



(10) **DE 10 2004 043 153 B4** 2013.11.21

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2004 043 153.1**

(22) Anmeldetag: **03.09.2004**

(43) Offenlegungstag: **23.03.2006**

(45) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung: **21.11.2013**

(51) Int Cl.: **C07K 14/575 (2006.01)**

C07K 14/605 (2006.01)

A61K 51/08 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

G01N 33/74 (2013.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:

Philipps-Universität Marburg, 35037, Marburg, DE

(74) Vertreter:

**Patentanwälte Olbricht, Buchhold, Keulertz
Partnerschaft, 60325, Frankfurt, DE**

(72) Erfinder:

**Gotthardt, Martin, Dr., 35274, Kirchhain, DE; Béhé,
Martin, Dr., 35043, Marburg, DE; Behr, Thomas,
Prof. Dr., 35043, Marburg, DE; Göke, Burkhard J.,
Prof. Dr., 82131, Gauting, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

US	5 424 286	A
WO	97/ 46 584	A1
WO	99/ 43 705	A1
WO	99/ 43 708	A1
WO	00/ 69 900	A2
WO	01/ 04 156	A1

**Datenbank PubMed, Zusammenfassung zu:
KNUDSEN, L.B. [u.a.]: Potent derivatives of
glucagon-like peptide-1 with pharmacokinetic
properties suitable for once daily administration.
J. Med. Chem. (2000) 43 (9) 1664-9**

**Datenbank PubMed, Zusammenfassung zu:
XIAO, Q. [u.a.]: Biological activities of glucagon-
like peptide-1 analogues in vitro and in vivo.
Biochemistry (06.03.2001) 40 (9) 2860-9**

(54) Bezeichnung: **Erfindung betreffend GLP-1 und Exendin**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Peptidderivate von GLP-1, Exendin-3 und Exendin-4 sowie ein Verfahren zur Herstellung eines Pharmakons zur Darstellung und Therapie von in erster Linie gastroenteropankreatischen Tumoren aber auch anderen gut- und bösartigen Erkrankungen verschiedener Organsysteme auf der Basis des Inkretinhormons GLP-1 und seiner Analoga.

Beschreibung

Beschreibung und Einleitung des allgemeinen Gebietes der Erfindung

[0001] Bei der Lokalisationsdiagnostik von gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren wird als wichtigste diagnostische Methode neben dem Ultraschall die Somatostatin Rezeptor Szintigraphie (SRS) eingesetzt. Das Prinzip ist hier die spezifische Darstellung von Tumoren mit Hilfe von radioaktiv markierten Peptiden, die in die Tumorzellen aufgenommen werden. Sodann kann mit Hilfe von Gammakameras die Anreicherung der Radioaktivität im Tumorgewebe bildlich nachgewiesen werden. Wenn ein Tumortyp einen für die SRS erforderlichen Rezeptor z. B. für das Somatostatin-Analogon Octreotide[®] besitzt, ist ein Nachweis dieser Tumoren problemlos möglich. Werden entsprechende Rezeptoren jedoch nicht exprimiert, entziehen sie sich dem szintigraphischen Nachweis. Neben der Lokalisationsdiagnostik ermöglichen radioaktiv markierte Peptide aber auch einen Ansatz zur Tumorbehandlung, indem man durch Markierung von Somatostatin-Analoga z. B. Octreotide[®] mit einem geeigneten Radionuklid (α - oder β -Strahler) eine spezifische rezeptorgerichtete Radiopeptidtherapie durchführen kann. Da die entsprechenden Radionuklide chemisch so vom Peptid gebunden werden (z. B. über Komplexierung mit einem zuvor an das Peptid gebundenen Metallchelator), dass sie zwar in die Tumorzelle aufgenommen aber nicht mehr ausgeschleust werden können, ergibt sich eine hohe spezifische Anreicherung im Tumorgewebe.

[0002] Allerdings exprimieren eine ganze Reihe von neuroendokrinen Tumoren (NET) darunter Insulinome und kleinzellige Bronchialkarzinome nicht die erforderlichen Subtypen des Somatostatinrezeptors, die für die SRS oder die Radiopeptidtherapie mit dem Somatostatin-Analogon Octreotide[®] notwendig sind. Insbesondere Insulinome entziehen sich in einem erheblichen Prozentsatz der szintigraphischen Diagnostik. Auch bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen stellt die SRS kein geeignetes Verfahren dar, da zwar die Primärtumore häufig darstellbar sind, die Metastasen jedoch nicht, da sie die Rezeptorexpression verloren haben. Somit sind sie auch keiner Radiopeptidtherapie zugänglich, die ein interessantes zusätzliches oder alternatives Therapieverfahren darstellt. Daher besteht der Bedarf an einem geeigneten Peptid, das von den genannten Tumoren aufgenommen wird.

[0003] Das Inkretinhormon Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) sowie seine Analoga Exendin 3 und Exendin 4 (aus dem Speichel des Gilaamons (Heloderma horridum und Heloderma suspectum) sind Peptide, für die Insulinome und kleinzellige Bronchialkarzinome – neben vielen anderen Tumorarten – Rezeptoren exprimieren. Insulinome stammen von den insulinproduzierenden β -Zellen in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas ab, in denen GLP-1 sowie Exendin 3 und Exendin 4 eine postprandiale Insulinsekretion auslösen.

Stand der Technik

[0004] Zur Verwendung von Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) in der Szintigraphie ist eine Markierung der Peptide erforderlich. Die Verfahren dazu und zur Markierung von Proteinen mit Radionukliden sind dem Fachmann bekannt und in zahlreichen Patentschriften (z. B. DE 690 18 226 T2) und wissenschaftlichen Arbeiten belegt. Die dabei beschriebenen Peptide zur Anwendung in der diagnostischen Bildgebung und zur Vermittlung von therapeutisch wirksamen Molekülen in pathologisches Gewebe werden in der Regel am N-terminalen Ende über ein Amin in das Peptid eingeführt. Die Peptide müssen dabei bezüglich der Stabilisierung weiter modifiziert werden.

[0005] Das in der US 2003/0232761 A1 verwendete GLP-1 und sein Derivat GLP-1 (7–37) sind beispielsweise am N-terminalen Ende über ein Amin modifiziert. Somit steht das N-terminale Ende von GLP-1 für die Bindung an einen GLP-1-Rezeptor nicht mehr zur Verfügung, so dass mit diesen Peptiden nur eine ungenügende Rezeptorbindung und Internalisierung möglich ist, diese Peptide also nicht zur Verwendung in der Radiopeptidtherapie von Insulinomen und kleinzelligen Bronchialkarzinomen geeignet sind. Eine Mutation z. B. ein Austausch einer Aminosäure innerhalb der Peptidsequenz von GLP-1 und Exendin-3 oder Exendin-4 und deren mögliche Modifikation durch ein Therapeutikum oder ein signalgebendes Molekül führt erfahrungsgemäß meist dazu, dass die Struktur des Peptides so gestört wird, dass keine Bindung an den Rezeptor mehr möglich ist.

[0006] Eine weitere Methode zu Modifikation von GLP-1, ohne Beeinflussung des N-Terminus ist derzeit nicht bekannt. Darüber hinaus sind keine GLP-1 Derivate bekannt, die markiert oder unmarkiert zum Einsatz in der Radiotherapie von Insulinomen und kleinzelligen Bronchialkarzinomen geeignet sind.

Aufgabe

[0007] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher, den Mangel im Stand der Technik zu beseitigen und Peptide bereitzustellen, die markiert werden können und auch mit dieser Markierung an den GLP-1-Rezeptor binden und die zur Herstellung eines Mittels für Diagnostik und Therapie von Erkrankungen bei denen die GLP-1 Rezeptorexpression eine Rolle spielt, eingesetzt werden.

Lösung der Aufgabe

[0008] Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Ansprüche gelöst, nämlich durch Peptidderivate von GLP-1, Exendin-3 oder Exendin-4, welche ganz oder teilweise die Aminosäuresequenzen der Peptide

GLP-1 (1–37)

H-His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-

16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33

Lys-Gly-Arg-Gly-OH

34 35 36 37

oder

Exendin-3:

H-His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35

Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂

36 37 38 39

oder

Exendin-4:

H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36

Pro-Pro-Ser-NH₂

37 38 39

beinhalten, dadurch gekennzeichnet, dass

- die Peptide am C-Terminus über ein Amin modifiziert sind und der N-Terminus für die Bindung an den GLP-1-Rezeptor zur Verfügung steht
- die Peptide aufgebaut sind aus GLP-1(x-y)A¹⁻³⁷, oder Exendin-3 (z-k)A¹⁻⁴⁰, oder Exendin-4 (z-k)A¹⁻⁴⁰, wobei x die Aminosäuren 1–36 der GLP-1 Aminosäuresequenz beinhaltet, y die Aminosäuren 2–37 der GLP-1 Aminosäuresequenz,

- z die Aminosäuren 1–38 der Exendin-3 oder Exendin-4 Aminosäuresequenz
 k die Aminosäuren 2–39 der Exendin-3 oder Exendin-4 Aminosäuresequenz darstellt,
 – A eine Attachmentgruppe ist, wobei die Hochzahl angibt, an welcher Position innerhalb der Aminosäuresequenz sich die Attachmentgruppe alternativ befinden kann und
 – A eine Aminosäure oder eine organische Gruppe mit einem freien Amin ist.

[0009] Weiterhin wird die Aufgabe gelöst durch chimäre Peptide aus GLP-1 und Exendin, wobei Exendin ausgewählt ist aus Exendin-3 oder Exendin-4 und die chimären Peptide ganz oder teilweise die Aminosäuresequenzen der Peptide beinhalten

GLP-1 (1–37)

H-His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-

16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33

Lys-Gly-Arg-Gly-OH

34 35 36 37

und

Exendin-3:

H-His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35

Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂

36 37 38 39

oder

Exendin-4:

H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36

Pro-Pro-Ser-NH₂

37 38 39

und die Peptide aufgebaut sind aus:

GLP-1(x-y) Exendin-3(z-k)A¹⁻⁷⁵, GLP-1(x-y) Exendin-4(z-k)A¹⁻⁷⁵, Exendin-3(z-k) GLP-1(x-y)A¹⁻⁷⁵ oder Exendin-4(z-k) GLP-1(x-y)A¹⁻⁷⁵,

wobei

x die Aminosäuren 1–36 der GLP-1 Aminosäuresequenz beinhaltet,

y die Aminosäuren 2–37 der GLP-1 Aminosäuresequenz,

z die Aminosäuren 1–38 der Exendin-3 oder Exendin-4 Aminosäuresequenz

k die Aminosäuren 2–39 der Exendin-3 oder Exendin-4 Aminosäuresequenz darstellt und A eine Attachementgruppe ist, wobei die Hochzahl angibt, an welcher Position innerhalb der Aminosäuresequenz sich die Attachementgruppe befindet und

A eine Aminosäure oder eine organische Gruppe mit einem freien Amin ist.

[0010] Diese Peptidderivate sowie die chimären Peptide werden unmarkiert oder markiert zur Herstellung eines Mittels zur Diagnostik und Therapie gut- und bösartiger Erkrankungen, bei denen die GLP-1 Rezeptorexpression eine Rolle spielt, eingesetzt.

[0011] Mit Hilfe dieser Peptidderivate von GLP-1, Exendin-3 und Exendin-4, sowie chimären Peptiden aus GLP-1, Exendin-3 oder Exendin-4 wird die Herstellung eines Mittels zur szintigraphischen Anwendung realisiert, das zur Diagnostik und Therapie von GLP-1-Rezeptor exprimierenden Tumoren, darunter NET (insbesondere von Insulinomen) und kleinzelligen Bronchialkarzinomen eingesetzt wird.

[0012] Dies ist erstmals möglich, da die erfindungsgemäßen Peptidderivate über ein Amin am C-Terminus modifiziert sind, und so der N-Terminus für die Bindung an den GLP-1-Rezeptor zur Verfügung steht.

[0013] Durch die Bindung der erfindungsgemäßen z. B. radioaktiv markierten Peptidderivate und chimären Peptide von GLP-1, Exendin-3 und Exendin-4 an den GLP-1-Rezeptor ist die Darstellung von GLP-1-Rezeptor exprimierenden Tumoren möglich und damit erfolgt eine erhebliche Verbesserung der Patientenversorgung. In erster Linie sind NET gastroenteropankreatische NET, wie Insulinome, bei denen zur Zeit kein nicht-invasives Verfahren mit einer ausreichenden Sensitivität verfügbar ist oder im Bereich der Lunge lokalisierte kleinzellige Bronchialkarzinome, bei denen die spezifische Differenzierung zwischen entzündlichen Prozessen und Tumoren bzw. Metastasen ebenfalls derzeit durch kein nicht-invasives Verfahren möglich ist.

[0014] Weiterhin wird mittels der erfindungsgemäßen Peptidderivate und chimären Peptide die Dichte Insulinproduzierender Zellen im Pankreas dargestellt sowie die Expression von GLP-1-Rezeptoren in vivo und in vitro. Dies ist z. B. bei der Darstellung GLP-1-Rezeptoren exprimierender Zellen beim Diabestes mellitus eine in vivo-Darstellung, da dies die Zellen sind, die auch Insulin sezernieren. Die Darstellung der GLP-1-Rezeptordichte im Pankreas ist besonders bei Patienten mit Diabetes mellitus während und nach der Therapie mit Medikamenten wichtig.

[0015] Zusätzlich wird die Verteilung von GLP-1-Rezeptoren in malignen und benignen Geweben dargestellt. Fragestellungen sind hier sowohl klinischer als auch wissenschaftlicher Natur, da es noch keine umfassenden in-vivo Daten zur GLP-1-Rezeptorverteilung beim Menschen gibt.

[0016] Die Erfindung hat also den Vorteil, dass Peptidderivate von GLP-1 (Glucagon-like Peptide-1), Exendin-3 und Exendin-4 sowie chimäre Peptide aus GLP-1, Exendin-3 oder Exendin-4 zur Herstellung eines Mittels insbesondere zur rezeptorgerichteten spezifischen Darstellung und Therapie insbesondere von NET, hier besonders von Insulinomen und kleinzelligen Bronchialkarzinomen eingesetzt werden.

[0017] Insbesondere bei der Diagnostik von kleinzelligen Bronchialkarzinomen ist eine GLP-1-Rezeptorszintigraphie anwendbar und erlaubt erstmals die spezifische Detektion von metastatisch befallenen Lymphknoten (entzündlich veränderte Lymphknoten versus befallene Lymphknoten).

[0018] Die Verwendung der erfindungsgemäßen Peptidderivate von GLP-1 (Glucagon-like Peptide-1), Exendin-3 und Exendin-4 sowie der chimären Peptide aus GLP-1, Exendin-3 oder Exendin-4 erfolgt weiterhin als Mittel zur Diagnostik und Therapie aller gut- und bösartiger Erkrankungen, bei denen die GLP-1 Rezeptorexpression eine Rolle spielt, im Besonderen als Kontrastmittel mit der Magnetresonanztomographie (MRT), als radioaktives Mittel in der Szintigraphie (SPECT, Single Photonen Computer Tomographie) bzw. Radiopeptidtherapie, in der PET (Positronen Emissions Tomographie), rezeptorvermittelten Chemotherapie und der optischen Diagnostik. Wobei unter optischer Diagnostik die Anregung eines fluoreszierenden Moleküls durch eine bestimmte Wellenlänge, welche eine nachfolgende Emission von Licht einer anderen Wellenlänge auslöst, verstanden wird. Dabei wird die emittierte Wellenlänge detektiert.

[0019] Es ist dem Fachmann leicht möglich die Art der Markierung am C-terminalen Terminus der Peptidderivate von GLP-1 (Glucagon-like Peptide-1), Exendin-3 und Exendin-4 sowie der chimären Peptide aus GLP-1, Exendin-3 oder Exendin-4 in Abhängigkeit von der gewünschten Anwendung auszuwählen, die z. B. für die Szintigraphie bzw. Radiotherapie aus radioaktiven Nukliden, für das Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie

mographie (MRT) beispielsweise aus Gadolinium, für endoskopische oder wissenschaftliche Untersuchungen aus Fluoreszenzfarbstoffen besteht.

[0020] Erfindungsgemäß werden unter malignen Erkrankungen bösartige Erkrankungen verstanden, bei denen die betroffenen Gewebe Veränderungen ihres Differenzierungsgrades gegenüber gesunden Geweben aufweisen, invasives Wachstum zeigen oder deren Gewebe sich über Blut- oder Lymphbahnen ausbreitet. Hierzu gehören alle neuroendokrinen Tumoren, insbesondere die des Gastrointestinaltraktes; insbesondere auch Insulinome, Bronchialkarzinome, Pankreaskarzinom und alle anderen bösartigen Erkrankungen, die mit einer Überexpression des GLP-1-Rezeptors verbunden sind.

[0021] Erfindungsgemäß werden unter benignen Erkrankungen gutartige Erkrankungen verstanden, die sich dadurch auszeichnen, dass die betroffenen Gewebe ihren Differenzierungsgrad nicht wesentlich verlieren, kein invasives Wachstum zeigen und keine Gewebeabsiedlungen über Lymph- oder Blutstrom bilden. Hierzu gehört z. B. Diabetes mellitus aber auch Störungen des Essverhaltens oder der Psyche.

Charakterisierung der Peptidderivate und chimären Peptide

[0022] Überraschenderweise wurde gefunden, dass die erfindungsgemäßen Peptidderivate von GLP-1, Exendin-3 und Exendin-4, sowie die erfindungsgemäßen chimäre Peptide aus GLP-1, Exendin-3 oder Exendin-4, die am C-Terminus über ein Amin modifiziert sind über einen N-Terminus an den GLP-1-Rezeptor binden. Sie zeigen sogar eine dem natürlichen Peptid ähnliche sehr hohe Affinität zum GLP-1-Rezeptor. Experimente mit tumortragenden Nacktmäusen zeigen eine spezifische Aufnahme in GLP-1-Rezeptor-positives Tumorgewebe.

[0023] Die erfindungsgemäßen Peptidderivate sowie die chimären Peptide werden unmarkiert oder über einen Chelator am C-terminalen Amin markiert als Mittel zur Diagnostik und Therapie gut- und bösartiger Erkrankungen, bei denen die GLP-1 Rezeptorexpression eine Rolle spielt, eingesetzt. Die Art der Markierung besteht dabei insbesondere aus einem Radiometall, einem MRT Kontrastmittel, einem fluoreszierenden Chromophor oder einem Chemotherapeutikum.

[0024] Der Vorgang und die Verfahren zur Markierung sind dem Fachmann geläufig (z. B. DE 690 18 226 T2) und erfolgen beispielsweise durch Koppelung von Radionukliden, amagnetischen Metallen und andere MRT-Kontrastmitteln oder Fluoreszenzfarbstoffen, so dass die Rezeptorbindung oder Internalisierung der erfindungsgemäßen Peptidderivate sowie der chimären Peptide nicht beeinträchtigt wird und der GLP-1-rezeptor-bindende N-Terminus ungebunden bleibt.

Die Aminosäuresequenzen der Ausgangspeptide:

GLP-1:

H-His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly-OH

19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37

Exendin-3:

H-His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-

19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37

Pro-Ser-NH₂

38 39

Exendin-4:

H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
 Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-
 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37
 Pro-Ser-NH₂
 38 39

[0025] Erfindungsgemäß werden folgende Peptidderivate von GLP-1 (1–37), Exendin-3 und Exendin-4 hergestellt

GLP-1(x-y)A¹⁻³⁷

Exendin-3 (z-k)A¹⁻⁴⁰

Exendin-4 (z-k)A¹⁻⁴⁰

[0026] Wobei gilt:

x = Aminosäuren 1–36 der GLP-1 Aminosäuresequenz

y = Aminosäuren 2–37 der GLP-1 Aminosäuresequenz

z = Aminosäuren 1–38 der Exendin-3 oder Exendin-4 Aminosäuresequenz

k = Aminosäuren 2–39 der Exendin-3 oder Exendin-4 Aminosäuresequenz

A = Attachmentgruppe bestehend aus einer oder mehreren Aminosäuren bzw. deren Derivaten als Signalmolekül an sich oder zur Bindung von Signalmolekülen oder zur Stabilisierung. A ist bevorzugt am C-Terminus lokalisiert und ist beispielsweise ein Amin bevorzugt Lysin oder alternativ eine andere Aminosäure mit einem freien Amin wie z. B. Ornithin oder ein organische Gruppe mit einem freien Amin an das ein Chelator zur Markierung mit Radionukliden oder ein MRT-Kontrastmittel, Fluoreszenzfarbstoff oder ein Chemotherapeutikum gekoppelt wird. Chelatoren sind beispielsweise DTPA (Diethylenetriaminopentaacetic acid, alternativ einsetzbar N,N-Bis(2-[bis(carboxymethyl)amino]-ethyl)glycine), alternativ DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetra-acetic acid), HYNIC (6-Hydrazinopyridin-3-carbonsäure), MAG3 (mercaptoacetyl-glycylglycylglycine), N4 (1,4,8,11-tetraazaundecane) und die bekannten Derivate aller genannten Chelatoren.

[0027] Die Hochzahl gibt an, an welcher Position innerhalb der Aminosäuresequenz sich die Attachmentgruppe alternativ befinden kann.

[0028] GLP-1(x-y)A¹⁻³⁷

hierbei sind verschieden lange GLP-1 Derivate umfasst, wobei x die Zahlen 1 bis 36 annehmen kann, aber kleiner ist als y, welches die Zahlen 2 bis 37 annehmen kann. A ist die Attachmentgruppe, die an jeder Stelle steht, bevorzugt aber am C-Terminus und um eins höher ist als y. Die Attachmentgruppe ist bevorzugt das Amin Lysin.

[0029] Exendin-3 (z-k)A¹⁻⁴⁰

hierbei sind verschieden lange Exendin-3 Derivate umfasst, wobei z die Zahlen 1 bis 38 annehmen kann, aber kleiner ist als k, welches die Zahlen 2 bis 39 annehmen kann. A ist die Attachmentgruppe die an jeder Stelle steht, jedoch bevorzugt am C-Terminus und um eins höher ist als y. Die Attachmentgruppe ist bevorzugt das Amin Lysin.

[0030] Exendin-4 (z-k)A¹⁻⁴⁰

hierbei sind verschieden lange Exendin-4 Derivate umfasst, wobei z die Zahlen 1 bis 38 annehmen kann, aber kleiner ist als k, welches die Zahlen 2 bis 39 annehmen kann. A ist die Attachmentgruppe die an jeder Stelle steht, jedoch bevorzugt am C-Terminus und um eins höher ist als y. Die Attachmentgruppe ist bevorzugt das Amin Lysin.

[0031] Insbesondere sind bevorzugt die Peptidderivate:

1. MC 10: (DTPA-Lys³⁷) GLP1 (7–36) amid
2. MC 13: (DTPA-Lys⁴⁰) Exendin-3 amid
3. MC 11: (DTPA-Lys⁴⁰) Exendin-4 amid

[0032] Die Synthese erfolgt z. B. über Firma Peptide Specialty Laboratories GmbH nach der Methode von Merrifield und Reinigung über HPLC).

[0033] MC 10 (DTPA-Lys³⁷) GLP1 (7–36) amid besteht aus den Aminosäuren 7–36 von GLP-1 und trägt am C-terminalen Ende als Aminosäure mit einem freien Amin, vorzugsweise Lysin an Position 37 sowie den Chelator DTPA.

[0034] MC 13 (DTPA-Lys⁴⁰) Exendin-3 amid besteht aus der gesamten Aminosäuresequenz von Exendin-3 und trägt am C-terminalen Ende als Aminosäure mit einem freien Amin, vorzugsweise ein Lysin an Position 40 sowie den Chelator DTPA.

[0035] MC 11 (DTPA-Lys⁴⁰) Exendin-4 amid besteht aus der gesamten Aminosäuresequenz von Exendin-4 und trägt am C-terminalen Ende als Aminosäure mit einem freien Amin, vorzugsweise ein Lysin an Position 39 sowie den Chelator DTPA.

[0036] Erfindungsgemäß werden folgende chimäre Peptide von GLP-1 (1–37) und Exendin-3 oder Exendin-4 hergestellt.

GLP-1(x-y) Exendin-3(z-k)A¹⁻⁷⁵
GLP-1(x-y) Exendin-4(z-k)A¹⁻⁷⁵

Exendin-3(z-k) GLP-1(x-y)A¹⁻⁷⁵
Exendin-4(z-k) GLP-1(x-y)A¹⁻⁷⁵

[0037] Wobei gilt:

x = Aminosäuren 1–36 der GLP-1 Aminosäuresequenz

y = Aminosäuren 2–37 der GLP-1 Aminosäuresequenz

z = Aminosäuren 1–38 der Exendin-3 oder Exendin-4 Aminosäuresequenz

k = Aminosäuren 2–39 der Exendin-3 oder Exendin-4 Aminosäuresequenz

A = Attachementgruppe bestehend aus einer oder mehreren Aminosäuren bzw. deren Derivaten als Signalmolekül an sich oder zur Bindung von Signalmolekülen oder zur Stabilisierung. A ist bevorzugt am C-Terminus lokalisiert und ist beispielsweise ein Amin bevorzugt Lysin oder alternativ eine andere Aminosäure mit einem freien Amin wie z. B. Ornithin oder ein organische Gruppe mit einem freien Amin an das ein Chelator zur Markierung mit Radionukliden oder ein MRT-Kontrastmittel, Fluoreszenzfarbstoff oder ein Chemotherapeutikum gekoppelt wird. Chelatoren sind beispielsweise DTPA (Diethylenetriaminopentaacetic acid, alternativ einsetzbar N,N-Bis(2-[bis(carboxymethyl)amino]-ethyl)glycine), alternativ DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetra-acetic acid), HYNIC (6-Hydrazinopyridin-3-carbonsäure), MAG3 (mercaptoacetyl-glycylglycylglycine), N4 (1,4,8,11-tetraazaundecane) und die bekannten Derivate aller genannten Chelatoren.

[0038] Die Hochzahl gibt an, an welcher Position innerhalb der Aminosäuresequenz sich die Attachementgruppe alternativ befinden kann.

[0039] GLP-1(x-y) Exendin-3(z-k)A¹⁻⁷⁵

hierbei sind chimäre Peptide aus GLP-1 und Exendin-3 umfasst, bei welchen die Aminosäuren 1 bis 36 von GLP-1 stammen und dann in der Folge die Aminosäuren 1 bis 39 vom Exendin-3. A ist die Attachementgruppe die an jeder Stelle steht, bevorzugt aber am C-Terminus und um eins höher ist als die Zahl der Aminosäuren aus GLP-1 und Exendin-3, bevorzugt das Amin Lysin.

[0040] GLP-1(x-y) Exendin-4(z-k)A¹⁻⁷⁵

hierbei sind chimäre Peptide aus GLP-1 und Exendin-4 umfasst, bei welchen die Aminosäuren 1 bis 36 von GLP-1 stammen und dann in der Folge die Aminosäuren 1 bis 39 vom Exendin-4. A ist die Attachementgruppe die an jeder Stelle steht, bevorzugt aber am C-Terminus und um eins höher ist als die Zahl der Aminosäuren aus GLP-1 und Exendin-4, bevorzugt das Amin Lysin.

[0041] Exendin-3(z-k) GLP-1(x-y)A¹⁻⁷⁵

hierbei sind chimäre Peptide aus Exendin-3 und GLP-1 umfasst, wobei z die Zahlen 1 bis 38 annehmen kann, aber kleiner ist als k, welches die Zahlen 2 bis 39 annehmen kann. A ist die Attachementgruppe die an jeder Stelle steht, jedoch bevorzugt am C-Terminus und um eins höher ist als y. Die Attachementgruppe ist bevorzugt das Amin Lysin.

[0042] Exendin-4(z-k) GLP-1(x-y)A¹⁻⁷⁵

hierbei sind chimäre Peptide aus Exendin-4 und GLP-1 umfasst, wobei z die Zahlen 1 bis 38 annehmen kann, aber kleiner ist als k, welches die Zahlen 2 bis 39 annehmen kann. A ist die Attachmentgruppe die an jeder Stelle steht, jedoch bevorzugt am C-Terminus und um eins höher ist als y. Die Attachmentgruppe ist bevorzugt das Amin Lysin.

[0043] Beispielhaft für ein chimäres GLP-1(x-y) Exendin-3(z-k)A¹⁻⁷⁵ oder GLP-1(x-y) Exendin-4(z-k)A¹⁻⁷⁵ Peptid ist MC12, bestehend aus GLP-1 (7–36) Exendin (33–39) Lys amid (Synthese über Firma Peptide Specialty Laboratories GmbH nach der Methode von Merrifield und Reinigung über HPLC gereinigt).

MC 12: (Ser³⁷, Gly³⁸, Ala³⁹, Pro⁴⁰, Pro⁴¹, Pro⁴², Ser⁴³, DTPA-Lys⁴⁴ amid) GLP1 (7–36)

[0044] MC 12 besteht aus der gesamten Aminosäuresequenz von GLP-1 (7–36) und trägt am C-terminalen Ende ein Amin, vorzugsweise Lysin an Position 44 sowie den Chelator DTPA sowie zusätzlich eine Kette aus 7 Aminosäuren von Exendin (33–39) Lys amid. Womit ein chimäres Peptid GLP-1 (7–36) Exendin (33–39) Lys amid vorliegt.

[0045] Dem Fachmann ist ersichtlich, dass somit verschieden lange Peptidderivate von GLP-1, Exendin-3 und Exendin-4, sowie verschieden lange chimäre Peptide aus GLP-1, Exendin-3 oder Exendin-4 vorliegen, die unterschiedliche Kombinationen der zugrunde liegenden Aminosäuresequenzen aus GLP-1, Exendin-3 und Exendin-4 enthalten.

[0046] Die erfindungsgemäßen Peptidderivate von GLP-1, Exendin-3 und Exendin-4, sowie die chimären Peptide aus GLP-1 mit Exendin-3 oder Exendin-4 die am C-Terminus über ein Amin modifiziert sind und über den N-Terminus an den GLP-1-Rezeptor binden umfassen auch Moleküle, die sich von den Aminosäuresequenzen der beschriebenen Peptide GLP-1, Exendin-3 und Exendin-4 an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Homologie zu diesen Sequenzen aufweisen. Homologie meint dabei eine Sequenzidentität von mindestens 40%, insbesondere eine Identität von mindestens 60%, vorzugsweise über 80% und besonders bevorzugt über 90%. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen Aminosäuresequenzen können dabei durch Deletion, Substitution und/oder Insertion entstanden sein.

[0047] Darüber hinaus werden die erfindungsgemäßen chimäre Peptide aus GLP-1, Exendin-3 oder Exendin-4 auch ohne C-terminale Modifikation hergestellt und finden dadurch besonders in der Herstellung eines Mittels zur Therapie von Diabetes eine Anwendung.

GLP-1(x-y) Exendin-3(z-k)
GLP-1(x-y) Exendin-4(z-k)

Exendin-3(z-k) GLP-1(x-y)
Exendin-4(z-k) GLP-1(x-y)

MC 20: (Ser³³, Gly³⁴, Ala³⁵, Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸, Ser³⁹)Exendin GLP1 (7–36)

[0048] MC 20 besteht aus der gesamten Aminosäuresequenz von GLP-1 (7–36) und trägt am C-terminalen eine Kette aus 7 Aminosäuren von Exendin (33–39). Womit ein nicht modifiziertes chimäres Peptid GLP-1 (7–36) Exendin (33–39) vorliegt.

Markierung der Peptidderivate und der chimären Peptide

[0049] Die erfindungsgemäßen Peptidderivate und die chimären Peptide werden zur Herstellung eines Mittels zur Diagnostik und Therapie gut- und bösartiger Erkrankungen, bei denen die GLP-1 Rezeptorexpression eine Rolle spielt, in einem geeigneten Stabilisierungspuffer gelöst, z. B. zur Stabilisierung der Metalle in vorzugsweise 0,5 M Natriumacetat pH 5,4 mit einer Konzentration von ca. 10⁻³ M. Alternativ wird zur Stabilisierung von Fluoreszenzfarbstoffen ein Puffer aus Ammoniumacetat bevorzugt, zur Stabilisierung von Chemotherapeutika und Kontrastmitteln ein physiologischer Puffer.

[0050] Die Markierung erfolgt an der Attachmentgruppe A durch Koppelung von Radionukliden, MRT Kontrastmitteln, Fluoreszenzfarbstoffen oder Chemotherapeutika. Dabei werden je nach Art der Anwendung für in vitro oder in vivo unterschiedliche Verfahren verwendet.

[0051] Als Radionuklide zur kovalenten oder komplexen Kopplung werden verwendet:

Nuklid	Anwendungsverfahren	$t_{1/2}$ [h]	Emittierende Strahlung	Energie [keV]	Art der Kopplung
F-18	PET	1,8	β^+	634	kovalent
Cu-64	PET	12,7	β^+	1673	komplex
Cu-67	Therapie	61,8	β^- γ	391 184	komplex
Ga-67	SPECT	79,2	γ	93/184/300	komplex
Ga-68	PET	1,1	β^+	2921	komplex
Y-86	PET	14,8	β^+ γ	1220 1076/1153	komplex
Y-90	Therapie	64,1	β^-	2280	komplex
Tc-99m	SPECT	6	γ	140	komplex
In-111	SPECT	67,2	γ	171/245	komplex
I-123	SPECT	13,2	γ	158	kovalent
I-124	PET	101	β^+ γ	2137/1534 602	kovalent
I-131	Therapie	192	γ β^-	364 606	kovalent
Lu-177	Therapie	158	γ β^-	208 112/208	komplex
Re-186	Therapie	88,8	γ β^-	137 1071	komplex
Re-188	Therapie	17	γ β^-	155/477/632 1965/2120	komplex
Pt-193m	Therapie	104	γ Auger e^-	135	komplex
Pt-195m	Therapie	96	γ Auger e^-	98	komplex
Ac-225	Therapie	240	γ α	99, 150	komplex
At-211	Therapie	7,2	γ Auger e^-	687	komplex kovalent
Bi-213	Therapie	0,76	γ α	440	komplex
Sm-153	Therapie	46	γ β^-	103	komplex
Er-169	Therapie	226	β^-	100	komplex

PET (Positronen Emissions Tomographie), SPECT (Single Photonen Computer Tomographie)

[0052] Als fluoreszierender Farbstoff/Chromophor werden beispielsweise verwendet: Fluorescein, Rhodamin, Coumarin, BODIPY, Pyrene (Cascadblau), Lucifergelb, Phycobiliprotein, Cyanin, Alexafluoro, Oregongrün, Texasrot, Coumarin, und deren Derivate.

[0053] Chelatoren sind beispielsweise DTPA (Diethylenetriaminepentaacetic acid, N,N-Bis(2-[bis(carboxymethyl)amino]ethyl)glycine), DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid), HYNIC (6-

Hydrazinopyridin-3-carbonsäure), MAG3 (mercaptoacetylglycylglycylglycine), N4 (1,4,8,11-tetraazaundecane) oder die Derivate aller genannten Chelatoren.

[0054] MRT Kontrastmittel sind zum Beispiel: Gadolinium, Mangan, Eisen, Europium, Kupfer, Nickel, Chrom, Prasodymium, Dysprosium oder Holmium oder deren Verbindung aber auch negative MRT Kontrastmittel wie z. B. Perfluorocarbone sowie z. B. Isotope zur MRT Spektroskopie wie F-19, H-1, P-31, Na-19.

[0055] Negative MRT Kontrastmittel sind erfindungsgemäss Kontrastmittel die das MRT Signal auslöschen bzw. stark abschwächen und nicht verstärken.

[0056] Chemotherapeutika sind insbesondere Alkylanzien, Interkalatoren, Antimetabolite, Enzymhemmer und Mitosegifte (beispielsweise Alkylsulfonate, Ethylimine Nitrosoharnstoffe Stickstofflostderivate, Folsäureanaloge, Purinanaloge, Pymiridinanaloge, Podophyllinderivate, Taxane, Vincaalkaloide, Anthrazykline, sonstige zytostatische Antibiotika, Platinverbindungen, Camptotecinderivate, verschiedenen Hormone, Wachstumsfaktoren, Interferone oder Interleukine), ansonsten die in „Onkologie 2004/05“ Autoren Preiss, Dornhoff, Hagmann, Schmieder erschienen im Zuckschwerdtverlag auf den Seiten 230–287 beschriebenen Chemotherapeutika, aber auch alle anderen zytostatisch oder zytotoxisch wirkenden Substanzen.

[0057] Je nach Art der Anwendung der erfindungsgemässen Proteinderivate und chimären Proteine und dem aus ihnen hergestellten Mittel zur Diagnostik und Therapie gut- und bösartiger Erkrankungen, bei denen die GLP-1 Rezeptorexpression eine Rolle spielt, wird die Markierungsreaktion in zwei Varianten durchgeführt.

Markierung zur in vitro Anwendung in der Radiotherapie

[0058] 3 µL der in einem geeigneten Stabilisierungspuffer vorzugsweise 0,5 M Natriumacetat pH 5,4 mit einer Konzentration von ca. 10^{-3} M gelösten erfindungsgemässen Peptidderivate oder eines der chimären Peptide werden zur Markierung zu 500 µL 0,5 M Natriumacetat pH 5,4 gegeben. Der pH-Wert liegt dabei zwischen 3–6. Dazu wird 185 MBq $^{111}\text{InCl}_3$ (Tyco, Petten, The Netherlands) in 0,1 M HCl 500 µL hinzugefügt und während 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Um alle Bindungsstellen abzusättigen wird nochmals 3 µL 10^{-3} M Lösung $^{nat}\text{InCl}_3$ zugegeben und nochmals 30 min inkubiert.

[0059] Die Qualitätskontrolle wird über eine HPLC-Säule vorgenommen:
Säule: CC 250/4.6 Nucleosil 120-5 C18 (Machery-Nagel, Oenisingen, Schweiz)
Gradient: 0->5 min 100% 0.05 M $\text{NH}_4\text{OOCCH}_3$, pH 5.4 (Puffer A); 5->25 min 100% Puffer A->50% Puffer A/
50% Acetonitril.

[0060] Die Qualitätskontrolle für eine in vitro Anwendung wird erfüllt bei einer Markierungsausbeute von mehr als 98%.

[0061] Somit steht ein radioaktiv markiertes Mittel zur Diagnostik und Therapie gut- und bösartiger Erkrankungen, bei denen die GLP-1 Rezeptorexpression eine Rolle spielt, zur Verfügung, dass beispielsweise in der Zell- und Gewebekultur mit Pankreaszellen eingesetzt wird.

Markierung zur in vivo Anwendung in der Radiotherapie

[0062] 3 µL der in einem geeigneten Stabilisierungspuffer vorzugsweise 0,5 M Natriumacetat pH 5,4 mit einer Konzentration von ca. 10^{-3} M gelösten erfindungsgemässen Peptidderivate oder eines der chimären Peptide werden zur Markierung zu 500 µL 0,5 M Natriumacetat pH 5,4 gegeben. Am Ende wird dazu 185 MBq $^{111}\text{InCl}_3$ (Tyco, Petten, The Netherlands) in 0,1 M HCl 500 µL dazugegeben und während 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Qualitätskontrolle wird über eine HPLC-Säule vorgenommen:
Säule: CC 250/4.6 Nucleosil 120-5 C18 (Machery-Nagel, Oenisingen, Schweiz)
Gradient: 0->5 min 100% 0.05 M $\text{NH}_4\text{OOCCH}_3$, pH 5.4 (Puffer A); 5->25 min 100% Puffer A->50% Puffer A/
50% Acetonitril.

[0063] Die Qualitätskontrolle für eine in vivo Anwendung wird erfüllt bei einer Markierungsausbeute von mehr als 98%.

[0064] Somit steht ein radioaktiv markiertes Mittel zur Diagnostik und Therapie gut- und bösartiger Erkrankungen, bei denen die GLP-1 Rezeptorexpression eine Rolle spielt zur Verfügung, dass beispielsweise zur Tumordetektion bei Patienten eingesetzt wird.

[0065] Der Begriff Patient bezieht sich dabei gleichermaßen auf Menschen und Wirbeltiere. Damit wird das Mittel in der Human- und Veterinärmedizin verwendet. Das therapeutisch und diagnostisch wirksame Mittel der vorliegenden Erfindung wird den Patienten, als Teil einer pharmazeutisch akzeptablen Komposition entweder oral, rektal, parenteral intravenös/intrararteriell, intramuskulär, subkutan, intrathekal, intracisternal, intracranial, intravaginal, intraperitoneal, intravasculär, lokal (Puder, Salbe oder Tropfen) oder in Sprayform verabreicht. Die entsprechende Dosierung ist je nach Anwendungsfall für Diagnostik und Therapie gut- und bösartiger Erkrankungen, bei denen die GLP-1 Rezeptorexpression eine Rolle spielt, vom Arzt festzulegen.

Internalisierungsstudie

[0066] Die Internalisierungsstudie zeigt beispielhaft den Transport der über in vitro-Markierung radioaktiv markierten erfindungsgemäßen Peptidderivate und chimären Proteine in die Zelle.

[0067] In einer 6-well Platte werden 100000 GLP-1-Rezeptor transfizierte CHO Zellen ausgesät. Die Zellen wachsen bis sie konfluent sind. Es werden 4 Gruppen gebildet:

Gruppe 1: totale Bindung, PBS gewaschen

[0068] Es werden 100000 cpm ^{111}In (10^{-15} Mol) markiertes Peptid in 2 mL Medium zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wird $3\times$ mit PBS gewaschen und die Zellen mit 20 mM MOPS (3-Morpholinopropanesulfonic acid) + 0,1% Triton-X-100 (ph 7,4) abgelöst. Die Aufnahme (Uptake) in die Zellen wird im γ -Counter gemessen. Die Zellzahl wird über der Proteingehalt mit dem Proteinassay-Kit von Bio-Rad (München, Deutschland) basierend auf der Methode von Bradford gemessen. Das Resultat wird in cpm/ μg Protein angegeben.

Gruppe 2: unspezifische Bindung, PBS gewaschen

[0069] Es werden 20 μL einer 10^{-3} M GLP-1 Lösung und 100000 cpm ^{111}In markiertes Peptid in 2 mL Medium zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wird $3\times$ mit PBS gewaschen und die Zellen mit 20 mM MOPS (3-Morpholinopropansulfonysäure) + 0,1% Triton-X-100 (ph 7,4) abgelöst. Der Uptake in den Zellen wird im γ -Counter gemessen. Die Zellzahl wird über der Proteingehalt mit dem Proteinassay-Kit von Bio-Rad (München, Deutschland) basierend auf der Methode von Bradford gemessen. Das Resultat wird in cpm/ μg Protein angegeben.

Gruppe 3: totale Bindung, Säure gewaschen

[0070] Es werden 20 μL einer 10^{-3} M GLP-1 Lösung und 100000 cpm ^{111}In markiertes Peptid in 2 mL Medium zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wird $1\times$ mit 0,1 M Natrium Acetatpuffer pH 4 gewaschen und $2\times$ mit PBS gewaschen und die Zellen mit 20 mM MOPS (3-Morpholinopropansulfonysäure) + 0,1% Triton-X-100 (ph 7,4) abgelöst. Der Uptake in den Zellen wird im γ -Counter gemessen. Die Zellzahl wird über der Proteingehalt mit dem Proteinassay-Kit von Bio-Rad (München, Deutschland) basierend auf der Methode von Bradford gemessen. Das Resultat wird in cpm/ μg Protein angegeben.

Gruppe 4: unspezifische Bindung, Säure gewaschen

[0071] Es werden 20 μL einer 10^{-4} M GLP-1 Lösung und 100000 cpm ^{111}In markiertes Peptid in 2 mL Medium zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wird $1\times$ mit 0,1 M Natrium Acetatpuffer pH 4 gewaschen und $2\times$ mit PBS gewaschen und die Zellen mit 20 mM MOPS (3-Morpholinopropansulfonysäure) + 0,1% Triton-X-100 (ph 7,4) abgelöst. Der Uptake in den Zellen wird im γ -Counter gemessen. Die Zellzahl wird über der Proteingehalt mit dem Proteinassay-Kit von Bio-Rad (München, Deutschland) basierend auf der Methode von Bradford gemessen. Das Resultat wird in cpm/ μg Protein angegeben.

Auswertung: $\% \text{IDsB} = \frac{\text{Res3.} - \text{Res4.}}{\text{Res1.} - \text{Res2.}} \cdot 100$

$\% \text{IdsB} = \% \text{Internalisierung der spezifischen Bindung}$

	%IdsB
MC10	75 ± 5
MC11	70 ± 7
MC12	73 ± 9

[0072] Das Ergebnis zeigt, dass ein guter Transport in die Zellen erfolgt.

Bindungsstudien

[0073] Bindungsstudien zeigen die spezifische Bindung der über in vivo-Markierung radioaktiv markierten erfindungsgemäßen Peptidderivate und chimären Proteine an den GLP-1-Rezeptor.

[0074] In einer 6-well Platte werden 100000 GLP-1-Rezeptor transfizierte CHO Zellen ausgesät. Die Zellen wachsen bis sie konfluent sind. Es werden dann in 2 mL 100000 cpm ¹¹¹In markiertes Peptid zugegeben. Um die Bindung zu testen wird mit 20 µL einer 10⁻³ M GLP-1 Lösung geblockt.

	% Blockierung
MC10	80 ± 3
MC11	85 ± 3
MC12	77 ± 6

[0075] Die in vivo Bioverteilung wird beispielsweise mit Nagern z. B. mit Nacktmäusen dargestellt. Dazu werden GLP-1 transfizierte CHO Zellen in Nacktmäuse injiziert. Nach ca. 3–5 Wochen sind Tumore einer Größe von ca. 300 mg gewachsen. Den Mäusen wird eines der erfindungsgemäßen 37 MBq ¹¹¹In markierten Peptide über die Schwanzvene injiziert und die Mäuse werden unter der einer γ-Kamera nach 4 h gemessen.

[0076] Dabei erfolgt eine schnelle Clearance über die Niere und eine Aufnahme in der Niere. Eine hohe Aufnahme erfolgt ebenfalls im GLP-1 Rezeptor positivem Tumor, während ein GLP-1 Rezeptor negativer Tumor kaum eine Aufnahme zeigt. Eine leichte Aufnahme ist ebenfalls im Pankreas zu sehen, andere Organe zeigen keine sichtbare Aufnahme.

[0077] In Gruppen von jeweils 4 Mäusen werden ex vivo Bioverteilungsstudien durchgeführt, bei denen 555 kBq In-111 markiertes MC10 in die Schwanzvene injiziert werden. 1, 4 und 24 h p. i. werden die Mäuse getötet und die Organe entnommen.

[0078] Die Aufnahme der Radioaktivität wird gemessen und die Organe gewogen. Die injizierte Dosis pro Gramm Organgewicht (% i. D./g) wird berechnet.

[0079] Die Resultate sehen wie folgt aus:

Organ	1 h	Staabw	4 h	Staabw	24 h	Staabw
Blut	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Leber	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
Magen	0,14	0,10	0,13	0,07	0,07	0,06
Milz	0,02	0,02	0,01	0,00	0,01	0,00
Pankreas	0,58	0,50	0,62	0,28	0,37	0,27
Nieren	7,90	3,62	7,41	3,56	4,85	3,05
Darm	0,12	0,06	0,07	0,06	0,04	0,03
Lunge	0,80	0,56	0,36	0,17	0,22	0,07
Herz	0,02	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00
Knochen	0,02	0,04	0,01	0,00	0,01	0,01

Muskel	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Tumor –	0,03	0,03	0,02	0,01	0,01	0,00
Tumor +	0,42	0,19	0,31	0,30	0,20	0,16

Mittelwert aus der Bioverteilung mit 4 Mäusen pro Gruppe in % i. D./g Staabw: Standardabweichung.

SEQUENCE LISTING

<110> Philipps-Universität Marburg
Philipps-Universität Marburg

<120> Erfindung betreffend GLP-1 und Exendin

<130> 80027-0005-P

<140> 10 2004 043 153.1

<141> 2004-09-03

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 37

<212> PRT

<213> human

<220>

<221> GLP-1

<222> (1)..(37)

<300>

<302> Erfindung betreffend GLP-1 und Exendin

<310> DE 10 2004 043 153.1

<311> 2004-09-03

<312> 2006-09-03

<313> (1)..(37)

<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> 39

<212> PRT

<213> Heloderma

<220>

<221> Exendin-3

<222> (1)..(39)

<300>

<302> Erfindung betreffend GLP-1 und Exendin

<310> DE 10 2004 043153.1

<311> 2004-09-03

<312> 2006-09-03

<313> (1)..(39)

<400> 2

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> 3
<211> 39
<212> PRT
<213> Heloderma

<220>
<221> Exendin-4
<222> (1)..(39)

<300>
<302> Erfindung betreffend GLP-1 und Exendin
<310> DE 102004043153.1
<311> 2004-09-03
<312> 2006-09-03
<313> (1)..(39)

<400> 3

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

Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO St. 25. Dieses kann von der amtlichen Veröffentlichungsplattform des DPMA heruntergeladen werden.

Patentansprüche

1. Peptidderivate von GLP-1, Exendin-3 oder Exendin-4, welche ganz oder teilweise die Aminosäuresequenzen der Peptide

GLP-1 (1-37)

H-His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser- Asp-
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33
Lys-Gly-Arg-Gly-OH
34 35 36 37

oder

Exendin-3:

H-His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
 Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-
 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35
 Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂
 36 37 38 39

oder

Exendin-4:

H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
 Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-
 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35
 Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂
 36 37 38 39

beinhalten, **dadurch gekennzeichnet**, dass

- die Peptide am C-Terminus über ein Amin modifiziert sind und der N-Terminus für die Bindung an den GLP-1-Rezeptor zur Verfügung steht
- die Peptide aufgebaut sind aus GLP-1(x-y)A¹⁻³⁷, oder Exendin-3 (z-k)A¹⁻⁴⁰ oder Exendin-4 (z-k)A¹⁻⁴⁰, wobei x die Aminosäuren 1–36 der GLP-1 Aminosäuresequenz beinhaltet, y die Aminosäuren 2–37 der GLP-1 Aminosäuresequenz, z die Aminosäuren 1–38 der Exendin-3 oder Exendin-4 Aminosäuresequenz k die Aminosäuren 2–39 der Exendin-3 oder Exendin-4 Aminosäuresequenz darstellt,
- A eine Attachmentgruppe ist, wobei die Hochzahl angibt, an welcher Position innerhalb der Aminosäuresequenz sich die Attachmentgruppe alternativ befinden kann und
- A eine Aminosäure oder eine organische Gruppe mit einem freien Amin ist.

2. Peptidderivate gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Attachmentgruppe A am C-Terminus lokalisiert ist und ein Amin darstellt.

3. Peptidderivate gemäß Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Attachmentgruppe A Lysin ist.

4. Peptidderivate gemäß Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Attachmentgruppe A eine Aminosäure mit einem freien Amin, nämlich Ornithin ist.

5. Peptidderivate gemäß Anspruch 1 bis 4 dadurch gekennzeichnet, dass an die Attachmentgruppe A ein Chelator zur Markierung mit Radionukliden oder ein MRT-Kontrastmittel, Fluoreszenzfarbstoff oder ein Chemotherapeutikum gekoppelt ist.

6. Peptidderivate gemäß der vorangegangenen Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass der Chelator N,N-Bis(2-[bis(carboxymethyl)amino]ethyl)glycine), DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclodecane-1,4,7,10-tetra-acetic acid), HYNIC (6-Hydrazinopyridin-3-carbonsäure), MAG3 (mercaptoacetylglycylglycylglycine), N4 (1,4,8,11-tetraazaundecane) und deren bekannte Derivate ist, vorzugsweise DTPA (Diethylenetriaminepentaacetic acid).

7. Peptidderivate gemäß der vorangegangenen Ansprüche dadurch gekennzeichnet dass die Markierung eine Koppelung von Radionuklid, MRT Kontrastmittel, Fluoreszenzfarbstoff und/oder Chemotherapeutikum ist.

8. Peptidderivate gemäß der vorangegangenen Ansprüche dadurch gekennzeichnet dass Fluoreszenzfarbstoffe ausgewählt sind insbesondere aus der Gruppe Fluorescein, Rhodamin, Coumarin, BODIPY, Pyrene (Cascadblau), Lucifergelb, Phycobiliprotein, Cyanin, Alexafluoro, Oregongrün, Texasrot, Coumarin, und deren Derivaten.

9. Peptidderivate gemäß der vorangegangenen Ansprüche dadurch gekennzeichnet dass das Radionuklid ausgewählt ist insbesondere aus der Gruppe F-18, Cu-64, Cu-67, Ga-67, Ga-68, Y-86, Y-90, Tc-99m, In-111, I-123, I-124, I-131, Lu-177, Re-186, Re-188, Pt-193m, Pt-195m, Ac-225, At-211, Bi-213, Sm-153 oder Er-169.

10. Peptidderivate gemäß der vorangegangenen Ansprüche dass MRT Kontrastmittel Gadolinium, Mangan, Eisen, Europium, Kupfer, Nickel, Chrom, Prasodymium, Dysprosium oder Holmium oder deren Verbindung ist oder Perfluorocarbone oder F-19, H-1, P-31, Na-19 ist.

11. Peptidderivate gemäß der vorangegangenen Ansprüche dadurch gekennzeichnet dass das Chemotherapeutika ausgewählt ist insbesondere aus der Gruppe Alkylsulfonate, Ethylimine Nitrosoharnstoffe Stickstofflostderivate, Folsäureanaloga, Purinanaloga, Pymiridinanaloga, Pdophyllinderivate, Taxane, Vincaalkaloide, anthrazykline, sonstige zytostatische Antibiotika, Platinverbindungen, Camptotecinderivate, Hormone, Wachstumsfaktoren, Interferone oder Interleukine oder zytostatisch oder zytotoxisch wirkenden Substanzen.

12. Peptidderivate gemäß der vorangegangenen Ansprüche dadurch gekennzeichnet dass die Markierung durch Koppelung von Radionukliden für in vitro-Anwendungen durch Absättigung der Bindungsstellen mit $^{na-}{}^tInCl_3$ erfolgt.

13. Chimäre Peptide aus GLP-1 und Exendin, wobei Exendin ausgewählt ist aus Exendin-3 oder Exendin-4 dadurch gekennzeichnet dass sie ganz oder teilweise die Aminosäuresequenzen der Peptide beinhalten

GLP-1 (1–37)

H-His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-

16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33

Lys-Gly-Arg-Gly-OH

34 35 36 37

und

Exendin-3:

H-His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35

Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂

36 37 38 39

oder

Exendin-4:

H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
 Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-
 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35
 Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂
 36 37 38 39

und die Peptide aufgebaut sind aus:

GLP-1(x-y) Exendin-3(z-k)A¹⁻⁷⁵, GLP-1(x-y) Exendin-4(z-k)A¹⁻⁷⁵, Exendin-3(z-k) GLP-1(x-y)A¹⁻⁷⁵ oder Exendin-4(z-k) GLP-1(x-y)A¹⁻⁷⁵,

wobei

x die Aminosäuren 1–36 der GLP-1 Aminosäuresequenz beinhaltet,

y die Aminosäuren 2–37 der GLP-1 Aminosäuresequenz,

z die Aminosäuren 1–38 der Exendin-3 oder Exendin-4 Aminosäuresequenz

k die Aminosäuren 2–39 der Exendin-3 oder Exendin-4 Aminosäuresequenz darstellt und A eine Attachmentgruppe ist, wobei die Hochzahl angibt, an welcher Position innerhalb der Aminosäuresequenz sich die Attachmentgruppe befindet und

A eine Aminosäure oder eine organische Gruppe mit einem freien Amin ist.

14. Chimäre Peptide aus GLP-1 und Exendin gemäß Anspruch 13 dadurch gekennzeichnet, dass die Attachmentgruppe A am C-Terminus lokalisiert ist und ein Amin darstellt.

15. Chimäre Peptide aus GLP-1 und Exendin gemäß Anspruch 13 dadurch gekennzeichnet, dass die Attachmentgruppe A Lysin ist.

16. Chimäre Peptide aus GLP-1 und Exendin gemäß Anspruch 13 dadurch gekennzeichnet, dass die Attachmentgruppe A eine Aminosäure mit einem freien Amin, nämlich Ornithin ist.

17. Chimäre Peptide aus GLP-1 und Exendin gemäß Anspruch 13 bis 16 dadurch gekennzeichnet, dass an die Attachmentgruppe A ein Chelator zur Markierung mit Radionukliden oder ein MRT-Kontrastmittel, Fluoreszenzfarbstoff oder ein Chemotherapeutikum gekoppelt ist.

18. Chimäre Peptide aus GLP-1 und Exendin gemäß Anspruch 13 bis 17 dadurch gekennzeichnet, dass der Chelator N,N-Bis(2-[bis(carboxymethyl)amino]ethyl)glycine), DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclodecane-1,4,7,10-tetra-acetic acid), HYNIC (6-Hydrazinopyridin-3-carbonsäure), MAG3 (mercaptoacetylglycylglycylglycine), N4 (1,4,8,11-tetraazaundecane) und deren bekannte Derivate ist, vorzugsweise DTPA (Diethylenetriamin-pentaacetic acid).

19. Chimäre Peptide aus GLP-1 und Exendin gemäß Anspruch 13 bis 18 dadurch gekennzeichnet dass die Markierung eine Koppelung von Radionuklid, MRT Kontrastmittel, Fluoreszenzfarbstoff und/oder Chemotherapeutikum ist.

20. Chimäre Peptide aus GLP-1 und Exendin gemäß Anspruch 13 bis 19 dadurch gekennzeichnet dass Fluoreszenzfarbstoffe ausgewählt sind insbesondere aus der Gruppe Fluorescein, Rhodamin, Coumarin, BO-DIPY, Pyrene (Cascadblau), Lucifergelb, Phycobiliprotein, Cyanin, Alexafluoro, Oregongrün, Texasrot, Coumarin, und deren Derivaten.

21. Chimäre Peptide aus GLP-1 und Exendin gemäß Anspruch 13 bis 20 dadurch gekennzeichnet dass das Radionuklid ausgewählt ist insbesondere aus der Gruppe F-18, Cu-64, Cu-67, Ga-67, Ga-68, Y-86, Y-90, Tc-99m, In-111, I-123, I-124, I-131, Lu-177, Re-186, Re-188, Pt-193m, Pt-195m, Ac-225, At-211, Bi-213, Sm-153 oder Er-169.

22. Chimäre Peptide aus GLP-1 und Exendin gemäß Anspruch 13 bis 21 dass MRT Kontrastmittel Gadolinium, Mangan, Eisen, Europium, Kupfer, Nickel, Chrom, Prasodymium, Dysprosium oder Holmium oder deren Verbindung ist oder Perfluorocarbone oder F-19, H-1, P-31, Na-19 ist.

23. Chimäre Peptide aus GLP-1 und Exendin gemäß Anspruch 13 bis 22 dadurch gekennzeichnet dass das Chemotherapeutika ausgewählt ist insbesondere aus der Gruppe Alkylsulfonate, Ethylimine Nitrosoharnstoffe Stickstofflostderivate, Folsäureanaloge, Purinanaloge, Pymiridinanaloga, Pdophyllinderivate, Taxane, Vincaalkaloide, anthrazykline, sonstige zytostatische Antibiotika, Platinverbindungen, Camptotecinderivate, Hormone, Wachstumsfaktoren, Interferone oder Interleukine oder zytostatisch oder zytotoxisch wirkenden Substanzen.

24. Chimäre Peptide aus GLP-1 und Exendin gemäß Anspruch 13 bis 23 dadurch gekennzeichnet dass die Markierung durch Koppelung von Radionukliden für in vitro-Anwendungen durch Absättigung der Bindungsstellen mit $^{nat}InCl_3$ erfolgt.

25. Verwendung der Peptidderivate von GLP-1, Exendin-3 und Exendin-4, sowie chimären Peptide aus GLP-1, Exendin-3 oder Exendin-4 gemäß der vorangegangenen Ansprüche zur Herstellung eines Mittels zur Diagnostik und Therapie gut- und bösartiger Erkrankungen, bei denen die GLP-1 Rezeptorexpression eine Rolle spielt.

26. Peptidderivate von GLP-1, Exendin-3 und Exendin-4, sowie chimäre Peptide aus GLP-1, Exendin-3 oder Exendin-4 gemäß der Ansprüche 1 bis 24 zur Bestimmung der Dichte Insulin-produzierender Zellen in einem Gewebe.

27. Peptidderivate von GLP-1, Exendin-3 und Exendin-4, sowie chimäre Peptide aus GLP-1, Exendin-3 oder Exendin-4 gemäß der Ansprüche 1 bis 24 zur Bestimmung der Expression von GLP-1-Rezeptoren oder deren Dichte.

28. Mittel zur Diagnostik und Therapie gut- und bösartiger Erkrankungen, bei denen die GLP-1 Rezeptorexpression eine Rolle spielt, dadurch gekennzeichnet dass es markierte Peptidderivate von GLP-1, Exendin-3 und Exendin-4, oder markierte chimäre Peptide aus GLP-1, Exendin-3 oder Exendin-4 gemäß Anspruch 1 und Anspruch 13 enthält.

29. Mittel zur Diagnostik und Therapie gut- und bösartiger Erkrankungen, bei denen die GLP-1 Rezeptorexpression eine Rolle spielt, dadurch gekennzeichnet dass es unmarkierte Peptidderivate von GLP-1, Exendin-3 und Exendin-4, oder unmarkierte chimäre Peptide aus GLP-1, Exendin-3 oder Exendin-4 gemäß Anspruch 1 und Anspruch 13 enthält.

30. Mittel gemäß Anspruch 28 dadurch gekennzeichnet dass die Markierung eine Koppelung von Radionukliden, MRT Kontrastmitteln, Fluoreszenzfarbstoffen und/oder Chemotherapeutikum beinhaltet.

31. Mittel gemäß Anspruch 28 und Anspruch 29 zu Diagnostik und Therapie gut- und bösartiger Erkrankungen, bei denen die GLP-1 Rezeptorexpression eine Rolle spielt.

32. Mittel gemäß Anspruch 28 und Anspruch 29 zur Diagnostik und Therapie, neuroendokriner Tumoren (NET) insbesondere Insulinomen und kleinzelligen Bronchialkarzinomen.

33. Mittel gemäß Anspruch 28 in der Szintigraphie, PET, SPECT, MRT, optischen Diagnostik, rezeptorvermittelten Chemotherapie, rezeptorvermittelten, zytostatischen oder zytotoxischen Therapie und Radiopeptidtherapie.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen