



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년03월04일
 (11) 등록번호 10-1237152
 (24) 등록일자 2013년02월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/575 (2006.01) *A61K 38/16* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2007-7007577
 (22) 출원일자(국제) 2005년08월26일
 심사청구일자 2010년03월31일
 (85) 번역문제출일자 2007년04월02일
 (65) 공개번호 10-2007-0093960
 (43) 공개일자 2007년09월19일
 (86) 국제출원번호 PCT/DE2005/001503
 (87) 국제공개번호 WO 2006/024275
 국제공개일자 2006년03월09일
 (30) 우선권주장
 10 2004 043 153.1 2004년09월03일 독일(DE)
 (56) 선행기술조사문헌
 Biochemistry, 2001, vol 40, pp2860-2869.
 전체 청구항 수 : 총 15 항

(73) 특허권자
필립스-유니버시티 마르부르크
 독일 35037 마르부르크 비겐스트라쎄 10
 (72) 발명자
고트하르트, 마르틴
 독일 35274 키르히하인 타이히만스개르텐 6
베헤, 마르틴
 독일 35043 마르부르크 피히텐베크 8
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
김영, 장수길

심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 **GLP-1 및 엑센딘 관련 발명**

(57) 요약

본 발명은 GLP-1 수용체에 결합하는 GLP-1(글루카곤-유사 펩티드 1) 및 엑센딘-3 및/또는 엑센딘-4로부터 유도된 펩티드에 관한 것이며, 이는 GLP-1 수용체 발현이 역할하는 양성 및 악성 질환들을 진단하고 치료하는 수단을 제조하기 위하여 표지되거나 비표지되어 사용될 수 있다.

(72) 발명자

베어, 토마스

독일 35043 마르부르크-카펠 포르스타우스슈트라쎄
2

피케, 부르크하르트, 요트.

독일 82131 가우팅 타실로슈트라쎄 14

특허청구의 범위

청구항 1

C-말단이 아민으로 변형되고, N-말단이 GLP-1 수용체에 결합하며,

엑센딘-3 (z-k)A 또는 엑센딘-4 (z-k)A를 가지고,

여기서, z는 하기 엑센딘-3 또는 엑센딘-4 아미노산 서열의 아미노산 1-38을 나타내고,

k는 하기 엑센딘-3 또는 엑센딘-4 아미노산 서열의 아미노산 2-39를 나타내고,

A는 C-말단에 위치하고, 리신인 아미노산, 유리 아미노기를 갖는 다른 아미노산, 또는 유리 아미노기를 갖는 유기기로 이루어지는 부착기이며,

킬레이터가 방사선헌종 또는 MRI 조영제, 형광 안료 또는 화학치료제로의 표지를 위하여 부착기 A에 커플링되는 것인,

엑센딘-3 또는 엑센딘-4의 펩티드 유도체.

<엑센딘-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

<엑센딘-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

청구항 2

제1항에 있어서, 유리 아미노기를 갖는 다른 아미노산이 오르티닌인 엑센딘-3 또는 엑센딘-4의 펩티드 유도체.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 킬레이터가 N,N-비스(2-[비스(카르복시메틸)아미노]-에틸)글리신), DOTA(1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산), HYNIC(6-히드라지노피리딘-3-카르복산), MAG3(메르캅토아세틸-글리실글리실글리신), N4(1,4,8,11-테트라아자운데칸) 또는 DTPA(디에틸렌트리아민펜타아세트산)인 엑센딘-3 또는 엑센딘-4의 펩티드 유도체.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 방사선헌종, MRI 조영제, 형광 안료 또는 화학치료제의 커플링으로 표지된 엑센딘-3 또는 엑센딘-4의 펩티드 유도체.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 선택된 형광 안료가 플루오레세인, 로다민, 쿠마린, BODIPY, 피렌(캐스캐이드 블루), 루시퍼 엘로우, 피코빌리프로테인, 시아닌, 알렉사플루오로, 오레곤 그린 또는 텍사스 레드의 군으로부터 선택되는 것인 엑센딘-3 또는 엑센딘-4의 펩티드 유도체.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 선택된 방사선택종이 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 또는 Er-169의 군으로부터 선택되는 것인 엑센딘-3 또는 엑센딘-4의 펩티드 유도체.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 선택된 MRI 조영제가 가돌리늄, 망간, 철, 유로퓸, 구리, 니켈, 크롬, 프라세오디뮴, 디스프로슘 또는 홀뮴 또는 퍼플루오로카본 또는 F-19, H-1, P-31, Na-19을 포함하는 군으로부터 선택되는 것인 엑센딘-3 또는 엑센딘-4의 펩티드 유도체.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 선택된 화학치료제가 알킬화제, 에틸이민, 니트로소모나스(엔. 우레아(N. ureae)), 질소 머스타드 유도체, 폴산 유사체, 퓨린 유사체, 피리미딘 유사체, 포도필린 유도체, 탁산, 빈카알칼로이드, 안트라시클린, 기타 세포증식억제 항생제, 백금 화합물, 캄프토테신 유도체, 호르몬, 성장 인자, 인터페론 또는 인터루킨 또는 세포증식억제 또는 세포독성 물질을 포함하는 군으로부터 선택되는 것인 엑센딘-3 또는 엑센딘-4의 펩티드 유도체.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, ^{nat}InCl₃으로 결합 부위를 포화시킴으로써, 시험관 내에서 사용하기 위한 방사선택종 커플링을 통해 표지가 이루어지는 것인 엑센딘-3 또는 엑센딘-4의 펩티드 유도체.

청구항 11

제1항 또는 제2항 기재의 엑센딘-3 또는 엑센딘-4의 펩티드 유도체를 포함하는, 조직 중 인슐린 생산 세포의 밀도를 측정하기 위한 약제.

청구항 12

제1항 또는 제2항 기재의 엑센딘-3 또는 엑센딘-4의 펩티드 유도체를 포함하는, GLP-1 수용체의 발현 또는 밀도를 측정하기 위한 약제.

청구항 13

표지된 제1항 또는 제2항 기재의 엑센딘-3 또는 엑센딘-4의 펩티드 유도체를 포함하는, GLP-1 수용체 발현이 역할하는 인슐린종, 기관지암, 췌장암, 당뇨병, 식이 장애 또는 정신 장애를 진단하고 치료하기 위한 약제.

청구항 14

제13항에 있어서, 표지가 방사선택종, MRI 조영제, 형광 안료 또는 화학치료제의 커플링을 함유하는 것인 약제.

청구항 15

제13항에 있어서, 인슐린종 및 소세포 기관지암을 진단하고 치료하기 위한 약제.

청구항 16

제13항에 있어서, 섬광조영술, PET, SPECT, MRI, 광학 진단법, 수용체-매개 화학요법, 수용체-매개 세포증식억제 또는 세포독성 요법 및 방사선택펩티드 요법에 사용하기 위한 약제.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 인크레틴 호르몬인 GLP-1 및 그의 유사체들에 기초한, 일차 위소장췌장 종양(gastroenteropancreatic tumor), 및 상이한 기관계의 다른 양성 및 악성 질환들을 표시하고 치료하기 위한 의약제의 제조 방법에 관한 것이다.

[0002] 위소장췌장 신경내분비 종양의 위치화에 있어서, 소마토스타틴 수용체 섬광조영술(SRS)은 초음파 다음으로 가장 중요한 진단 방법이다. 여기에서의 원리는 종양 세포에 의해 흡수되는 방사성 표지된 펩티드의 도움으로 종양을 구체적으로 묘사하는 것이다. 그리고 나면, 감마 카메라의 도움으로, 종양 조직 내에서 방사능이 축적되는 것이 가시적으로 확인될 수 있다. 특정 유형의 종양이 SRS에 대해 필요한 수용체들 중 하나, 예를 들어 소마토스타틴 유사체인 옥트레오티드(octreotide)(등록상표)를 갖는다면, 이러한 종양들을 확인하는 것은 문제가 없다. 하지만, 해당하는 수용체들이 발현되지 않는다면, 섬광조영술로 확인할 수 없게 된다. 위치 진단 뿐 아니라, 방사성 표지된 펩티드는 또한 적절한 방사선택종(α - 또는 β -방출자)으로 소마토스타틴 유사체, 예를 들어 옥트레오티드(등록상표)를 표지함으로써 구체적인 수용체 표적 방사선택종 요법을 수행할 수 있는 종양 치료에 대한 접근법을 가능케 한다. 해당하는 방사선택종들이 종양 세포에 의해 실제로 흡수되고, 더 이상 방출될 수 없는 방식으로 펩티드에 의해 화학적으로 결합(예를 들어, 이전에 그 펩티드에 결합된 금속 킬레이터와의 착화에 의해)된다는 사실로 인해 종양 조직 내에 매우 특이적으로 축적되게 된다.

[0003] 하지만, 모든 계열의 신경내분비 종양(NET), 특히 인슐린종 및 소세포 기관지암은 소마토스타틴 유사체인 옥트레오티드(등록상표)를 이용한 SRS 또는 방사선택종 요법에 필수적인 소마토스타틴 수용체 하위유형들을 발현하지 않는다. 특히, 상당한 비율의 인슐린종들은 섬광조영 진단에 의해 탐지되지 않는다. 소세포 기관지암에서도, 일차 종양은 종종 보여지지만 전이는 수용체를 발현하지 않기 때문에 보여질 수 없어서, SRS는 적절한 방법을 이루지 못한다. 결과적으로, 이들로는 방사선택종 요법을 수행하지 못하며, 이로 인해 추가적이거나 별법으로서의 치료 방법에 대한 관심이 존재한다. 그러므로, 앞서 언급된 종양들에 흡수될 적절한 펩티드에 대한 필요가 존재한다.

[0004] 인크레틴 호르몬인 글루카곤-유사 펩티드-1(GLP-1), 및 그의 유사체인 엑센딘-3 및 엑센딘-4(도마뱀(길라 몬스터(gila monster)인 멕시코독도마뱀(Heloderma horridum) 및 아메리카독도마뱀(Heloderma suspectum)의 침에서 유래됨)은 인슐린종 및 소세포 기관지암을 비롯한 많은 다른 종류의 종양들이 발현하는 수용체에 대한 펩티드들이다. 인슐린종은 인슐린을 생산하는 췌장 내 랑게르한스 섬의 β -세포로부터 유래하는데, 거기서 GLP-1 뿐 아니라 엑센딘-3 및 엑센딘-4는 식후 인슐린 분비를 유발한다.

배경기술

[0005] 섬광조영술에서 글루카곤-유사 펩티드-1(GLP-1)을 이용하기 위해서는, 펩티드를 표지하는 것이 필요하다. 그를 위한 방법 및 방사선택종을 이용한 단백질 표지 방법은 당업자에게 공지되어 있으며, 수많은 특허출원(예를 들어, DE 690 18 226 T2) 및 학술 문헌들에 기재되어 있다. 진단 영상화에서의 적용 및 병리 조직에서의 치료적으로 유효한 분자 교환을 위한, 상기 문헌에 설명되어 있는 펩티드들은 정상적으로는 펩티드에서 아미노를 통해

N-말단 상에 삽입된다. 그러한 펩티드는 동시에 안정화를 위해 추가로 변형되어야 한다.

- [0006] 예를 들어, US 2003/0232761 A1에서 사용된 GLP-1 및 그의 유도체 GLP-1(7-37)은 N-말단 상에서 하나의 아미노기로 변형된다. 그러므로, GLP-1의 N-말단은 더 이상 GLP-1 수용체에 결합할 수 없으며, 그로 인해 이들 펩티드들에서는 수용체 결합 및 내재화 모두가 부적당하다. 따라서, 후자는 인슐린종 및 소세포 기관지암의 방사선 펩티드 요법에서 사용하기에 부적절하다. 경험으로 알 수 있는 바와 같이, GLP-1 및 엑센딘-3 또는 엑센딘-4의 펩티드 서열 내 아미노산 치환과 같은 돌연변이 및 치료 분자 또는 신호전달 분자를 통한 가능한 변형은 가장 흔하게는, 펩티드 구조에 손상을 일으키고, 수용체에 대한 어떠한 추가적인 결합도 차단시킨다.
- [0007] N-말단에 영향주지 않으면서 GLP-1을 변형시키는 다른 방법은 현재 알려져 있지 않다. 나아가, 인슐린종 및 소세포 기관지암의 방사선요법에 사용하기에 적절한 표지 또는 비표지된 GLP-1 유도체는 전혀 알려져 있지 않다.
- [0008] <과제>
- [0009] 그러므로, 본 발명의 과제는 선행기술의 기술적 상태의 문제점을 제거하고, 표지될 수 있으면서 그러한 표지를 이용하여 GLP-1 수용체와 결합할 수 있고, GLP-1 수용체의 발현이 역할하는 질환들을 진단하고 치료하기 위한 약제를 제조하는데 사용될 수 있는 유용한 펩티드를 제조하는 것이다.
- [0010] <과제 해결 수단>
- [0011] 본 과제는 C-말단에서 아미노에 의해 변형되고 GLP-1 수용체에서 N-말단을 통해 결합하는, GLP-1, 엑센딘-3 및 엑센딘-4의 펩티드 유도체 및 GLP-1과 엑센딘-3 또는 엑센딘-4의 키메라 펩티드를 통해, 본 발명에 의해 기초하여, 청구항에 의해 달성된다. 이들 펩티드 유도체들 및 키메라 펩티드들은 GLP-1 수용체 발현이 역할하는 양성 또는 악성 질환을 진단하고 치료하기 위한 약제를 제조하는데 사용되기 위하여 비표지 또는 표지된다.
- [0012] 이러한 GLP-1, 엑센딘-3 및 엑센딘-4의 펩티드 유도체 및 GLP-1, 엑센딘-3 또는 엑센딘-4의 키메라 펩티드를 통해, NET(특히, 인슐린종) 및 소세포 기관지암을 포함하는 GLP-1 수용체 발현 종양들을 진단하고 치료하는데 사용될 선험조영 방법을 위한 수단이 제조된다. 본 발명에 기초한 펩티드 유도체들이 C-말단에서 아미노에 의해 변형되고, 그에 따라 N-말단이 GLP-1 수용체에 대해 결합할 수 있게 됨으로써, 이는 최초로 가능케 되었다.
- [0013] 본 발명에 기초한 펩티드 유도체, 예를 들어 방사선 표지된, GLP-1, 엑센딘-3 및 엑센딘-4의 키메라 펩티드의 GLP-1 수용체에 대한 결합을 통해, GLP-1 수용체를 발현하는 종양을 보여주는 것이 가능하며, 이로 인해 환자에 대한 의료 관리를 상당히 개선시킬 수 있게 된다. NET, 특히 위소장췌장 NET, 예를 들어 인슐린종에 대해서는 지금까지 충분한 감수성을 갖는 비침입성(non-invasive) 방법이 전혀 이용가능하지 않았으며, 폐 구역에 위치한 소세포 기관지암 또한, 염증 과정과 종양 또는 전이 사이의 구체적인 구별이 비침입성 방법에 의해서는 가능하지 않았다. 나아가, 모두 본 발명에 기초하고 있는 펩티드 유도체 및 키메라 펩티드를 사용하여, 췌장 내의 인슐린 생산 세포 및 생체 내 및 시험관 내에서의 GLP-1 수용체 발현의 밀도를 가시화할 수 있다. 예를 들어, 당뇨병의 경우 GLP-1 수용체를 발현하는 세포들은 인슐린을 분비하는 세포들이기 때문에, 생체 내에서 보여진다. 췌장 내 GLP-1 수용체 밀도의 표시는 의약품을 이용한 치료 동안 및 치료 후의 당뇨병 환자의 경우에 있어 특히 중요하다. 뿐만 아니라, 악성 및 양성 조직에서의 GLP-1 수용체의 분포가 나타내진다. 현재까지 인간에서의 GLP-1 수용체의 분포에 관한 어떠한 포괄적인 데이터도 입수가능하지 않으므로, 본원에서의 구별되는 문제들은 임상적이고 과학적 특질에 관한 것이다.
- [0014] 따라서, 본 발명의 이점은 GLP-1(글루카곤-유사 펩티드-1), 엑센딘-3 및 엑센딘-4의 펩티드 유도체 및 GLP-1, 엑센딘-3 또는 엑센딘-4의 키메라 펩티드가, 특히 NET, 본원에서는 특히 인슐린종 및 소세포 기관지암의 수용체 표적된 특정적인 표지 및 치료를 위한 약제를 제조하는데 사용된다는 것이다.
- [0015] GLP-1 수용체 선험조영술은 특히, 소세포 기관지암을 진단하는데 이용가능하며, 이는 처음으로 림프절 내에서의 전이를 특정적으로 탐지(염증에 의해 변화된 림프절 대 전이에 의해 공격된 림프절)하는 것을 가능케 한다. 본 발명에 따른 GLP-1(글루카곤-유사 펩티드-1), 엑센딘-3 및 엑센딘-4로부터의 펩티드 유도체, 및 GLP-1, 엑센딘-3 또는 엑센딘-4로부터의 키메라 펩티드는 GLP-1 수용체 발현이 역할하는 모든 악성 및 양성 질환들에 대한 진단 및 치료용 약제로, 특히 자기 공명 영상화(MRI)의 조영제; 선험조영술(SPECT, 단일 광자 방출 전산화 단층촬영법) 및 방사선펩티드 요법; PET(양전자 방출 단층촬영법); 수용체-매개 화학요법; 및 광학 진단법에서의 방사능제에서 사용된다. 여기서 광학 진단법은 특정 파장에 의해 형광 분자가 자극되어 상이한 파장의 연속적인 광방출을 유도하는 것을 의미한다. 탐지되는 것은 방출된 파장이다.
- [0016] 전문가가 원하는 적용분야(예를 들어, 방사성 핵종으로부터의 선험조영술 또는 방사선요법; 가돌리늄으로부터의

자기 공명 영상화(MRI)에서의 조영제; 및 형광 안료로부터의 내시경 또는 과학적 검사법)에 따라, GLP-1(글루카곤-유사 펩티드-1), 엑센딘-3 및 엑센딘-4로부터의 펩티드 유도체 및 GLP-1, 엑센딘-3 또는 엑센딘-4로부터의 키메라 펩티드의 C-말단에서의 표지 종류를 용이하게 선택할 수 있다.

[0017] 본 발명에 따르면, 악성 질환은 영향받은 조직이 건강한 조직과 비교했을 때의 분화 수준의 변화, 침투성 성장 또는 혈류 또는 림프계의 조직의 확산을 보이는 것들이다. 모든 신경내분비 종양들, 특히 위소장관의 암종; 특히 인슐린종, 기관지암, 췌장암 및 GLP-1 수용체의 과발현과 관련된 모든 다른 악성 질환들이 이 카테고리에 속한다.

[0018] 본 발명에 따르면, 양성 질환은 영향받은 조직이 분화 수준이 심각하게 낮아지지 않고, 침투성 성장을 보이지 않으며, 혈류 또는 림프계의 조직 전이가 전혀 일어나지 않은 것을 특징으로 하는 것들이다. 여기에는, 예를 들어 당뇨병 뿐 아니라 식이 장애 및 정신 장애 또한 포함된다.

[0019] <펩티드 유도체 및 키메라 펩티드의 특성화>

[0020] 놀랍게도, C-말단에서 아미노에 의해 변형된 GLP-1, 엑센딘-3 및 엑센딘-4로부터의 펩티드 유도체, 및 GLP-1, 엑센딘-3 또는 엑센딘-4로부터의 키메라 펩티드가 N-말단에서 GLP-1 수용체에 결합하는 것이 발견되었다. 이들은 천연 펩티드와 같이, GLP-1 수용체에 대한 높은 정도의 친화력을 보이기까지 하였다. 종양을 갖고 있는 무모(hairless) 마우스를 이용한 실험은 양성 종양 조직의 GLP-1 수용체에서의 특이적인 흡수를 보여 준다.

[0021] 본 발명에 따른 펩티드 유도체 및 키메라 펩티드는 GLP-1 수용체 발현이 역할하는 양성 및 악성 질환들을 진단하고 치료하는데 사용되기 위한 약제로서, 비표지되거나 또는 C-말단 아미노에서 킬레이터를 통해 표지된다. 여기에서 표지의 유형은 주로 방사선금속, MRI 조영제, 형광 발색단 또는 화학치료제로 이루어진다.

[0022] 표지 과정 및 방법은 당업자에게 잘 알려져 있으며(예를 들어, DE 690 18 226 T2), 이는 예를 들어 방사선택종, 비자기 금속 및 다른 MRI 조영제들 또는 형광 안료의 커플링을 통해 이루어지며; 이는 수용체의 결합 또는 본 발명에 따른 펩티드 유도체, 및 키메라 펩티드의 내재화가 손상되지 않으며, GLP-1 수용체가 결합하는 N-말단이 자유롭게(연결되지 않은 채로) 남아있다는 것을 의미한다.

[0023] 본래 펩티드의 아미노산 서열은 다음과 같다:

[0024] 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

[0025]

[0026] 엑센딘-3:

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

[0027]

[0028] 엑센딘-4:

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

[0029]

[0030] 본 발명에 따라, 하기의 GLP-1(1-37), 엑센딘-3 및 엑센딘-4의 펩티드 유도체들이 제조된다:

- [0031] $GLP-1(x-y)A^{1-37}$
- [0032] 엑센딘-3 $(z-k)A^{1-40}$
- [0033] 엑센딘-4 $(z-k)A^{1-40}$
- [0034] 상기 식들 중,
- [0035] x는 GLP-1 아미노산 서열의 아미노산 1-36이고,
- [0036] y는 GLP-1 아미노산 서열의 아미노산 2-37이고,
- [0037] z는 엑센딘-3 또는 엑센딘-4 아미노산 서열의 아미노산 1-38이고,
- [0038] k는 엑센딘-3 또는 엑센딘-4 아미노산 서열의 아미노산 2-39이며,
- [0039] A는 신호 분자로서, 또는 신호 분자와 결합하거나 이들을 안정화시키기 위한 하나 이상의 아미노산 또는 이들의 유도체로 이루어진 부착기이다. 바람직하게는, A는 C-말단에 위치하며, 아미노는 바람직하게는 리신 또는 다른 계는 유리 아미노를 갖는 다른 아미노산, 예를 들어 오르니틴 또는 유리 아미노를 갖는 유기 기이며, 그 위에서 킬레이터가 방사선헌종 또는 MRI 조영제, 형광 안료 또는 화학치료제와의 표지를 위해 커플링된다.
- [0040] 사용될 수 있는 킬레이터에는 DTPA (디에틸렌트리아민펜타아세트산), 또는 N,N-비스(2-[비스(카르복시메틸)아미노]-에틸)글리신), 또는 DOTA (1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산), HYNIC (6-히드라지노피리딘-3-카르본산), MAG3 (메르캅토아세틸-글리실글리실글리신), N4 (1,4,8,11-테트라아자운데칸) 및 상기 이름의 킬레이터들의 모든 알려진 유도체들이 포함된다.
- [0041] 상기 성분은 아미노산 서열 내의 어느 위치에서 부착기가 선택적으로 발견될 수 있는지를 보여준다.
- [0042] $GLP-1(x-y)A^{1-37}$
- [0043] 여기에서는, 상이한 길이의 GLP-1 유도체들이 포함되며, 여기서 x는 숫자 1 내지 36일 수 있으며, 이는 숫자 2 내지 37일 수 있는 y보다 작다. A는 임의의 위치에 위치할 수 있는 부착기이며, 바람직하게는 C-말단에 위치하며, y보다 1이 더 크다. 바람직하게는, 부착기는 아미노 리신이다.
- [0044] 엑센딘-3 $(z-k)A^{1-40}$
- [0045] 여기에서는, 상이한 길이의 엑센딘-3 유도체들이 포함되며, 여기서 z는 숫자 1 내지 38일 수 있으며, 이는 숫자 2 내지 39일 수 있는 k보다 작다. A는 임의의 위치에 위치할 수 있는 부착기이며, 바람직하게는 C-말단에 위치하며, y보다 1이 더 크다. 바람직하게는, 부착기는 아미노 리신이다.
- [0046] 엑센딘-4 $(z-k)A^{1-40}$
- [0047] 여기에서는, 상이한 길이의 엑센딘-4 유도체들이 포함되며, 여기서 z는 숫자 1 내지 38일 수 있으며, 이는 숫자 2 내지 39일 수 있는 k보다 작다. A는 임의의 위치에 위치할 수 있는 부착기이며, 바람직하게는 C-말단에 위치하며, y보다 1이 더 크다. 바람직하게는, 부착기는 아미노 리신이다.
- [0048] 하기 펩티드 유도체들이 특히 바람직하다:
- [0049] 1. MC 10: $(DTPA-Lys^{37}) GLP1 (7-36)$ 아미드
- [0050] 2. MC 13: $(DTPA-Lys^{40})$ 엑센딘-3 아미드
- [0051] 3. MC 11: $(DTPA-Lys^{40})$ 엑센딘-4 아미드
- [0052] 합성은 예를 들어, 메리필드(Merrifield) 방법에 따라 펩티드 스페셜티 레이보러토리스 게엠베하(Peptide Specialty Laboratories GmbH)사에서 이루어졌으며, 정제는 HPLC를 통해 이루어졌다.
- [0053] MC 10 $(DTPA-Lys^{37}) GLP1 (7-36)$ 아미드는 GLP-1의 아미노산 7-36으로 이루어지며, C-말단에서 유리 아미노를 갖는 아미노산을 가지며, 바람직하게는 위치 37에서 리신 및 킬레이터 DTPA를 갖는다.

- [0054] MC 13 (DTPA-Lys⁴⁰) 엑센딘-3 아미드는 엑센딘-3의 완전한 아미노산 서열로 이루어지며, C-말단에서 유리 아미노를 갖는 아미노산을 가지며, 바람직하게는 위치 40에서 리신 및 킬레이터 DTPA를 갖는다.
- [0055] MC 11 (DTPA-Lys⁴⁰) 엑센딘-4 아미드는 엑센딘-4의 완전한 아미노산 서열로 이루어지며, C-말단에서 유리 아미노를 갖는 아미노산을 가지며, 바람직하게는 위치 39에서 리신 및 킬레이터 DTPA를 갖는다.
- [0056] 본 발명에 따라, 다음의 GLP-1(1-37) 및 엑센딘-3 또는 엑센딘-4로부터의 키메라 펩티드들이 제조된다:
- [0057] $GLP-1(x-y)$ 엑센딘-3(z-k)A¹⁻⁷⁵
- [0058] $GLP-1(x-y)$ 엑센딘-4(z-k)A¹⁻⁷⁵
- [0059] 엑센딘-3(z-k) GLP-1(x-y)A¹⁻⁷⁵
- [0060] 엑센딘-4(z-k) GLP-1(x-y)A¹⁻⁷⁵
- [0061] 여기에서는 하기가 적용된다:
- [0062] x는 GLP-1 아미노산 서열의 아미노산 1-36이고,
- [0063] y는 GLP-1 아미노산 서열의 아미노산 2-37이고,
- [0064] z는 엑센딘-3 또는 엑센딘-4 아미노산 서열의 아미노산 1-38이고,
- [0065] k는 엑센딘-3 또는 엑센딘-4 아미노산 서열의 아미노산 2-39이며,
- [0066] A는 신호 분자로서, 또는 신호 분자와 결합하거나 이들을 안정화시키기 위한 하나 이상의 아미노산 또는 이들의 유도체로 이루어진 부착기이다. 바람직하게는, A는 C-말단에 위치하며, 아미노는 바람직하게는 리신 또는 다른 것은 유리 아미노를 갖는 다른 아미노산, 예를 들어 오르니틴 또는 유리 아미노를 갖는 유기 기이며, 그 위에서 킬레이터가 방사선헤중 또는 MRI 조영제, 형광 안료 또는 화학치료제와의 표지를 위해 커플링된다.
- [0067] 사용될 수 있는 킬레이터에는 DTPA (디에틸렌트리아민펜타아세트산), 다른 것은 N,N-비스(2-[비스(카르복시메틸)아미노]-에틸)글리신), 다른 것은 DOTA (1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산), HYNIC (6-히드라지노피리딘-3-카르복산), MAG3 (메르캅토아세틸-글리실글리실글리신), N4 (1,4,8,11-테트라아자운데칸) 및 상기 이름의 킬레이터들의 모든 알려진 유도체들이 포함된다.
- [0068] 상기 성분은 아미노산 서열 내의 어느 위치에서 부착기가 선택적으로 발견될 수 있는지를 보여준다.
- [0069] $GLP-1(x-y)$ 엑센딘-3(z-k)A¹⁻⁷⁵
- [0070] 여기에서는, GLP-1 및 엑센딘-3으로부터의 키메라 펩티드가 포함되며, 여기서 아미노산 1 내지 36은 GLP-1으로부터 유래되고, 그 뒤의 아미노산 1 내지 39는 엑센딘-3으로부터 유래된다. A는 임의의 위치에 위치할 수 있는 부착기이며, 바람직하게는 C-말단에 위치하고, GLP-1 및 엑센딘-3으로부터의 아미노산 개수보다 1이 더 크며, 바람직하게는 아미노 리신이다.
- [0071] $GLP-1(x-y)$ 엑센딘-4(z-k)A¹⁻⁷⁵
- [0072] 여기에서는, GLP-1 및 엑센딘-3으로부터의 키메라 펩티드가 포함되며, 여기서 아미노산 1 내지 36은 GLP-1으로부터 유래되고, 그 뒤의 아미노산 1 내지 39는 엑센딘-4으로부터 유래된다. A는 임의의 위치에 위치할 수 있는 부착기이며, 바람직하게는 C-말단에 위치하고, GLP-1 및 엑센딘-4으로부터의 아미노산 개수보다 1이 더 크며, 바람직하게는 아미노 리신이다.
- [0073] 엑센딘-3(z-k) GLP-1(x-y)A¹⁻⁷⁵
- [0074] 여기에서는, GLP-3 및 엑센딘-1으로부터의 키메라 펩티드가 포함되며, 여기서 z는 숫자 1 내지 38일 수 있으며, 이는 숫자 2 내지 39일 수 있는 k보다 작다. A는 임의의 위치에 위치할 수 있는 부착기이며, 바람직하게는 C-말단에 위치하며, y보다 1이 더 크다. 바람직하게는, 부착기는 아미노 리신이다.
- [0075] 엑센딘-4(z-k) GLP-1(x-y)A¹⁻⁷⁵

- [0076] 여기에서는, 엑센딘-4 및 엑센딘-1으로부터의 키메라 펩티드가 포함되며, 여기서 z 는 숫자 1 내지 38일 수 있으며, 이는 숫자 2 내지 39일 수 있는 k 보다 작다. A 는 임의의 위치에 위치할 수 있는 부착기이며, 바람직하게는 C-말단에 위치하며, y 보다 1이 더 크다. 바람직하게는, 부착기는 아미노 리신이다.
- [0077] 예시적인 키메라 GLP-1(x-y) 엑센딘-3(z-k)A¹⁻⁷⁵ 또는 GLP-1(x-y) 엑센딘-4(z-k)A¹⁻⁷⁵ 펩티드는 MC12이며, 이는 GLP-1 (7-36) 엑센딘 (33-39) Lys 아미드로 이루어져 있다(합성은 메리필드 방법에 따라 펩티드 스페셜티 레이 보러토리스 게엠베하에서 수행되었으며, HPLC를 통해 정제되었음).
- [0078] MC 12: (Ser³⁷, Gly³⁸, Ala³⁹, Pro⁴⁰, Pro⁴¹, Pro⁴², Ser⁴³, DTPA-Lys⁴⁴ 아미드) GLP1 (7-36)
- [0079] MC 12는 GLP-1(7-36)의 완전한 아미노산 서열로 이루어져 있으며, 이는 C-말단에서 아미노, 바람직하게는 위치 44에서의 리신 및 길레이터 DTPA를 가지며, 뿐만 아니라 엑센딘 (33-39) Lys 아미드로부터의 7개의 아미노산으로 된 사슬을 갖는다. 따라서, 키메라 펩티드 GLP-1 (7-36) 엑센딘 (33-39)Lys 아미드가 존재한다.
- [0080] 본원에서 GLP-1, 엑센딘-3 및 엑센딘-4로부터의 상이한 길이의 펩티드 유도체, 및 GLP-1, 엑센딘-3 또는 엑센딘-4로부터의 상이한 길이의 키메라 펩티드가 존재하며, 이들은 그들이 기초하고 있는 GLP-1, 엑센딘-3 및 엑센딘-4로부터의 다양한 조합의 아미노산 서열들을 함유한다는 것은 당업자에게 명백하다.
- [0081] C-말단에서 아미노가 변형되고, N-말단을 통해 GLP-1 수용체에서 결합하는, 본 발명에 기초한 GLP-1, 엑센딘-3 및 엑센딘-4로부터의 펩티드 유도체, 및 GLP-1, 엑센딘-3 또는 엑센딘-4로부터의 키메라 펩티드들은 또한, 상기 설명된 펩티드 GLP-1, 엑센딘-3 및 엑센딘-4와 하나 이상의 자리에서 구별되며, 이들 서열들과 고도로 상동성을 갖는 분자들을 포함한다. 여기서 상동성은 40% 이상의 서열 동일성, 특히 60%의 동일성, 바람직하게는 80% 초과, 특히 바람직하게는 90% 초과와 서열 동일성을 의미한다. 상기에서 설명된 아미노산 서열에 대한 편차는 결실, 치환 및/또는 첨가를 통해 나타날 수 있다.
- [0082] 나아가, 본 발명에 따른 GLP-1, 엑센딘-3 또는 엑센딘-4로부터의 키메라 펩티드들은 또한, C-말단에 대한 어떠한 변형도 갖지 않으면서 제조된다. 이들은 특히, 당뇨병 치료용 약제를 제조하는데 사용된다.
- [0083] GLP-1(x-y) 엑센딘-3(z-k)
- [0084] GLP-1(x-y) 엑센딘-4(z-k)
- [0085] 엑센딘-3(z-k) GLP-1(x-y)
- [0086] 엑센딘-4(z-k) GLP-1(x-y)
- [0087] MC 20: (Ser³³, Gly³⁴, Ala³⁵, Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸, Ser³⁹) 엑센딘 GLP1 (7-36)
- [0088] MC 20는 GLP-1(7-36)의 완전한 아미노산 서열로 이루어져 있으며, 이는 C-말단에서 엑센딘 (33-39)로부터의 7개의 아미노산으로 된 사슬을 갖는다. 따라서, 비변형된 키메라 펩티드 GLP-1 (7-36) 엑센딘 (33-39)가 존재한다.
- [0089] <펩티드 유도체 및 키메라 펩티드 표지>
- [0090] 본 발명에 따른 펩티드 유도체 및 키메라 펩티드들은, 예를 들어 금속을 안정화시키기 위하여, 적합한 안정화 완충액, 바람직하게는 농도가 약 10⁻³ M인 pH 5.4의 0.5 M 아세트산나트륨 중에 용해된다. 다르게는, 형광 안료를 안정화시키기 위해, 아세트산암모늄 완충액이 바람직하며; 화학치료제 및 조영제를 안정화시키기 위해서는 생리학적 완충액이 바람직하다.
- [0091] 표지는 방사선핵종, MRI 조영제, 형광 안료 또는 화학치료제의 커플링을 통해 부착기 A에서 일어난다. 적용이 시험관 내 또는 생체 내에서 일어나는지 여부에 따라 상이한 방법들이 적용된다.

[0092] 다음의 것들이 공유 또는 착체 커플링을 위한 방사선헤중으로서 사용된다:

핵종	적용 방법	$t_{1/2}$ [h]	방출된 방사선	에너지 [keV]	커플링 유형
F-18	PET	1.8	β^+	634	공유
Cu-64	PET	12.7	β^+	1673	착체
Cu-67	치료	61.8	β^- γ	391 184	착체
Ga-67	SPECT	79.2	γ	93/184/300	착체
Ga-68	PET	1.1	β^+	2921	착체
Y-86	PET	14.8	β^+ γ	1220 1076/1153	착체
Y-90	치료	64.1	β^-	2280	착체
Tc-99m	SPECT	6	γ	140	착체
In-111	SPECT	67.2	γ	171/245	착체
I-123	SPECT	13.2	γ	158	공유
I-124	PET	101	β^+ γ	2137/1534 602	공유
I-131	치료	192	γ β^-	364 606	공유
Lu-177	치료	158	γ β^-	208 112/208	착체
Re-186	치료	88.8	γ β^-	137 1071	착체
Re-188	치료	17	γ β^-	155/477/632 1965/2120	착체
Pt-193m	치료	104	γ 오거 e^-	135	착체
Pt-195m	치료	96	γ 오거 e^-	98	착체
Ac-225	치료	240	γ α	99, 150	착체
At-211	치료	7.2	γ 오거 e^-	687	착체 공유
Bi-213	치료	0.76	γ α	440	착체
Sm-153	치료	46	γ β^-	103	착체
Er-169	치료	226	β^-	100	착체

[0093]

[0094] PET (양전자 방출 단층촬영법), SPECT (단일 광자 방출 전산화 단층촬영법)

[0095] 형광 안료/발색단으로는 다음과 같은 것들이 사용되었다:

[0096] 플루오레세인, 로다민, 쿠마린, BODIPY, 피렌(캐스캐이드 블루), 루시퍼 옐로우, 피코빌리프로테인, 시아닌, 알렉사플루오로, 오레곤 그린, 텍사스 레드 및 이들의 유도체들.

[0097] 사용될 수 있는 킬레이터에는 DTPA (디에틸렌트리아민펜타아세트산), 다르게는 N,N-비스(2-[비스(카르복시메틸)아미노]-에틸)글리신), 다르게는 DOTA (1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라-아세트산), HYNIC (6-히드라지노피리딘-3-카르본산), MAG3 (메르캅토아세틸-글리실글리실글리신), N4 (1,4,8,11-테트라아자운데칸) 및 상기 이름의 킬레이터들의 모든 알려진 유도체들이 포함된다.

[0098] 사용될 수 있는 MRI 조영제에는 가돌리늄, 망간, 철, 유로퓸, 구리, 니켈, 크롬, 프라세오디뮴, 디스프로슘 또는 홀뮴 또는 이들의 화합물, 및 음성 MRI 조영제, 예를 들어 피플루오로카본, 및 MRI 분광법용 F-19, H-1, P-31, Na-19와 같은 동위원소들이 포함된다. 본 발명에 따른 음성 MRI 조영제는 MRI 신호를 지우거나, 그것을 크게 약화시키는, 즉 그것을 증폭시키지 않는 것들이다.

[0099] 사용될 수 있는 화학치료제에는 알킬화제, 인터칼레이트제, 항대사물질, 효소 억제제 및 차단제 및 방추사 포이

준(예를 들어, 알킬술포네이트, 에틸이민, 니트로소모나스(N. 우레아), 질소 머스타드 유도체, 폴산 유사체, 퓨린 유사체, 피리미딘 유사체, 포도필린 유도체, 탁산, 빈카알칼로이드, 안트라시클린, 기타 세포증식억제 항생제, 백금 화합물, 캄프토테신 유도체, 상이한 호르몬, 성장 인자, 인터페론 또는 인터루킨), 그렇지 않으면 문헌 ["Onkologie 2004/05", authors Preiss, Dornhoff, Hagmann, Schmieder, published by Zuckschwerdtverlag, at pp. 230-287]에 설명된 화학치료제, 및 모든 다른 세포증식억제 또는 세포독성 물질들이 포함된다.

[0100] 본 발명에 따른 단백질 유도체 및 키메라 단백질이 사용되는 적용분야의 유형, 및 GLP-1 수용체 발현이 역할하는 양성 및 악성 질환들을 진단하고 치료하기 위해 상기 언급된 단백질들로 제조되는 약제의 유형에 따라, 표지 반응은 두 가지 변형법으로 수행될 것이다.

[0101] <방사선치료법에서의 시험관 내 적용을 위한 표지>

[0102] 표지 목적을 위해, 적합한 안정화 완충액, 바람직하게는 농도가 약 10^{-3} M인 pH 5.4의 0.5 M 아세트산나트륨 중에 용해된, 본 발명에 따른 펩티드 유도체 또는 키메라 펩티드 3 μ l를 pH가 5.4인 0.5 M 아세트산나트륨 500 μ l에 첨가한다. pH 값은 3 및 6 사이이다. 그리고 나서, 0.1 M HCl 500 μ l 중의 185 MBq $^{111}\text{InCl}_3$ (네덜란드 페텐(Petten)의 타이코(Tyco))를 첨가하고, 37°C에서 30분 동안 인큐베이션한다. 마지막으로, 10^{-3} M 용액 $^{111}\text{InCl}_3$ 3 μ l를 첨가한 후, 모든 결합 부위들을 포화시키기 위해 30분 동안 추가로 인큐베이션한다.

[0103] 품질 제어는 HPLC 컬럼을 통해 수행한다:

[0104] 컬럼: CC 250/4.6 뉴클레오실(Nucleosil) 120-5 C18 (스위스 외니징겐(Oenisigen)의 마셔리-나겔(Machery-Nagel))

[0105] 구배: 0->5 분 100% 0.05 M $\text{NH}_4\text{OOCCH}_3$, pH 5.4 (완충액 A); 5->25 분 100% 완충액 A ->50% 완충액 A/50% 아세톤 니트릴.

[0106] 시험관 내 적용에 대한 품질 제어는 98% 초과인 표지 수율을 만족시킨다.

[0107] 따라서, 방사성 표지된 약제는 GLP-1 수용체 발현이 역할하는 양성 및 악성 질환들을 진단하고 치료하는데 유용하며, 예를 들어 췌장 세포의 세포 및 조직 배양에 사용될 수 있다.

[0108] <방사선치료법에서의 생체 내 적용을 위한 표지>

[0109] 표지 목적을 위해, 적합한 안정화 완충액, 바람직하게는 농도가 약 10^{-3} M인 pH 5.4의 0.5 M 아세트산나트륨 중에 용해된, 본 발명에 따른 펩티드 유도체 또는 키메라 펩티드 3 μ l를 pH가 5.4인 0.5 M 아세트산나트륨 500 μ l에 첨가한다. 마지막으로, 0.1 M HCl 500 μ l 중의 185 MBq $^{111}\text{InCl}_3$ (네덜란드 페텐의 타이코)를 첨가하고, 37°C에서 30분 동안 인큐베이션한다. 품질 제어는 HPLC 컬럼을 통해 수행한다:

[0110] 컬럼: CC 250/4.6 뉴클레오실 120-5 C18 (스위스 외니징겐의 마셔리-나겔)

[0111] 구배: 0->5 분 100% 0.05 M $\text{NH}_4\text{OOCCH}_3$, pH 5.4 (완충액 A); 5->25 분 100% 완충액 A ->50% 완충액 A/50% 아세톤 니트릴.

[0112] 생체 내 적용에 대한 품질 제어는 98% 초과인 표지 수율을 만족시킨다.

[0113] 따라서, 방사성 표지된 약제는 GLP-1 수용체 발현이 역할하는 양성 및 악성 질환들을 진단하고 치료하는데 유용하며, 예를 들어 환자의 종양을 탐지하는데 사용될 수 있다.

[0114] 용어 "환자"는 환자 및 유사한 척추동물을 의미한다. 따라서, 본 약제는 인간용 의약 및 수의학 모두에 사용될 수 있다. 본 발명에 기초한 치료적으로 유효하고 진단학적으로 유효한 약제는 다음 형태들 중 하나로, 허용되는 제약학적 조성물의 일부로서 환자에게 제공된다: 경구용, 직장용, 비경구용, 정맥내/동맥내 투여용, 근육내 투여용, 피하 투여용, 경막내 투여용, 수조내 투여용, 두개내 투여용, 질내 투여용, 복강내 투여용, 혈관내 투여용, 국소 투여용(분제, 연고 또는 점적제) 또는 스프레이 형태(에어로졸).

[0115] 요구되는 투여량은 GLP-1 수용체 발현이 역할하는 양성 및 악성 질환들을 진단하고 치료하는 각각의 개별적인

경우에 있어서, 의사에 의해 결정되어야 한다.

[0116] <내재화 실험>

[0117] 내재화 실험은, 예시적인 방식으로 본 발명에 따른 펩티드 유도체 및 키메라 단백질(모두 시험관 내에서 방사성 표지됨)의 세포 내 수송을 보여 준다.

[0118] 6 웰 플레이트에서, 100,000개의 GLP-1 수용체 형질감염된 CHO 세포를 시딩하였다. 조밀해질 때까지 세포들을 성장시켰다. 그리고 나서, 4개의 그룹을 만들었다:

[0119] 그룹 1: 완전한 결합, PBS로 세척

[0120] 100,000 cpm ¹¹¹In (10⁻¹⁵ 몰) 표지된 펩티드를 2 mL 배지에 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그리고 나서, PBS로 3회 세척하고, 세포를 20 mM MOPS(3-모르폴리노프로판술폰산) + 0.1% 트리톤-X-100(pH 7.4)로 분리시켰다. 세포내 흡수는 γ-카운터로 측정하였다. 세포 수는 브래드포드 방법에 기초하여, 바이오-라드(Bio-Rad)(독일 뮌헨)로부터의 단백질 분석 키트를 사용하여 단백질 함량으로 측정하였다. 결과들은 단백질(cpm/μg)로 나타내었다.

[0121] 그룹 2: 비특이적 결합, PBS로 세척

[0122] 20 μl 의 10⁻³ M GLP-1 용액 및 100,000 cpm ¹¹¹In 표지된 펩티드를 2 mL 배지에 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그리고 나서, PBS로 3회 세척하고, 세포를 20 mM MOPS(3-모르폴리노프로판술폰산) + 0.1% 트리톤-X-100(pH 7.4)로 분리시켰다. 세포내 흡수는 γ-카운터로 측정하였다. 세포 수는 브래드포드 방법에 기초하여, 바이오-라드(독일 뮌헨)로부터의 단백질 분석 키트를 사용하여 단백질 함량으로 측정하였다. 결과들은 단백질(cpm/μg)로 나타내었다.

[0123] 그룹 3: 완전한 결합, 산으로 세척

[0124] 20 μl 의 10⁻³ M GLP-1 용액 및 100,000 cpm ¹¹¹In 표지된 펩티드를 2 mL 배지에 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그리고 나서, pH 4의 0.1 M 아세트산나트륨으로 1회 세척하고, PBS로 2회 세척하고, 세포를 20 mM MOPS(3-모르폴리노프로판술폰산) + 0.1% 트리톤-X-100(pH 7.4)로 분리시켰다. 세포내 흡수는 γ-카운터로 측정하였다. 세포 수는 브래드포드 방법에 기초하여, 바이오-라드(독일 뮌헨)로부터의 단백질 분석 키트를 사용하여 단백질 함량으로 측정하였다. 결과들은 단백질(cpm/μg)로 나타내었다.

[0125] 그룹 4: 비특이적 결합, 산으로 세척

[0126] 20 μl 의 10⁻³ M GLP-1 용액 및 100,000 cpm ¹¹¹In 표지된 펩티드를 2 mL 배지에 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그리고 나서, pH 4의 0.1 M 아세트산나트륨으로 1회 세척하고, PBS로 2회 세척하고, 세포를 20 mM MOPS(3-모르폴리노프로판술폰산) + 0.1% 트리톤-X-100(pH 7.4)로 분리시켰다. 세포내 흡수는 γ-카운터로 측정하였다. 세포 수는 브래드포드 방법에 기초하여, 바이오-라드(독일 뮌헨)로부터의 단백질 분석 키트를 사용하여 단백질 함량으로 측정하였다. 결과들은 단백질(cpm/μg)로 나타내었다.

$$%IDsB = \frac{Res3. - Res4.}{Res1. - Res2.} * 100$$

[0127] 평가:

[0128] %IdsB = 특이적 결합의 내재화 %

[0129]

	%IdsB
MC 10	75 ± 5
MC 11	70 ± 7
MC 12	73 ± 9

[0130] 결과는 세포 내로의 수송이 우수하게 일어났음을 보여준다.

[0131] 결합 실험

[0132] 결합 실험은 생체-표지를 통해 일어나는 본 발명에 따른 방사선 표지된 펩티드 유도체 및 키메라 단백질의 GLP-

1 수용체 상으로의 특이적 결합을 보여준다.

[0133] 6 웰 플레이트에 100,000개의 GLP-1 수용체 형질감염된 CHO 세포를 시딩하였다. 조밀해질 때까지 세포들을 성장시켰다. 그리고 나서, 2 mL의 100,000 cpm ¹¹¹In 표지된 펩티드를 첨가하였다. 그리고 나서, 결합을 시험하기 위해, 20 μL의 10⁻³ M GLP-1 용액으로 블로킹시켰다.

[0134]

	블로킹 %
MC 10	80±3
MC 11	85±3
MC 12	77±6

[0135] 생체 내 생분포(bio-distribution)는, 예를 들어 무모 마우스와 같은 설치류에서 보여질 수 있다. 이 목적을 위해, GLP-1 형질감염된 CHO 세포를 무모 마우스에 주입하였다. 약 3 내지 5 주 후, 약 300 mg 크기의 종양이 자랐다. 그리고 나서, 37 MBq ¹¹¹In 표지된 본 발명에 따른 펩티드를 마우스의 꼬리 정맥에 주입하고, 4시간 후 γ-카메라로 측정하였다.

[0136] 이 과정에서, 신장을 통한 빠른 제거(clearance)와 신장에서의 흡수가 있었다. 또한, GLP-1 수용체 양성 종양에서는 흡수율이 높았던 반면에, GLP-1 수용체 음성 종양에서는 흡수가 거의 없었다. 또한, 췌장에서는 약간의 흡수가 있었고, 다른 기관은 가시적인 흡수를 보이지 않았다.

[0137] 생체 외 생분포 실험은 각각 555 kBq In-111 표지된 MC10이 꼬리 정맥에 주입된 4마리의 마우스로 된 그룹으로 수행하였다. 1시간, 4시간 및 24시간에 모든 마우스들을 죽이고, 기관을 제거하였다.

[0138] 방사능 흡수율을 측정하고, 기관들의 중량을 측정하였다. 기관 중량 당 주입량의 백분율을 계산하였다. 결과는 다음과 같다:

기관	1 h	Stdev	4 h	Stdev	24 h	Stdev
혈액	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
간	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00
위	0.14	0.10	0.13	0.07	0.07	0.06
비장	0.02	0.02	0.01	0.00	0.01	0.00
췌장	0.58	0.50	0.62	0.28	0.37	0.27
신장	7.90	3.62	7.41	3.56	4.85	3.05
소장	0.12	0.06	0.07	0.06	0.04	0.03
폐	0.80	0.56	0.36	0.17	0.22	0.07
심장	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00
뼈	0.02	0.04	0.01	0.00	0.01	0.01
근육	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
종양 -	0.03	0.03	0.02	0.01	0.01	0.00
종양 +	0.42	0.19	0.31	0.30	0.20	0.16

[0139] 그룹 당 4마리의 마우스로 측정된 생분포의 평균값(% i.D./g)

[0140] Stdev: 표준 편차

서열 목록

Organization Applicant

 Street : Biegenstr.10
 City : Marburg (Lahn)
 State : Hessen
 Country : Deutschland
 PostalCode : 35039

PhoneNumber : 06421-282 6938
 FaxNumber : 06421-282 7021
 EmailAddress : grieb@verwaltung.uni-marburg.de
 <110> OrganizationName : Philipps-Universität Marburg
 Application Project

 <120> Title : Erfindung betreffend GLP-1 und Exendin
 <130> AppFileReference : WO 1262
 <140> CurrentAppNumber : PCT/DE2005/001503
 <141> CurrentFilingDate : 2005-08-26

Sequence

 <213> OrganismName : Human
 <400> PreSequenceString :
 HDEFERHAEG TFTSDVSSYL EGQAAKEFIA WLKGRG 37
 <212> Type : PRT
 <211> Length : 37
 SequenceName : GLP-1
 SequenceDescription :

Feature

 Sequence: GLP-1:
 <221> FeatureKey : GLP-1
 <222> LocationFrom : 1
 <222> LocationTo : 37
 Other Information :
 CDSJoin : No

Patent

 Sequence: GLP-1:
 <302> Title : Erfindung betreffend GLP-1 und Exendin
 <308> DBAccessionNumber :
 <309> DBEntryDate : ____-__-__
 <310> DocNumber : DE 10 2004 043 153.1
 <311> PatentFilingDate : 2004-09-03
 <312> PubDate : 2006-09-03
 <313> From : 1
 <313> To : 37

Sequence

 <213> OrganismName : human
 <400> PreSequenceString :
 HSDGTFTSDL SKQMEEEA VR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS 39
 <212> Type : PRT
 <211> Length : 39
 SequenceName : Exendin-3
 SequenceDescription :

Feature

Sequence: Exendin-3:
 <221> FeatureKey : Exendin-3
 <222> LocationFrom : 1
 <222> LocationTo : 39
 Other Information :
 CDSJoin : No

Patent

Sequence: Exendin-3:
 <302> Title : Erfindung betreffend GLP-1 und Exendin
 <308> DBAccessionNumber :
 <309> DBEntryDate : ____-__-__
 <310> DocNumber : DE 10 2004 043153.1
 <311> PatentFilingDate : 2004-09-03
 <312> PubDate : 2006-09-03
 <313> From : 1
 <313> To : 39

Sequence

<213> OrganismName : human
 <400> PreSequenceString :
 HGEGTFTSDL SKQMEEEA VR LFIEWLKN GG PSSGAPPPS 39
 <212> Type : PRT
 <211> Length : 39
 SequenceName : Exendin-4
 SequenceDescription :

Feature

Sequence: Exendin-4:
 <221> FeatureKey : Exendin-4
 <222> LocationFrom : 1
 <222> LocationTo : 39
 Other Information :
 CDSJoin : No

Patent

Sequence: Exendin-4:
 <302> Title : Erfindung betreffend GLP-1 und Exendin
 <308> DBAccessionNumber :
 <309> DBEntryDate : ____-__-__
 <310> DocNumber : DE 102004043153.1
 <311> PatentFilingDate : 2004-09-03
 <312> PubDate : 2006-09-03
 <313> From : 1
 <313> To : 39