Exendin-3 und Exendin-4 wird von einer "wesentlichen Homologie" mit Exendin-3 und Exendin-4 gesprochen, wenn die Aminosäuresequenzen des Derivats zu mindestens 80%, vorzugsweise zu mindestens 90% und insbesondere zu mindestens 95% gleich mit der Sequenz von Exendin-3 oder -4 oder einem Fragment von Exendin-3 oder -4 mit der gleichen Anzahl von Aminosäureresten wie das Derivat sind. Die erfindungsgemäßen Derivate umfassen Exendin-3- oder Exendin-4-Fragmente, die zusätzlich zu der Tatsache, dass sie eine Sequenz enthalten, die im wesentlichen homolog mit der Sequenz eines natürlich vorkommenden Exendin-3- oder Exendin-4-Peptids ist, eine oder mehrere zusätzliche Aminosäuren an ihren Amino- und/oder Carboxy-Termini enthalten. Somit betrifft die Erfindung Polypeptidfragmente von Exendin-3- oder Exendin-4, die eine oder mehrere Aminosäuren enthalten können, die möglicherweise in natürlich vorkommenden Exendin-3- oder Exendin-4-Sequenzen nicht vorhanden sind, vorausgesetzt, dass diese Polypeptide eine insulinotrope Aktivität besitzen, die die Aktivität von Exendin-3 oder Exendin-4 übertrifft.

[0051] Gleichermaßen umfasst die Erfindung Exendin-3- oder Exendin-4-Fragmente, die trotz der Tatsache, dass sie eine Sequenz enthalten, die im wesentlichen homolog mit der Sequenz eines natürlich vorkommenden Exendin-3- oder Exendin-4-Peptids ist, einen Mangel an einer oder mehreren zusätzlichen Aminosäuren an ihren Amino- und/oder Carboxy-Termini, die natürlicherweise an einem Exendin-3- oder Exendin-4-Peptid auftreten, aufweisen können. Somit betrifft die Erfindung Polypeptidfragmente von Exendin-3 oder Exendin-4, denen eine oder mehrere Aminosäuren, die normalerweise in einer natürlich vorkommenden Exendin-3- oder Exendin-4-Sequenz vorhanden sind, fehlen können, vorausgesetzt, dass diese Polypeptide eine insulinotrope Aktivität besitzen, die die Aktivität von Exendin-3 oder Exendin-4 übertrifft.

[0052] Die Erfindung betrifft ferner die offensichtlichen oder trivialen Varianten der vorstehend beschriebenen Fragmente, die nicht-konsequenzielle Aminosäuresubstitutionen aufweisen (und somit Aminosäuresequenzen aufweisen, die von der natürlichen Sequenz abweichen), vorausgesetzt, dass derartige Varianten eine insulinotrope Aktivität besitzen, die im wesentlichen identisch mit der Aktivität der vorstehend beschriebenen Exendin-3- oder Exendin-4-Derivate ist.

[0053] Zu Beispielen für offensichtliche oder triviale Substitutionen gehören die Substitution von einem basischen Rest durch einen anderen basischen Rest (z. B. Arg anstelle von Lys), die Substitution von einem hydrophoben Rest durch einen anderen hydrophoben Rest (z. B. Leu anstelle von Ile) oder die Substitution von einem aromatischen Rest durch einen anderen aromatischen Rest (z. B. Phe anstelle von Tyr) und dergl.

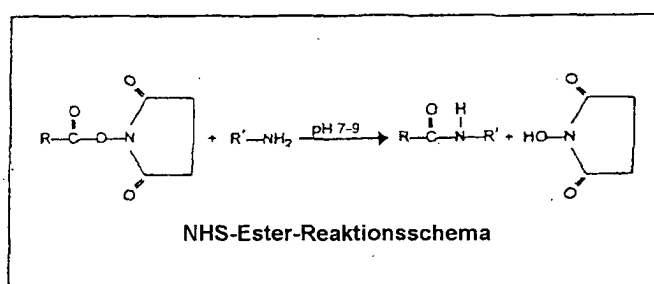
2. Modifizierte insulinotrope Peptide

[0054] Die Erfindung betrifft modifizierte insulinotrope Peptide und deren Derivate. Die erfindungsgemäßen modifizierten, insulinotropen Peptide umfassen reaktive Gruppen, die mit verfügbaren reaktiven funktionellen Gruppen an Blutkomponenten unter Bildung von kovalenten Bindungen reagieren können. Die Erfindung be-

trifft ferner derartige Modifikationen, derartige Kombinationen mit Blutkomponenten und Verfahren zu ihrer Verwendung. Diese Verfahren umfassen die Verlängerung der wirksamen therapeutischen in vivo-Halbwertszeit der modifizierten insulinotropen Peptide.

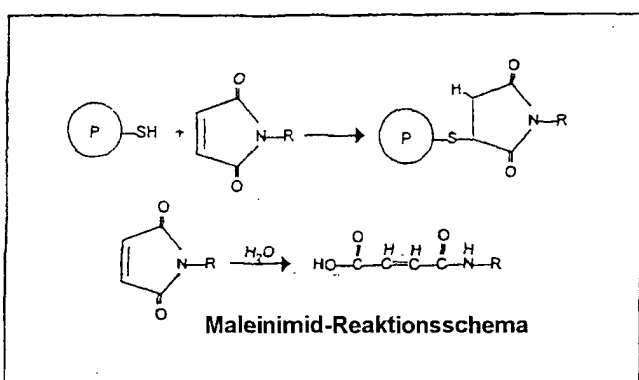
[0055] Zur Bildung von kovalenten Bindungen mit der funktionellen Gruppe an einem Protein kann man als chemisch reaktive Gruppe (reaktiver Rest) eine Vielzahl von aktiven Carboxylgruppen, insbesondere Estern, verwenden, wobei der Hydroxylrest in den Konzentrationen, die zur Modifikation der insulinotropen Peptide erforderlich sind, physiologisch verträglich ist. Obgleich eine Anzahl von unterschiedlichen Hydroxylgruppen in diesen Verknüpfungsmitteln verwendet werden kann, handelt es sich beim zweckmäßigsten Mittel um N-Hydroxysuccinimid (NHS), N-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS), Maleinimidbenzoylsuccinimid (MBS), gamma-Maleinimidobutyryloxysuccinimidester (GMBS) und Maleinimidopropionsäure (MPA).

[0056] Primäre Amine stellen die hauptsächlichen Ziele der NHS-Ester dar, wie aus dem nachstehenden Schema hervorgeht. Zugängliche α -Aminogruppen, die an den N-Termini von Proteinen vorhanden sind, reagieren mit NHS-Estern. Jedoch sind α -Aminogruppen an einem Protein für die NHS-Kupplung nicht erwünscht oder verfügbar. Obgleich 5-Aminosäuren in ihren Seitenketten Stickstoff aufweisen, reagiert nur das ϵ -Amin von Lysin in signifikantem Umfang mit NHS-Estern. Eine Amidbindung wird gebildet, wenn die NHS-Esterkonjugationsreaktion mit primären Aminen unter Freisetzung von N-Hydroxysuccinimid abläuft, wie im nachstehenden Schema dargestellt ist. Diese Succinimid enthaltenden reaktiven Gruppen werden hier als Succinimidygruppen bezeichnet.



[0057] In den bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung handelt es sich bei der funktionellen Gruppe am Protein um eine Thiolgruppe und bei der chemisch reaktiven Gruppe um eine Maleinimido enthaltende Gruppe, wie GMBA oder MPA). GMBA bedeutet gamma-Maleinimidbutyrylamid. Derartige Maleinimid enthaltende Gruppen werden hier als Maleinimidogruppen bezeichnet.

[0058] Die Maleinimidogruppe ist besonders selektiv für Sulfhydrylgruppen an Peptiden, wenn der pH-Wert des Reaktionsgemisches auf 6,5 bis 7,4 gehalten wird. Beim pH-Wert 7,0 ist die Reaktionsgeschwindigkeit von Maleinimidogruppen mit Sulfhydrylen 1000-fach schneller als mit Aminen. Eine stabile Thioetherverknüpfung zwischen der Maleinimidogruppe und dem Sulfhydryl wird gebildet, die unter physiologischen Bedingungen nicht gespalten werden kann.



[0059] Die erfindungsgemäßen insulinotropen Peptide und Peptidderivate können für eine spezifische Markierung und nicht-spezifische Markierung von Blutkomponenten modifiziert werden.

A. Spezifische Markierung

[0060] Vorzugsweise werden die erfindungsgemäßen modifizierten, insulinotropen Peptide (ITP) so konzipiert, dass sie spezifisch mit Thiolgruppen an mobilen Blutproteinen reagieren. Eine derartige Reaktion wird vorzugsweise durch eine kovalente Bindung eines therapeutischen Peptids, das mit einer Maleinimidverknüpfung (z. B. hergestellt aus GMBS, MPA oder anderen Maleinimiden) an eine Thiolgruppe an einem mobilen

Blutprotein, wie Serumalbumin oder IgG, modifiziert ist, erreicht.

[0061] Unter bestimmten Umständen bietet eine spezifische Markierung mit Maleinimiden mehrere Vorteile gegenüber einer nicht-spezifischen Markierung von mobilen Proteinen mit Gruppen, wie NHS oder Sulfo-NHS. Thiolgruppen kommen in vivo weniger häufig vor als Aminogruppen. Daher gehen die erfindungsgemäßen Maleinimidderivate eine kovalente Bindung mit weniger Proteinen ein. Beispielsweise liegt in Albumin (das häufigste Blutprotein) nur eine einzige Thiolgruppe vor. Somit besteht bei ITP-Maleinimid-Albumin-Konjugaten die Tendenz, dass sie ein Molverhältnis von etwa 1:1 von ITP zu Albumin aufweisen. Zusätzlich zu Albumin weisen auch IgG-Moleküle (Klasse II) freie Thiole auf. Da IgG-Moleküle und Serumalbumin den Großteil des löslichen Proteins im Blut ausmachen, machen sie auch den Großteil der freien Thiolgruppen im Blut aus, die zur kovalenten Bindung an mit Maleinimid modifizierte ITPs verfügbar sind.

[0062] Ferner führt auch unter freie Thiolgruppen enthaltenden Blutproteinen eine spezifische Markierung mit Maleinimiden zur bevorzugten Bildung von ITP-Maleinimid-Albumin-Konjugaten, und zwar aufgrund der besonderen Eigenschaften von Albumin selbst. Die einzige freie Thiolgruppe von Albumin, die von Spezies zu Spezies hochgradig konserviert ist, befindet sich am Aminosäurerest 34 (Cys³⁴). Es wurde kürzlich gezeigt, dass das Cys³⁴ von Albumin eine erhöhte Reaktivität in Bezug zu freien Thiolgruppen an anderen, freie Thiolgruppen enthaltenden Proteinen aufweist. Dies ist teilweise auf den sehr niedrigen pK-Wert von 5,5 für das Cys³⁴ von Albumin zurückzuführen. Dieser Wert ist wesentlich niedriger als typische pK-Werte für Cysteinreste im allgemeinen, die typischerweise etwa 8 betragen. Aufgrund dieses niedrigen pK-Werts liegt unter normalen physiologischen Bedingungen Cys³⁴ von Albumin vorwiegend in der ionisierten Form vor, was dessen Reaktivität erheblich steigert, wie hier ausgeführt wird. Zusätzlich zu dem niedrigen pK-Wert von Cys³⁴ besteht ein weiterer Faktor, der die Reaktivität von Cys³⁴ steigert, in dessen Position, d. h. in einer Spalte in der Nähe der Oberfläche einer Schleife der v-Region von Albumin. Diese Position macht Cys³⁴ in hohem Maße gegenüber sämtlichen Arten von Liganden zugänglich und stellt einen wichtigen Faktor in der biologischen Rolle von Cys³⁴ als Fänger von freien Radikalen und Fänger von freien Thiolgruppen dar. Aufgrund dieser Eigenschaften ist Cys³⁴ hochgradig reaktiv mit ITP-Maleinimiden. Die Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit kann 1000-fach sein, bezogen auf die Reaktionsgeschwindigkeiten von ITP-Maleinimiden mit anderen, freie Thiolgruppen enthaltenden Proteinen.

[0063] Ein weiterer Vorteil von ITP-Maleinimid-Albumin-Konjugaten besteht in der Reproduzierbarkeit in Verbindung mit der 1:1-Beladung von Albumin mit Peptid, spezifisch an Cys³⁴. Weitere Techniken, z. B. Glutaraldehyd, DCC, EDC und andere chemische Aktivierungen, beispielsweise von freien Aminen, weisen diese Selektivität nicht auf. Beispielsweise enthält Albumin 52 Lysinreste, von denen sich 25 bis 30 an der Oberfläche von Albumin befinden und für die Konjugation zugänglich sind. Eine Aktivierung dieser Lysinreste oder alternativ eine Modifikation von Peptiden unter Kupplung über diese Lysinreste führt zu einer heterogenen Population von Konjugaten. Auch bei Anwendung eines 1:1-Molverhältnisses von Peptid zu Albumin besteht das Ergebnis in mehrfachen Konjugationsprodukten, von denen einige 0, 1, 2 oder mehr Peptide pro Albumin enthalten und wobei jedes Produkt Peptide aufweist, die in willkürlicher Weise an einer der 25 bis 30 verfügbaren Lysinstellen gekuppelt ist. Aufgrund der zahlreichen möglichen Kombinationen wird eine Charakterisierung der genauen Zusammensetzung und der Art der einzelnen Ansätze schwierig und eine Reproduzierbarkeit von Ansatz zu Ansatz ist praktisch unmöglich, was die Verwendung derartiger Konjugate als Therapeutika weniger erstrebenswert macht. Obgleich es ferner den Anschein hat, dass eine Konjugation über Lysinreste von Albumin zumindest den Vorteil der Abgabe größerer Mengen des therapeutischen Mittels pro Albuminmolekül aufweisen sollte, haben Untersuchungen gezeigt, dass ein 1:1-Verhältnis von therapeutischem Mittel zu Albumin bevorzugt ist. In einem Artikel von Stehle et al., "The Loading Rate Determines Tumor Targeting Properties of Methotrexate-Albumin Conjugates in Rats", *Anti-Cancer Drugs*, Bd. 8 (1997), S. 677–685 (auf diese Druckschrift wird hier durch Verweis Bezug genommen), berichten die Autoren, dass ein 1:1-Verhältnis des Antikrebsmittels Methotrexat zu Albumin, das über Glutaraldehyd gekuppelt ist, zu den vielversprechendsten Ergebnissen führte. Diese Konjugate wurden von Tumorzellen aufgenommen, während Konjugate, die 5:1 bis 20:1 Methotrexatmoleküle trugen, veränderte HPLC-Profile aufwiesen und in vivo rasch von der Leber aufgenommen wurden. Es wird angenommen, dass bei diesen höheren Verhältnissen Konformationsänderungen an Albumin dessen Wirksamkeit als therapeutischer Träger vermindern.

[0064] Durch eine kontrollierte in vivo-Verabreichung von Maleinimid-ITPs kann man in vivo die spezifische Markierung von Albumin und IgG steuern. Bei typischen Verabreichungen markieren 80–90% der verabreichten Maleinimid-ITPs Albumin, während weniger als 5% IgG markieren. Ferner kommt es zu einer Spurenmarkierung von freien Thiolen, wie Glutathion. Eine derartige spezifische Markierung wird für eine in vivo-Anwendung bevorzugt, da sie eine genaue Berechnung der geschätzten Halbwertszeit des verabreichten Mittels ermöglicht.

[0065] Zusätzlich zur Erzielung einer kontrollierten spezifischen in vivo-Markierung können Maleinimid-ITPs eine spezifische ex vivo-Markierung von Serumalbumin und IgG bewerkstelligen. Eine derartige ex vivo-Markierung beinhaltet die Addition von Maleinimid-ITPs an Blut, Serum oder Kochsalzlösung mit einem Gehalt an Serumalbumin und/oder IgG. Nach Vornahme einer ex vivo-Modifikation mit Maleinimid-ITPs können das Blut,

das Serum oder die Kochsalzlösung wieder dem Blut für eine in vivo-Behandlung zugeführt werden.

[0066] Im Gegensatz zu NHS-Peptiden sind Maleinimid-ITPs im allgemeinen in Gegenwart von wässrigen Lösungen und in Gegenwart von freien Aminen recht stabil. Da Maleinimid-ITPs nur mit freien Thiolen reagieren, sind Schutzgruppen im allgemeinen nicht erforderlich, um eine Reaktion von Maleinimid-ITPs mit sich selbst zu verhindern. Außerdem ermöglicht die erhöhte Stabilität des Peptids die Anwendung weiterer Reinigungsstufen, wie HPLC, um hochgradig gereinigte Produkte, die sich zur in vivo-Anwendung eignen, herzustellen. Schließlich ergibt die erhöhte chemische Stabilität ein Produkt mit längerer Lagerbeständigkeit.

B. Nicht-spezifische Markierung

[0067] Die erfindungsgemäßen ITPs können auch für eine nicht-spezifische Markierung von Blutkomponenten modifiziert werden. Bindungen an Aminogruppen werden im allgemeinen für eine nicht-spezifische Bindung, insbesondere unter Bildung von Amidbindungen, herangezogen. Zur Bildung derartiger Bindungen kann man als chemisch reaktive Gruppe, die mit dem ITP gekuppelt ist, eine Vielzahl von aktiven Carboxylgruppen, insbesondere Ester, verwenden, wobei der Hydroxylrest in den erforderlichen Konzentrationen physiologisch verträglich ist. Obgleich eine Anzahl von verschiedenen Hydroxylgruppen in diesen Verknüpfungsmitteln verwendet werden kann, besteht das zweckmäßigste Produkt in N-Hydroxysuccinimid (NHS) und N-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS).

[0068] Weitere Verknüpfungsmittel, die verwendet werden können, sind im US-Patent 5 612 034 (auf das hier durch Verweis Bezug genommen wird) beschrieben.

[0069] Die verschiedenen Stellen, mit denen die chemisch reaktiven Gruppen der nicht-spezifischen ITPs in vivo reagieren können, umfassen Zellen, insbesondere rote Blutkörperchen (Erythrozyten) und Blutplättchen, sowie Proteine, wie Immunoglobuline, einschließlich IgG und IgM, Serumalbumin, Ferritin, steroidbindende Proteine, Transferrin, thyroxinbindendes Protein, α -2-Makroglobulin und dergl. Derartige Rezeptoren, mit denen die derivatisierten ITPs reagieren und die nicht langlebig sind, werden im allgemeinen vom menschlichen Wirt innerhalb von etwa 3 Tagen beseitigt. Die vorstehend aufgeführten Proteine (einschließlich der Proteine der Zellen) verbleiben mindestens 3 Tage im Blutkreislauf und können 5 Tage oder mehr (üblicherweise nicht mehr als 60 Tage, im allgemeinen nicht mehr als 30 Tage) besonders bis zum Erreichen der Halbwertszeit, auf der Basis der Konzentration im Blut verbleiben.

[0070] Größtenteils erfolgt die Umsetzung mit mobilen Komponenten im Blut, insbesondere mit Blutproteinen und Zellen, ganz besonders mit Blutproteinen und Erythrozyten. Unter "mobil" ist zu verstehen, dass es für die Komponente keinen festen Ort gibt, an dem sie über einen längeren Zeitraum hinweg verbleibt, im allgemeinen nicht mehr als 5 Minuten und insbesondere nicht mehr als 1 Minute, obgleich einige der Blutkomponenten über längere Zeiträume hinweg relativ stationär sein können. Zu Beginn liegt eine relativ heterogene Population von markierten Proteinen und Zellen vor. Jedoch verändert sich größtenteils die Population innerhalb einiger Tage nach Verabreichung in erheblichem Maße im Vergleich zur anfänglichen Population, und zwar in Abhängigkeit von der Halbwertszeit der markierten Proteine im Blutkreislauf. Somit wird üblicherweise innerhalb von etwa 3 Tagen oder mehr IgG zum überwiegenden markierten Protein im Blutkreislauf. Üblicherweise machen 5 Tage nach der Verabreichung IgG, Serumalbumin und Erythrozyten mindestens etwa 60 Mol-% und insbesondere mindestens etwa 75 Mol-% der konjugierten Komponenten im Blut aus, wobei IgG, IgM (in einem erheblich geringerem Ausmaß) und Serumalbumin mindestens etwa 50 Mol-%, üblicherweise etwa 75 Mol-% und insbesondere mindestens etwa 80 Mol-% der nicht-zellulären konjugierten Komponenten ausmachen.

[0071] Die erwünschten Konjugate von nicht-spezifischen ITPs an Blutkomponenten lassen sich in vivo durch direkte Verabreichung der ITPs an den Patienten, bei dem es sich um einen Menschen oder um einen anderen Säuger handeln kann, herstellen. Die Verabreichung kann in Form eines Bolus erfolgen oder langsam innerhalb einer bestimmten Zeitspanne durch Infusion unter Verwendung eines dosierten Stroms oder dergl. erfolgen.

[0072] Gegebenenfalls können die vorliegenden Konjugate auch ex vivo hergestellt werden, indem man Blut mit erfindungsgemäßen derivatisierten ITPs vereinigt, eine kovalente Bindung der modifizierten ITPs an reaktiven funktionellen Gruppen von Blutkomponenten ermöglicht und sodann das konjugierte Blut in den Wirt zurückleitet oder diesem verabreicht. Der vorstehende Vorgang kann ferner durchgeführt werden, indem man zunächst eine individuelle Blutkomponente oder eine begrenzte Anzahl an Komponenten, wie rote Blutkörperchen, Immunoglobuline, Serumalbumin oder dergl., reinigt und die Komponente oder Komponenten ex vivo mit den chemisch reaktiven ITPs vereinigt. Das markierte Blut oder die, markierte Blutkomponente können sodann wieder dem Wirt zugeführt werden, um das Subjekt in vivo mit therapeutisch wirksamen Konjugaten zu versorgen. Das Blut kann ferner während der ex vivo-Handhabung einer Behandlung zur Verhinderung einer Koagulation unterzogen werden.

3. Synthese von modifizierten ITPs

A. ITP-Synthese

[0073] ITP-Fragmente lassen sich nach üblichen Verfahren der Festphasen-Peptidchemie, die dem Fachmann geläufig sind, synthetisieren. Beispielsweise lassen sich ITP-Fragmente durch chemische Festphasentechniken gemäß Steward und Young (J. M. Steward, und J. D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2. Auflg., Pierce Chemical Company, Rockford, Ill., (1984)) unter Verwendung eines Applied Biosystem-Synthesegeräts herstellen. Gleichmaßen lassen sich mehrere Fragmente herstellen und sodann unter Bildung von größeren Fragmenten miteinander verknüpfen. Diese synthetischen Peptidfragmente können auch mit Aminosäuresubstitutionen an speziellen Positionen hergestellt werden.

[0074] Bezüglich der Festphasen-Peptidsynthese findet sich eine Zusammenfassung der zahlreichen Techniken bei J. M. Steward und J. D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman Co. (San Francisco), (1963), und bei J. Meienhofer, Hormonal Proteins and Peptides, Academic Press (New York), Bd. 2 (1973), S. 46. Bezüglich einer klassischen Synthese in Lösung wird auf G. Schroder und K. Lupke, The Peptides, Academic Press (New York), Bd. 1, verwiesen. Im allgemeinen umfassen diese Verfahren die sequenzielle Addition von einer oder mehreren Aminosäuren oder von in geeigneter Weise geschützten Aminosäuren an eine wachsende Peptidkette. Normalerweise wird entweder die Amino- oder die Carboxylgruppe der ersten Aminosäure durch eine geeignete Schutzgruppe geschützt. Die geschützte oder derivatisierte Aminosäure wird sodann an einem inerten festen Träger angebracht oder in Lösung verwendet, wobei man die nächste Aminosäure in der Sequenz mit der komplementären, in geeigneter Weise geschützten Amino- oder Carboxylgruppe unter Bedingungen, die zur Bildung der Amidbindung geeignet sind, addiert. Anschließend wird die Schutzgruppe von diesem neu addierten Aminosäurerest entfernt und die nächste Aminosäure (in geeigneter Weise geschützt) wird addiert usw.

[0075] Nachdem sämtliche erwünschten Aminosäuren in der richtigen Reihenfolge verknüpft sind, werden etwaige verbleibende Schutzgruppen (und gegebenenfalls der feste Träger) sequenziell oder gleichzeitig entfernt, wodurch man das endgültige Polypeptid erhält. Durch eine einfache Modifikation des allgemeinen Verfahrens ist es möglich, gleichzeitig mehr als eine Aminosäure an eine wachsende Kette zu addieren, indem man beispielsweise (unter Bedingungen, die nicht zur Razemisierung von chiralen Zentren führen) ein geschütztes Tripeptid mit einem in geeigneter Weise geschützten Dipeptid kuppelt, wodurch man nach Schutzgruppenentfernung ein Pentapeptid erhält.

[0076] Ein besonders bevorzugtes Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen beinhaltet die Festphasen-Peptidsynthese, bei dem die Aminosäure am α -N-Terminus durch eine säure- oder basenempfindliche Gruppe geschützt ist. Derartige Schutzgruppen sollen unter den Bedingungen der Bildung der Peptidverknüpfung stabil sein, wobei sie leicht ohne Zerstörung der wachsenden Peptidkette oder ohne Razemisierung von etwaigen, darin enthaltenen chiralen Zentren entfernt werden können. Zu geeigneten Schutzgruppen gehören 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc), tert.-Butyloxycarbonyl (Boc), Benzyloxycarbonyl (Cbz), Biphenylisopropylloxycarbonyl, tert.-Amyloxycarbonyl, Isobornyloxycarbonyl, α,α -Dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl, o-Nitrophenylsulfenyl, 2-Cyano-tert.-butyloxycarbonyl und dergl. Die 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc)-Schutzgruppe wird für die Synthese von ITP-Fragmenten besonders bevorzugt. Zu weiteren bevorzugten Seitenketten-Schutzgruppen gehören für Seitenketten-Aminogruppen, wie Lysin und Arginin, 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl (pmc), Nitro, p-Toluolsulfonyl, 4-Methoxybenzolsulfonyl, Cbz, Boc und Adamantylloxycarbonyl; für Tyrosin Benzyl, o-Brombenzyloxycarbonyl, 2,6-Dichlorbenzyl, Isopropyl, tert.-Butyl (t-Bu), Cyclohexyl, Cyclopentyl und Acetyl (Ac); für Serin tert.-Butyl, Benzyl und Tetrahydropyranyl; für Histidin Trityl, Benzyl, Cbz, p-Toluolsulfonyl und 2,4-Dinitrophenyl; für Tryptophan Formyl; für Asparaginsäure und Glutaminsäure Benzyl und tert.-Butyl; und für Cystein Triphenylmethyl (Trityl).

[0077] Beim Festphasen-Peptidsyntheseverfahren wird die α -C-terminale Aminosäure an einen geeigneten festen Träger oder Harz gebunden. Zu geeigneten festen Trägern, die sich bei der vorstehenden Synthese eignen, gehören Materialien, die gegenüber den Reagenzien und bei den Reaktionsbedingungen der stufenweisen Kondensations-Schutzgruppenentfernungs-Reaktionen inert sind und ferner im verwendeten Medium unlöslich sind. Ein bevorzugter fester Träger für die Synthese von α -C-terminalen Carboxypeptiden ist 4-Hydroxymethylphenoxymethyl-Copoly(styrol; 1 % Divinylbenzol). Ein bevorzugter fester Träger für α -C-terminale Amidpeptide ist das von der Fa. Applied Biosystems (Foster City, Calif.), erhältliche 4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl)phenoxyacetamidoethyl-Harz. Die α -C-terminale Aminosäure wird an das Harz mittels N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC) oder O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU) mit oder ohne 4-Dimethylaminopyridin (DMAP), 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT), Benzotriazol-1-yloxy-tris-(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat (BOP) oder Bis-(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinchlorid (BOPCl), etwa 1 bis etwa 24 Stunden bei einer Temperatur von 10 bis 50°C in einem Lösungsmittel, wie Dichlormethan oder DMF, gekuppelt.

[0078] Wenn es sich beim festen Träger um 4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmocaminomethyl)-phenoxyacetami-

doethyl-Harz handelt, wird die Fmoc-Gruppe mit einem sekundären Amin, vorzugsweise Piperidin, abgespalten, bevor die Kupplung mit der α -C-terminalen Aminosäure auf die vorstehend beschriebene Weise erfolgt. Das bevorzugte Verfahren zur Kupplung des von Schutzgruppen befreiten 4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl)phenoxyacetamidoethyl-Harzes besteht in der Verwendung von O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU, 1 Äquivalent) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT, 1 Äquivalent) in DMF. Die Kupplung der nachfolgenden geschützten Aminosäuren kann in einem aus dem Stand der Technik bekannten Polypeptid-Syntheseautomaten erfolgen. Bei einer bevorzugten Ausführungsform werden die α -N-terminalen Aminosäuren der wachsenden Peptidkette mit Fmoc geschützt. Die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe von der α -N-terminalen Seite des wachsenden Peptids wird durch Behandlung mit einem sekundären Amin, vorzugsweise Piperidin, vorgenommen. Die einzelnen geschützten Aminosäuren werden sodann in einem 3-fachen molaren Überschuss eingeführt. Die Kupplung erfolgt vorzugsweise in DMF. Beim Kupplungsmittel handelt es sich normalerweise um O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU, 1 Äquivalent) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT, 1 Äquivalent).

[0079] Am Ende der Festphasensynthese wird das Polypeptid vom Harz entfernt und von Schutzgruppen befreit, entweder nacheinander oder in einem einzigen Vorgang. Die Entfernung des Polypeptids und die Schutzgruppenentfernung kann in einem einzigen Vorgang erfolgen, indem man das an das Harz gebundene Polypeptid mit einem Spaltungsreagenz, das Thioanisol, Wasser, Ethandithiol und Trifluoressigsäure umfasst, behandelt. In Fällen, bei denen es sich bei der α -C-terminalen Gruppe des Polypeptids um ein Alkylamid handelt, wird das Harz durch Aminolyse mit einem Alkylamin gespalten. Alternativ kann das Peptid durch Umesterung, z. B. mit Methanol, unter anschließender Aminolyse oder durch direkte Umamidierung entfernt werden. Das geschützte Peptid kann an dieser Stelle gereinigt oder direkt in der nächsten Stufe eingesetzt werden. Die Entfernung der Seitenketten-Schutzgruppen wird unter Verwendung des vorstehend beschriebenen Spaltungscocktails erreicht. Das vollständig von Schutzgruppen befreite Peptid wird durch eine Folge von chromatographischen Stufen gereinigt, wobei beliebige oder sämtliche der folgenden Typen herangezogen werden: Ionenaustausch an einem schwach basischen Harz (Acetatform); hydrophobe Adsorptionschromatographie an nicht-derivatisiertem Polystyrol-Divinylbenzol (z. B. Amberlite XAD); Kieselgel-Adsorptionschromatographie; Ionenaustauschchromatographie an Carboxymethylcellulose; Verteilungschromatographie, z. B. an Sephadex G-25, LH-20 oder Gegenstromverteilung; Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC), insbesondere Umkehrphasen-HPLC an einer Säulenpackung mit einer Octyl- oder Octadecylsilyl-Siliciumdioxid-gebundenen Phase.

[0080] Die Molekulargewichte dieser ITPs werden durch Fast Atom Bombardment (FAB)-Massenspektroskopie ermittelt.

[0081] Die erfindungsgemäßen ITPs lassen sich zur Verwendung als Proarzneistoffe mit N- und C-terminalen Schutzgruppen synthetisieren.

1. N-terminale Schutzgruppen

[0082] Wie vorstehend erörtert, bezieht sich der Ausdruck "N-Schutzgruppe" auf Gruppen, die zum Schutz des α -N-Terminus einer Aminosäure oder eines Peptids oder zum anderweitigen Schutz der Aminogruppe einer Aminosäure oder eines Peptids gegen unerwünschte Reaktionen während synthetischer Vorgänge vorgesehen sind. Üblicherweise verwendete N-Schutzgruppen sind in Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis" (John Wiley & Sons, New York (1981)) (auf diese Druckschrift wird durch Verweis Bezug genommen) beschrieben. Ferner können Schutzgruppen als Proarzneistoffe verwendet werden, die in vivo, beispielsweise durch enzymatische Hydrolyse, leicht unter Freisetzung des biologisch aktiven Ausgangsprodukts gespalten werden können. Zu α -N-Schutzgruppen gehören niedere Alkanoylgruppen, wie Formyl, Acetyl ("AC"), Propionyl, Pivaloyl, tert.-Butylacetyl und dergl.; zu weiteren Acylgruppen gehören 2-Chloracetyl, 2-Bromacetyl, Trifluoracetyl, Trichloracetyl, Phthalyl, o-Nitrophenoxyacetyl, -Chlorbutyryl, Benzoyl, 4-Chlorbenzoyl, 4-Brombenzoyl, 4-Nitrobenzoyl und dergl.; Sulfonylgruppen, wie Benzolsulfonyl, p-Toluolsulfonyl und dergl.; Carbamat bildende Gruppen, wie Benzyloxycarbonyl, p-Chlorbenzyloxycarbonyl, p-Methoxybenzyloxycarbonyl, p-Nitrobenzyloxycarbonyl, 2-Nitrobenzyloxycarbonyl, p-Brombenzyloxycarbonyl, 3,4-Dimethoxybenzyloxycarbonyl, 3,5-Dimethoxybenzyloxycarbonyl, 2,4-Dimethoxybenzyloxycarbonyl, 4-Ethoxybenzyloxycarbonyl, 2-Nitro-4,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl, 3,4,5-Trimethoxybenzyloxycarbonyl, 1-(p-Biphenyl)-1-methylethoxycarbonyl, α,α -Dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl, Benzhydryloxycarbonyl, tert.-Butyloxycarbonyl, Diisopropylmethoxycarbonyl, Isopropylloxycarbonyl, Ethoxycarbonyl, Methoxycarbonyl, Allyloxycarbonyl, 2,2,2,-Trichlorethoxycarbonyl, Phenoxycarbonyl, 4-Nitrophenoxycarbonyl, Fluorenyl-9-methoxycarbonyl, Cyclopentylloxycarbonyl, Adamantylloxycarbonyl, Cyclohexylloxycarbonyl, Phenylthiocarbonyl und dergl.; Arylalkylgruppen, wie Benzyl, Triphenylmethyl, Benzyloxymethyl, 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) und dergl.; und Silylgruppen, wie Trimethylsilyl und dergl.

2. Carboxy-Schutzgruppen

[0083] Wie vorstehend erörtert, bezieht sich der Ausdruck "Carboxy-Schutzgruppe" auf eine Ester- oder Amidgruppe zum Schutz einer Carbonsäure, die zum Blockieren oder Schützen der funktionellen Carbonsäuregruppe verwendet wird, während Reaktionen an anderen funktionellen Stellen der Verbindung durchgeführt werden. Carboxy-Schutzgruppen werden in Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", (1981), S. 152–186 (auf diese Druckschrift wird durch Verweis Bezug genommen) beschrieben.

[0084] Ferner kann eine Carboxy-Schutzgruppe als Proarzneistoff verwendet werden, wobei die Carboxy-Schutzgruppe in vivo leicht abgespalten werden kann, beispielsweise durch enzymatische Hydrolyse, um die biologisch aktive Ausgangsverbindung freizusetzen. Derartige Carboxy-Schutzgruppen sind dem Fachmann geläufig und werden in starkem Umfang beim Schutz von Carboxylgruppen auf dem Gebiet der Penicilline und Cephalosporine verwendet, wie es in den US-Patenten 3 840 556 und 3 719 667 (auf diese Druckschriften wird durch Verweis Bezug genommen) beschrieben ist. Repräsentative Carboxy-Schutzgruppen sind C₁-C₈-Niederalkyl (z. B. Methyl, Ethyl oder tert.-Butyl und dergl.); Arylalkyl, wie Phenethyl oder Benzyl und substituierte Derivate davon, wie Alkoxybenzyl- oder Nitrobenzylgruppen und dergl.; Arylalkenyl, wie Phenylethenyl und dergl.; Aryl und substituierte Derivate davon, wie 5-Indanyl und dergl.; Dialkylaminoalkyl, wie Dimethylaminoethyl und dergl.; Alkanoyloxyalkylgruppen, wie Acetoxymethyl, Butyryloxymethyl, Valeryloxymethyl, Isobutyryloxymethyl, Isovaleryloxymethyl, 1-(Propionyloxy)-1-ethyl, 1-(Pivaloyloxy)-1-ethyl, 1-Methyl-1-(propionyloxy)-1-ethyl, Pivaloyloxymethyl, Propionyloxymethyl und dergl.; Cycloalkanoyloxyalkylgruppen, wie Cyclopropylcarbonyloxymethyl, Cyclobutylcarbonyloxymethyl, Cyclopentylcarbonyloxymethyl, Cyclohexylcarbonyloxymethyl und dergl.; Aroyloxyalkyl, wie Benzoyloxymethyl, Benzoyloxyethyl und dergl.; Arylalkylcarbonyloxyalkyl, wie Benzylcarbonyloxymethyl, 2-Benzylcarbonyloxyethyl und dergl.; Alkoxyalkylcarbonyloxyalkyl, wie Methoxycarbonylmethyl, Cyclohexyloxyalkylcarbonylmethyl, 1-Methoxycarbonyl-1-ethyl und dergl.; Alkoxyalkylcarbonyloxyalkyl oder Cycloalkyloxyalkylcarbonyloxyalkyl, wie Methoxycarbonyloxymethyl, tert.-Butyloxyalkylcarbonyloxymethyl, 1-Ethoxyalkylcarbonyloxy-1-ethyl, 1-Cyclohexyloxyalkylcarbonyloxy-1-ethyl und dergl.; Aryloxyalkylcarbonyloxyalkyl, wie 2-(Phenoxycarbonyloxy)-ethyl, 2-(5-Indanyloxyalkylcarbonyloxy)-ethyl und dergl.; Alkoxyalkylcarbonyloxyalkyl, wie 2-(1-Methoxy-2-methylpropan-2-oyloxy)-ethyl und dergl.; Arylalkyloxyalkylcarbonyloxyalkyl, wie 2-(Benzoyloxyalkylcarbonyloxy)-ethyl und dergl.; Arylalkenyloxyalkylcarbonyloxyalkyl, wie 2-(3-Phenylpropen-2-yloxyalkylcarbonyloxy)-ethyl und dergl.; Alkoxyalkylaminocarbonyloxyalkyl, wie tert.-Butyloxyalkylaminomethyl und dergl.; Alkylaminocarbonyloxyalkyl, wie Methylaminocarbonyloxyalkyl und dergl.; Alkanoylaminocarbonyloxyalkyl, wie Acetylaminomethyl und dergl.; Heterocycloalkylcarbonyloxyalkyl, wie 4-Methylpiperazinylcarbonyloxyalkyl und dergl.; Dialkylaminocarbonyloxyalkyl, wie Dimethylaminocarbonyloxyalkyl, Diethylaminocarbonyloxyalkyl und dergl.; (5-(Niederalkyl)-2-oxo-1,3-dioxolen-4-yl)-alkyl, wie (5-tert.-Butyl-2-oxo-1,3-dioxolen-4-yl)-methyl und dergl.; und (5-Phenyl-2-oxo-1,3-dioxolen-4-yl)-alkyl, wie (5-Phenyl-2-oxo-1,3-dioxolen-4-yl)-methyl und dergl.

[0085] Repräsentative Amidcarboxy-Schutzgruppen sind Aminocarbonyl- und Niederalkylaminocarbonylgruppen.

[0086] Bei bevorzugten erfindungsgemäßen carboxygeschützten Verbindungen handelt es sich um Verbindungen, bei denen folgende Carboxy-Schutzgruppen vorliegen: Niederalkyl-, Cycloalkyl- oder Arylalkylester, z. B. Methylester, Ethylester, Propylester, Isopropylester, Butylester, sec.-Butylester, Isobutylester, Amylester, Isoamyloxyester, Octylester, Cyclohexylester, Phenylethylester und dergl., oder ein Alkanoyloxyalkyl-, Cycloalkanoyloxyalkyl-, Aroyloxyalkyl- oder Arylalkylcarbonyloxyalkylester. Bevorzugte Amidcarboxy-Schutzgruppen sind Niederalkylaminocarbonylgruppen. Beispielsweise kann Asparaginsäure am α -C-Terminus durch eine säurelabile Gruppe (z. B. tert.-Butyl) und am β -C-Terminus durch eine gegenüber einer Hydrierung labile Gruppe (z. B. Benzyl) geschützt sein und anschließend während der Synthese selektiv einer Schutzgruppenentfernung unterzogen werden.

B. Modifikation von ITPs

[0087] Die Art der Herstellung der erfindungsgemäßen modifizierten ITPs kann stark variieren, und zwar je nach der Art der verschiedenen Elemente, die das ITP umfassen. Die Syntheseverfahren werden so gewählt, dass sie einfach ablaufen, hohe Ausbeuten ergeben und zu einem hochgereinigten Produkt führen. Normalerweise wird die chemisch reaktive Gruppe in der letzten Synthesestufe erzeugt, beispielsweise bei einer Carboxylgruppe unter Veresterung zur Bildung eines aktiven Esters. Nachstehend sind spezielle Verfahren zur Herstellung von erfindungsgemäßen modifizierten ITPs beschrieben.

[0088] Jedes ausgewählte ITP, das einer Modifikation mit einem Linker und einem reaktiven Mittel unterzogen werden soll, wird gemäß den folgenden Kriterien modifiziert: wenn eine Carboxylgruppe, die für die Beibehaltung der pharmakologischen Aktivität nicht kritisch ist, am ursprünglichen ITP verfügbar ist und keine weitere reaktive funktionelle Gruppe am ITP vorhanden ist, so wird die Carbonsäuregruppe als Verknüpfungsstelle für die Modifikation der Linker-reaktiven Einheit ausgewählt. wenn keine Carbonsäuren verfügbar sind, so werden

andere funktionelle Gruppen, die für die Beibehaltung der pharmakologischen Aktivität nicht kritisch sind, als Verknüpfungspunkt für die Modifikation der Linker-reaktiven Einheit ausgewählt. Wenn mehrere funktionelle Gruppen an einem ITP verfügbar sind, so wird eine Kombination von Schutzgruppen in der Weise herangezogen, dass nach Addition der Linker-reaktiven Einheit und Schutzgruppenentfernung sämtlicher geschützter funktioneller Gruppen immer noch eine Beibehaltung der pharmakologischen Aktivität erreicht wird. Wenn am ITP keine funktionellen Gruppen verfügbar sind, so ermöglichen Synthesebemühungen eine Modifikation des ursprünglichen ITP auf solche Weise, dass eine Beibehaltung der biologischen Aktivität und eine Beibehaltung des Rezeptors oder der Zielspezifität erreicht werden.

[0089] Die chemisch reaktive Einheit wird so platziert, dass bei Bindung des ITP an die Blutkomponente das ITP einen wesentlichen Anteil der Aktivität des unmodifizierten ITP beibehält.

[0090] In noch spezifischerer Weise werden die einzelnen ITPs, die für die Derivatisierung mit einem Linker und einer reaktiven Einheit ausgewählt sind, gemäß den folgenden Kriterien modifiziert: wenn eine terminale Carboxylgruppe am therapeutischen Peptid verfügbar ist und für die Beibehaltung der pharmakologischen Aktivität nicht kritisch ist und keine weiteren empfindlichen funktionellen Gruppen am ITP vorhanden sind, so wird die Carbonsäure als Verknüpfungspunkt für die Modifikation der Linker-reaktiven Einheit gewählt. Wenn die terminale Carboxylgruppe an der pharmakologischen Aktivität beteiligt ist oder wenn keine Carbonsäuren verfügbar sind, so werden beliebige andere empfindliche funktionelle Gruppen, die für die Beibehaltung der pharmakologischen Aktivität nicht kritisch sind, als Verknüpfungspunkt für die Modifikation der Linker-reaktiven Einheit ausgewählt. Wenn mehrere empfindliche funktionelle Gruppen an einem ITP verfügbar sind, so wird eine Kombination von Schutzgruppen in der Weise herangezogen, dass nach Addition der Linker-reaktiven Einheit und Schutzgruppenentfernung von sämtlichen geschützten empfindlichen funktionellen Gruppen immer noch eine Beibehaltung der pharmakologischen Aktivität erreicht wird. Wenn keine empfindlichen funktionellen Gruppen am therapeutischen Peptid verfügbar sind, so ermöglichen es Synthesebemühungen, eine Modifikation des ursprünglichen Peptids in der Weise vorzunehmen, dass ein Weg für die Beibehaltung der biologischen Aktivität und für die Beibehaltung der Rezeptor- oder Zielspezifität gefunden wird. In diesem Fall erfolgt die Modifikation am gegenüberliegenden Ende des Peptids.

[0091] Ein NHS-Derivat kann aus einer Carbonsäure in Abwesenheit von weiteren empfindlichen funktionellen Gruppen im therapeutischen Peptid synthetisiert werden. Speziell wird ein derartiges therapeutisches Peptid mit N-Hydroxysuccinimid in wasserfreiem CH_2Cl_2 und mit EDC umgesetzt. Das Produkt wird durch Chromatographie gereinigt oder aus dem entsprechenden Lösungsmittelsystem umkristallisiert, wodurch man das NHS-Derivat erhält.

[0092] Alternativ kann ein NHS-Derivat aus einem ITP, das eine Amino- und/oder Thiolgruppe und eine Carbonsäure enthält, synthetisiert werden. Wenn im Molekül eine freie Amino- oder Thiolgruppe vorhanden ist, so ist es bevorzugt, diese empfindlichen funktionellen Gruppen vor Durchführung der Addition des NHS-Derivats zu schützen. Wenn beispielsweise das Molekül eine freie Aminogruppe enthält, ist eine Umwandlung des Amins in ein mit Fmoc geschütztes Amin oder vorzugsweise in ein mit tBoc geschütztes Amin erforderlich, um die vorstehend beschriebenen chemischen Reaktionen durchzuführen. Die Aminfunktionalität wird nach Herstellung des NHS-Derivats nicht einer Schutzgruppenentfernung unterzogen. Daher gilt dieses Verfahren nur für eine Verbindung, deren Aminogruppe zur Herbeiführung einer angestrebten pharmakologischen Wirkung freigelegt werden muss. Zusätzlich kann ein NHS-Derivat aus einem therapeutischen Peptid, das eine Amino- oder eine Thiolgruppe und keine Carbonsäure enthält, synthetisiert werden. Wenn das gewählte Molekül keine Carbonsäure enthält, kann eine Reihe von bifunktionellen Linkern zur Umwandlung des Moleküls in ein reaktives NHS-Derivat verwendet werden. Beispielsweise erhält man durch Lösen von Ethylenglykol-bis-(succinimidylsuccinat) (EGS) und Triethylamin in DMF und durch Zugabe zu dem eine freie Aminogruppe enthaltenden Molekül (in einem Verhältnis von 10:1 zugunsten von EGS) das Mono-NHS-Derivat. Zur Bildung eines NHS-Derivats aus einem mit Thiol derivatisierten Molekül kann man N-[γ -Maleinimidobutyryloxy]-succinimidester (GMBS) und Triethylamin in DMF verwenden. Die Maleinimidogruppe reagiert mit dem freien Thiol und das NHS-Derivat wird aus dem Reaktionsgemisch durch Chromatographie an Siliciumdioxid oder durch HPLC gereinigt.

[0093] Ein NHS-Derivat kann auch aus einem ITP mit einem Gehalt an mehreren empfindlichen funktionellen Gruppen synthetisiert werden. Jeder Einzelfall ist zu analysieren und unterschiedlich zu lösen. Jedoch ist die Erfindung dank der Tatsache, dass eine große Reihe von Schutzgruppen und bifunktionellen Linkern handelsüblich sind, auf beliebige therapeutische Peptide anwendbar, wobei vorzugsweise nur eine einzige chemische Stufe zur Derivatisierung des ITP oder zwei Stufen, wobei zunächst eine empfindliche Gruppe geschützt wird, oder drei Stufen (Einführung der Schutzgruppe, Aktivierung und Schutzgruppenentfernung) erforderlich sind. In Ausnahmefällen ist eine Synthese unter Anwendung von zahlreichen Stufen (über drei Stufen hinaus) erforderlich, um ein therapeutisches Peptid in ein aktives NHS- oder Maleinimid-Derivat umzuwandeln.

[0094] Ein Maleinimid-Derivat kann auch aus einem ITP mit einem Gehalt an einer freien Aminogruppe und einer freien Carbonsäure synthetisiert werden. Zur Herstellung eines Maleinimid-Derivats aus einem aminoderivatisierten Molekül kann man N-[γ -Maleinimidobutyryloxy]-succinimidester (GMBS) und Triethylamin in DMF

verwenden. Die Succinimidestergruppe reagiert mit der freien Aminogruppe und das Maleinimid-Derivat wird aus dem Reaktionsgemisch durch Kristallisation oder durch Chromatographie an Siliciumdioxid oder durch HPLC gereinigt.

[0095] Schließlich lässt sich ein Maleinimid-Derivat aus einem therapeutischen Peptid, das zahlreiche weitere empfindliche funktionelle Gruppen und keine freien Carboxylgruppen enthält, synthetisieren. Wenn das gewählte Molekül keine Carbonsäure enthält, kann eine Reihe von bifunktionellen Vernetzungsmitteln dazu verwendet werden, das Molekül in ein reaktives NHS-Derivat umzuwandeln. Beispielsweise kann Maleinimidopropionsäure (MPA) an das freie Amin unter Bildung eines Maleinimid-Derivats durch eine Umsetzung des freienamins mit der Carbonsäuregruppe von MPA unter Anwendung einer HBTU/HOBt/DIEA-Aktivierung in DMF gekuppelt werden.

[0096] Alternativ können zahlreiche andere handelsübliche, heterobifunktionelle Vernetzungsmittel je nach Bedarf verwendet werden. Eine große Anzahl von bifunktionellen Verbindungen sind für die Verknüpfung mit Einheiten verfügbar. Zu beispielhaften Reagenzien gehören: Azidobenzoylhydrazid, N-[4-(p-Azidosalicylamino)-butyl]-3'-(2'-pyridyldithio)-propionamid, Bis-sulfosuccinimidylsuberat, Dimethyladipimidat, Disuccinimidyltartrat, N-y-Maleinimidobutyryloxysuccinimidester, N-Hydroxysulfosuccinimidyl-4-azidobenzoat, N-Succinimidyl-(4-azidophenyl)-1,3'-dithiopropionat, N-Succinimidyl-(4-iodoacetyl)-aminobenzoat, Glutaraldehyd und Succinimidyl-4-(N-maleinimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat.

4. Anwendungsmöglichkeiten von modifizierten ITP

[0097] Die erfindungsgemäßen modifizierten ITPs finden zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten, einschließlich: Verwendung zur Behandlung von Diabetes, als Sedativum, zur Behandlung von Störungen des Nervensystems, zur Herbeiführung einer anxiolytischen Wirkung am ZNS, zur Aktivierung des ZNS, zur postoperativen Behandlung und zur Behandlung von Insulin-Resistenz.

A. Diabetes-Behandlungen

[0098] Die erfindungsgemäßen modifizierten ITPs bewirken im allgemeinen eine Normalisierung von Hyperglykämie über glucoseabhängige, insulinabhängige und insulinunabhängige Mechanismen. Als solche sind die modifizierten ITPs wertvoll als primäre Mittel zur Behandlung von Diabetes mellitus vom Typ II und als unterstützende Mittel zur Behandlung von Diabetes mellitus vom Typ I.

[0099] Die Verwendung einer wirksamen Menge von modifizierten ITPs zur Behandlung von Diabetes mellitus hat den Vorteil, dass diese Produkte wirksamer als unmodifizierte ITPs sind. Da die modifizierten ITPs in vivo stabiler sind, können für eine wirksame Behandlung geringere Mengen des Moleküls verabreicht werden. Die vorliegende Erfindung eignet sich insbesondere zur Behandlung von Patienten mit Diabetes sowohl vom Typ I als auch vom Typ II insofern, als die Wirkung des Peptids von der Glucosekonzentration im Blut abhängig ist und somit das Risiko von hyperglykämischen Nebenwirkungen im Vergleich zu den Risiken bei Anwendung der derzeitigen Behandlungsverfahren stark verringert ist.

[0100] Die vorliegende Erfindung stellt auch ein Verfahren zur Behandlung von Diabetes mellitus bei einer Person bereit, wobei das Verfahren die Bereitstellung einer Menge an modifiziertem ITP, die zur Behandlung von Diabetes ausreicht, umfasst, wobei die Zusammensetzung ein modifiziertes ITP enthält.

B. Behandlung von Störungen des Nervensystems

[0101] Die erfindungsgemäßen modifizierten ITPs finden auch als Sedativa Anwendung. Gemäß einem Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zum Sedieren eines Säugetiersubjekts mit einer Abnormalität, die zu einer verstärkten Aktivierung des zentralen oder peripheren Nervensystems führt, unter Verwendung der modifizierten ITPs bereitgestellt. Das Verfahren umfasst die Verabreichung eines modifizierten ITP an das Subjekt in einer ausreichenden Menge, um bei dem Subjekt eine sedative oder anxiolytische Wirkung herbeizuführen. Das modifizierte ITP kann intrazerebroventrikulär, oral, subkutan, intramuskulär, oder intravenös verabreicht werden. Derartige Verfahren eignen sich zur Behandlung oder Besserung von Zuständen des Nervensystems, wie Angstzustände, Bewegungsstörungen, Aggression, Psychosen, Anfällen, panischen Attacken, Hysterie und Schlafstörungen.

[0102] Gemäß einem verwandten Aspekt umfasst die Erfindung ein Verfahren zur Verstärkung der Aktivität eines Säugetiersubjekts, wobei das Verfahren die Verabreichung eines modifizierten ITP an das Subjekt in einer Menge, die zur Herbeiführung einer Aktivierungswirkung bei dem Subjekt ausreicht, umfasst. Vorzugsweise befindet sich das Subjekt in einem Zustand, der zu einer verminderten Aktivierung des zentralen oder peripheren Nervensystems führt. Die modifizierten ITPs finden insbesondere Anwendung bei der Behandlung oder Besserung von Depressionen, schizoaffektiven Störungen, Schlafapnoe, Aufmerksamkeitsdefizitsyndromen mit geringer Konzentrationsfähigkeit, Gedächtnisverlust, Vergesslichkeit und Narkolepsie, um nur einige Zu-

stände aufzuführen, bei denen ein Arousal des Zentralnervensystems vorteilhaft sein kann. Die erfindungsgemäßen modifizierten ITPs können zur Herbeiführung eines Arousals zur Behandlung oder Besserung von Depressionen, schizoaffektiven Störungen, Schlafapnoe, Aufmerksamkeitsdefizitsyndromen mit geringer Konzentrationsfähigkeit, Gedächtnisverlust, Vergesslichkeit und Narkolepsie verwendet werden. Die therapeutische Wirksamkeit der Behandlung mit dem modifizierten ITP kann durch Befragung des Patienten zur Bestimmung von dessen Zustand, durch psychologisch/neurologische Tests oder aufgrund der Besserung der mit diesen Zuständen verbundenen Symptomen verfolgt werden. Beispielsweise kann die Behandlung von Narkolepsie durch Überwachung des Auftretens von narkoleptischen Anfällen verfolgt werden. Als weiteres Beispiel können die Einflüsse von modifizierten ITPs auf die Konzentrationsfähigkeit oder auf die Gedächtniskapazität eines Patienten unter Anwendung zahlreicher diagnostischer Tests, die dem Fachmann geläufig sind, getestet werden.

C. Postoperative Behandlung

[0103] Die erfindungsgemäßen modifizierten ITPs können für postoperative Behandlungen herangezogen werden. Ein Patient benötigt die erfindungsgemäßen modifizierten ITPs etwa 1 bis 16 Stunden vor Durchführung eines chirurgischen Eingriffs, während des Eingriffs am Patienten und nach dem Eingriff für eine Zeitspanne von nicht mehr als etwa 5 Tage.

[0104] Die erfindungsgemäßen modifizierten ITPs werden in einem Zeitraum von etwa 16 Stunden bis etwa 1 Stunde vor Beginn der Operation verabreicht. Der Zeitpunkt vor der Operation, an dem die erfindungsgemäßen Verbindungen zur Verringerung von katabolischen Effekten und der Insulin-Resistenz zu verabreichen sind, hängt von einer Anzahl von Faktoren ab. Diese Faktoren sind dem Arzt mit üblicher Erfahrung im allgemeinen bekannt. Hierzu gehören insbesondere die Tatsache, ob der Patient nüchtern ist oder eine Glucoseinfusion, ein Getränk oder eine beliebige andere Form einer Unterstützung während der Vorbereitungsperiode vor der Operation erhalten hat. Zu weiteren wichtigen Faktoren gehören das Geschlecht, das Gewicht und das Alter des Patienten, die Ursachen, die einer etwaigen Unfähigkeit zur Regulierung der Blutglucose zugrunde liegen, das zu erwartende Ausmaß des durch die Operation verursachten Traumas, die Verabreichungswege und die biologische Verfügbarkeit, die Beständigkeit im Körper, die Zubereitungsart und die Wirkungsstärke der verabreichten Verbindung. Eine bevorzugte Zeitspanne, innerhalb der die Verabreichung der erfindungsgemäßen modifizierten ITPs beginnen soll, beträgt etwa 1 bis etwa 10 Stunden vor Operationsbeginn. Eine besonders bevorzugte Zeitspanne für den Beginn der Verabreichung beträgt 2 bis 8 Stunden vor Operationsbeginn.

[0105] Eine Insulin-Resistenz im Anschluss an einen bestimmten Operationstyp, einer selektiven Bauchoperation, ist am ersten Tag nach der Operation besonders intensiv, dauert mindestens 5 Tage und kann bis zur Normalisierung bis zu 3 Wochen benötigen. Der postoperative Patient benötigt möglicherweise eine Verabreichung der erfindungsgemäß verwendeten ITPs für eine Zeitspanne im Anschluss an das Operationstrauma, die von Faktoren abhängt, die der Arzt mit üblicher Erfahrung erkennt und festlegen kann. Hierzu gehören die Tatsache, ob der Patient nüchtern ist oder eine Glucoseinfusion, ein Getränk oder eine beliebige andere Form einer Unterstützung im Anschluss an die Operation erhalten hat, sowie ferner (ohne Beschränkung hierauf) das Geschlecht, das Gewicht und das Alter des Patienten, die Ursachen, die einer etwaigen Unfähigkeit zur Regulierung der Blutglucose zugrunde liegen, das zu erwartende Ausmaß des durch die Operation verursachten Traumas, der Verabreichungsweg und die biologische Verfügbarkeit, die Beständigkeit im Körper, die Zubereitungsart und die Wirkungsstärke der verabreichten Verbindung. Die bevorzugte Verabreichungsdauer der erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen beträgt nicht mehr als 5 Tage im Anschluss an die Operation.

D. Behandlung von Insulin-Resistenz

[0106] Die erfindungsgemäßen modifizierten ITPs können zur Behandlung von Insulin-Resistenz unabhängig von ihrer Verwendung bei der postoperativen Behandlung eingesetzt werden. Eine Insulin-Resistenz kann auf eine Verringerung der Bindung von Insulin an Zelloberflächenrezeptoren oder auf Veränderungen im intrazellulären Stoffwechsel zurückzuführen sein. Der erste Typ, der durch eine Verringerung der Insulinempfindlichkeit charakterisiert ist, kann typischerweise durch eine erhöhte Insulinkonzentration überwunden werden. Der zweite Typ, der durch eine Verringerung der Insulin-Reaktionsfähigkeit charakterisiert ist, kann nicht durch große Mengen an Insulin überwunden werden. Eine Insulin-Resistenz im Anschluss an ein Trauma kann durch Insulindosen überwunden werden, die proportional zum Grad der Insulin-Resistenz sind. Sie ist somit offensichtlich durch eine Verringerung der Insulin-Empfindlichkeit hervorgerufen.

[0107] Die Dosis von modifizierten ITPs, die eine Normalisierung des Blutglucosespiegels eines Patienten bewirken, hängt von einer Anzahl von Faktoren ab, wozu (ohne Beschränkung hierauf) folgende Faktoren gehören: Geschlecht, Gewicht und Alter des Patienten, die Schwere der Unfähigkeit zur Regulierung der Blutglucose, die Ursachen, die einer Unfähigkeit zur Regulierung der Blutglucose zugrunde liegen, die Tatsache, ob Glucose oder eine andere Kohlenhydratquelle gleichzeitig verabreicht wird, der Verabreichungsweg und die bio-

logische Verfügbarkeit, die Beständigkeit im Körper, die Zubereitungsart und die Wirkungsstärke.

5. Verabreichung der modifizierten ITPs

[0108] Die modifizierten ITPs werden in einem physiologisch verträglichen Medium verabreicht, z. B. in entionisiertem Wasser, phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), Kochsalzlösung, wässrigem Ethanol oder einem anderen Alkohol, Plasma, proteinartigen Lösungen, Mannit, wässriger Glucose, Alkohol, Pflanzenölen oder dergl. Zu weiteren Additiven, die zugesetzt werden können, gehören Puffer, wobei die Medien im allgemeinen auf einen pH-Wert im Bereich von etwa 5 bis 10 gepuffert werden, wobei der Puffer im allgemeinen eine Konzentration von etwa 50 bis 250 mM aufweist, wobei die Salzkonzentration im allgemeinen im Bereich von etwa 5 bis 500 mM liegt. Ferner sind physiologisch verträgliche Stabilisatoren und dergl. enthalten. Die Zusammensetzungen können aus Zweckmäßigkeitsgründen für die Lagerung und den Transport lyophilisiert werden.

[0109] Die modifizierten ITPs werden großenteils oral, parenteral, z. B. intravaskulär (IV), intraarteriell (IA), intramuskulär (IM), subkutan (SC) oder dergl. verabreicht. Die Verabreichung kann in geeigneten Situationen durch Transfusion erfolgen. In einigen Fällen, bei denen die Reaktion der funktionellen Gruppe relativ langsam ist, kann die Verabreichung oral, nasal, rektal, transdermal oder über ein Aerosol erfolgen, wobei die Natur des Konjugats eine Übertragung auf das vaskuläre System ermöglicht. Üblicherweise wird eine einzige Injektion angewandt, obgleich gegebenenfalls auch mehr als eine Injektion angewandt werden kann. Die modifizierten ITPs werden mit beliebigen zweckmäßigen Mitteln, z. B. Spritzen, Trokars, Katheter oder dergl., verabreicht.

Die spezielle Verabreichungsart hängt von der zu verabreichenden Menge, der Tatsache, ob ein einziger Bolus gegeben oder eine kontinuierliche Verabreichung durchgeführt werden soll, oder dergl. ab. Vorzugsweise erfolgt die Verabreichung intravaskulär, wobei die Zufuhrstelle für die Erfindung nicht kritisch ist und die Zufuhr vorzugsweise an einer Stelle erfolgt, wo eine rasche Durchblutung vorliegt, z. B. an einer intravenösen, peripheren oder zentralen Vene. Weitere Verabreichungswege finden dann Anwendung, wenn die Verabreichung mit Techniken mit langsamer Wirkstofffreisetzung oder einer Schutzmatrix gekuppelt sind. Es ist beabsichtigt, die ITPs wirksam im Blut zu verteilen, so dass sie zu einer Reaktion mit den Blutkomponenten befähigt sind. Die Konzentration des Konjugats variiert in breitem Umfang und reicht im allgemeinen von etwa 1 pg/ml bis 50 mg/ml. Die intravaskulär verabreichte Gesamtmenge liegt im allgemeinen im Bereich von etwa 0,1 mg/ml bis etwa 10 mg/ml und insbesondere von etwa 1 mg/ml bis etwa 5 mg/ml.

[0110] Aufgrund der Bindung an langlebige Komponenten des Bluts, wie Immunoglobulin, Serumalbumin, rote Blutkörperchen und Blutplättchen, ergibt sich eine Reihe von Vorteilen. Die Aktivität der modifizierten ITP-Verbindung wird auf Tage bis Wochen verlängert. Während dieser Zeitspanne braucht nur eine einzige Verabreichung zu erfolgen. Es lässt sich eine höhere Spezifität erreichen, da der Wirkstoff vorwiegend an große Moleküle gebunden wird, wo die Wahrscheinlichkeit geringer ist, dass er intrazellulär aufgenommen wird und andere physiologische Vorgänge stört.

[0111] Die Bildung der kovalenten Bindung zwischen der Blutkomponente kann in vivo oder ex vivo erfolgen. Zur ex vivo-Bildung einer kovalenten Bindung wird das modifizierte ITP zu Blut, Serum oder Kochsalzlösung mit einem Gehalt an humanem Serumalbumin oder IgG gegeben, um die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem modifizierten ITP und der Blutkomponente zu ermöglichen. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird das ITP mit Maleinimid modifiziert und mit Humanserumalbumin in Kochsalzlösung umgesetzt. Nachdem das modifizierte ITP mit der Blutkomponente unter Bildung eines ITP-Protein-Konjugats reagiert hat, kann das Konjugat dem Patienten verabreicht werden.

[0112] Alternativ kann das modifizierte ITP dem Patienten direkt verabreicht werden, so dass die kovalente Bindung zwischen dem modifizierten ITP und der Blutkomponente in vivo entsteht.

6. Überwachung der Anwesenheit von modifizierten ITPs

[0113] Das Blut des Säugetier-Wirts kann in Bezug auf die Aktivität der ITPs und/oder das Vorliegen der modifizierten ITPs überwacht werden. Entnimmt man einen Teil oder eine Probe des Bluts des Wirts zu verschiedenen Zeitpunkten, so lässt sich feststellen, ob das ITP eine Bindung mit den langlebigen Blutkomponenten in ausreichender Menge eingegangen ist, um eine therapeutische Wirkung zu erzielen. Anschließend wird der Spiegel der ITP-Verbindung im Blut bestimmt. Gegebenenfalls kann man auch feststellen, an welche Blutkomponenten die ITP-Moleküle gebunden sind. Dies ist bei Anwendung nicht-spezifischer ITPs von besonderer Bedeutung. Für spezifische Maleinimid-ITPs ist es wesentlich einfacher, die Halbwertszeit von Serumalbumin und IgG zu berechnen.

[0114] Die modifizierten GLPS können unter Anwendung von Tests auf insulinotrope Aktivität, HPLC-MS oder von gegen ITPs gerichtete Antikörper überwacht werden.

A. Test auf insulinotrope Aktivität

[0115] Die vorliegende Erfindung betrifft modifizierte ITP-Derivate, deren insulinotrope Aktivität größer oder gleich groß wie die insulinotrope Aktivität der nicht-modifizierten ITPs ist. Die insulinotrope Beschaffenheit einer Verbindung lässt sich bestimmen, indem man diese Verbindung Säugetierzellen zur Verfügung stellt oder die Verbindung Tieren injiziert und die Freisetzung von immunoreaktivem Insulin (IRI) in das Medium bzw. in das Kreislaufsystem des Tiers überwacht. Die Anwesenheit von IRI wird durch Anwendung eines Radioimmunoassay, der spezifisch Insulin nachweisen kann, erfasst.

[0116] Obgleich beliebige Radioimmunoassays, die zum Nachweis der Anwesenheit von IRI befähigt sind, herangezogen werden können, ist es bevorzugt, eine Modifikation des Testverfahrens von J. D. M. Albano et al. (Acta Endocrinol., Bd. 70 (1972), S. 487–509) heranzuziehen. Bei dieser Modifikation wird ein Phosphat/Albumin-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 verwendet. Das Inkubationsgemisch wird hergestellt, indem man nacheinander 500 µl Phosphatpuffer, 50 µl Perfusatprobe oder Ratten-Insulinstandard in Perfusat, 100 µl anti-Insulin-Antiserum (Wellcome Laboratories, Verdünnung 1:40 000) und 100 µl [¹²⁵I]-Insulin unter Bildung eines Gesamtvolumens von 750 µl in ein Einmal-Glasröhrchen der Abmessungen 10 × 75 mm gibt. Nach 2- bis 3-tägiger Inkubation bei 4°C wird freies Insulin durch Aktivkohletrennung von dem an Antikörper gebundenem Insulin getrennt. Die Testempfindlichkeit beträgt im allgemeinen 1–2 µU/ml. Um die Freisetzung von IRI in das Zellkulturmedium von gezüchteten Zellen in einer Gewebekultur zu messen, baut man vorzugsweise eine radioaktive Markierung in das Proinsulin ein. Obgleich man beliebige radioaktive Markierungen, die zur Markierung eines Polypeptids befähigt sind, verwenden kann, ist es bevorzugt, [³H]-Leucin zu verwenden, um eine Markierung von Proinsulin zu erreichen. Die Markierung kann für eine beliebige Zeitspanne durchgeführt werden, die ausreicht, einen nachweisbar markierten Pool von Proinsulinmolekülen zu bilden. Es ist jedoch bevorzugt, Zellen in Gegenwart einer radioaktiven Markierung während einer 60-minütigen Zeitspanne zu inkubieren. Obgleich beliebige Zellen, die zur Expression von Insulin befähigt sind, herangezogen werden können, um festzustellen, ob eine Verbindung eine insulinotrope Wirkung besitzt, ist es bevorzugt, Ratten-Insulinomzellen und insbesondere RIN-38-Ratten-Insulinomzellen zu verwenden. Derartige Zellen können in beliebigen geeigneten Medien gezüchtet werden. Jedoch ist die Züchtung unter Verwendung von DME-Medium mit einem Gehalt an 0,1 % BSA und 25 mM Glucose bevorzugt.

[0117] Die insulinotrope Beschaffenheit eines modifizierten ITP kann auch durch pankreatische Infusion bestimmt werden. Das in situ isolierte, perfundierte Ratten-Pankreaspräparat stellt eine Modifikation des Verfahrens von J. C. Penhos et al. (Diabetes, Bd. 18 (1969), S. 733–738) dar. Gemäß einem derartigen Verfahren werden Ratten in nüchternem Zustand (vorzugsweise männliche Albino-Ratten von Charles River-Stamm) mit einem Gewicht von 350–600 g mit einer intraperitonealen Injektion von Amytal-Natrium (Eli Lilly and Co., 160 ng/kg) betäubt. Renale, adrenale, gastrische und untere Colon-Blutgefäße werden abgebunden. Der gesamte Dünndarm wird einer Resektion unterworfen, ausgenommen etwa 4 cm des Duodenums und das Kolon descendens und das Rektum. Somit wird nur ein geringer Teil des Dünndarms perfundiert, wodurch eine mögliche Störung durch enterische Substanzen mit insulinotroper Immunoreaktivität auf ein Minimum beschränkt wird. Beim Perfusat handelt es sich vorzugsweise um einen modifizierten Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer mit 4 % Dextran T70 und 0,2 % Rinderserumalbumin (Fraktion V). Vorzugsweise wird ein Gemisch aus 95 % O₂ und 5 % CO₂ eingeleitet. Eine Vierkanal-Walzenlagerpumpe mit nicht-pulsierendem Strom (Buchler polystatic, Buchler Instruments Division, Nuclear-Chicago Corp.) wird vorzugsweise verwendet. Ein Übergang von einer Perfusatsquelle auf eine andere wird vorzugsweise durch Schalten eines Dreiweghahns erreicht. Die Art und Weise der Durchführung, Modifikation und Analyse der Perfusion erfolgt vorzugsweise gemäß den Verfahren von G. C. Weir et al. (J. Clin. Invest., Bd. 54 (1974), S. 1403–1412 (auf diese Druckschrift wird durch Verweis Bezug genommen)).

B. HPLC-MS

[0118] Mit Massenspektrometrie (MS) gekuppelte HPLC kann zum Test auf die Anwesenheit von Peptiden und modifizierten Peptiden herangezogen werden, wie es dem Fachmann geläufig ist. Typischerweise werden zwei mobile Phasen verwendet: 0,1 % TFA/Wasser und 0,1 % TFA/Acetonitril. Die Säulentemperaturen sowie die Gradientenbedingungen können variiert werden. Spezielle Einzelheiten hierzu finden sich im nachstehenden Beispielteil.

C. Antikörper

[0119] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Verfahren zur Bestimmung der Konzentration der ITPs oder von deren Konjugaten in biologischen Proben (z. B. Blut), unter Verwendung von für die ITPs spezifischen Antikörpern sowie die Verwendung derartiger Antikörper zur Behandlung von Toxizität, die potentiell mit derartigen ITPs oder Konjugaten verbunden ist. Dies ist vorteilhaft, weil die erhöhte Stabilität und Lebensdauer der

ITPs in vivo im Patienten zu neuen Schwierigkeiten während der Behandlung, einschließlich einer erhöhten Toxizitätsgefahr, führen kann.

[0120] Die Verwendung von anti-ITP-Antikörpern, entweder monoklonal oder polyklonal, mit Spezifität für bestimmte ITPs kann zur Lösung derartiger Probleme beitragen. Der Antikörper kann von einem Wirt, der mit dem speziellen, modifizierten ITP oder mit einem immunogenen Fragment des Mittels oder einem synthetisierten Immunogen, das einer antigenen Determinante des Mittels entspricht, immunisiert worden ist, erzeugt oder abgeleitet werden. Bevorzugte Antikörper weisen eine hohe Spezifität und Affinität für die nativen, derivatisierten und konjugierten Formen des modifizierten ITP auf. Derartige Antikörper können auch mit Enzymen, Fluorochromen oder radioaktiven Markierungen markiert sein.

[0121] Für modifizierte ITPs spezifische Antikörper lassen sich unter Verwendung von gereinigten ITPs zur Induktion von derivatisierten, ITP-spezifischen Antikörpern erzeugen. Unter "Induktion von Antikörpern" sind nicht nur die Stimulation einer Immunantwort durch Injektion an Tiere zu verstehen, sondern auch analoge Stufen bei der Herstellung von synthetischen Antikörpern oder anderen spezifisch bindenden Molekülen, z. B. ein Screening von rekombinanten Immunglobulin-Bibliotheken. Sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper können gemäß aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren erzeugt werden.

[0122] Die Antikörper können zur Überwachung der Anwesenheit von ITP-Peptiden im Blutstrom verwendet werden. Blut- und/oder Serumproben können durch SDS-PAGE und Western-Blotting analysiert werden. Derartige Techniken ermöglichen die Analyse von Blut oder Serum zur Bestimmung der Bindung der modifizierten ITPs an Blutkomponenten.

[0123] Die Antikörper gegen das therapeutische Mittel können auch zur Behandlung einer Toxizität, die durch die Verabreichung des modifizierten ITP herbeigeführt worden ist, verwendet werden. Sie können ex vivo oder in vivo verwendet werden. Ex vivo-Verfahren umfassen eine Immunodialyse-Behandlung von Toxizität unter Verwendung von Antikörpern gegen das therapeutische Mittel, die an festen Trägern fixiert sind. In vivo-Verfahren umfassen die Verabreichung von Antikörpern gegen das therapeutische Mittel in Mengen, die die Herbeiführung einer Clearance von Antikörper-Mittel-Komplexen bewirken.

[0124] Die Antikörper können zur Entfernung der modifizierten ITPs und von Konjugaten hiervon aus dem Blut eines Patienten unter ex vivo-Kontakt des Bluts mit den Antikörpern unter sterilen Bedingungen entfernt werden. Beispielsweise können die Antikörper an einer Säulenmatrix fixiert oder anderweitig immobilisiert werden und das Blut kann dem Patienten entnommen und über die Matrix geleitet werden. Die modifizierten ITPs binden an die Antikörper. Das Blut, das eine geringe Konzentration an dem ITP enthält, kann sodann in das Kreislaufsystem des Patienten zurückgeleitet werden. Die Menge des entfernten modifizierten ITP kann durch Einstellen von Druck und Strömungsgeschwindigkeit gesteuert werden. Eine bevorzugte Entfernung der modifizierten ITPs aus der Plasmakomponente von Patientenblut kann beispielsweise unter Verwendung einer semipermeablen Membran erreicht werden oder indem man zunächst die Plasmakomponente von der zellulären Komponente durch aus dem Stand der Technik bekannte Maßnahmen abtrennt, bevor man die Plasmakomponente über eine Matrix, die die antitherapeutischen Antikörper enthält, leitet. Alternativ kann die bevorzugte Entfernung von ITP-konjugierten Blutzellen, einschließlich roten Blutkörperchen, durchgeführt werden, indem man die Blutzellen gewinnt und im Patientenblut einengt und diese Zellen mit fixierten anti-ITP-Antikörpern kontaktiert, um die Serumkomponente des Patientenbluts auszuschließen.

[0125] Die anti-ITP-Antikörper können in vivo parenteral einem Patienten verabreicht werden, der eine Behandlung mit dem modifizierten ITP oder Konjugaten davon erhalten hat. Die Antikörper binden die ITP-Verbindungen und Konjugate hiervon. Nach erfolgter Bindung wird die ITP-Aktivität behindert, wenn nicht sogar vollständig blockiert, wodurch die biologisch wirksame Konzentration der ITP-Verbindung im Blutkreislauf des Patienten verringert und schädliche Nebenwirkungen auf ein Minimum begrenzt werden. Außerdem erleichtert der gebundene Antikörper-ITP-Komplex die Clearance der ITP-Verbindungen und der Konjugate hiervon aus dem Blutkreislauf des Patienten.

[0126] Nachstehend wird die Erfindung durch die folgenden nicht-beschränkenden Beispiele erläutert.

Beispiele

Allgemeines

[0127] Festphasen-Peptidsynthesen der insulinotropen Peptide im 100 µmol-Maßstab wurden unter Anwendung einer Festphasensynthese und eines manuellen Symphony Peptide Synthesizer-Geräts mit Fmoc-geschütztem Rink Amide MBHA-Harz, Fmoc-geschützten Aminosäuren, O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) in N,N-Dimethylformamid (DMF)-Lösung und Aktivierung mit N-Methylmorpholin (NMM) und Entfernung der Fmoc-Schutzgruppen mit Piperidin durchgeführt (Stufe 1). Falls erforderlich, wurde eine selektive Schutzgruppenentfernung der Lys(Aloc)-Gruppe manuell durchgeführt und erreicht, indem man das Harz mit einer Lösung von 3 Äquivalenten Pd(PPh₃)₄ in Lösung in 5 ml CHCl₃:NMM:HOAc (18:1:0,5) 2 Stunden lang behandelte (Stufe 2). Sodann wurde das Harz mit CHCl₃ (6 × 5 ml), 20 % HOAc

in DCM (6 × 5 ml), DCM (6 × 5 ml) und DMF (6 × 5 ml) gewaschen. In einigen Fällen wurde sodann die Synthese für die Addition einer AEEA-Gruppe (Aminoethoxyethoxyessigsäure-Gruppe), für die Addition von Essigsäure oder für die Addition von 3-Maleinimidopropionsäure (MPA) reautomatisiert (Stufe 3). Die Spaltung vom Harz und die Isolierung des Produkts wurden unter Verwendung von 85 % TFA/5 % TIS/5 % Thioanisol und 5 % Phenol durchgeführt, wonach die Fällung mit eiskaltem Et₂O erfolgte (Stufe 4). Die Produkte wurden durch präparative Umkehrphasen-HPLC unter Verwendung eines präparativen binären Varian (Rainin)-HPLC-Systems gereinigt: Gradientenelution mit 30–55 % B (0,045 % TFA in H₂O (A) und 0,045 % TFA in CH₃CN (B)) innerhalb von 180 Minuten mit 9,5 ml/min unter Verwendung einer Phenomex Luna 10 µ-Phenyl-Hexyl (21 mm × 25 cm)-Säule und eines UV-Detektors (Varian Dynamax UVD II) bei λ 214 und 254 nm. Die Reinheit des Produkts wurde durch RP-HPLC-Massenspektrometrie unter Verwendung eines Hewlett Packard LCMS-1100-Spektrometers, der mit einem Diodenfelddetektor ausgerüstet war, unter Anwendung einer "Elektro-spray"-Ionisierung zu 95 % bestimmt.

Beispiel 1

Herstellung von Tyr³²-Exendin-4(1-32)-NH₂

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Glu-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Tyr-amid

Fmoc-Rink Amide MBHA-Harz

Stufe 1 ↓ SPPS

H₂N-HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPY-PS

Stufe 2 ↓ 85 % TFA/5 % TIS/5 % Thioanisol/5 % Phenol

TFA TFA TFA
H₂N-HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPY-NH₂
TFA

Tyr³²-Exendin-4 (1-32)-NH₂

[0128] Die Festphasen-Peptidsynthese des Analogens im 100 µmol-Maßstab wird unter Anwendung der manuellen Festphasensynthese und eines Symphony Peptide Synthesizer-Geräts unter Verwendung von Fmoc-geschütztem Rink Amide MBHA-Harz, Fmoc-geschützten Aminosäuren, O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) in N,N-Dimethylformamidlösung (DMF-Lösung) und Aktivierung mit N-Methylmorpholin (NMM) und Entfernung von Fmoc-Schutzgruppen mit Piperidin durchgeführt (Stufe 1). Die Abspaltung vom Harz und die Isolierung des Produkts werden unter Verwendung von 85 % TFA/5 % TIS/5 % Thioanisol und 5 % Phenol und durch anschließende Fällung mit Trockeneisgekühltem Et₂O durchgeführt (Stufe 2). Das Produkt wird durch präparative Umkehrphasen-HPLC unter Verwendung eines präparativen binären Varian (Rainin)-HPLC-Systems gereinigt: Gradientenelution mit 30–55 % B (0,045 % TFA in H₂O (A) und 0,045 % TFA in CH₃CN (B)) innerhalb von 180 Minuten mit 9,5 ml/min unter Verwendung einer Phenomenex Luna 10 µ Phenyl-Hexyl-Säule der Abmessungen 21 mm × 25 cm und eines UV-Detektors (Varian Dynamax UVD II) bei λ 214 und 254 nm durchgeführt. Man erhält das gewünschte Peptid in einer durch RP-HPLC bestimmten Reinheit von >95 %.

Beispiel 2
Herstellung von Tyr³¹-Exendin-4(1-31)

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Glu-Met-Glu-Glu-Glu-
Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Tyr-amid

Fmoc-Rink Amide MBHA-Harz

Stufe 1 ↓ SPPS

H₂N-HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGY-PS

Stufe 2 ↓ 85% TFA/5% TIS/5% Thioanisol/5% Phenol

TFA TFA TFA
H₂N-HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGY-NH₂
TFA

Tyr³¹-Exendin-4 (1-31)-NH₂

[0129] Die Festphasen-Peptidsynthese des Analogens im 100 µmol-Maßstab wird unter Anwendung der manuellen Festphasensynthese und eines Symphony Peptide Synthesizer-Geräts unter Verwendung von Fmoc-geschütztem Rink Amide MBHA-Harz, Fmoc-geschützten Aminosäuren, O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) in N,N-Dimethylformamidlösung (DMF-Lösung) und Aktivierung mit N-Methylmorpholin (NMM) und Entfernung von Fmoc-Schutzgruppen mit Piperidin durchgeführt (Stufe 1). Die Abspaltung vom Harz und die Isolierung des Produkts werden unter Verwendung von 85 % TFA/5 % TIS/5 % Thioanisol und 5 % Phenol und durch anschließende Fällung mit Trockeneisgekühltem Et₂O durchgeführt (Stufe 2). Das Produkt wird durch präparative Umkehrphasen-HPLC unter Verwendung eines präparativen binären Varian (Rainin)-HPLC-Systems gereinigt: Gradientenelution mit 30–55 % B (0,045 % TFA in H₂O (A) und 0,045 % TFA in CH₃CN (B)) innerhalb von 180 Minuten mit 9,5 ml/min unter Verwendung einer Phenomenex Luna 10 µ Phenyl-Hexyl-Säule der Abmessungen 21 mm × 25 cm und eines UV-Detektors (Varian Dynamax UVD II) bei λ 214 und 254 nm durchgeführt. Man erhält das gewünschte Peptid in einer durch RP-HPLC bestimmten Reinheit von >95 %.

Beispiel 3
Herstellung von Exendin-4(9-39)-NH₂

Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-
Leu-Lys-Asu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-amid

Fmoc-Rink Amide MBHA -Harz

Stufe 1 ↓ SPPS

H₂N-DLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-PS

Stufe 2 ↓ 85% TFA/5% TIS/5% Thioanisol/5% Phenol

TFA TFA TFA
H₂N-DLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH₂
TFA

Exendin-4 (9-39)-NH₂

[0130] Die Festphasen-Peptidsynthese des Analogens im 100 µmol-Maßstab wird unter Anwendung der manuellen Festphasensynthese und eines Symphony Peptide Synthesizer-Geräts unter Verwendung von Fmoc-geschütztem Rink Amide MBHA-Harz, Fmoc-geschützten Aminosäuren, O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) in N,N-Dimethylformamidlösung (DMF-Lö-

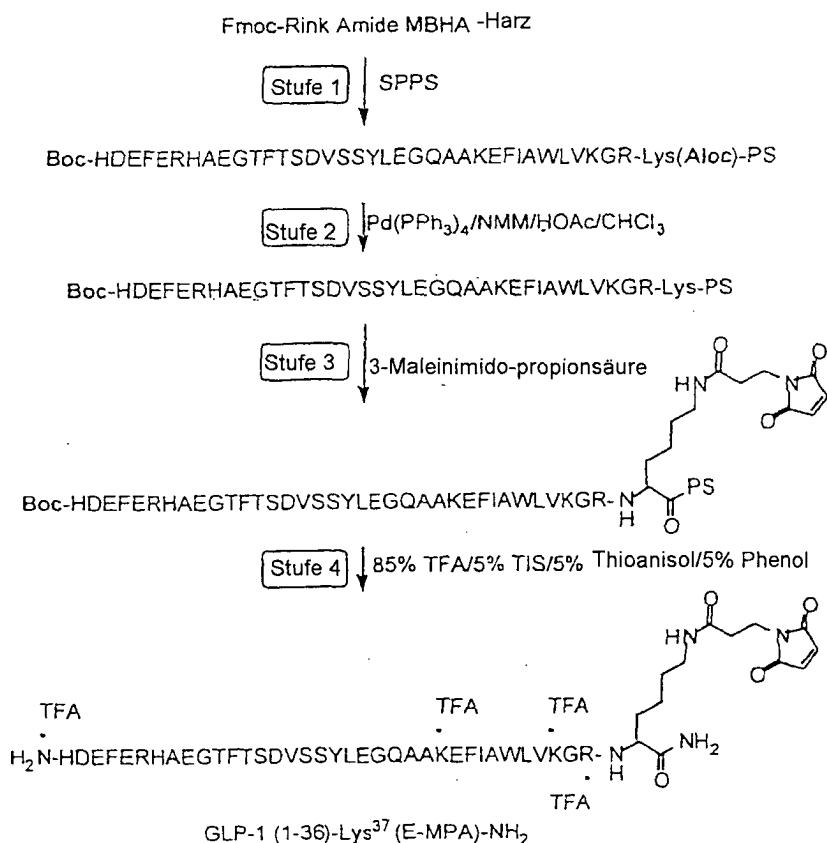
sung) und Aktivierung mit N-Methylmorpholin (NMM) und Entfernung von Fmoc-Schutzgruppen mit Piperidin durchgeführt (Stufe 1). Die Abspaltung vom Harz und die Isolierung des Produkts werden unter Verwendung von 85 % TFA/5 % TIS/5 % Thioanisol und 5 % Phenol und durch anschließende Fällung mit Trockeneis-gekühltem Et₂O durchgeführt (Stufe 2). Das Produkt wird durch präparative Umkehrphasen-HPLC unter Verwendung eines präparativen binären Varian (Rainin)-HPLC-Systems gereinigt: Gradientenelution mit 30–55 % B (0,045 % TFA in H₂O (A) und 0,045 % TFA in CH₃CN (B)) innerhalb von 180 Minuten mit 9,5 ml/min unter Verwendung einer Phenomenex Luna 10 µ Phenyl-Hexyl-Säule der Abmessungen 21 mm × 25 cm und eines UV-Detektors (Varian Dynamax UVD II) bei λ 214 und 254 nm durchgeführt. Man erhält das gewünschte Peptid in einer durch RP-HPLC bestimmten Reinheit von >95 %.

Beispiel 4

Herstellung von GLP-1(1-36)-Lys³⁷(ε-MPA)-NH₂ · 5TFA;

His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-A1a-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Lys (ε-MPA) -NH₂ · 5TFA

[0131] Das modifizierte GLP-1-Peptid wird durch Entknüpfen der Aminogruppe des addierten Lysinrestes gemäß dem nachstehenden Schema synthetisiert.



[0132] Unter automatisierter Peptidsynthese wurden die folgenden geschützten Aminosäuren nacheinander an Rink Amide MBHA-Harz addiert: Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(tBoc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(tBoc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(Pbf)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Boc-His(N-Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Boc-His(N-Trt)-OH (Stufe 1).

[0133] Die selektive Entfernung der Lys(Aloc)-Schutzgruppe wurde manuell durchgeführt und durch Behandlung des Harzes mit einer Lösung von 3 Äquivalenten Pd(PPh₃)₄ in Lösung in 5 ml CHCl₃:NMM:HOAc (18:1:0,5) für 2 Stunden erreicht (Stufe 2). Das Harz wurde sodann mit CHCl₃ (6 × 5 ml), 20 % HOAc in DCM (6 × 5 ml), DCM (6 × 5 ml) und DMF (6 × 5 ml) gewaschen. Die Synthese wurde sodann für die Addition von 3-Maleinimidopropionsäure reautomatisiert (Stufe 3). Die Abspaltung vom Harz und die Isolierung des Pro-

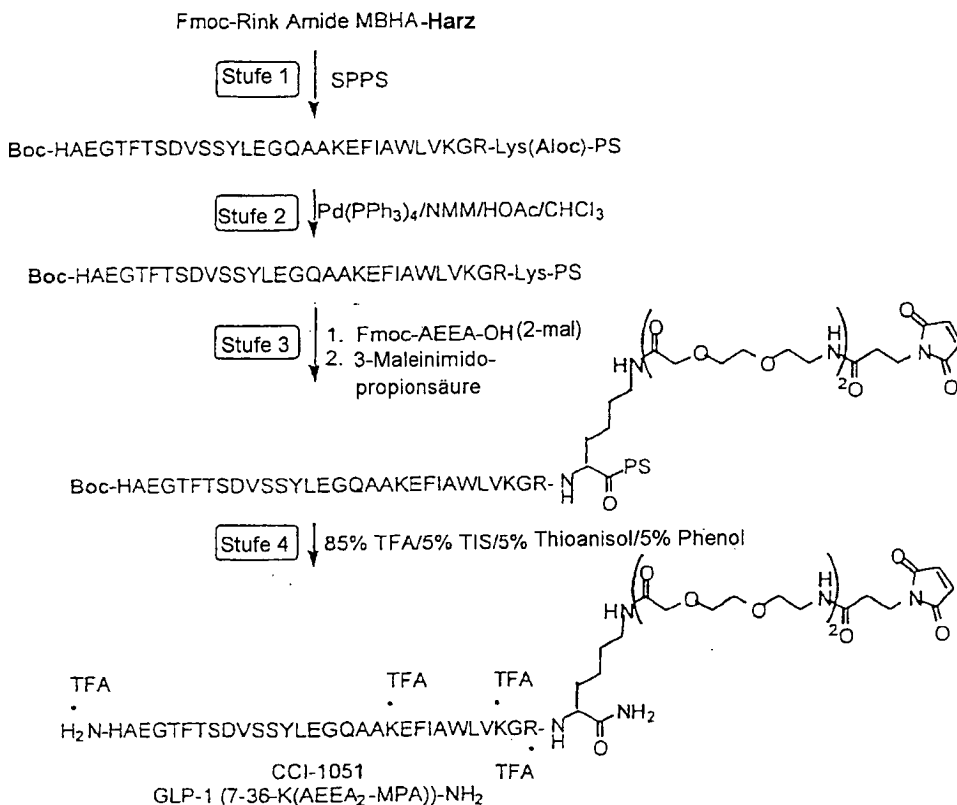
dukts wurden unter Verwendung von 85 % TFA/5 % TIS/5 % Thioanisol und 5 % Phenol und durch anschließende Fällung mit Trockeneis-gekühltem Et₂O durchgeführt (Stufe 4). Das Produkt wurde durch präparative Umkehrphasen-HPLC unter Verwendung eines präparativen binären Varian (Rainin)-HPLC-Systems gereinigt: Gradientenelution mit 30–55 % B (0,045 % TFA in H₂O (A) und 0,045 % TFA in CH₃CN (B)) innerhalb von 180 Minuten mit 9,5 ml/min unter Verwendung einer Phenomenex Luna 10 µ Phenyl-Hexyl-Säule der Abmessungen 21 mm × 25 cm und eines UV-Detektors (Varian Dynamax UVD II) bei λ 214 und 254 nm. Die Reinheit des Produkts wurde durch RP-HPLC-Massenspektrometrie unter Verwendung eines Hewlett Packard LCMS-1100-Spektrometers, der mit einem Diodenfelddetektor ausgerüstet war, unter Anwendung einer "Elektrospray"-Ionisierung zu >95 % bestimmt.

Beispiel 5

Herstellung von GLP-1(1-36)-Lys³⁷(ε-AEEA-AEEA-MPA)-NH₂ · 5TFA;

His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Lys(ϵ -AEEA-AEEA-MPA)-NH₂ · 5TFA

[0134] Das modifizierte GLP-1-Peptid wird durch Entknüpfen des ϵ -N-Terminus des addierten Lysinrestes gemäß dem nachstehenden Schema synthetisiert.



[0135] Unter automatisierter Peptidsynthese wurden die folgenden geschützten Aminosäuren nacheinander an Rink Amide MBHA-Harz addiert: Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(tBoc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(tBoc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(Pbf)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Boc-His(N-Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Boc-His(N-Trt)-OH (Stufe 1).

[0136] Die selektive Entfernung der Lys(Aloc)-Schutzgruppe wurde manuell durchgeführt und durch Behandlung des Harzes mit einer Lösung von 3 Äquivalenten $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ in Lösung in 5 ml CHCl_3 :NMM:HOAc (18:1:0,5) für 2 Stunden erreicht (Stufe 2). Das Harz wurde sodann mit CHCl_3 (6 × 5 ml), 20 % HOAc in DCM (6 × 5 ml), DCM (6 × 5 ml) und DMF (6 × 5 ml) gewaschen. Die Synthese wurde sodann für die Addition der zwei AEEA-Gruppen (Aminoethoxyethoxyessigsäuregruppen) und für die Addition der 3-Maleinimidopropionsäure reautomatisiert (Stufe 3). Die Abspaltung vom Harz und die Isolierung des Produkts wurden unter Ver-

wendung von 85 % TFA/5 % TIS/5 % Thioanisol und 5 % Phenol und durch anschließende Fällung mit Trockeneis-gekühltem Et₂O durchgeführt (Stufe 4). Das Produkt wurde durch präparative Umkehrphasen-HPLC unter Verwendung eines präparativen binären Varian (Rainin)-HPLC-Systems gereinigt: Gradientenelution mit 30–55 % B (0,045 % TFA in H₂O (A) und 0,045 % TFA in CH₃CN (B)) innerhalb von 180 Minuten mit 9,5 ml/min unter Verwendung einer Phenomenex Luna 10 µ Phenyl-Hexyl-Säule der Abmessungen 21 mm × 25 cm und eines UV-Detektors (Varian Dynamax UVD II) bei λ 214 und 254 nm. Die Reinheit des Produkts wurde durch RP-HPLC-Massenspektrometrie unter Verwendung eines Hewlett Packard LCMS-1100-Spektrometers, der mit einem Diodenfelddetektor ausgerüstet war, unter Anwendung einer "Elektrospray"-Ionisierung zu >95 % bestimmt. ESI-MS m/z für C₁₇₄H₂₆₅N₄₄O₅₆ (MH⁺), ber. 3868, gef. [M+H₂)²⁺ 1934, [M+H₃)³⁺ 1290, [M+H₄)⁴⁺ 967.

Beispiel 6

Herstellung von GLP-1(7-36)-Lys³⁷(ε-MPA)-NH₂ · 4TFA;

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Lys(ε-MPA)-NH₂ · 4TFA

[0137] Das modifizierte GLP-1-Peptid wird durch Entknüpfen des ε-N-Terminus des addierten Lysinrestes auf die nachstehend beschriebene Weise synthetisiert.

[0138] Unter Anwendung einer automatisierten Peptidsynthese wurden die folgenden geschützten Aminosäuren sequenziell an Rink Amide MBHA-Harz addiert: Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(tBoc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(tBoc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(Pbf)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Boc-His(N-Trt)-OH (Stufe 1).

[0139] Die selektive Entfernung der Lys(Aloc)-Schutzgruppe wurde manuell durchgeführt und durch Behandlung des Harzes mit einer Lösung von 3 Äquivalenten Pd(PPh₃)₄ in Lösung in 5 ml CHCl₃:NMM:HOAc (18:1:0,5) für 2 Stunden erreicht (Stufe 2). Das Harz wurde sodann mit CHCl₃ (6 × 5 ml), 20 % HOAc in DCM (6 × 5 ml), DCM (6 × 5 ml) und DMF (6 × 5 ml) gewaschen. Die Synthese wurde sodann für die Addition von 3-Maleinimidopropionsäure reautomatisiert (Stufe 3). Die Abspaltung vom Harz und die Isolierung des Produkts wurden unter Verwendung von 85 % TFA/5 % TIS/5 % Thioanisol und 5 % Phenol und durch anschließende Fällung mit Trockeneis-gekühltem Et₂O durchgeführt (Stufe 4). Das Produkt wurde durch präparative Umkehrphasen-HPLC unter Verwendung eines präparativen binären Varian (Rainin)-HPLC-Systems gereinigt: Gradientenelution mit 30–55 % B (0,045 % TFA in H₂O (A) und 0,045 % TFA in CH₃CN (B)) innerhalb von 180 Minuten mit 9,5 ml/min unter Verwendung einer Phenomenex Luna 10 µ Phenyl-Hexyl-Säule der Abmessungen 21 mm × 25 cm und eines UV-Detektors (Varian Dynamax UVD II) bei λ 214 und 254 nm. Die Reinheit des Produkts wurde durch RP-HPLC-Massenspektrometrie unter Verwendung eines Hewlett Packard LCMS-1100-Spektrometers, der mit einem Diodenfelddetektor ausgerüstet war, unter Anwendung einer "Elektrospray"-Ionisierung zu >95 % bestimmt.

Beispiel 7

Herstellung von GLP-1(7-36)-Lys³⁷(ε-AEEA-AEEA-MPA)-NH₂ · 4TFA;

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Lys(ε-AEEA-AEEA-MPA)-NH₂ · 4TFA

[0140] Das modifizierte GLP-1-Peptid wird durch Entknüpfen des ε-N-Terminus des addierten Lysinrestes auf die nachstehend beschriebene Weise synthetisiert.

[0141] Unter Anwendung einer automatisierten Peptidsynthese wurden die folgenden geschützten Aminosäuren sequenziell an Rink Amide MBHA-Harz addiert: Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(tBoc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(tBoc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(Pbf)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Boc-His(N-Trt)-OH (Stufe 1).

[0142] Die selektive Entfernung der Lys(Aloc)-Schutzgruppe wurde manuell durchgeführt und durch Behandlung des Harzes mit einer Lösung von 3 Äquivalenten $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ in Lösung in 5 ml CHCl_3 :NMM:HOAc (18:1:0,5) für 2 Stunden erreicht (Stufe 2). Das Harz wurde sodann mit CHCl_3 (6 × 5 ml), 20 % HOAc in DCM (6 × 5 ml), DCM (6 × 5 ml) und DMF (6 × 5 ml) gewaschen. Die Synthese wurde sodann für die Addition der zwei AEEA-Gruppen (Aminoethoxyethoxyessigsäuregruppen) und für die Addition von 3-Maleinimidopropionsäure reautomatisiert (Stufe 3). Die Abspaltung vom Harz und die Isolierung des Produkts wurden unter Verwendung von 85 % TFA/5 % TIS/5 % Thioanisol und 5 % Phenol und durch anschließende Fällung mit Trockeneis-gekühltem Et_2O durchgeführt (Stufe 4). Das Produkt wurde durch präparative Umkehrphasen-HPLC unter Verwendung eines präparativen binären Varian (Rainin)-HPLC-Systems gereinigt: Gradientenelution mit 30–55 % B (0,045 % TFA in H_2O (A) und 0,045 % TFA in CH_3CN (B)) innerhalb von 180 Minuten mit 9,5 ml/min unter Verwendung einer Phenomenex Luna 10 μ Phenyl-Hexyl-Säule der Abmessungen 21 mm × 25 cm und eines UV-Detektors (Varian Dynamax UVD II) bei λ 214 und 254 nm. Die Reinheit des Produkts wurde durch RP-HPLC-Massenspektrometrie unter Verwendung eines Hewlett Packard LCMS-1100-Spektrometers, der mit einem Diodenfelddetektor ausgerüstet war, unter Anwendung einer "Elektrospray"-Ionisierung zu >95 % bestimmt.

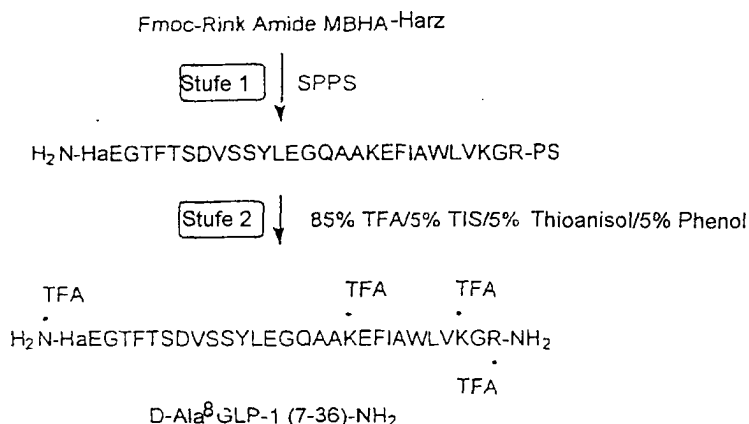
Beispiel 8

Herstellung von D-Ala⁸ GLP-1(7-36)-Lys³⁷(ϵ -MPA)-NH₂ · 4TFA;

His-D-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Lys(ϵ -MPA)-NH₂ · 4TFA

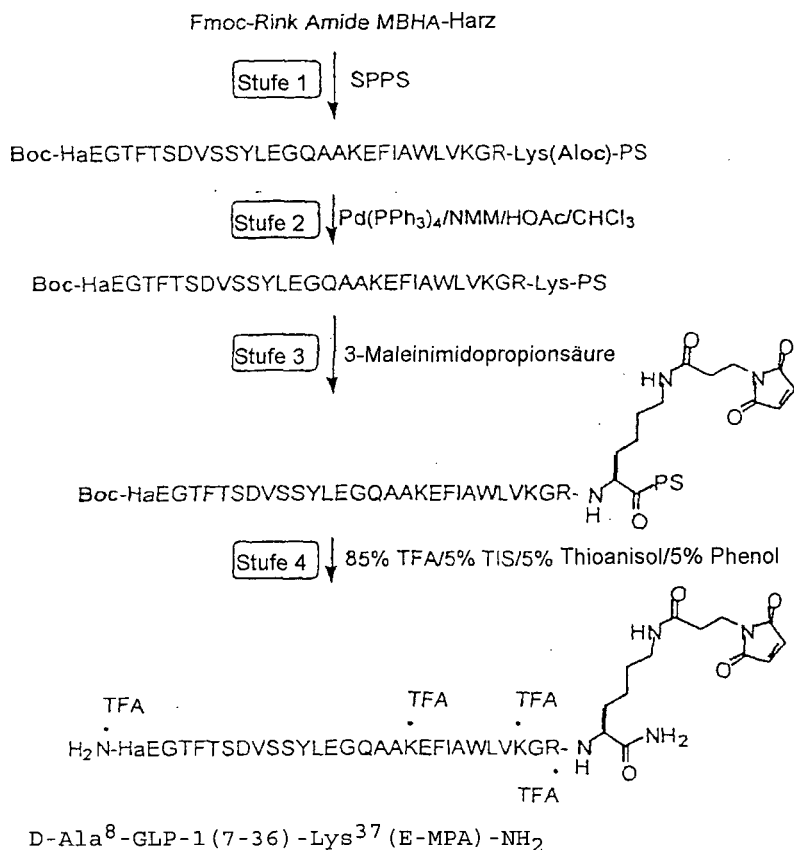
[0143] D-Ala⁸ GLP-1(7-36)-Amid wurde gemäß dem nachstehenden Schema synthetisiert.

A. Herstellung von D-Ala⁸-GLP-1(7-36)-Amid



[0144] Die Festphasen-Peptidsynthese des GLP-1-Analogen im 100 μmol -Maßstab wird unter Anwendung der manuellen Festphasensynthese und eines Symphony Peptide Synthesizer-Geräts unter Verwendung von Fmoc-geschütztem Rink Amide MBHA-Harz, Fmoc-geschützten Aminosäuren, O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) in N,N-Dimethylformamidlösung (DMF-Lösung) und Aktivierung mit N-Methylmorpholin (NMM) und Entfernung von Fmoc-Schutzgruppen mit Piperidin durchgeführt (Stufe 1). Die Abspaltung vom Harz und die Isolierung des Produkts werden unter Verwendung von 85 % TFA/5 % TIS/5 % Thioanisol und 5 % Phenol und durch anschließende Fällung mit Trockeneis-gekühltem Et_2O durchgeführt (Stufe 2). Das Produkt wird durch präparative Umkehrphasen-HPLC unter Verwendung eines präparativen binären Varian (Rainin)-HPLC-Systems gereinigt: Gradientenelution mit 30–55 % B (0,045 % TFA in H_2O (A) und 0,045 % TFA in CH_3CN (B)) innerhalb von 180 Minuten mit 9,5 ml/min unter Verwendung einer Phenomenex Luna 10 μ Phenyl-Hexyl-Säule der Abmessungen 21 mm × 25 cm und eines UV-Detektors (Varian Dynamax UVD II) bei λ 214 und 254 nm durchgeführt. Man erhält das gewünschte Peptid in einer durch RP-HPLC bestimmten Reinheit von >95 %.

[0145] Das modifizierte GLP-1-Peptid wird durch Entknüpfen des ϵ -N-Terminus des addierten Lysinrestes gemäß dem nachstehenden Schema synthetisiert.

B. Herstellung von D-Ala⁸-GLP-1(7-36)-Lys³⁷(ε-MPA)-Amid

Unter Anwendung einer automatisierten Peptidsynthese wurden die folgenden geschützten Aminosäuren sequenziell an Rink Amide MBHA-Harz addiert: Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(tBoc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(tBoc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(Pbf)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-d-Ala-OH, Boc-His(N-Trt)-OH (Stufe 1).

[0146] Die selektive Entfernung der Lys(Aloc)-Schutzgruppe wurde manuell durchgeführt und durch Behandlung des Harzes mit einer Lösung von 3 Äquivalenten Pd(PPh₃)₄ in Lösung in 5 ml CHCl₃:NMM:HOAc (18:1:0,5) für 2 Stunden erreicht (Stufe 2). Das Harz wurde sodann mit CHCl₃ (6 × 5 ml), 20 % HOAc in DCM (6 × 5 ml), DCM (6 × 5 ml) und DMF (6 × 5 ml) gewaschen. Die Synthese wurde sodann für die Addition von 3-Maleinimidopropionsäure reautomatisiert (Stufe 3). Die Abspaltung vom Harz und die Isolierung des Produkts wurden unter Verwendung von 85 % TFA/5 % TIS/5 % Thioanisol und 5 % Phenol und durch anschließende Fällung mit Trockeneis-gekühltem Et₂O durchgeführt (Stufe 4). Das Produkt wurde durch präparative Umkehrphasen-HPLC unter Verwendung eines präparativen binären Varian (Rainin)-HPLC-Systems gereinigt: Gradientenelution mit 30–55 % B (0,045 % TFA in H₂O (A) und 0,045 % TFA in CH₃CN (B)) innerhalb von 180 Minuten mit 9,5 ml/min unter Verwendung einer Phenomenex Luna 10 μ Phenyl-Hexyl-Säule der Abmessungen 21 mm × 25 cm und eines UV-Detektors (Varian Dynamax UVD II) bei λ 214 und 254 nm. Die Reinheit des Produkts wurde durch RP-HPLC-Massenspektrometrie unter Verwendung eines Hewlett Packard LCMS-1100-Spektrometers, der mit einem Diodenfelddetektor ausgerüstet war, unter Anwendung einer "Elektrospray"-Ionisierung zu >95 % bestimmt.

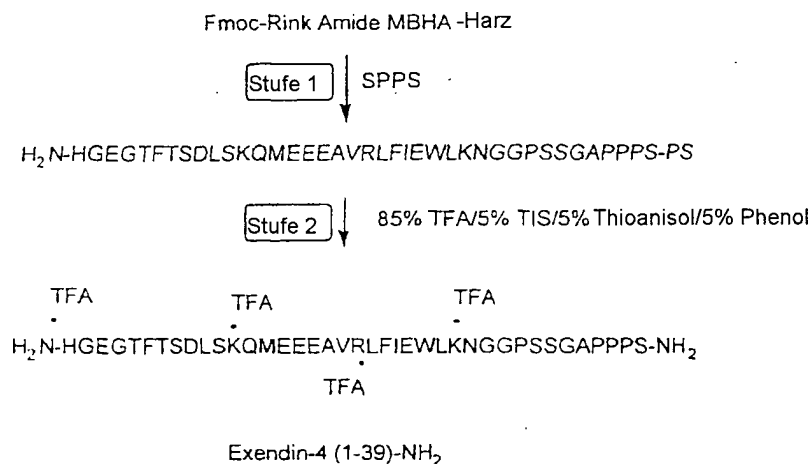
Beispiel 10

Herstellung von Exendin-4(1-39)-Lys⁴⁰(ε-MPA)-NH₂

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys(ε-MPA)-NH₂ · 5TFA

[0150] Exendin-4 wird gemäß dem nachstehenden Schema synthetisiert.

A. Herstellung von Exendin-4



[0151] Eine Festphasen-Peptidsynthese von Exendin-4 im 100 µmol-Maßstab wird unter Anwendung der manuellen Festphasensynthese und eines Symphony Peptide Synthesizer-Geräts unter Verwendung von Fmoc geschütztem Rink Amide MBHA-Harz durchgeführt. Die folgenden geschützten Aminosäuren werden sequenziell an das Harz addiert: Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Boc-His(Trt)-OH. Die Bestandteile werden in N,N-Dimethylformamid (DMF) gelöst und entsprechend der Sequenz unter Verwendung von O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) und Diisopropylethylamin (DIEA) aktiviert. Die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe wird unter Verwendung einer Lösung von 20 % (Vol./Vol.) Piperidin in N,N-Dimethylformamid (DMF) für eine Zeitspanne von 20 Minuten erreicht (Stufe 1). Die Spaltung vom Harz und die Isolierung des Produkts wird unter Verwendung von 85 % TFA/5 % TIS/5 % Thioanisol und 5 % Phenol unter anschließender Fällung mit eiskaltem Et₂O durchgeführt (Stufe 2). Das Produkt wird durch präparative Umkehrphasen-HPLC unter Verwendung eines präparativen binären Varian (Rainin)-HPLC-Systems gereinigt: Gradientenelution mit 30–55 % B (0,045 % TFA in H₂O (A) und 0,045 % TFA in CH₃CN (B)) innerhalb von 180 Minuten mit 9,5 ml/min unter Verwendung einer Phenomenex Luna 10 µ Phenyl-Hexyl-Säule der Abmessungen 21 mm × 25 cm und eines UV-Detektors (Varian Dynamax UVD II) bei λ 214 und 254 nm durchgeführt. Man erhält das gewünschte Peptid in einer durch RP-HPLC bestimmten Reinheit von >95 %.

B. Herstellung von modifiziertem Exendin-4 (SEQ ID NO: 18)

[0152] Das modifizierte Exendin-4-Peptid wird durch Entknüpfen des ε-N-Terminus des addierten Lysinrestes gemäß dem nachstehenden Schema synthetisiert.

Fmoc-Rink Amide MBHA-Harz

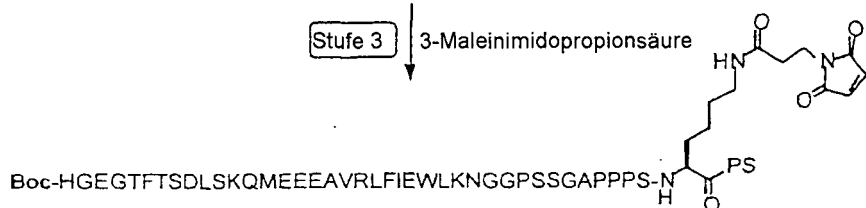
Stufe 1 ↓ SPPS

Boc-HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-Lys(Aloc)-PS

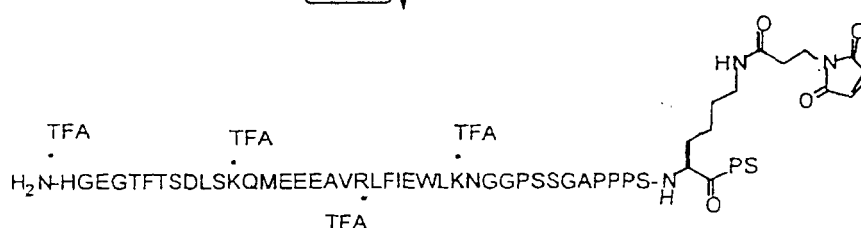
Stufe 2 ↓ Pd(PPh₃)₄/NMM/HOAc/CHCl₃

Boc-HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-Lys-PS

Stufe 3 ↓ 3-Maleinimidopropionsäure



Stufe 4 ↓ 85% TFA/5% TIS/5% Thioanisol/5% Phenol

Exendin-4 (1-39)-Lys⁴⁰(E-MPA)-NH₂

[0153] Unter Anwendung einer automatisierten Peptidsynthese wurden die folgenden geschützten Aminosäuren sequenziell an Rink Amide MBHA-Harz addiert: Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-5 Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg(Bpf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Boc-His(Trt)-OH (Stufe 1).

[0154] Die selektive Entfernung der Lys(Aloc)-Schutzgruppe wurde manuell durchgeführt und durch Behandlung des Harzes mit einer Lösung von 3 Äquivalenten Pd(PPh₃)₄ in Lösung in 5 ml CHCl₃:NMM:HOAc (18:1:0,5) für 2 Stunden erreicht (Stufe 2). Das Harz wurde sodann mit CHCl₃ (6 × 5 ml), 20 % HOAc in DCM (6 × 5 ml), DCM (6 × 5 ml) und DMF (6 × 5 ml) gewaschen. Die Synthese wurde sodann für die Addition von 3-Maleinimidopropionsäure reautomatisiert (Stufe 3). Die Abspaltung vom Harz und die Isolierung des Produkts wurden unter Verwendung von 85 % TFA/5 % TIS/5 % Thioanisol und 5 % Phenol und durch anschließende Fällung mit Trockeneis-gekühltem Et₂O durchgeführt (Stufe 4). Das Produkt wurde durch präparative Umkehrphasen-HPLC unter Verwendung eines präparativen binären Varian (Rainin)-HPLC-Systems gereinigt: Gradientenelution mit 30–55 % B (0,045 % TFA in H₂O (A) und 0,045 % TFA in CH₃CN (B)) innerhalb von 180 Minuten mit 9,5 ml/min unter Verwendung einer Phenomenex Luna 10 µ Phenyl-Hexyl-Säule der Abmessungen 21 mm × 25 cm und eines UV-Detektors (Varian Dynamax UVD II) bei λ 214 und 254 nm. Die Reinheit des Produkts wurde durch RP-HPLC-Massenspektrometrie unter Verwendung eines Hewlett Packard LCMS-1100-Spektrometers, der mit einem Diodenfelddetektor ausgerüstet war, unter Anwendung einer "Elektrospray"-Ionisierung zu >95 % bestimmt.

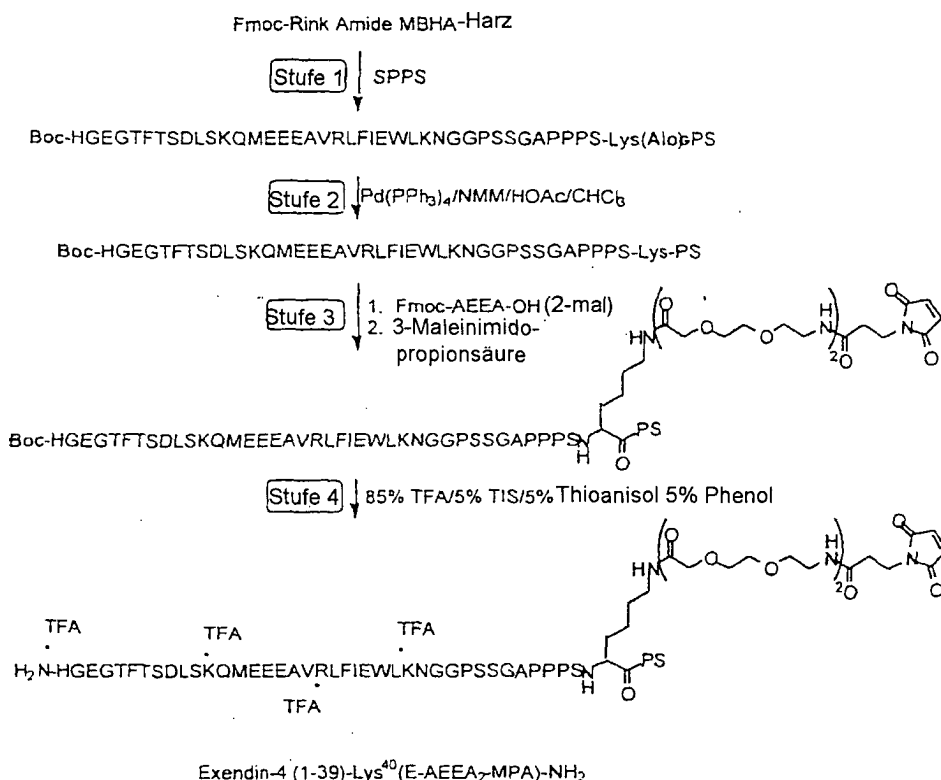
Beispiel 11

Herstellung von modifiziertem Exendin-4(1-39)-Lys⁴⁰(ε-AEEA-AEEA-MPA)-NH₂ · 5TFA;

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys(ε-AEEA-AEEA-MPA)-NH₂ · 5TFA

[0155] Das modifizierte Exendin-4-Peptid wird durch Entknüpfen des ε-N-Terminus des addierten Lysinrestes

gemäß dem nachstehenden Schema synthetisiert.



[0156] Unter Anwendung einer automatisierten Peptidsynthese wurden die folgenden geschützten Aminosäuren sequenziell an Rink Amide MBHA-Harz addiert: Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg(Bpf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Boc-His(Trt)-OH (Stufe 1).

[0157] Die selektive Schutzgruppenentfernung der Lys(Aloc)-Gruppe wurde manuell durchgeführt und unter Behandlung des Harzes mit einer Lösung von 3 Äquivalenten $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ in 5 ml $\text{CHCl}_3:\text{NMM}:\text{HOAc}$ (18:1:0,5) für eine Zeitspanne von 2 Stunden erreicht (Stufe 2). Das Harz wurde sodann mit CHCl_3 (6 × 5 ml), 20 % HOAc in DCM (6 × 5 ml), DCM (6 × 5 ml) und DMF (6 × 5 ml) gewaschen. Die Synthese wurde sodann für die Addition der zwei AEEA-Gruppen (Aminoethoxyethoxyessigsäuregruppen) und für die Addition von 3-Maleinimidopropionsäure reautomatisiert (Stufe 3). Die Abspaltung vom Harz und die Isolierung des Produkts wurden unter Verwendung von 85 % TFA/5 % TIS/5 % Thioanisol und 5 % Phenol und durch anschließende Fällung mit Trockeneis-gekühltem Et_2O durchgeführt (Stufe 4). Das Produkt wurde durch präparative Umkehrphasen-HPLC unter Verwendung eines präparativen binären Varian (Rainin)-HPLC-Systems gereinigt: Gradientenelution mit 30–55 % B (0,045 % TFA in H_2O (A) und 0,045 % TFA in CH_3CN (B)) innerhalb von 180 Minuten mit 9,5 ml/min unter Verwendung einer Phenomenex Luna 10 μ Phenyl-Hexyl-Säule der Abmessungen 21 mm × 25 cm und eines W-Detektors (Varian Dynamax UVD II) bei λ 214 und 254 nm. Die Reinheit des Produkts wurde durch RP-HPLC-Massenspektrometrie unter Verwendung eines Hewlett Packard LCMS-1100-Spektrometers, der mit einem Diodenfelddetektor ausgerüstet war, unter Anwendung einer "Elektrospray"-Ionisierung zu >95 % bestimmt.

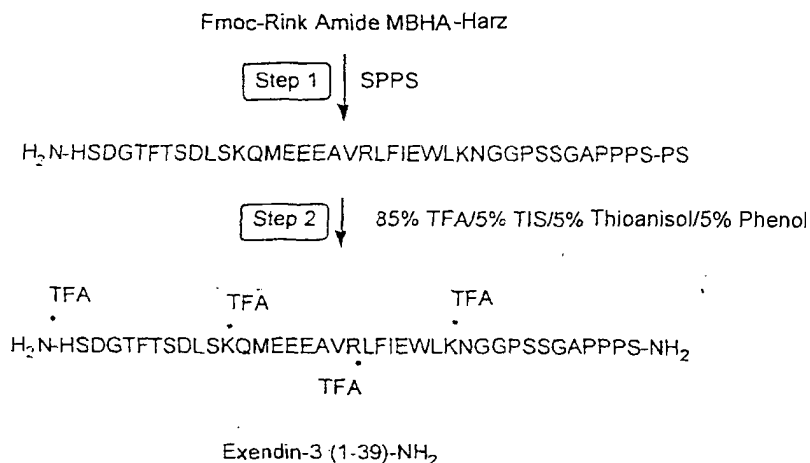
Beispiel 12

Herstellung von Exendin-3(1-39)-Lys⁴⁰(ε-MPA)-NH₂ · 5TFA

His-Ser-ASp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-L
eu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys(ε-MPA)-NH₂ · 5TFA

A. Herstellung von Exendin-3

[0158] Zunächst wird das Exendin-3-Peptid gemäß dem nachstehenden Schema synthetisiert.



[0159] Die Festphasen-Peptidsynthese von Exendin-3 im 100 µmol-Maßstab wird unter Anwendung einer manuellen Festphasensynthese und eines Symphony Peptide Synthesizer-Geräts unter Verwendung von Fmoc-geschütztem Rink Amide MBHA-Harz durchgeführt. Die folgenden geschützten Aminosäuren werden sequenziell an das Harz addiert: Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Boc-His(Trt)-OH. Die Bestandteile werden in N,N-Dimethylformamid (DMF) gelöst und entsprechend der Sequenz unter Verwendung von O-Benzotriazol-1-yl-N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) und Diisopropylethylamin (DIEA) aktiviert.

[0160] Die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe wird unter Verwendung einer Lösung von 20 % (Vol./Vol.) Piperidin in N,N-Dimethylformamid (DMF) für eine Zeitspanne von 20 Minuten erreicht (Stufe 1). Die Abspaltung vom Harz und die Isolierung des Produkts werden unter Verwendung von 85 % TFA/5 % TIS/5 % Thioanisol und 5 % Phenol und durch anschließende Fällung mit Trockeneis-gekühltem Et₂O durchgeführt (Stufe 2). Das Produkt wird durch präparative Umkehrphasen-HPLC unter Verwendung eines präparativen binären Varian (Rainin)-HPLC-Systems gereinigt: Gradientenelution mit 30–55 % B (0,045 % TFA in H₂O (A) und 0,045 % TFA in CH₃CN (B)) innerhalb von 180 Minuten mit 9,5 ml/min unter Verwendung einer Phenomenex Luna 10 µ Phenyl-Hexyl-Säule der Abmessungen 21 mm × 25 cm und eines UV-Detektors (Varian Dynamax UVD II) bei λ 214 und 254 nm. Die Reinheit des Produkts wird durch RP-HPLC-Massenspektrometrie unter Verwendung eines Hewlett Packard LCMS-1100-Spektrometers, der mit einem Diodenfelddetektor ausgerüstet war, unter Anwendung einer "Elektrospray"-Ionisierung zu >95 % bestimmt.

B. Herstellung von modifiziertem Exendin-3

[0161] Unter Anwendung einer automatisierten Peptidsynthese wurden die folgenden geschützten Aminosäuren sequenziell an Rink Amide MBHA-Harz addiert: Fmoc-Lys(Alloc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg(Bpf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH,

Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(OtBu)-OH, Boc-His(Trt)-OH (Stufe 1). Das modifizierte Exendin-3 wird durch Entknüpfen des ϵ -N-Terminus des addierten Lysinrestes synthetisiert.

[0162] Die selektive Entfernung der Lys(Aloc)-Schutzgruppe wurde manuell durchgeführt und durch Behandlung des Harzes mit einer Lösung von 3 Äquivalenten $\text{Pd(PPh}_3)_4$ in Lösung in 5 ml CHCl_3 :NMM:HOAc (18:1:0,5) für 2 Stunden erreicht (Stufe 2). Das Harz wurde sodann mit CHCl_3 (6 \times 5 ml), 20 % HOAc in DCM (6 \times 5 ml), DCM (6 \times 5 ml) und DMF (6 \times 5 ml) gewaschen. Die Synthese wurde sodann für die Addition von 3-Maleinimidopropionsäure reautomatisiert (Stufe 3). Die Abspaltung vom Harz und die Isolierung des Produkts wurden unter Verwendung von 85 % TFA/5 % TIS/5 % Thioanisol und 5 % Phenol und durch anschließende Fällung mit Trockeneis-gekühltem Et_2O durchgeführt (Stufe 4). Das Produkt wurde durch präparative Umkehrphasen-HPLC unter Verwendung eines präparativen binären Varian (Rainin)-HPLC-Systems gereinigt: Gradientenelution mit 30–55 % B (0,045 % TFA in H_2O (A) und 0,045 % TFA in CH_3CN (B)) innerhalb von 180 Minuten mit 9,5 ml/min unter Verwendung einer Phenomenex Luna 10 μ Phenyl-Hexyl-Säule der Abmessungen 21 mm \times 25 cm und eines UV-Detektors (Varian Dynamax UVD II) bei λ 214 und 254 nm. Die Reinheit des Produkts wurde durch RP-HPLC-Massenspektrometrie unter Verwendung eines Hewlett Packard LCMS-1100-Spektrometers, der mit einem Diodenfelddetektor ausgerüstet war, unter Anwendung einer "Elektrospray"-Ionisierung zu >95 % bestimmt.

Beispiel 13

Herstellung von Exendin-3(1-39)-Lys⁴⁰(ϵ -AEEA-AEEA-MPA)-NH₂ \cdot 5TFA;


His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys(ϵ -AEEA-AEEA-MPA)-NH₂ \cdot 5TFA

[0163] Das modifizierte Exendin-3-Peptid wird durch Entknüpfen des ϵ -N-Terminus des addierten Lysinrestes gemäß den nachstehenden Angaben synthetisiert.

[0164] Unter Anwendung einer automatisierten Peptidsynthese wurden die folgenden geschützten Aminosäuren sequenziell an Rink Amide MBHA-Harz addiert: Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg(Bpf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(OtBu)-OH, Boc-His(Trt)-OH (Stufe 1).

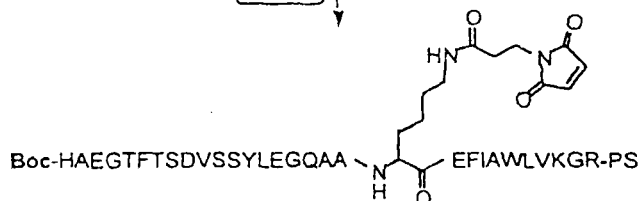
[0165] Die selektive Entfernung der Lys(Aloc)-Schutzgruppe wurde manuell durchgeführt und durch Behandlung des Harzes mit einer Lösung von 3 Äquivalenten $\text{Pd(PPh}_3)_4$ in Lösung in 5 ml CHCl_3 :NMM:HOAc (18:1:0,5) für 2 Stunden erreicht (Stufe 2). Das Harz wurde sodann mit CHCl_3 (6 \times 5 ml), 20 % HOAc in DCM (6 \times 5 ml), DCM (6 \times 5 ml) und DMF (6 \times 5 ml) gewaschen. Die Synthese wurde sodann für die Addition der zwei AEEA-Gruppen (Aminoethoxyethoxyessigsäuregruppen) und für die Addition von 3-Maleinimidopropionsäure reautomatisiert (Stufe 3). Die Abspaltung vom Harz und die Isolierung des Produkts wurden unter Verwendung von 85 % TFA/5 % TIS/5 % Thioanisol und 5 % Phenol und durch anschließende Fällung mit Trockeneis-gekühltem Et_2O durchgeführt (Stufe 4). Das Produkt wurde durch präparative Umkehrphasen-HPLC unter Verwendung eines präparativen binären Varian (Rainin)-HPLC-Systems gereinigt: Gradientenelution mit 30–55 % B (0,045 % TFA in H_2O (A) und 0,045 % TFA in CH_3CN (B)) innerhalb von 180 Minuten mit 9,5 ml/min unter Verwendung einer Phenomenex Luna 10 μ Phenyl-Hexyl-Säule der Abmessungen 21 mm \times 25 cm und eines UV-Detektors (Varian Dynamax UVD II) bei λ 214 und 254 nm. Die Reinheit des Produkts wurde durch RP-HPLC-Massenspektrometrie unter Verwendung eines Hewlett Packard LCMS-1100-Spektrometers, der mit einem Diodenfelddetektor ausgerüstet war, unter Anwendung einer "Elektrospray"-Ionisierung zu >95 % bestimmt.

Herstellung von Lys²⁶(ε-MPA)GLP-1(7-36)-NH₂

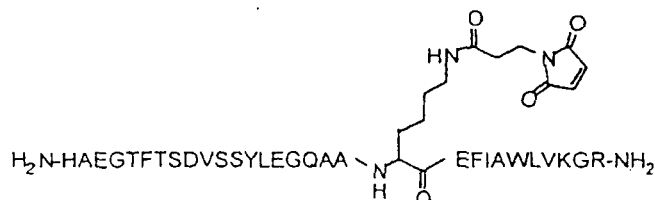
Stufe 1  SPPS

Stufe 2 \downarrow Pd(PPh₃)₄/NMM/HOAc/CHCl₃

Stufe 3 3-Maleinimidopropionsäure

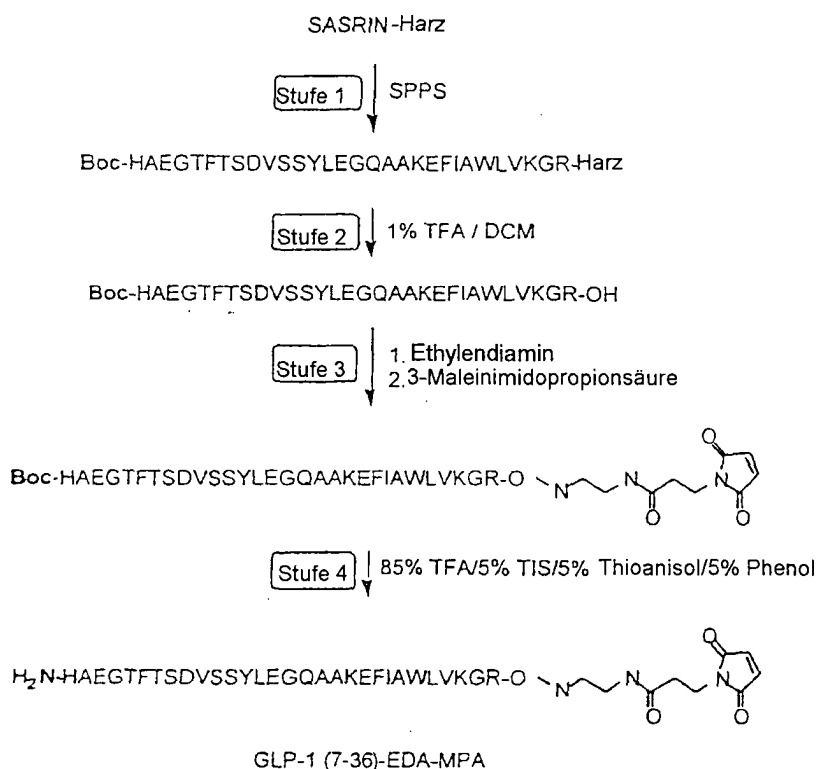


Stufe 4 ↓ 85% TFA/5% TIS/5% Thioanisol/5% Phenol



Lys²⁶(E-MPA)GLP-1 (7-36)-NH₂

33/44



Beispiel 15

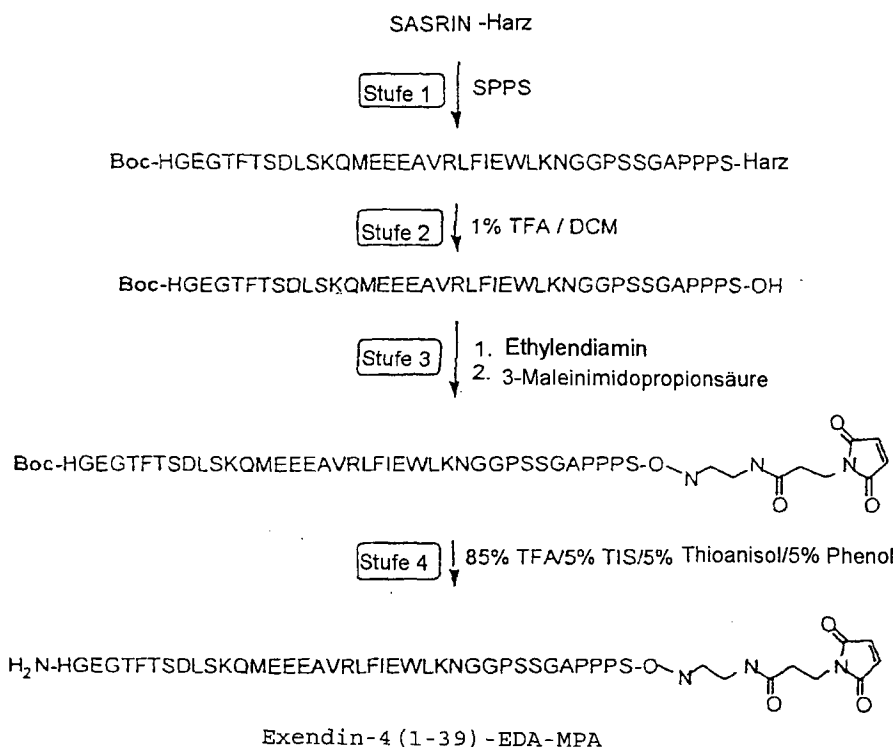
Herstellung von GLP-1(7-36)-EDA-MPA

[0167] Eine Festphasen-Peptidsynthese des modifizierten GLP-1-Analogen im 100 µmol-Maßstab wird manuell und an einem Symphony Peptide Synthesizer-Gerät mit SASRIN (supersäureempfindliches Harz) durchgeführt. Die folgenden geschützten Aminosäuren werden sequenziell an das Harz addiert: Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Boc-His(Trt)-OH. Die Bestandteile werden in N,N-Dimethylformamid (DMF) gelöst und entsprechend der Sequenz unter Verwendung von O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU) und Diisopropylethylamin (DIEA) aktiviert. Die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe wird unter Verwendung einer Lösung von 20 % (Vol./Vol.) Piperidin in N,N-Dimethylformamid (DMF) für eine Zeitspanne von 20 Minuten erreicht (Stufe 1). Das vollständig geschützte Peptid wird vom Harz durch Behandlung mit 1 % TFA/DCM abgespalten (Stufe 2). Ethylendiamin und 3-Maleinimidopropionsäure werden sodann sequenziell an den freien C-Terminus addiert (Stufe 3). Die Schutzgruppen werden unter Verwendung von 86 % TFA/ 5 % TIS/ 5 % H₂O/ 2 % Thioanisol und 2 % Phenol abgespalten und das Produkt durch Fällung mit Trockeneis-gekühltem Et₂O isoliert (Stufe 4). Das Produkt wird durch präparative Umkehrphasen-HPLC unter Verwendung eines präparativen binären Varian (Rainin)-HPLC-Systems mit einer Dynamax C₁₈, 60Å, 8 µm, 21 mm × 25 cm-Säule, die mit einem Dynamax C₁₈, 60Å, 8 µm Guard-Modul (21 mm × 25 cm-Säule) und einem UV-Detektor (Varian Dynamax UVD II) ausgerüstet ist, bei λ 214 und 254 nm gereinigt. Man erhält das angestrebte DAC in einer durch RP-HPLC bestimmten Reinheit von >95 %.

Beispiel 16

Herstellung von Exendin-4(1-39)-EDA-MPA

[0168] Das nachstehende Schema erläutert die Synthese von Exendin-4(1-39)-EDA-MPA.



[0169] Eine Festphasen-Peptidsynthese des modifizierten Exendin-4-Analogen im 100 µmol-Maßstab wird manuell und an Symphony Peptide Synthesizer-SASRIN (supersäureempfindliches Harz) durchgeführt. Die folgenden geschützten Aminosäuren werden sequenziell an das Harz addiert: Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-ASn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Boc-His(Trt)-OH. Die Bestandteile werden in N,N-Dimethylformamid (DMF) gelöst und entsprechend der Sequenz unter Verwendung von O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorphosphat (HBTU) und Diisopropylethylamin (DIEA) aktiviert. Die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe wird unter Verwendung einer Lösung von 20 % (Vol./Vol.) Piperidin in N,N-Dimethylformamid (DMF) für eine Zeitspanne von 20 Minuten erreicht (Stufe 1). Das vollständig geschützte Peptid wird vom Harz durch Behandlung mit 1 % TFA/DCM abgespalten (Stufe 2). Ethylendiamin und 3-Maleinimidopropionsäure werden sodann sequenziell an den freien C-Terminus addiert (Stufe 3). Die Schutzgruppen werden unter Verwendung von 86 % TFA/ 5 % TIS/ 5 % H₂O/ 2 % Thioanisol und 2 % Phenol abgespalten und das Produkt durch Fällung mit Trockeneis-gekühltem Et₂O isoliert (Stufe 4). Das Produkt wird durch präparative Umkehrphasen-HPLC unter Verwendung eines präparativen binären Varian (Rainin)-HPLC-Systems mit einer Dynamax C₁₈, 60Å, 8 µm, 21 mm × 25 cm-Säule, die mit einem Dynamax C₁₈, 60Å, 5 µm Guard-Modul (21 mm × 25 cm-Säule) und einem UV-Detektor (Varian Dynamax UVD II) ausgerüstet ist, bei λ 214 und 254 nm gereinigt. Man erhält das angestrebte DAC in einer durch RP-HPLC bestimmten Reinheit von >95 %.

SEQUENZLISTS

<110> ConjuChem, Inc.

Bridon, Dominique P.

L'Archeveque, Benoit

Ezrin, Alan M.

Holmes, Darren

Leblanc, Anouk

St. Pierre, Serge

<120> Long Lasting Insulinotropic Peptides

<130> 1610

<140>

<141>

<150> 60/159,783

<151> 1999-10-15

<150> 60/134,406

<151> 1999-05-17

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 37

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung einer künstlichen Sequenz: Synthetisches Peptid

<400> 1

His Asp Glu Phe Glu Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val
1 5 10 15

Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu
20 25 30

Val Lys Gly Arg Gly
35

<210> 2

<211> 31

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung einer künstlichen Sequenz: Synthetisches Peptid

<400> 2

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 3

<211> 22

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung einer künstlichen Sequenz: Synthetisches Peptid

<400> 3

Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val
1 5 10 15

Xaa Gly Arg Xaa Gly Arg
20

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung einer künstlichen Sequenz: Synthetisches Peptid

<400> 4

Ser Asp Val Ser
1

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung einer künstlichen Sequenz: Synthetisches Peptid

<400> 5

Thr Ser Asp Val Ser

1 5

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung einer künstlichen Sequenz: Synthetisches Peptid

<400> 6

Phe Thr Ser Asp Val Ser

1 5

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung einer künstlichen Sequenz: Synthetisches Peptid

<400> 7

Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung einer künstlichen Sequenz: Synthetisches Peptid

<400> 8

Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung einer künstlichen Sequenz: Synthetisches Peptid

<400> 9

Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser
1 5

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung einer künstlichen Sequenz: Synthetisches Peptid

<400> 10

Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser
1 5 10

<210> 11

<211> 39

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung einer künstlichen Sequenz: Synthetisches Peptid

<400> 11

His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 12

<211> 39

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung einer künstlichen Sequenz: Synthetisches Peptid

<400> 12

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 13

<211> 31

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung einer künstlichen Sequenz: Synthetisches Peptid

<400> 13

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Tyr
 20 25 30

<210> 14

<211> 31

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung einer künstlichen Sequenz: Synthetisches Peptid

<400> 14

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Tyr
 20 25 30

<210> 15

<211> 31

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung einer künstlichen Sequenz: Synthetisches Peptid

<400> 15

Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Met Ile Glu
 1 5 10 15

Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 20 25 30

<210> 16

<211> 37

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung einer künstlichen Sequenz: Synthetisches Peptid

<400> 16

His Asp Glu Phe Glu Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val
 1 5 10 15

Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu
 20 25 30

Val Lys Gly Arg Lys
 35

<210> 17

<211> 31

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung einer künstlichen Sequenz: Synthetisches Peptid

<400> 17

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Lys
 20 25 30

<210> 18

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung einer künstlichen Sequenz: Synthetisches Peptid

<400> 18

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys
 35 40

<210> 19

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung einer künstlichen Sequenz: Synthetisches Peptid

<400> 19

His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys
 35 40

<210> 20

<211> 31

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung einer künstlichen Sequenz: Synthetisches Peptid

<400> 20

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Glu Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Tyr
 20 25 30

<210> 21

<211> 30

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung einer künstlichen Sequenz: Synthetisches Peptid

<400> 21

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| His | Gly | Glu | Gly | Thr | Phe | Thr | Ser | Asp | Leu | Ser | Lys | Glu | Met | Glu | Glu |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | 15 | | | |

| | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Arg | Leu | Phe | Ile | Glu | Trp | Leu | Lys | Asn | Gly | Gly | Tyr |
| | | 20 | | | | 25 | | | | | 30 | | |

<210> 22

<211> 29

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung einer künstlichen Sequenz: Synthetisches Peptid

<400> 22

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Leu | Ser | Lys | Gln | Met | Glu | Glu | Glu | Ala | Val | Arg | Leu | Phe | Ile | Glu |
| 1 | | | 5 | | | | | 10 | | | | 15 | | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Trp | Leu | Lys | Gly | Gly | Pro | Ser | Ser | Gly | Pro | Pro | Pro | Ser |
| | | 20 | | | | 25 | | | | | | |

Patentansprüche

1. Modifiziertes insulinotropes Peptid oder Derivat oder Fragment davon, umfassend:
 - ein insulinotropes Peptid oder Derivat oder Fragment mit insulinotroper Aktivität; und
 - eine an das insulinotrope Peptid oder Derivat oder Fragment gekuppelte Maleinimidgruppe, wobei die Maleinimidgruppe zur Reaktion mit Thiolgruppen an Blutkomponenten unter Bildung einer stabilen kovalenten Bindung befähigt ist.
2. Modifiziertes Peptid nach Anspruch 1, wobei das insulinotrope Peptid aus der Gruppe GLP-1, Exendin-3, Exendin-4 und Analoge davon ausgewählt ist.
3. Modifiziertes Peptid nach Anspruch 2, wobei es sich beim insulinotropen Peptid um GLP-1 (7-36) oder ein Analoges davon handelt.
4. Modifiziertes Peptid nach Anspruch 1, wobei es sich bei der Blutkomponente um Serumalbumin handelt.
5. Modifiziertes Peptid nach Anspruch 1, wobei das Peptid aus der Gruppe SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 und SEQ ID NO:15 ausgewählt ist.
6. Modifiziertes Peptid nach Anspruch 1, wobei das Peptid aus der Gruppe SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21 und SEQ ID NO:22 ausgewählt ist.
7. Zusammensetzung, umfassend ein modifiziertes insulinotropes Peptid gemäß der Definition in einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung von Diabetes beim Menschen.
8. Konjugat, umfassend ein modifiziertes insulinotropes Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 6, das kovalent an ein Blutprotein gebunden ist.
9. Konjugat nach Anspruch 8, wobei es sich beim Blutprotein um Serumalbumin handelt.
10. Verwendung einer Zusammensetzung zur Herstellung eines Arzneimittels, das die in vivo-Halbwertszeit eines insulinotropen Peptids bei einem Diabetes-Patienten verlängert, wobei die Zusammensetzung ein Derivat eines insulinotropen Peptids oder Analoges davon umfasst, wobei das Derivat eine an das insulinotrope Peptid gekuppelte Maleinimidgruppe umfasst, wobei die Maleinimidgruppe zur Reaktion mit Thiolgruppen an Blutkomponenten unter Bildung stabiler, kovalenter Bindungen befähigt ist.
11. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 10, wobei das insulinotrope Peptid aus der Grup-

pe GLP-1, Exendin-3, Exendin-4 und Analoge davon ausgewählt ist.

12. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 10 oder 11, wobei das Derivat mit Serumalbumin umgesetzt ist.

13. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 10, wobei das Peptid aus der Gruppe SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 und SEQ ID NO:15 ausgewählt ist.

14. Modifiziertes insulinotropes Peptid, ausgewählt aus der Gruppe GLP-1(1-36)-Lys³⁷(ε-MPA)NH₂, GLP-1(1-36)-Lys³⁷(ε-AEEA-AEEA-MPA)NH₂, GLP-1(7-36)-Lys³⁷(ε-MPA)NH₂, GLP-1(7-36)-Lys³⁷(ε-AEEA-AEEA-MPA)NH₂, D-Ala⁸GLP-1(7-36)-Lys³⁷(ε-MPA)NH₂, D-Ala⁸GLP-1(7-36)-Lys³⁷(ε-AEEA-AEEA-MPA)NH₂, Exendin-4(1-39)-Lys⁴⁰(ε-MPA)NH₂, Exendin-4(1-39)-Lys⁴⁰(ε-AEEA-AEEA-MPA)NH₂, Exendin-3(1-39)-Lys⁴⁰(ε-MPA)NH₂ und Exendin-3(1-39)-Lys⁴⁰(ε-AEEA-AEEA-MPA).

15. Verbindung, ausgewählt aus der Gruppe D-Ala⁸GLP-1(7-36)-Lys³⁷(ε-(AEEA)_n-MPA)NH₂, worin n eine ganze Zahl mit einem Wert von 0 bis 2 ist.

16. Verbindung nach Anspruch 15, nämlich D-Ala⁸GLP-1(7-36)-Lys³⁷(ε-MPA)NH₂.

17. Verbindung nach Anspruch 15, nämlich D-Ala⁸GLP-1(7-36)-Lys³⁷(ε-AEEA-AEEA-MPA)NH₂.

18. Verbindung nach Anspruch 15, nämlich D-Ala⁸GLP-1(7-36)-Lys³⁷(ε-AEEA-MPA)NH₂.

19. Zusammensetzung, umfassend eine Verbindung nach einem der Ansprüche 15–18 in Verbindung mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger.

20. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 15 bis 18 bei der Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Diabetes oder zur Verstärkung der Expression von Insulin in einem Patienten.

21. Konjugat, umfassend eine Verbindung nach einem der Ansprüche 15 bis 18, in konvalenter Bindung an ein Blutprotein.

22. Konjugat nach Anspruch 21, wobei es sich beim Blutprotein um Albumin handelt.

23. Zusammensetzung, umfassend ein Konjugat nach einem der Ansprüche 8, 9, 21 oder 22 in Verbindung mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger.

24. Verwendung der Zusammensetzung nach Anspruch 23 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verlängerung der in vivo-Halbwertszeit eines insulinotropen Peptids bei einem Diabetes-Patienten.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen