



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년08월26일
(11) 등록번호 10-0978418
(24) 등록일자 2010년08월20일

(51) Int. Cl.
A61K 49/00 (2006.01) A61K 51/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2004-7017608
(22) 출원일자(국제출원일자) 2003년05월06일
심사청구일자 2008년05월06일
(85) 번역문제출일자 2004년11월02일
(65) 공개번호 10-2004-0104686
(43) 공개일자 2004년12월10일
(86) 국제출원번호 PCT/US2003/014379
(87) 국제공개번호 WO 2003/092742
국제공개일자 2003년11월13일
(30) 우선권주장
60/378,571 2002년05월06일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US19975688488 A1

전체 청구항 수 : 총 13 항

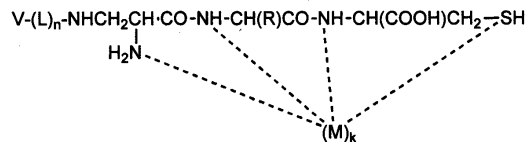
(73) 특허권자
엔도사이트, 인코포레이티드
미국, 인디애나 47906, 웨스트 라파에트, 켄트 애비뉴 3000
(72) 발명자
레아몬, 크리스토퍼폴
미국, 인디애나 47906, 웨스트 라파에트, 팜 릿지 로드 5830
파커, 매튜에이.
미국, 캘리포니아 92101, 샌 디에고, 식스쓰 애버뉴 2350, 아파트먼트 5에프
(74) 대리인
강명구, 강석용

심사관 : 박정웅

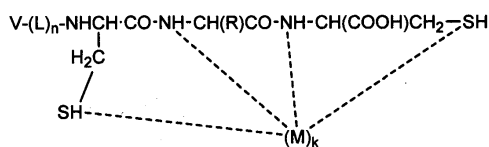
(54) 비타민-표적된 영상제

(57) 요약

본 발명은 영상제에 대한 표적화 리간드로 비타민, 또는 이의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체를 이용하여 이들에 대한 수용체를 보유하는 세포에 방사성핵종-기초한 영상제를 표적하는 화합물과 방법에 관한다. 본 발명에서는 이런 방법에 사용되는 아래 화학식 화합물을 제공한다:

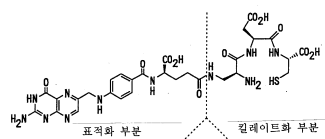


or



상기 화합물에서, V는 생체내에서 수용체-매개된 막통과 수송의 기질이 되는 비타민, 또는 이의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체이고, L은 이가 링커이고, R은 화학식 $\text{H}_2\text{NCH(R)COOH}$ 아미노산의 측쇄이고, M은 방사성핵종의 양이온이고, n은 1 또는 0이고, K는 1 또는 0이고, 상기 화합물은 제약학적으로 수용가능한 담체내에 존재할 수 있다. 비타민-기초한 화합물은 표적된 세포의 진단 영상 목적으로 세포, 예를 들면 다양한 종양 세포 유형에 방사성핵종을 표적하는데 사용될 수 있다.

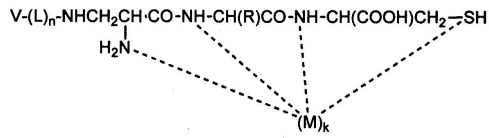
대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

아래 화학식의 화합물:



여기서, V는 생체내에서 수용체-매개된 막통과 수송의 기질이 되는 비타민, 또는 이의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체이고;

L은 이가 링커이고;

R은 화학식 $H_2NCHRCOOH$ 아미노산의 측쇄이고;

M은 방사성핵종의 양이온이고;

n은 1 또는 0이고;

k는 1 또는 0이다.

청구항 2

제 1항에 있어서, V는 엽산염, 리보플라빈, 티아민, 비타민 B12, 비오틴, 또는 이들의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체에서 선택되는 비타민인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 방사성핵종은 갈륨, 인듐, 구리, 테크네튬, 또는 레늄의 핵종에서 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 방사성핵종은 테크네튬의 핵종인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 5

제 1항에 있어서, V는 엽산염, 또는 이의 엽산염 수용체 결합 유사체 또는 유도체인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 6

아래 화학식 화합물 및 제약학적으로 수용가능한 담체를 함유하고 동물에서 세포 개체군의 진단 영상용 조성물에 있어서, 상기 세포는 세포 표면에서 비타민 수용체로 특성화되고,



여기서, V는 생체내에서 수용체-매개된 막통과 수송의 기질이 되는 비타민, 또는 이의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체이고;

L은 이가 링커이고;

R은 화학식 $H_2NCHRCOOH$ 아미노산의 측쇄이고;

M은 방사성핵종의 양이온이고;

n은 1 또는 0인 것을 특징으로 하는 진단 영상용 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 화합물에서 V는 엽산염, 리보플라빈, 티아민, 비타민 B12, 비오틴, 또는 이들의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체에서 선택되는 비타민인 것을 특징으로 하는 진단 영상용 조성물.

청구항 8

제 6항에 있어서, 화합물에서 방사성핵종은 갈륨, 인듐, 구리, 테크네튬, 또는 레늄의 핵종에서 선택되는 것을 특징으로 하는 진단 영상용 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서, 화합물에서 방사성핵종은 테크네튬의 핵종인 것을 특징으로 하는 진단 영상용 조성물.

청구항 10

제 6항에 있어서, 비경구 투여에 적합한 것을 특징으로 하는 진단 영상용 조성물.

청구항 11

제 6항에 있어서, V는 엽산염, 또는 이의 엽산염 수용체 결합 유사체 또는 유도체인 것을 특징으로 하는 진단 영상용 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

아래 화학식 화합물:



여기서, V는 생체내에서 수용체-매개된 막통과 수송의 기질이 되는 비타민, 또는 이의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체이고;

L은 이가 링커이고;

R은 화학식 $H_2NCHRCOOH$ 아미노산의 측쇄이고;

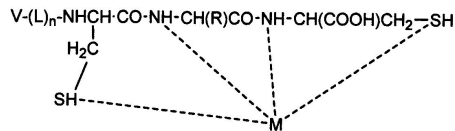
M은 방사성핵종의 양이온이고;

n은 1 또는 0이고;

k는 1 또는 0이다.

청구항 19

아래 화학식 화합물 및 제약학적으로 수용가능한 담체를 함유하고 동물에서 세포 개체군의 진단 영상용 조성물에 있어서, 상기 세포는 세포 표면에서 비타민 수용체로 특성화되고,



여기서, V는 생체내에서 수용체-매개된 막통과 수송의 기질이 되는 비타민, 또는 이의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체이고;

L은 이가 링커이고;

R은 화학식 $H_2NCHRCOOH$ 아미노산의 측쇄이고;

M은 방사성핵종의 양이온이고;

n은 1 또는 0인 것을 특징으로 하는 진단 영상용 조성물.

청구항 20

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 동물 세포로 영상제(imaging agent)를 표적하는 화합물과 방법에 관한다. 좀더 구체적으로, 방사성핵종-기초한 영상제는 비타민, 비타민 수용체 결합 유도체 또는 이의 유사체를 영상제에 대한 표적 리간드로 이용함으로써 이런 비타민에 대한 수용체를 보유하는 세포로 표적된다.

배경기술

[0002] 막통과 수송(transmembrane transport)은 중요한 세포 기능이다. 약물 요법과 유전자 전달을 비롯한 의학과 생물학의 여러 분야에서 막통과 수송의 중요성이 인정되고 있기 때문에, 이런 과정의 이해와 적용을 위한 많은 과학적 노력이 있어왔다. 가령, 단백질 담체, 항체 담체, 리포솜 전달 체계, 일렉트로포레이션, 직접 주사, 세포 융합, 바이러스 담체, 삼투성 충격, 칼슘-인산염 매개된 형질전환을 이용한 핵산의 막통과 전달이 시도되었다. 하지만, 이들 기술은 막통과 수송이 발생하는 세포 유형 및 외인성 분자의 성공적인 막통과 수송에 요구되는 조건에 의해 제한된다. 게다가, 이들 기술은 생활성의 상실없이 세포막을 통하여 수송될 수 있는 외인성 분자의 유형과 크기에 의해 제한된다.

[0003] 광범위하게 이용되는 외인성 분자의 막통과 수송의 한가지 기전은 수용체-매개된 내포작용(endocytosis)이다. 적절하게는, 수용체-매개된 내포작용은 생체내와 시험관내 모두에서 진행된다. 수용체-매개된 내포작용은 막의 함입(invagination)을 통하여, 막 수용체에 결합된 리간드의 막에 접하는 영역 내부로의 이동을 수반한다. 이런 과정은 수용체에 수용체-특이적 리간드의 결합에 의해 개시되거나 활성화된다. 갈락토오스, 만노스, 만노스 6-포스페이트, 트랜스페린, 아시알로당단백질, 엽산염, 트랜스코발라민(비타민 B_{12}), α -2 마크로글로불린, 인슐린 및 다른 펩티드 성장 인자, 예를 들면 표피 성장 인자(EGF)를 비롯한 많은 수용체-매개된 내포작용 체계가 특성화되었다.

[0004] 수용체 매개된 내포작용은 외인성 분자, 예를 들면 단백질과 핵산을 세포에 수송하는데 이용되고 있다. 일반적

으로, 특이적인 리간드는 관심있는 외인성 분자에 공유, 이온 또는 수소 결합에 의해 화학적으로 공액되어, 공액체에서 표적 수용체에 의해 인식되는 부분(리간드 부분)을 보유하는 공액체 분자를 형성한다. 이런 기술을 이용하여, 광독성(phototoxic) 단백질 프소랄렌은 인슐린에 공액되고 인슐린 수용체 내포작용 경로로 내재화되었다(Gasparro, Biochem. Biophys. Res. Comm. 141(2), pp. 502-509, Dec. 15, 1986); 갈락토오스 말단 아시알로당단백질에 대한 간세포 특이적 수용체는 플라스미드에 비-공유 결합된 아시알로오로소무코이드-폴리-L-리신의 간세포-특이적 막통과 수송에 이용되었다(Wu, G. Y., J. Biol. Chem. , 262(10), pp. 4429- 4432, 1987); EGF에 대한 세포 수용체는 EGF에 공유 결합된 폴리뉴클레오티드를 세포 내부로 전달하는데 이용되었다(Myers, European Patent Application 86810614.7, Jun. 6, 1988); 유기금속성 B₁₂-내적 인자 복합체에 대한 내재된 세포 수용체는 경구 투여이후에, 비타민 B₁₂와 복합된 약물, 호르몬, 생활성 펩티드, 면역원의 순환체로의 수송을 매개하는데 이용되었다(Russell-Jones et al., European patent Application 86307849.9, Apr. 29, 1987); 만노스-6-포스페이트 수용체는 저밀도 지단백을 세포로 수송하는데 이용되었다(Murray, G. J. and Neville, D. M. , Jr., J. Biol. Chem, Vol. 255 (24), pp. 1194-11948, 1980); 콜레라 독소 결합 아단위 수용체는 인슐린을 인슐린 수용체 결합된 세포로 수송하는데 이용되었다(Roth and Maddox, J. Cell. Phys. Vol. 115, p. 151, 1983); 사람 융모성 성선자극 호르몬 수용체는 HCG에 결합된 리신 사슬 A를 적절한 HCG 수용체를 갖는 세포로 수송하는데 이용되었다(Oeltmann and Heath, J. Biol. Chem, vol. 254, p. 1028 (1979)).

[0005] 한 구체예에서, 본 발명은 비타민, 비타민 수용체 결합 유도체 또는 이의 유사체에 대한 수용체를 보유하는 막을 교차하여 방사성핵종-기초한 영상체의 막통과 수송을 수반한다. 비타민 또는 비타민 유도체/유사체에 대한 수용체를 보유하는 세포막은 공액체의 막통과 수송을 개시하고 용인할 만큼 충분한 시간동안 비타민-영상체 공액체와 접촉시키고, 동물에서 이들 비타민-영상체 공액체의 체내분포를 모니터한다. 다른 구체예에서, 비타민 또는 비타민 유도체/유사체 표적화 부분은 세포 표면 비타민 수용체에 결합하여 킬레이트된 방사성핵종을 세포 표면에 농축시킨다.

[0006] 본 발명에서는 (1) 비타민 수용체의 위치 및 (2) 결합된 수용체-매개된 내포작용 과정을 활용한다. 가령, 본 발명에서는 종양 세포 또는 수용체를 과다발현하는 다른 세포형에서 비타민, 이의 유도체 또는 유사체에 특이적으로 결합하는 비타민 수용체, 운반체 또는 다른 표면-제시된 단백질의 독특한 발현, 과다발현 또는 선택적 발현을 활용한다. 따라서, 본 발명은 세포가 비타민-영상체 공액체와 접촉하는 경우에 발생하는 수용체-매개된 내포작용 과정을 활용하여 비타민 또는 비타민 유도체/유사체에 대한 수용체를 과다발현하는 세포, 예를 들면 종양 세포 또는 다른 세포형을 감지하는데 이용할 수 있다.

[0007] 비타민 수용체, 예를 들면 높은 고도-친화성 염산염 수용체(FR)는 암 세포에서 높은 수준으로 발현된다. 난소, 유선, 결장, 폐, 코, 목, 뇌의 상피 암 모두 상승된 수준의 FR을 발현하는 것으로 보고되었다. 실제로, 모든 사람 난소 종양의 90% 이상이 이런 수용체를 다량으로 발현하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 발명은 다양한 종류의 종양 및 질병 상태에 관여하는 다른 세포형의 진단 영상에 이용될 수 있다.

[0008] 리간드에 복합된 방사성핵종 킬레이터는 진단 영상 목적의 비-침입성 프로브로 사용되고 있다. 가령, 혈관활성 장관 펩티드, 소마토스타틴 유사체, 단클론 항체는 방사성핵종을 세포, 예를 들면 종양 세포에 집중시키는 리간드로 사용되고 있다. 단클론 항체 및 이의 다양한 단편은 초기에 많은 주목을 받았는데, 그 이유는 단클론 항체를 표적화 리간드로 이용하여 정확한 종양-특이적 표적화를 달성할 수 있었기 때문이다. 불행하게도, 이런 접근 방식은 문제가 발생하였는데, 그 이유는 i) 항체가 대형 크기로 인하여 순환 시간을 연장시켜 영상 목적에 부적합하고, ii) 항체의 생산 비용이 고가이며, iii) 항체가 면역원성으로 인하여 다중 분량으로 사용되면 인화(人和)되어야 하고, iv) 항체-결합된 방사성핵종의 종양 대 비-표적 조직 비율(T/NT)이 최적-이하이기 때문이다. 따라서, 최근에는 이런 단점이 없는 작은 종양-특이적 리간드의 사용이 주목을 받고 있다.

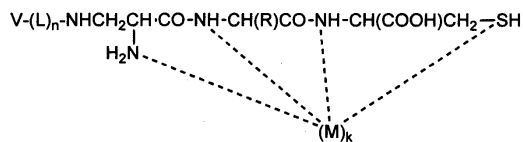
[0009] 비타민, 예를 들면 엽산은 영상체의 종양 세포로의 표적화에 이용되는데, 작은 크기로 인하여 선호된다. 생체내 종양 영상에서 첫 번째로 보고된 엽산-기초한 표적화 복합체는 ¹²⁵요오드를 포함하는 히스타민 유도체였다. 상기 복합체는 오래 존속하는 ¹²⁵I 방사성핵종 성분으로 인하여 적절한 임상 후보로 간주되지 않았다. 이후, 종양 영상을 위한 테페록사민-엽산염 공액체가 개발되었다(반감기가 78시간인 감마-방출 방사성핵종, 테페록사민 킬레이터 ⁶⁷Ga). 상기 공액체에서 간담도 제거가 확인되어, 복부 위치를 정확하게 영상하는데 예상되는 문제점으로 인하여 전임상 개발이 중단되었다. 하지만, 이런 장애물은 테페록사민 킬레이터를 ¹¹¹In(68시간 반감기)의 효과적 킬레이터, 디에틸렌트리아민 펜타아세트산(DTPA)으로 대체함으로써 극복되었다. ¹¹¹In-DTPA-엽산염의 일차

적인 제거 경로는 신장으로 확인되었다.

좀더 최근에, ^{99m}Tc 가 진단 영상에 선호되는 방사성핵종으로 수용되었는데, 그 이유는 i) 방사성핵종이 상업적으로 가용한 ^{99}Mo - ^{99m}Tc 발생장치로부터 용이하게 획득되고, ii) ^{99m}Tc 를 대량으로 생산하는 비용이 ^{111}In 을 생산하는 비용에 비하여 저렴하고, iii) ^{99m}Tc 가 훨씬 짧은 반감기(6시간)를 보유하기 때문인데, 이는 좀더 많은 방사성핵종의 투여를 가능하게 하고 생명 유지에 필수적인 장치에 유해한 방사선 노출의 위험없이 좀더 높은 해상도 영상을 결과한다.

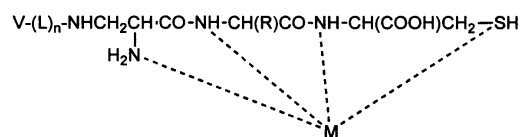
여러 엽산염-기초한 ^{99m}Tc 공액체가 개발되었다. 가령, ^{99m}Tc -6-하이드라지노니코틴아미도-하이드라지도(HYNIC; Guo, et al., J. Nucl. Med., 40(9): 1563-1569 (1999)), ^{99m}Tc -12-아미노-3,3,9,9-테트라메틸-5-옥사-4,8 디아자-2,10-도데칸디노에 디옥심(OXA)(Linder, et al., Soc. Nucl. Med., Proc.47th Annual Meeting, 2000,41(5):119P), ^{99m}Tc -에틸렌디시스테인(Ilgan, et al., CancerBiother. & Radiopharm., 13(6): 427-435(1998)), ^{99m}Tc -DTPA-엽산염(Mathias, et al., Bioconjug. Chem., 11(2): 253-257(2000))의 엽산염 공액은 유망한 생체내 종양 흡수 특성을 보였다. 하지만, 최적의 종양 대 비-표적 조직 비율(T/NT)을 나타내고 신장을 통하여 제거되는 대안적인 비타민-기초한 ^{99m}Tc 공액체, 또는 다른 방사선헌종을 이용한 비타민-기초한 공액체가 필요하다. 이런 비타민-기초한 공액체는 종양 영상제로써 임상 개발 및 다른 질병 상태의 진단에 적합하다.

한 구체예에서 아래 화학식의 화합물을 제공한다:



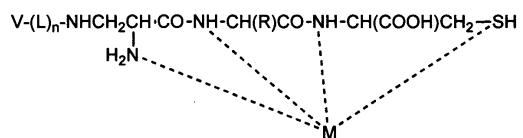
여기서, V는 비타민, 또는 이의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체이고, L은 이가 링커이고, R은 화학식 $\text{H}_2\text{NCHRCOOH}$ 아미노산의 측쇄이고, M은 방사성핵종의 양이온이고, n은 1 또는 0이고, k는 1 또는 0이다. 상기 비타민은 생체내에서 수용체-매개된 막통과 수송의 기질이다.

다른 구체예에서, 아래 화학식 화합물 및 제약학적으로 수용가능한 담체를 함유하는 진단 영상용 조성물을 제공한다:



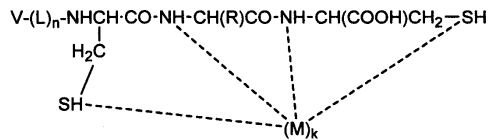
여기서, V는 비타민, 또는 이의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체이고, L은 이가 링커이고, R은 화학식 $\text{H}_2\text{NCHRCOOH}$ 아미노산의 측쇄이고, M은 방사성핵종의 양이온이고, n은 1 또는 0이다. 상기 비타민은 생체내에서 수용체-매개된 막통과 수송의 기질이다.

또 다른 구체예에서, 동물에서 세포 개체군을 영상하는 방법을 제공하는데, 여기서 세포는 세포 표면에서 비타민 수용체로 특성화된다. 상기 방법은 아래 화학식 화합물 및 제약학적으로 수용가능한 담체를 함유하는 조성물의 효과량을 동물에 투여하고 동물에서 이들 화합물의 체내분포를 모니터링하는 단계로 구성된다:



여기서, V는 세포 표면 비타민 수용체에 특이적인 비타민, 또는 이의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체이고, L은 이가 링커이고, R은 화학식 $H_2NCHRCOOH$ 아미노산의 측쇄이고, M은 방사성핵종의 양이온이고, n은 1 또는 0이다.

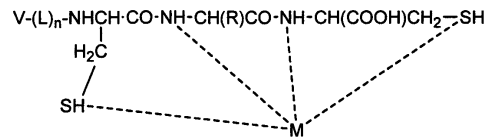
[0021] 또 다른 구체예에서 아래 화학식의 화합물을 제공한다:



[0022]

[0023] 여기서, V는 생체내에서 수용체-매개된 막통과 수송의 기질이 되는 비타민, 또는 이의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체이고, L은 이가 링커이고, R은 화학식 $H_2NCHRCOOH$ 아미노산의 측쇄이고, M은 방사성핵종의 양이온이고, n은 1 또는 0이고, k는 1 또는 0이다.

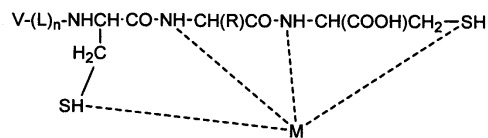
[0024] 또 다른 구체예에서, 아래 화학식 화합물 및 제약학적으로 수용가능한 담체를 함유하는 진단 영상용 조성물을 제공한다:



[0025]

[0026] 여기서, V는 생체내에서 수용체-매개된 막통과 수송의 기질이 되는 비타민, 또는 이의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체이고, L은 이가 링커이고, R은 화학식 $H_2NCHRCOOH$ 아미노산의 측쇄이고, M은 방사성핵종의 양이온이고, n은 1 또는 0이다.

[0027] 또 다른 구체예에서, 동물에서 세포 개체군을 영상하는 방법을 제공하는데, 여기서 세포는 세포 표면에서 비타민 수용체로 특성화된다. 상기 방법은 아래 화학식 화합물 및 제약학적으로 수용가능한 담체를 함유하는 조성물의 효과량을 동물에 투여하고 동물에서 이들 화합물의 체내분포를 모니터링하는 단계로 구성된다:



[0028]

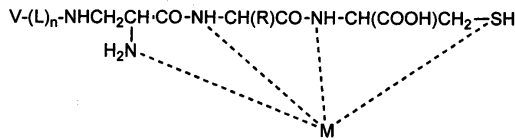
[0029] 여기서, V는 세포 표면 비타민 수용체에 특이적인 비타민, 또는 이의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체이고, L은 이가 링커이고, R은 화학식 $H_2NCHRCOOH$ 아미노산의 측쇄이고, M은 방사성핵종의 양이온이고, n은 1 또는 0이다.

[0030] 이들 구체예에 따른 화합물에서 V는 예로써 엽산염, 리보플라빈, 티아민, 비타민 B₁₂, 비오틴, 이들의 유도체, 유사체에서 선택되는 비타민이다. 이들 구체예에 따른 화합물에서 방사성핵종은 예로써 갈륨, 인듐, 구리, 테크네튬, 레늄의 핵종에서 선택될 수 있다.

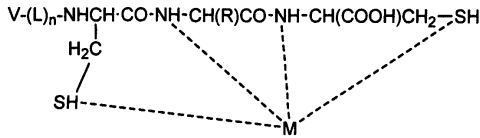
발명의 상세한 설명

[0054] 본 발명에서는 비타민 수용체를 유일하게 발현하거나 과다발현하거나 또는 우선적으로 발현하는 세포 개체군으로 방사선택종-기초한 영상제를 표적하는 화합물과 방법을 제시한다. 따라서, 비타민 또는 수용체 결합 유도체/유사체는 영상제에 대한 표적화 리간드로 이용된다. 진단 영상용 비타민-영상제 공액체는 방사선택종을 세포로 표적하고 세포 개체군, 예를 들면 종양 세포 개체군에 방사선택종을 농축시키는데 사용될 수 있다.

[0055] 본 발명에서는 이런 용도로 아래 화학식 화합물 및 제약학적으로 수용가능한 담체를 함유하는 진단 영상용 조성물을 제공한다:



or



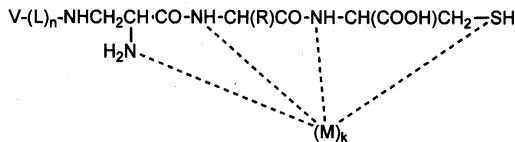
[0056]

[0057]

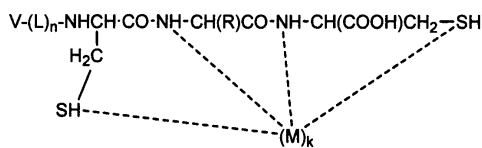
상기 화합물에서, V는 비타민, 또는 이의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체이고, L은 이가 링커이고, R은 화학식 $\text{H}_2\text{NCH(R)COOH}$ 아미노산의 측쇄이고, M은 방사성핵종의 양이온이고, n은 1 또는 0이다. 상기 비타민, 또는 이의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체는 생체내에서 수용체-매개된 막통과 수송의 기질이다.

[0058]

또한, 본 발명에서는 아래 화학식 화합물을 제공한다:



and



[0059]

[0060]

여기서, V는 비타민, 또는 이의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체이고, L은 이가 링커이고, R은 화학식 $\text{H}_2\text{NCH(R)COOH}$ 아미노산의 측쇄이고, M은 방사성핵종의 양이온이고, n은 1 또는 0이다. 상기 비타민은 생체내에서 수용체-매개된 막통과 수송의 기질이다.

[0061]

이들 화합물의 전형은 도 1에 도시된 EC20 화합물이다. 본 발명에 따른 다른 화합물의 전형은 EC11, EC13, EC14, EC15, EC19, EC31, EC53 화합물이다(참조: 도 10). 이런 비타민 부분(예, EC20에서 염산 부분)은 세포 FR에 높은 친화성 결합을 제공한다. 상기 화합물은 이중기능성 펩티드-기초한 킬레이터를 또한 포함하는데, 이는 방사성핵종, 예를 들면 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 의 킬레이트화(chelation)를 위한 부위를 제공하며(참조: 도 1), 선택적으로 상기 화합물은 비타민 부분이 킬레이트화 부분에 공유 결합되는 링커를 포함할 수 있다.

[0062]

본 발명에서, 이들 화합물의 비타민 부분은 생체내에서 수용체-매개된 막통과 수송의 기질이 되는 비타민, 또는 이의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체이다. 비타민은 링커(L)를 통하여 상기 화합물의 킬레이터 영역에 선택적으로 결합된다. 킬레이터 영역은 제 3의 아미노산 잔기를 통하여 시스테인 잔기에 결합된 α, β -디아미노 프로피온산 부분으로 구성된다. 상기 화합물의 킬레이터 영역은 방사성핵종 양이온(M)(k = 1)에 결합하도록 적합된다.

[0063]

본 발명에서, 방사성핵종이 결합된 화합물은 "비타민-영상제 공액체"라고 한다.

[0064]

링커의 구조는 본 발명에 중요하지 않다. 따라서, 이는 임의의 생체적합성 이가 링커일 수 있다. 전형적으로, 링커는 대략 1 내지 30개, 바람직하게는 대략 2 내지 20개 탄소 원자를 포함한다. 저분자량 링커(대략 30 내지 300의 분자량을 보유하는 링커)가 전형적으로 이용된다. 비타민 부분은 비타민, 이의 유도체 또는 유사체일 수도 있다. 가령, 염산염은 프테로인산에 결합된 L 배열에서 1개의 글루탐산을 보유한다. 도 1에 도시된 바와 같이, EC20은 킬레이터 부분에 결합된 염산 유사체를 포함하는데, 그 이유는 EC20이 D 배열로 글루탐산을 보유하기 때문이다. EC11과 EC14는 2개의 글루탐산 잔기를 보유하고, 따라서 이들 화합물은 염산의 유도체로 간주될 수 있다(도 10).

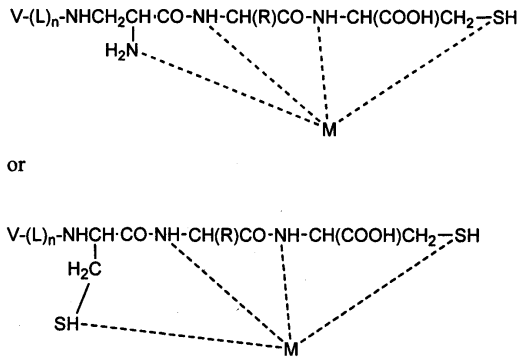
- [0065] 수용체-매개된 내포작용을 유인하고 본원에 개시된 방법에 사용되는 비타민에는 니아신, 판토텐산, 엽산, 리보플라빈, 티아민, 비오틴, 비타민 B₁₂, 지질 용해성 비타민 A, D, E, K 등이 포함된다. 이들 비타민 및 이들의 유도체와 유사체는 영상제와 결합하여 본 발명에 따른 비타민-킬레이터 공액체를 형성하는 비타민을 구성한다. 바람직한 비타민 부분에는 엽산, 비오틴, 리보플라빈, 티아민, 비타민 B₁₂, 이들 비타민 분자의 유사체와 유도체, 다른 관련된 비타민 수용체-결합 분자 등이 포함된다.
- [0066] 엽산, 폴린산, 프테로인산, 프테로폴리글루탐산 및 엽산염 수용체-결합 프테리딘, 예를 들면 테트라하이드로프테린, 디하이드로폴레이트, 테트라하이드로폴레이트, 이들의 데아자(deaza)와 디데아자(dideaza) 유사체가 본 발명에 사용될 수 있다. "데아자와 디데아자 유사체" 유사체는 자연 발생 엽산 구조에서 1-2개의 질소 원자가 1개의 탄소 원자로 대체된 엽산염 유사체를 의미한다. 가령, 데아자 유사체에는 데아자, 3-데아자, 5-데아자, 8-데아자, 10-데아자 유사체 등이 포함된다. 디데아자 유사체에는 1,5-디데아자, 5,10-디데아자, 8,10-디데아자, 5,8-디데아자 유사체 등이 포함된다. 이들 유사체는 엽산염 유사체 또는 유도체이고 엽산염 수용체에 결합할 수 있다. 본 발명에 유용한 다른 엽산염 유사체 또는 유도체는 엽산염 수용체-결합 유사체 아미노프테린, 아메토프테린(메토포렉세이트), N¹⁰-메틸폴레이트, 2-데아미노-하이드록시폴레이트, 데아자 유사체, 예를 들면 1-데아자메토프테린 또는 3-데아자메토프테린 및 3,5-디클로로-4-아미노-4-데옥시-N¹⁰-메틸프테로일글루탐산(디클로로메토포렉세이트)이다.
- [0067] 이런 비타민 또는 이의 유도체/유사체는 세포 개체군에 선택적으로 결합하여, 표적된 세포에서 수용체에 결합 가능한 비타민 또는 유도체/유사체에 대한 이들 수용체의 우선적 발현으로 인하여 시각화될 수 있다. 비타민에 대한 결합 부위는 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 비타민 분자에 대한 수용체를 보유하는데, 여기서 수용체 또는 다른 단백질은 가시화되는 세포 개체군에 의해 유일하게 발현되거나 과다발현되거나 또는 우선적으로 발현된다. 가시화되는 세포에 의해 유일하게 발현되거나 과다발현되거나 또는 우선적으로 발현되는 표면-제시된 단백질은 다른 세포에서는 존재하지 않거나 적은 양으로 존재하고, 본 발명의 비타민-영상제 공액체를 이용한 진단 영상에 표적된 세포의 선별적이고 신속하며 민감한 시각화 수단을 제공하는 수용체이다.
- [0068] 본 발명에서 비타민-영상제 공액체는 시각화되는 암 세포 또는 다른 세포에서 수용체에 높은 친화성으로 결합할 수 있다. 높은 친화성 결합은 비타민 부분에 고유하거나 화학적으로 변형된 비타민(유사체 또는 유도체)의 사용에 의해 또는 공액체에 존재하는 비타민과 킬레이터 부분간 특정한 화학적 결합에 의해 강화될 수 있다.
- [0069] 본 발명에서 킬레이터는 개별 세포막 수용체에 대한 결합 가능성을 강화하기 위하여 복수의 서로 다른 비타민, 또는 이의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체와 공액될 수 있다. 대안으로, 비타민-영상제 공액체의 독립된 일부 분량이 개별 세포막 수용체에 대한 결합 가능성을 강화하기 위하여 서로 다른 비타민-영상제 공액체를 구성할 수 있다.
- [0070] 일반적으로, 킬레이터 및 비타민, 또는 이의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체간 복합체를 형성하는 임의의 방법을 본 발명에 이용할 수 있다. 킬레이터는 킬레이터의 직접 공액 및 이가 링커의 이용으로 비타민, 또는 이의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체와 복합체를 형성할 수 있다. 대안으로, 비타민과 킬레이터는 링커의 이용없이 공액될 수 있다. 링커가 이용되면, 링커는 수소, 이온 또는 공유 결합을 통하여 비타민, 또는 이의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체 및 킬레이터를 직접 공액할 수 있다. 또한, 본 발명에서 이가 링커는 예로써 중간 링커, 스페이서 암 또는 가교 분자를 통한 연결에 의해 킬레이터를 비타민, 또는 이의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체와 연결하는 간접 수단을 형성할 수 있다. 직접과 간접 연결 수단 모두 본 발명에 따른 방법의 실행을 위하여, 세포막에서 비타민, 또는 이의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체가 비타민 수용체에 결합하는 것을 방해하지 않아야 한다.
- [0071] 비타민, 또는 이의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체 및 킬레이터의 공유 결합은 링커의 이용 유무에 상관없이 산, 알데하이드, 하이드록시, 아미노 또는 하이드라조 작용기 사이의 아마이드, 에스테르 또는 이미노 결합의 형성으로 발생할 수 있다. 가령, 비타민 부분 또는 킬레이터에서 카르복실산은 카르보닐디이미다졸 또는 표준 카르보디이미드 결합 시약, 예를 들면 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드(EDC)를 이용하여 활성화시키고, 이후 적어도 하나의 친핵성 작용기, 다시 말하면 하이드록시, 아미노, 하이드라조 또는 티올을 보유하는 공액체의 다른 성분이나 링커와 반응시킬 수 있다.
- [0072] 진단 영상에 적합한 방사성핵종에는 핵종 ¹¹¹In, ^{99m}Tc, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga 또는 ⁶⁸Ga를 비롯한 갈륨, 인듐, 구리, 테크네튬, 레늄의 방사성핵종 등이 포함된다. 이들 방사성핵종은 양이온이고, 공액체의 킬레이트화 작용기를 통

하여 킬레이터와 복합되어 비타민-영상제 공액체를 형성한다.

- [0073] 본 발명에 따른 비타민-영상제 공액체는 세포 개체군이 비타민, 또는 이의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체에 대한 수용체를 유일하게 발현하거나 과다발현하거나 또는 우선적으로 발현하는 동물에서 신티그래피 영상 기술로 세포 개체군을 선택적으로 시각화하는데 사용된다. 비타민-영상제 공액체는 비타민 유도체 또는 유사체에 결합하는 비타민 수용체를 유일하게 발현하거나 우선적으로 발현하거나 또는 과다발현하는 병원성 세포 개체군을 시각화하는데 이용될 수 있다.
- [0074] 본 발명은 암; 비타민 또는 이의 비타민 유도체/유사체에 결합할 수 있는 수용체를 과다발현하는 임의의 다른 유형의 병원성 세포에 의해 매개된 질환을 비롯한 다양한 병리를 유발하는 병원성 세포 개체군에 적용가능하다. 따라서, 병원성 세포 개체군은 양성 종양과 악성 종양을 비롯한 종양원성 또는 비-종양원성이다. 세포 개체군이 암 세포 개체군이면, 암 세포는 자발적으로 발생하거나 숙주 동물의 생식세포계에 존재하는 돌연변이 또는 체세포 돌연변이에 의해 발생하거나, 또는 화학약품, 바이러스 또는 방사선에 의해 유도될 수 있다. 본 발명은 암종, 육종, 림프종, 흡진성병, 흑색종, 중피종, 버킷 림프종, 비후강 암종, 골수종과 같은 암의 진단 영상에 이용될 있다. 암 세포 개체군에는 경구, 비후강, 흉선, 내분비, 피부, 위, 식도, 후두, 목, 췌장, 결장, 방광, 골, 난소, 경부, 자궁, 유방, 고환, 전립선, 직장, 신장, 간, 폐, 뇌 암 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 세포 개체군이 암 세포 개체군인 구체예에서, 전이되었거나 일차 종양으로부터 분리 과정에 있는 일차 종양 세포를 비롯한 종양 세포는 비타민-영상제 공액체를 사용하여 가시화시킬 수 있다.
- [0075] 본 발명의 비타민-영상제 공액체는 질병 상태를 진단하거나 질병 진행을 모니터링하는데 사용될 수 있다. 가령, 본 발명에 따른 진단 영상 방법은 종양의 외과적 제거, 방사선 요법, 화학 요법 또는 생물학적 요법을 비롯한 치료적 접근에 의한 제거이후 종양의 재발을 예방하는 예방 치료제와 함께 암의 진행을 모니터링하는데 이용될 수 있다.
- [0076] 본 발명의 조성물과 방법은 임상 의학과 수의학 분야에 이용될 수 있다. 따라서, 시각화될 수 있는 세포 개체군을 보유하는 동물은 사람 또는, 수의학 분야에서 실험 동물, 가축, 애완동물 또는 야생 동물이다. 본 발명은 사람; 실험 동물, 예를 들면 설치류(예, 생쥐, 쥐, 햄스터 등), 토끼, 원숭이, 침팬지; 애완동물, 예를 들면 개, 고양이, 토끼; 가축, 예를 들면 소, 말, 돼지, 양, 염소; 사료잡힌 야생 동물, 예를 들면 곰, 판다, 사자, 호랑이, 표범, 코끼리, 얼룩말, 기린, 고릴라, 돌고래, 고래 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 동물에 이용될 수 있다. 진단 영상용 조성물은 1회 이상의 분량으로 투여되는 경우에 동물에서 진단 영상에 표적되는 세포를 시각화시키는데 효과적인 함량의 비타민-영상제 공액체를 함유한다. 적절하게는, 비타민-영상제를 함유하는 진단 영상용 조성물은 동물에 장관외, 예를 들면 피내, 피하, 근육내, 복강내, 정맥내 또는 척수강내 투여된다. 대안으로, 비타민-영상제 공액체를 함유하는 조성물은 다른 의학적으로 유용한 과정으로 동물에 투여되고, 임의의 효과량 및 경구와 흡입 약형을 비롯한 적절한 약형을 이용할 수 있다.
- [0077] 장관외 약형의 예는 등장성 염수, 5% 글루코오스 또는 다른 공지된 제약학적으로 수용가능한 액체 담체, 예를 들면 액체 알코올, 글리콜, 에스테르, 아마이드에 녹인 비타민-영상제 공액체의 수용액이다. 본 발명에 따른 장관외 약형은 비타민-영상제 공액체의 1회 분량을 함유하는 재구성가능 냉동건조물 형태일 수 있다.
- [0078] 진단 영상용 조성물에서 비타민-영상제 공액체의 용량은 동물 크기, 진단 영상에 표적된 세포 개체군, 사용되는 특정 비타민-영상제 공액체, 공액체의 투여 경로에 좌우된다. 동물에 투여되는 효과량은 체표면적, 체중, 동물 상태의 치료자 평가에 기초한다. 효과량 범위는 대략 1 ng/kg 내지 1 mg/kg, 좀더 바람직하게는 대략 100 ng/kg 내지 500 μ g/kg, 가장 바람직하게는 대략 100 ng/kg 내지 25 μ g/kg이다.
- [0079] 비타민-영상제 공액체를 함유하는 진단 영상용 조성물을 투여하는데 효과적인 섭생을 이용할 수 있다. 가령, 진단 영상용 조성물은 표적된 세포 개체군의 시각화를 달성하기 위하여 단일 분량, 또는 필요한 경우에 복수 분량으로 투여될 수 있다. 비타민-영상제 공액체를 함유하는 진단 영상용 조성물은 최초 주사이후 수일 또는 수개월 간격으로 동물에 추가로 주사할 수 있는데, 이런 추가 주사는 질병 상태의 진행을 모니터링하는데 유용하다. 비타민-영상제 공액체를 함유하는 진단 영상용 조성물은 표지되지 않은 비타민과 공동으로 투여될 수도 있다. "공동으로"는 영상 품질을 개선하기 위하여, 표지되지 않은 비타민을 영상제와 동시 투여하거나 또는 표지되지 않은 비타민을 영상제 투여에 앞서 미리 주사할 수 있음을 의미한다. 가령, 영상제는 대략 0.5 ng/kg 내지 100 mg/kg, 좀더 바람직하게는 대략 1 μ g/kg 내지 100 mg/kg, 가장 바람직하게는 대략 100 μ g/kg 내지 100 mg/kg의 표지되지 않은 비타민과 공동으로 투여될 수 있다.
- [0080] 전형적으로, 진단 영상용 조성물은 장관외 투여용으로 제제화되고, 표적된 세포 개체군의 영상을 가능하게 하

는 효과량으로 동물에 투여된다. 전형적으로, 비타민-표적된 영상제를 함유하는 진단 영상용 조성물을 동물에 투여하고, 비타민-영상제 공액체가 표적된 세포 개체군에 전달되고 농축되는 충분한 시간이후 상기 동물에서 영상 과정을 실시하는데, 영상은 상기 비타민-영상제 공액체에 의해 가능하다. 질병의 진행을 모니터하거나 진단에 이용되는 영상 과정은 일반적으로, 비타민-영상제 공액체를 함유하는 진단 영상용 조성물의 투여이후 대략 1 내지 6 시간 시점에 실시된다.

[0081] 본 발명에서는 동물에서 세포 개체군을 영상하는 방법을 또한 제공하는데, 여기서 세포는 세포 표면에서 비타민 수용체로 특성화된다. 상기 방법은 아래 화학식 화합물 및 제약학적으로 수용가능한 담체를 함유하는 조성물의 효과량을 동물에 투여하고 동물에서 이들 화합물의 체내분포를 모니터링하는 단계로 구성된다:



[0083] 여기서, V는 세포 표면 비타민 수용체에 특이적인 비타민, 또는 이의 비타민 수용체 결합 유도체 또는 유사체이고, L은 이가 링커이고, R은 화학식 $\text{H}_2\text{NCH(R)COOH}$ 아미노산의 측쇄이고, M은 방사성핵종의 양이온이고, n은 1 또는 0이다.

[0084] 상기 방법은 세포 배양액과 같은 시험관내에서, 또는 세포가 동물 조직의 일부를 형성하거나 동물 조직에 존재하는 생체내에서 세포 개체군을 영상하는데 이용될 수 있다. 따라서, 표적 세포에는 예로써 장관에 정렬된 세포, 예를 들면 구강과 인두 점막; 소장 의 용모를 형성하는 세포; 또는 대장에 정렬된 세포 등이 포함될 수 있다. 본 발명에서 장관 세포는 비타민-영상제 공액체를 함유하는 진단 영상용 조성물의 경구 투여로 표적될 수 있다. 유사하게, 동물의 호흡기(비도/폐)에 정렬된 세포는 본 발명에 따른 복합체의 흡입으로 표적될 수 있고, 난소와 뇌의 세포를 비롯한 내부 장기의 세포는 진단 영상용 조성물의 장관의 투여로 표적될 수 있다.

실시예

[0085] 실시예 1

[0086] 재료

[0087] N¹⁰-트리플루오르아세틸프테로인산은 Eprova AG, Schaffhausen, Switzerland로부터 구입하였다. 펩티드 합성 시약은 NovaBiochem과 Bachem으로부터 구입하였다. ^{99m}Tc 과테크네튬산나트륨은 Syncor에서 공급하였다. [ReO₂(en)₂]Cl은 Rouschias(Rouschias, G., Chem. Rev., 74: 531(1974))에 따라 준비하였다. 셀룰로오스 플레이트와 DEAE 이온 교환 플레이트는 J. T. Baker로부터 구입하였다.

[0088] 실시예

[0089] EC20의 합성, 정제, 분석적 특성화

[0090] EC20은 Fmoc-전략을 활용하여 중합체-지지된 순차적 방식으로 제조하였다(참조: 하기 반응식 I; Fmoc = 9-플루오렌메틸옥시카르보닐; Boc = tert. 부틸옥시카르보닐; Dap = 디아미노프로피온산; DMF = 디메틸포름아마이드; DIPEA = 디이소프로필에틸아민). EC20은 Fmoc-L-Cys(Trt)-OH로 적하된 산-민감성 Wang 수지에서 합성하였다. 벤조트리아졸-1-일-옥시-트리스-피롤리디노-포스포늄헥사플루오로포스페이트(PyBOP)는 적은 당량의 아미노산으로 효율적인 결합을 담보하기 위한 활성화 시약으로 사용하였다. Fmoc 보호기는 표준 조건(DMF에서 20% 피페리딘)하에 매 결합 단계이후 제거하였다. 최종 조합 단계이후, 펩티드는 2.5% 에탄디티올, 2.5% 트리이소프로필실란, 2.5% 탈이온수를 함유하는 92.5% 트리플루오르아세트산으로 처리하여 중합성 지지체로부터 절단하였다. 이런 반응으로 t-Bu, Boc, 트리틸 보호기 역시 동시에 제거되었다. 최종적으로, 수성 수산

화합물에서 트리플루오르아세틸 부분을 제거하여 EC20을 얻었다.

[0091]

가공되지 않은 EC20은 Xterra RP18 30 x 300 mm, 7 μ m 칼럼(Waters); 이동상 32 mM HCl(A), MeOH(B); 37분동안 20 ml/min의 유속으로 99% A와 1% B로 시작하여 89% A와 11% B로 종결되는 농도 구배를 이용한 HPLC로 정제하였다. 일반적으로, 이들 조건하에 EC20 단량체는 14.38분에 용리되고, EC20 이황화 이량체(소량 오염물질)는 16.83분에 용리되었다. 도 10에 도시된 모든 다른 화합물은 하기 반응식 II에 도시된 바와 같이 합성된 EC15를 제외하고 유사한 합성 반응식을 이용하여 제조할 수 있다.

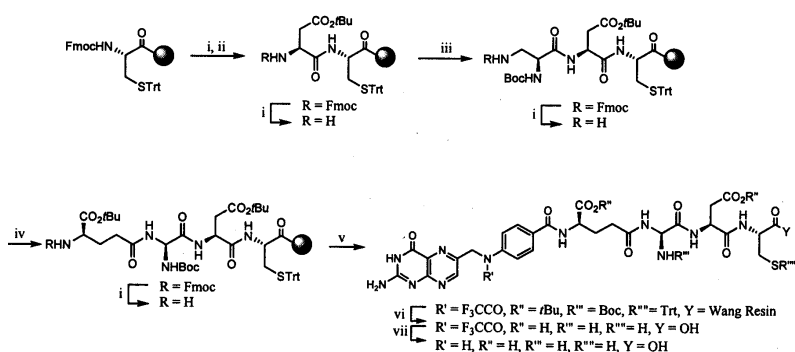
[0092]

2 mg의 HPLC-정제된 EC20은 0.62 ml D₂O에 용해시키고, 500 MHz ¹H-NMR 스펙트럼을 기록하였다. 표 1에서는 EC20 분자에서 모든 교환가능 양성자에 대한 화학적 이동, 신호 형식, J 값을 기재한다.

[0093]

EC20은 전자분사-질량 분광법(electrospray-mass spectrometry)으로 분석하였다. 주요 양성 이온 피크(m/z, 상대 강도): 746.1, 100; 747.1, 44; 556.8, 32; 570.8, 16.

반응식 I



[0094]

[0095]

표 1

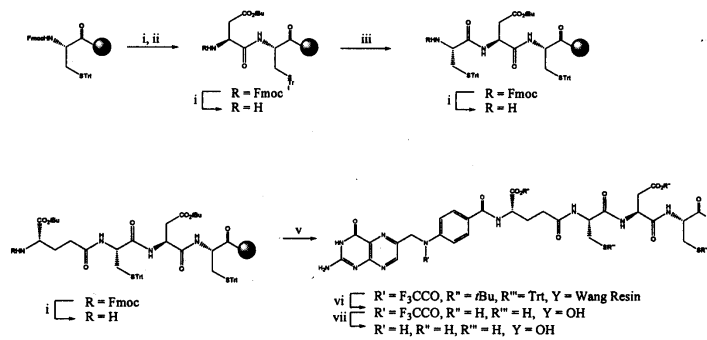
[0096]

EC20에 대한 ¹H-NMR 데이터. EC20은 D₂O에 용해시키고, 500 MHz 스펙트럼을 기록하였다. 화학적 이동(δ)은 ppm으로 표시한다. δ 에서 HOD에 대한 신호 = 4.8 ppm을 기준으로 이용하였다. pD = 4.78; s = 단일항; d = 이중항; m = 복수항.

Residue	Protons observed	Chemical Shift (δ)	Signals	J values
Pte	H-7	8.76	s	³ J _{12,13} = ² J _{15,16} =8.8 Hz
	2 x H-9	4.64	s	
	H-12 a, H-16	7.68	d	
	H-13 a, H-15	6.8	d	
D-Glu	H-2	4.41	dd	³ J _{2,3} = ³ J _{2,3b} =4.5 Hz ² J _{3a,3b} =14.2 Hz ³ J _{3a,4} = ³ J _{4b,4} =5.6 Hz
	H-3a	2.08	m	
	H-3B	2.27	m	
	2 x H-4	2.44	dd	
Dpr	H-2	4.1	dd; X of ABX System	³ J _{2,3A} =6.6 Hz; ³ J _{2,3B} =4.7 Hz ² J _{A,B} =14.7 Hz
	H-3A	3.52	dd; A of ABX System	
	H-3B	3.72	dd; B of ABX System	
			dd; X of ABX System	
Asp	H-2	4.71	dd; X of ABX System	³ J _{2,3A} =9.5 Hz; ³ J _{2,3B} =4.3 Hz ² J _{A,B} =16.1 Hz
	H-3A	2.62	dd; A of ABX System	
	H-3B	2.81	dd; B of ABX System	
			dd; X of ABX System	
Cys	H-2	4.3	dd; X of ABX System	³ J _{2,3A} =5.5 Hz; ³ J _{2,3B} =4.4 Hz ² J _{A,B} =14.1 Hz
	H-3A	2.85	dd; A of ABX System	
	H-3B	2.89	dd; B of ABX System	
			dd; X of ABX System	

[0097]

반응식 II



Reagents and conditions: i) 20% Piperidine, DMF; ii) Fmoc-Asp(OrBu)-OH, PyBop, DIPEA, DMF; iii) Fmoc-Cys(Trt)-OH, PyBop, DIPEA, DMF; iv) Fmoc-D-Glu-OrBu, PyBop, DIPEA, DMF; v) N^{10} -TFA-Ptc-OH, DIPEA, DMSO; vi) TFAA, HSCH₂CH₂SH, iPr₃SiH; vii) H₂NOH, pH = 10.3

실시예 3

비-방사성 시약 바이알과 ^{99m}Tc -EC20의 제조

EC20 키트는 ^{99m}Tc -EC20 방사성 약제의 제조에 사용하였다. 각 키트는 0.1 mg EC20, 80 mg 소듐 α -D-글루코헵토네이트, 80 mg tin(II) 클로라이드 디하이드레이트 및 냉동 건조에 앞서 pH를 6.8 ± 0.2 로 조정할 수 있을 만큼 충분한 수산화나트륨 또는 염산을 포함하였다. 냉동 건조된 분말은 아르곤 대기하에 5 ml 바이알에 밀봉하였다. 이후, 키트는 사용 또는 만기(현재 반감기 > 2년) 때까지 -20°C 에서 동결 보관하였다. 중요하게는, tin(II) 클로라이드 성분은 첨가된 ^{99m}Tc -과테크네튬을 환원시키는데 필요하고, 소듐 α -D-글루코헵토네이트 성분은 EC20 화합물로의 최종 킬레이트화에 앞서 새로 환원된 ^{99m}Tc 를 안정시키는데 필요하다.

^{99m}Tc -EC20은 아래와 같이 제조하였다(다시 말하면, ^{99m}Tc 의 EC20으로의 킬레이트화). 먼저, 부분적으로 물속에 잠긴 납 바이알 보호대를 보유하는 비등 용액조를 준비하였다. EC20 바이알의 상부는 70% 에탄올로 표면을 소독하고, 바이알은 적절한 보호 용기에 위치시켰다. 27-게이지 바늘이 달린 보호된 주사기를 이용하여, 0.9% 염화나트륨에 녹인 1 ml의 무균 과테크네튬나트륨 ^{99m}Tc 주사액을 보호된 바이알에 주입하였다. 바이알로부터 주사기의 제거에 앞서, 첨가된 과테크네튬의 용적과 동등한 용적의 가스를 바이알로부터 방출시켜 바이알 내부의 압력을 정상화시켰다. 바이알은 30초동안 부드럽게 회전시켜 냉동 건조된 분말을 완전히 분해시켰다. 이후, 바이알은 비등 용액조에서 납 보호대에 위치시켰다. 용액은 ~18분동안 가열하고, 이후 최소 15분동안 실온으로 냉각하였다. 상기 용액은 일광으로부터 보호된 실온(15 – 25°C)에서 보관할 수 있지만, 제조하고 6시간 이내에 사용하여야 한다.

방사성약물의 방사화학적 안정성은 일광으로부터 보호된 실온에서 최대 24시간동안 보관한 이후 HPLC로 측정하였다. ^{99m}Tc -EC20 용액($20 \mu\text{l}$)의 시료는 Waters 600E Multisolvent Delivery System과 490 UV 감지기, Bioscan EC-3200 방사선감지기, Laura v1.5 방사선크로마토그램 소프트웨어, Waters Nova-Pak C18($3.9 \times 150 \text{ mm}$) 칼럼을 이용하여 분석하였다. 주입된 시료는 20% 메탄올과 0.1% 트리플루오르아세트산을 함유하는 수성 이동상을 이용하여 1 ml/min 유속으로 등용매 용리하였다. HPLC 분석 결과는 UV 감지기(280nm)와 감마 방사선감지기로 모니터링하였다. ^{99m}Tc -EC20의 방사화학적 순도는 모든 경우에 적어도 24 시간동안 90% 이상으로 유지되었다.

실시예 4

TLC에 의한 ^{99m}Tc -EC20의 방사화학적 순도 측정

^{99m}Tc -EC20의 제조에서 방사화학적 주요 불순물은 1) ^{99m}Tc 과테크네튬, 2) ^{99m}Tc -글루코헵토네이트(리간드 교환 전구물질), 3) 비-특이적 결합 ^{99m}Tc (EC20 분자의 예상 Dap-Asp-Cys 킬레이트화 위치가 아닌 다른 위치에 결합된 ^{99m}Tc), 4) 가수분해된 ^{99m}Tc 이다. ^{99m}Tc -EC20의 가능한 임상적 용도를 검사하기 위하여, 각 불순물의 양을 측정하

고 ^{99m}Tc -EC20의 전체 방사화학적 순도를 산정하는 3-TLC-기초한 방법을 개발하였다.

[0107] 제 1 시스템에서 셀룰로오스 플레이트는 탈이온수로 개발하였다. ^{99m}Tc -EC20, ^{99m}Tc -글루코헵토네이트, 비-특이적 결합 ^{99m}Tc , ^{99m}Tc 과테크네튬은 용매 전선(solvent front)($R_f = 1.0$)으로 이동하는 반면, 가수분해된 ^{99m}Tc 는 원점에 잔류한다($R_f = 0.0$). 셀룰로오스 플레이트는 $R_f = 0.3$ (원점으로부터 1.5 cm)에서 2 조각으로 절단하고, 각 조각은 검량기(dose calibrator)를 이용하여 계산하였다. 가수분해된 ^{99m}Tc 의 비율은 아래와 같이 계산하였다: $A = \text{가수분해된 } \% ; ^{99m}\text{Tc} = (\text{아래쪽 조각에서 } \mu\text{Ci} / \text{양 조각에서 } \mu\text{Ci}) \times 100$.

[0108] 제 2 시스템에서 셀룰로오스 플레이트는 아세톤과 0.9% NaCl(7:3, v/v)으로 개발하였다. ^{99m}Tc -과테크네튬은 $R_f = 0.9$ 로 이동하는 반면, ^{99m}Tc -EC20, ^{99m}Tc -글루코헵토네이트, 비-특이적 결합 ^{99m}Tc , 가수분해된 ^{99m}Tc 는 원점에 잔류한다($R_f = 0.0$). 셀룰로오스/아세톤-염수 플레이트는 $R_f = 0.6$ (원점으로부터 3 cm)에서 2 조각으로 절단하고, 각 조각은 검량기(dose calibrator)를 이용하여 계산하였다. ^{99m}Tc -과테크네튬의 비율은 아래와 같이 계산하였다: $B = ^{99m}\text{Tc}\text{-과테크네튬 } \% = (\text{위쪽 조각에서 } \mu\text{Ci} / \text{양 조각에서 } \mu\text{Ci}) \times 100$.

[0109] 최종적으로, 제 3 시스템에서 DEAE 이온 교환 플레이트는 0.3 M Na_2SO_4 로 개발하였다. ^{99m}Tc -글루코헵토네이트는 용매 전선($R_f = 1.0$)으로 이동하고, 비-특이적 결합 ^{99m}Tc 는 $R_f = 0.6$ 으로 이동하고, ^{99m}Tc -EC20, 가수분해된 ^{99m}Tc , ^{99m}Tc -과테크네튬은 원점에 잔류한다(^{99m}Tc -EC20. $R_f = 0.1$; 가수분해된 ^{99m}Tc : $R_f = 0.0$; ^{99m}Tc 과테크네튬: $R_f = 0.3$). 셀룰로오스/ Na_2SO_4 플레이트는 원점으로부터 2.5 cm에서 2 조각으로 절단하고, 각 조각은 검량기(dose calibrator)를 이용하여 계산하였다. ^{99m}Tc -글루코헵토네이트와 비-특이적 결합 ^{99m}Tc 의 비율은 아래와 같이 계산하였다: $C = (^{99m}\text{Tc}\text{-글루코헵토네이트} + \text{비-특이적 결합 } ^{99m}\text{Tc})\% = (\text{위쪽 조각에서 } \mu\text{Ci} / \text{양 조각에서 } \mu\text{Ci}) \times 100$. 이후, ^{99m}Tc -EC20의 전체 방사화학적 순도는 아래와 같이 계산하였다: 방사화학적 순도 = $100 - (A+B+C)$.

[0110] 도 2에 도시된 바와 같이, ^{99m}Tc -EC20 제제의 HPLC 분석 결과는 피크 A-D로 표시된 4가지 방사화학적 구성요소를 보여준다. 피크 A는 유리 ^{99m}Tc 로 확인되었고 < 2%로 재현가능하게 존재한다. ^{99m}Tc -글루코헵토네이트(데이터 제시하지 않음)에서와 구별되는 피크 B는 2.8분의 체류 시간(retention time)으로 용리되었다. 상기 구성요소는 혼합물의 대략 3%를 나타내고, 예상 Dap-Asp-Cys 부분이 아닌 EC20 분자의 일부 다른 위치에서 ^{99m}Tc 킬레이트화에 기인하는 것으로 생각되었다. 피크 C와 D(각각 4.8분과 13.2분의 체류 시간)는 공식화된 방사화학적 활성의 대부분을 설명한다.

[0111] 실시예 5

[0112] Re-EC20의 합성

[0113] 52 mg(0.010 mmol) EC20과 $[\text{ReO}_2(\text{en})_2]\text{Cl}$ (52 mg, 0.14 mmol)은 각각 6 mL와 1 mL 아르곤-정화된 인산염 완충액(0.05 M, pH 5.8)에 용해시켰다. 이들 두 용액은 합치고 아르곤 대기하에 비등 용액조에서 2시간동안 가열하였다. 반응 혼합물은 동결하고 하룻밤동안 냉동 건조시켰다. 가공되지 않은 산물은 HPLC(Xterra RPI8 칼럼, 19x150 mm, 10 mM $\text{NH}_4\text{OAc}/\text{CH}_3\text{CN}$, 유속 10 mL/min; 구배 1% 내지 8%)로 정제하였다. 분획물은 수거하고 냉동 건조시키며 사용 때까지 -20°C 에 보관하였다.

[0114] 방사성 물질의 분석에는 질량 분광 시설이 가용하지 않기 때문에, 비-방사성 레늄 유사체, Re-EC20을 분석하였다. 레늄과 테크네튬 모두 물리적·화학적 특성에서 현저한 유사성을 공유하는 VIIA 군 금속이다. 또한, 이들은 유기 리간드와 유사한 복합체를 형성한다. 이런 유사한 화학적 행태는 비-방사성 레늄 유사체에 기초한 새로운 종류의 테크네튬 방사성약물의 구조 해석에 빈번하게 활용되고 있다. 흥미롭게도, Re-EC20의 HPLC 분석 결과 역시 ^{99m}Tc -EC20(크로마토그램 제시하지 않음)에서 피크 C와 D와 유사하게, 각각 5분과 14.2분에 용리하는 2개의 주요 피크를 보였다. 질량 분광 분석 결과는 이들 두 구성요소가 Re-EC20 복합체($m/z = 945$)에 상응하는 이성질

체임을 입증하였다. 실제로, 이들 종류는 도 3에 도시된 바와 같이, Dap-Asp-Cys 킬레이트화 고리에서 테크네튬-산소 결합의 *syn* 또는 *anti* 배열을 보유하는 부분입체이성질체이다. i) Re-EC20 크로마토그램에서 두 피크가 이성질성 복합체를 나타내고, ii) 테크네튬 복합체에서 유사한 이성질체가 보고되었기 때문에, ^{99m}Tc -EC20 방사선크로마토그램에서 구성요소 C와 D 역시 이성질체일 가능성이 높다.

[0115] **실시예 6**

[0116] **세포 배양**

[0117] 세포는 항생제가 없는 5% CO₂/95% 가습된 대기에서 37°C에서 10% 열-불활화된 소 태아 혈청(HIFCS)을 함유하는 엽산염-없는 RPMI 배지(FFRPMI)를 이용하여 단층으로 연속 배양하였다. 상기 HIFCS는 세포가 이런 생리학적으로 좀더 적절한 배지에서 성장을 지속할 수 있도록 하는 내인성 엽산염의 정상적인 보충을 함유하였다. 모든 세포 실험물은 지시된 경우를 제외하고, 10% HIFCS(FFRPMI/HIFCS)를 함유하는 FFRPMI를 성장 배지로 이용하여 실시하였다.

[0118] **실시예 7**

[0119] **상대적 친화성 분석**

[0120] 다양한 엽산염 유도체의 상대적 친화성은 Westerhoff et al.(Mol. Pharm., 48: 459-471 (1995))에 의해 기술된 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 간단히 말하면, FR-양성 KB 세포는 0.25% 트립신/PBS에서 실온에서 3분동안 부드럽게 트립신 처리하고, 이후 FFRPMI/HIFCS에서 회석하였다. 5분 800 x g 회전 및 1회 PBS 세척이후, 최종 세포 펠렛은 FFRPMI 1640(혈청없음)에 부유시켰다. 세포는 증가하는 농도의 엽산염-함유 검사 물질의 유무하에 얼음 위에서 100 nM의 ^3H -엽산염과 함께 15분동안 배양하였다. 시료는 5분동안 10,000 x g로 원심분리하고, 세포 펠렛은 완충액에서 부유시키고 5 ml 신틸레이션 콕테일을 함유하는 개별 바이알에 이전하며, 이후 방사능을 계산하였다. 음성 대조 튜브는 FFRPMI(경쟁물질없음)에 ^3H -엽산염만을 함유하였다. 양성 대조 튜브는 1 mM 최종 농도의 엽산을 보유하고, 이들 시료에서 측정된 CPM(라벨의 비-특이적 결합을 나타냄)은 모든 시료에서 차감하였다. 상대적 친화성은 KB FR에 결합된 50%의 ^3H -엽산염을 제거하는데 필요한 화합물의 역 몰비율로 정의하고, FR에 대한 엽산의 상대적 친화성은 1로 설정하였다.

[0121] 이런 분석법을 이용하여 세포 표면 FR에 대한 결합을 엽산과 직접적으로 경쟁하는 EC20의 능력을 측정하였다. 중요하게는, 1.0의 상대적 친화성 값은 검사 물질 리간드가 FR에 대하여 엽산과 동등한 친화성을 보유한다는 것을 의미한다. 유사하게, 1보다 작은 값은 약한 친화성을 반영하고, 1보다 큰 값은 강한 친화성을 반영한다.

[0122] 배양된 KB 세포는 증가하는 농도의 비-방사성 엽산, EC20, 레늄-EC20(이성질체 A; 피크 C), 레늄-EC20(이성질체 B; 피크 0), 또는 관련된 엽산염-기초한 방사성약물, DTPA-엽산염의 존재하에 100 nM ^3H -엽산염과 함께 배양하였다. 4°C에서 15분 배양한 이후, 세포는 결합되지 물질을 세척하여 제거하고 잔류 세포-연관된 방사능을 계산하였다. 결합된 방사능의 양은 결합되지 않은 리간드의 농도에 대하여 도면에 기입하고 IC₅₀ 값(^3H -엽산 결합을 50% 차단하는데 요구되는 리간드의 농도)을 예측하였다. 도 4와 표 2에 도시된 바와 같이, EC20은 사람 FR에 대한 엽산의 친화성과 비교하여 0.92의 친화성을 보유하는 것으로 확인되었다. 레늄-EC20의 양 이성질체는 부모 EC20 분자와 매우 유사한 상대적 친화성 값(Re-EC20 이성질체 A와 이성질체 B에서 각각 1.42와 1.37)을 보였다. DTPA-엽산염, ^{111}In -킬레이트화 엽산염 방사성약물은 엽산 수용체에 대하여 0.87의 상대적 친화성을 보였다. 따라서, 다양한 금속 킬레이트화 모티프를 이용한 엽산염의 화학적 변형은 FR에 대한 비타민의 내적 친화성을 교란하지 않았다.

[0123] **표 2**

[0124] **상대적 친화성 예측.** 상대적 친화성(RA)은 FR-양성 KB 세포에 결합된 50%의 ^3H -엽산염을 제거하는데 필요한 화합물의 역 몰비율로 정의하였다. 엽산의 상대적 친화성은 1로 설정하였다. 각 검사 물질은 삼중으로 평가하였다.

[0125]

검사 물질	IC ₅₀ (nM)	S.D.	RA	S.D.
엽산	118	±19	1.00	
EC20	128	±25	0.92	±0.23
EC20:Re 이성질체 1	83	±16	1.42	±0.36
EC20:Re 이성질체 2	86	±3	1.37	±0.23
DPTA-엽산염	136	±12	0.87	±0.16

[0126]

실시예 8

[0127]

시간-의존성 세포 흡수

[0128]

KB 세포는 12-웰 Falcon 플레이트에 접종하고 하룻밤동안 합류이하 단층을 형성시켰다. 1 ml의 새로운 FFRPMI/HIFCS로 1회 세척한 이후, 각 웰에 10 nM ^{99m}Tc-EC20을 함유하는 1 ml FFRPMI/HIFCS를 투입하고, 이후 1 ml의 차가운 PBS, pH 7.4로 4회 세척하였다. 세포 단층은 1% 소듐 도데실 설페이트를 함유하는 0.5 ml PBS, pH 7.4에 실온에서 15분동안 용해시키고, 이후 Packard 감마 계측기를 이용하여 방사능을 계산하였다. 각 시료에서 단백질은 BioRad DC 단백질 분석 키트를 이용하여 정량하고, 세포 단백질 수치는 세포당 2.23x10⁻⁷ mg 단백질의 전환 계수를 활용하여 세포수로 전환시켰다. 최종 요약된 수치는 세포당 EC20의 분자 관계로 표시하였다.

[0129]

이런 프로토콜을 활용하여 FR-양성 KB 세포로 ^{99m}Tc-EC20 흡수의 동역학을 정량적으로 측정하였다. 도 5에 도시된 바와 같이, 항정-상태 흡수는 37℃에서 2시간 이내에 도달하였는데, 여기서 대략 3.2백만개의 EC20 분자가 세포-결합되었고, 반면 반-극대 세포 결합은 10 nM의 상기 방사성약물과 세포를 혼합한 이후 9분에 나타났다. 흥미롭게도, 10배 높은 농도의 ^{99m}Tc-EC20(100 nM; 데이터 제시하지 않음)과 함께 세포를 배양하면 37초만에 반-극대 포화점에 도달하였다.

[0130]

실시예 9

[0131]

농도-의존성 세포 흡수

[0132]

KB 세포는 12-웰 Falcon 플레이트에 접종하고 하룻밤동안 합류이하 단층을 형성시켰다. 1 ml의 새로운 FFRPMI/HIFCS로 1회 세척한 이후, 각 웰에 증가하는 농도의 ^{99m}Tc-EC20을 함유하는 1 ml FFRPMI/HIFCS를 투입하였다. 이후, 세포는 37℃에서 2시간동안 배양하고 1 ml의 차가운 PBS, pH 7.4로 4회 세척하였다. 세포 단층은 1% 소듐 도데실 설페이트를 함유하는 0.5 ml PBS, pH 7.4에 실온에서 15분동안 용해시키고, 이후 Packard 감마 계측기를 이용하여 방사능을 계산하였다. 단백질 함량은 전술한 바와 같이 측정하고, 최종 요약된 수치는 세포당 EC20의 분자 관계로 표시하였다.

[0133]

도 6에 도시된 바와 같이, ^{99m}Tc-EC20의 세포 흡수는 세포의 농도에 의존하는 것으로 밝혀졌다. 이용된 특정 KB 세포는 세포당 최대 4백만개의 엽산염 방사성약물 분자와 결합하는 것으로 확인되었다. 상기 데이터의 스캐차드 분석에서 결합의 K_D가 3.2 nM로 예측되었는데, 이런 수치는 이들 동일 세포에 결합하는 비타민 엽산염에서 관찰된 K_D에 필적한다.

[0134]

피크 B 구성요소의 완전한 실체가 확립되지는 않았지만, UV 흡수 분석에서 상기 구성요소가 엽산염 부분을 보유하는 것으로 나타났다(다시 말하면, 흡수 스펙트럼이 363 nm에서 엽산염의 신호 종속적 흡수 피크를 보유하였다). 이런 HPLC-정제된 방사선표지된 물질(피크 B 물질)은 수거하고, 이후 배양된 KB 세포에 첨가하였다. 도 7에 도시된 바와 같이, ^{99m}Tc-표지된 피크 B 구성요소의 세포 흡수 역시 세포의 농도에 의존하는 것으로 밝혀졌다. 상기 데이터의 스캐차드 분석에서 결합의 K_D가 1.1 nM로 예측되었다. 흥미롭게도, 피크 B의 세포 결합은 과도한 엽산의 존재하에 완전히 차단되었는데, 이는 이런 제제화 부산물 역시 방사선단 목적으로 FR-양성 세포를 표적할 수 있음을 암시한다.

[0135]

실시예 10

[0136]

혈액 제거

- [0137] 본 연구에 이용된 동물은 투약에 앞서 대략 3주동안 엽산염-없는 사료(Harlan #TD-90261)를 공급하였다. 이런 맞춤된 사료로의 풍토 순화(acclimation)는 필수적인데, 그 이유는 통상적인 설치류 사료가 다량의 엽산(6 mg/kg chow)을 함유하고 생쥐에서 높은 혈청 엽산염 수준을 조장하기 때문이다. 게다가, 선행 연구에서 3주동안 엽산염-없는 사료를 섭취한 생쥐가 사람 혈청에서 측정가능한 9-14 nM 농도보다 약간 더 높은 25 ± 7 nM의 혈청 엽산염 수준을 안정적으로 유지하는 것으로 밝혀졌다.
- [0138] ^{99m}Tc -EC20 용액은 사용 당일에 제조하는데, 최초 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ EC20을 함유하였다. 상기 용액은 무균 염수로 추가로 희석하여 작업 원액을 준비하였다. 산물의 방사화학적 순도는 TLC에 의해 ~94%로 예측되었다. 각 동물은 짧은 디에틸 에테르 마취동안 꼬리 정맥을 통하여 대략 1.0 ml 부피 i.v.로 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ EC20($67 \text{ nmol}/\text{kg}$)을 투여하였다. 주사이후 지정된 시점(참조: 도 8)에서, 각 동물은 CO_2 질식으로 안락사시키고, 직후에 심장 천자(cardiac puncture)로 채혈하였다.
- [0139] 도 8에 도시된 바와 같이, ^{99m}Tc -EC20은 Balb/c 생쥐에서 순환계로부터 급속하게 제거되었다. 상기 방사성약물의 혈장 반감기는 ~4분으로 예측되었고, 4시간후, 주사된 ^{99m}Tc -EC20 분량의 0.2% 미만이 순환계에 잔존하였다(혈액이 전체 체중의 5.5%를 차지한다고 가정함). 상기 데이터는 엽산염 공액체가 정맥내 투여이후 급속하게 제거되고, 혈액유래 방사능으로 인한 비-특이적 조직 흡수의 우려없이 주사이후 수시간 이내에 귀중한 조직 체내분포 데이터를 획득할 수 있음을 암시한다.
- [0140] **실시예 11**
- [0141] **조직 분포 연구**
- [0142] 생체내에서 종양을 표적하는 ^{99m}Tc -EC20의 능력은 FR-양성 M109 모델을 이용하여 평가하였다. 이들 종양 세포는 Balb/c 생쥐와 동계이고, 접종후 2주이내 이내에 피하 고형 종양을 재현가능하게 형성한다. D-Glu 잔기를 추가로 보유하는 점을 제외하고 ^{99m}Tc -EC20과 구조적으로 유사한 ^{99m}Tc -EC14(즉, $\text{Pte-}_D\text{-Glu-}_D\text{-Glu-}\beta\text{Dpr-Asp-Cys}$), ^{99m}Tc -EC28(벤조일- $_D\text{-Glu-}_n\text{-Glu-}\beta\text{Dpr-Asp-Cys}$ 로 구성되는 대조제를 보유하는 비-프테로에이트), 기존에 보고된 ^{111}In -DTPA-엽산염 방사성약물 역시 본 생물검정으로 평가하였다. 중요하게는, ^{99m}Tc -EC28 대조제는 필수 프테리딘 고리 부분이 부재하기 때문에, 세포 표면 FR에 결합하지 않는다.
- [0143] 4 내지 5 주령 생쥐(Balb/c 균주)는 Harlan Sprague Dawley, Inc.(Indianapolis, IN)로부터 구입하고 실험에 앞서 3주동안 엽산염-없는 사료를 공급하였다. 동계의 FR-양성 M109 종양 세포(1×10^6 /동물)는 실험 2주전에 오른쪽 겨드랑이의 피하 세포층에 접종하였다. 모든 생쥐는 암컷이었고, 종양 중량은 실험 당일에 54.2 ± 29.8 mg이었다. ml당 $100 \mu\text{g}$ 약물을 함유하는 ^{99m}Tc -EC20 원액은 사용 당일에 제조하였는데, 이의 방사화학적 순도는 > 96%이었다. ^{111}In -DTPA-엽산염뿐만 아니라 2가지 다른 ^{99m}Tc -킬레이트제, ^{99m}Tc -EC14와 ^{99m}Tc -EC28 역시 > 90% 방사화학적 순도로 제조하였다. 모든 용액은 염수 단독으로 또는 100 당량의 엽산(경쟁을 위하여)을 함유하는 염수 용액으로 희석하여 최종 방사성약물 농도가 $10 \mu\text{mol}/\text{ml}$ 가 되도록 하였다.
- [0144] 각 동물은 짧은 디에틸 에테르 마취동안 측면 꼬리 정맥을 통하여 $100 \mu\text{l}$ 부피로 대략 $40 \mu\text{mol}/\text{kg}$ i.v. 분량의 검사 물질을 투여하였다. 주사 4시간후, 각 동물은 CO_2 질식으로 죽이고 절개하였다. 선택된 조직은 떼어내고 칭량하며 계산하여 ^{99m}Tc 분포를 확인하였다. CPM 수치는 붕괴 보정(decay correction)하고, 결과는 습식 중량 조직 g당 주사 분량 %로 요약하였다.
- [0145] 표 3에 도시된 바와 같이, 방사성약물을 포함하는 3가지 "엽산염", ^{99m}Tc -EC14, ^{99m}Tc -EC20, ^{111}In -DTPA-엽산염은 FR-양성 종양과 신장에 집중적으로 축적되긴 하지만, 종양에서보다 신장에서 조직 g당 좀더 높은 비율로 주사 분량(%ID/g)이 농축되었다. 흥미롭게도, ^{111}In -DTPA-엽산염과 ^{99m}Tc -EC20의 순 종양 축적(net tumor accumulation)은 거의 동일하고(각각 19와 17 %ID/g), 반면 ^{99m}Tc -EC14의 종양 흡수는 ~10% ID/g로 다소 적었다. 그럼에도 불구하고, 이들 3가지 약물은 높은 종양 대 혈액 비율(> 30 내지 1)을 보였다.

표 3

피하 M109 종양을 보유하는 Balb/c 생쥐에서 엽산염 방사성약물의 체내분포

	% Injected Dose per Gram Tissue (4hr post intravenous injection)*						
	^{99m} Tc-EC14	^{99m} Tc-EC14 + Folic acid	^{99m} Tc-EC20	^{99m} Tc-EC20 +Folic acid	¹¹¹ In-DTPA- Folate	¹¹¹ In-DTPA- Folate + Folic acid	^{99m} Tc-EC28
Blood	0.31 ± 0.14	0.19 ± 0.07	0.34 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.21 ± 0.10	0.09 ± 0.04	0.06 ± 0.04
Heart	2.39 ± 0.64	0.08 ± 0.01	1.57 ± 0.26	0.08 ± 0.01	2.57 ± 0.82	0.06 ± 0.02	0.03 ± 0.01
Lung	2.08 ± 0.40	0.15 ± 0.04	2.22 ± 0.63	0.31 ± 0.26	1.72 ± 0.61	0.09 ± 0.2	0.05 ± 0.01
Liver	3.44 ± 2.19	1.37 ± 0.98	3.56 ± 0.25	1.15 ± 0.22	5.21 ± 2.63	0.81 ± 0.03	0.50 ± 0.26
Spleen	2.68 ± 2.49	2.99 ± 1.43	0.95 ± 0.15	0.38 ± 0.33	3.30 ± 2.33	1.46 ± 0.73	0.60 ± 0.38
Intestine	1.70 ± 0.55	0.32 ± 0.11	2.56 ± 0.61	2.93 ± 1.49	1.87 ± 0.69	0.82 ± 0.14	0.47 ± 0.19
Kidney	98.0 ± 40.7	5.94 ± 0.52	138 ± 12.4	5.64 ± 2.13	191 ± 79.2	3.14 ± 1.96	0.62 ± 0.14
Muscle	0.99 ± 0.28	0.09 ± 0.11	0.67 ± 0.20	0.06 ± 0.02	1.19 ± 0.48	0.05 ± 0.04	0.02 ± 0.01
Stomach	1.47 ± 0.58	0.10 ± 0.03	1.45 ± 0.55	3.35 ± 5.19	1.62 ± 0.65	0.25 ± 0.20	0.21 ± 0.19
Tumor	9.83 ± 2.77	0.43 ± 0.52	17.2 ± 1.02	0.45 ± 0.18	19.3 ± 5.86	0.46 ± 0.42	0.11 ± 0.06
Tumor/Blood	34.1 ± 7.41	2.00 ± 2.00	51.0 ± 8.20	4.70 ± 1.30	102 ± 43.4	5.00 ± 4.60	2.00 ± 0.50

* 도시된 수치는 3마리 동물로부터 얻은 데이터의 평균 ± s.d.이다.

엽산염-특이적 표적화는 2가지 상이한 방법에 의해 더욱 뒷받침되었다. 첫째, FR-양성 종양과 신장에서 ^{99m}Tc-EC14, ^{99m}Tc-EC20, ¹¹¹In-DTPA-엽산염이 100배 과량의 엽산과 동시-투여되는 경우에 이들의 축적이 효과적으로 차단되었다(> 94%). 둘째, ^{99m}Tc-EC28 대조제는 신장과 종양에서 적절히 축적되지 않았다. 양 관찰 결과는 표적된 흡수 및 이들 방사성약물의 FR-양성 조직으로의 체류에 손상되지 않은 "엽산염-유사"(또는 프테로에이트) 부분이 요구됨을 입증한다.

실시예 12

감마 신티그래피

M109 종양 세포(1 x 10⁶/동물)는 실험 2주전에 Balb/c 생쥐의 오른쪽 겨드랑이의 피하 세포층에 접종하였다. 각 동물은 짧은 디에틸 에테르 마취동안 측면 꼬리 정맥을 통하여 100 μl 부피로 대략 50 μmol/kg i.v. 분량의 검사 물질을 투여하였다. 주사 4시간후, 각 동물은 CO₂ 질식으로 죽이고, 이후 영상 획득 표면의 상부에 위치시켰다. 전신 영상 획득은 Technicare Omega 500 Sigma 410 핵종 감마 카메라를 이용하여 분당 50-75,000 계수의 계수율(count rate)로 1분동안 실시하였다. 모든 데이터는 Medasys Pinnacle 소프트웨어가 설치된 Medasys MS-DOS-기초한 컴퓨터를 이용하여 분석하였다.

이런 감마 신티그래피 프로토콜을 활용하여 FR-양성 M109 종양과 신장에 의한 ^{99m}Tc-EC20의 흡수를 확인하였다. 도 9에 도시된 바와 같이, 앞서 기술된 ^{99m}Tc-EC20으로 주사된 생쥐의 복부 영상에서 2개의 신장(k)과 M109 종양 덩어리(T; 어깨 부위)에 감마 방사능이 관찰되었다. 다른 신체 조직에서는 감지가능한 방사능추적자가 관찰되지 않았다. ¹¹¹In-DTPA-엽산염 방사성약물에서 유사한 영상 프로필이 보고되었다.

실시예 13

소변 배출과 대사

^{99m}Tc-EC20의 소변 HPLC 중분화 프로필은 Balb/c 생쥐를 이용하여 얻었다. 생쥐(각 ~20g)는 측면 꼬리 정맥을 통하여 1 mCi(6.7 nmol) ^{99m}Tc-EC20을 투여하였다. 1, 4 또는 6 시간후, 두 생쥐군은 CO₂ 질식으로 안락사시키고 소변을 수거하였다. GV13 Millex 필터를 통하여 여과한 이후, Nova-Pak C18 3.9 x 150 mm 칼럼과 방사화학적 감지기가 구비된 HPLC 장치를 이용하여 방사화학적 중분화(speciation)를 평가하였다. 상기 장치는 0.1% TFA를 함유하는 20% 메탄올로 1 ml/min의 유속으로 등용매 용리하였다.

¹¹¹In-DTPA-엽산염에 대한 일차 제거 경로는 소변인 것으로 앞서 확인되었다. 도 2에 도시된 HPLC 프로필과 유사하게, ^{99m}Tc-EC20 표준과 소변 시료 모두 4가지 방사성 피크를 보였다. 표 4에 도시된 바와 같이, 표준의 방사화학적 순도(*syn*과 *anti* ^{99m}Tc-EC20에 상응하는 것으로 추정되는 피크 C와 D의 합)는 6시간의 실험 기간동안 ~93%로

일정하게 유지되었다. 표준(피크 A)에서 유리 ^{99m}Tc 의 함량은 ~2%이었다. 중요하게는, 상기 방사화학적 프로파일 내에서 피크 B는 비정상적인 다소 불안정한 위치에서 ^{99m}Tc 로 킬레이트된 EC20인 것으로 생각되는데, 이런 분획물에서 측정된 방사능은 ^{99m}Tc -EC20에 대한 전체 방사화학적 순도 예측에 포함되지 않았다. 종합적으로, 이런 데이터는 상기 제제가 6시간의 실험 기간동안 염수 용액에서 안정적으로 유지된다는 것을 암시한다.

[0159] Balb/c 생쥐에 주사이후 1시와 4시 시점에, 생쥐 소변에서 ^{99m}Tc -EC20의 방사화학적 종분화 프로파일은 변하지 않았다. 하지만, 주사이후 6시 시점에는 소변에 존재하는 방사능이 너무 적어 HPLC에 의한 정확한 분석이 불가능하였다. 소변에서 회수된 방사성 화학종에서 부모 약물의 비율은 정량이 가능한 4시간동안 대략 90%로 상대적으로 일정하게 유지되었다. 상기 수치는 표준의 93% 순도와 매우 유사한데, 이는 ^{99m}Tc -EC20이 변형되지 않은 형태로 소변으로 주로 배출된다는 것을 암시한다.

[0160] **표 4**

[0161] Balb/c 생쥐로부터 ^{99m}Tc -EC20의 배출과 대사. 생쥐는 측면 꼬리 정맥을 통하여 1 mCi(6.7 nmol) ^{99m}Tc -EC20을 투여하였다. 지정된 시점에서, 두 생쥐군은 CO_2 질식으로 안락사시키고 소변을 수거하였다. 이후, HPLC 장치를 이용하여 방사화학적 종분화(speciation)를 평가하였다. 피크 C와 D(syn과 anti 이성질체)의 영역 비율 합계를 이용하여 손상되지 않은 ^{99m}Tc -EC20의 전체 순도를 산정한다.

[0162]

피크	RT(min)	영역 비율						
		^{99m}Tc -EC20 표준			소변 시료(2마리 생쥐/시점)			
		0 hr	1 hr	6 hr	1 hrs	4 hr		
A(과테크네튬)	1.4	2	2.1	1.8	8.3	6.3	9.4	10.2
B(미지)	3.4	4.5	4.5	4.8	2.5	2.6	5.4	0
C(이성질체 1)	5.5	15.5	15.7	15.9	20.4	18.1	7.3	11.1
D(이성질체 2)	18.5	78	77.7	77.5	68.8	73	77.9	78.7
C와 D 합계		93.5	93.4	93.4	89.2	91.1	85.2	89.8

[0163] **실시예 14**

[0164] **혈청 단백질 결합**

[0165] 새로운 쥐 혈청 및 공업용 남성 혈청(AB형 공여자, Sigma Chemical Co.)을 사용하여 혈청 단백질에 ^{99m}Tc -EC20의 시험관내 결합을 평가하였다. 실온에서 ^{99m}Tc -EC20을 1 ml 혈청과 혼합하고 1분후, 0.3 ml 혈청 용액을 청결한 Amicon Centrifree® 한외여과 장치(30,000NMWL)에 삼중으로 이전하였다. 원심분리기에 혈청 용액을 적하하고 1분 이내에, 20℃에서 1000 x g에서 20분동안 회전시켰다. 원액의 50 μl 시료와 각 장치로부터 유래된 여과물의 50 μl 시료는 청결한 튜브에 이전하고 자동 감마 계측기에서 계산하였다. 1 ml 정상 염수와 혼합된 ^{99m}Tc -EC20의 대조 용액은 동일한 방식으로 한외여과하였다. 3개의 시료 각각에서 유리 ^{99m}Tc 의 비율을 산정하였다.

[0166] ^{99m}Tc -EC20이 한외여과 장치에 경미한 수준의 비-특이적 결합(~5%)을 보이긴 하지만, 이중 대략 70%는 쥐 또는 사람 혈청(각각 69%와 72%) 용액에서 > 30kDa 혈청 단백질 분획물과 집중적으로 결합하는 것으로 밝혀졌다. 중요하게는, ^{99m}Tc -EC20이 FR-양성 조직에 효과적이고 우선적으로 축적되기 때문에(참조: 표 2와 도 8), 혈청 단백질에 대한 이의 명백한 친화성은 생체내에서 FR을 표적하는 이런 방사성추적자의 능력에 영향을 주지 않는 것으로 보인다.

[0167] **실시예 15**

[0168] **조직 분포 연구**

- [0169] 본 실시예에 이용되는 프로토콜은 실시예 11에 기술된 프로토콜과 유사하다. 생체내에서 종양을 표적하는 ^{99m}Tc -EC20의 능력은 FR-양성 M109와 FR-음성 4T1 종양 모델을 이용하여 추가로 평가하였다. 6주령 암컷 Balb/c 생쥐 ($n = 3/\text{투약군}$)는 Harlan Sprague Dawley, Inc.(Indianapolis, IN)로부터 구입하고, 종양 세포 접종에 앞서 7일동안 엽산염-없는 사료(Harlan TEKLAD)를 공급하였다.
- [0170] 동계의 FR-양성 M109 종양 세포(2×10^6 Po/동물) 또는 FR-음성 4T1 세포(5×10^5 Po/동물)는 1% 동계 생쥐 혈청을 함유하는 $100 \mu\text{l}$ 엽산염-없는 RPMI-1640에서 피하 접종하였다. ml 당 $100 \mu\text{g}$ 약물을 함유하는 ^{99m}Tc -EC20 원액은 전술한 바와 같이 사용 당일에 제조하였다.
- [0171] 종양 세포 접종후 16일에, 각 동물은 M109 종양-보유 동물의 경우에 500 또는 1800 nmol/kg EC20 및 4T1 종양-보유 동물의 경우에 500 nmol/kg EC20을 정맥내 주사하였다(3마리 생쥐/투약군). 모든 주사액은 $100 \mu\text{l}$ 부피이었다. 주사 4시간후, 각 동물은 CO_2 질식으로 죽이고 심장 천자(cardiac puncture)로 채혈하며 절개하였다. 선택된 조직(심장, 폐, 간, 비장, 신장, 내장, 위, 근육, 종양)은 떼어내고 칭량하며 자동 감마 계측기에서 계산하여 ^{99m}Tc 분포를 확인하였다. 습식 중량 조직의 주사 용량 비율(% ID/g)의 측면에서 방사성약물의 흡수는 주사 제제의 회석액으로부터 준비된 표준을 기준하여 산정하였다.
- [0172] 도 11에 도시된 바와 같이, 엽산염 수용체-특이적 표적화가 입증되었는데, 그 이유는 ^{99m}Tc -EC20이 FR-양성 M109 종양과 신장에 집중적으로 축적되고 FR-음성 4T1 종양에는 축적되지 않았기 때문이다. FR-음성 4T1 종양에서 흡수는 FR-양성 M109 종양에서보다 7.6배 낮았다. 예상대로 신장을 제외한 정상 조직에서 ^{99m}Tc -EC20의 흡수는 낮게 나타났다. 이들 결과는 ^{99m}Tc -EC20 표적화가 FR-특이적임을 입증한다.
- [0173] **실시예 16**
- [0174] **조직 분포 연구**
- [0175] 본 실시예에 이용되는 프로토콜은 실시예 11에 기술된 프로토콜과 유사하다. FR-양성 KB 종양 모델을 이용하여, 생체내에서 종양을 표적하는 ^{99m}Tc -EC11(펩티드- A_1), ^{99m}Tc -EC13(펩티드- A_3), ^{99m}Tc -EC14(펩티드- A_2)의 능력을 평가하였다. 4주령 수컷 누드 생쥐($n = 4/\text{군}$)는 종양 세포 접종에 앞서 10일동안 엽산염-없는 사료를 공급하였다.
- [0176] FR-양성 KB 종양 세포(0.25×10^6 /동물)는 낭내 부위에 피하 접종하였다. 종양 세포 접종 14일후, 동물은 표 5에 도시된 공액체 분량(대략 $12 \mu\text{g/kg}$)의 ^{99m}Tc -EC11, ^{99m}Tc -EC13 또는 ^{99m}Tc -EC14를 정맥내 주사하였다. ^{99m}Tc -EC11, ^{99m}Tc -EC13, ^{99m}Tc -EC14 원액은 전술한 바와 같이 사용 당일에 제조하였다. 대략 20배 과량의 유리 엽산염(대략 $200 \mu\text{g/kg}$)을 대조 동물($n = 4/\text{군}$)에 동시 투여하였다. 주사 4시간후, 각 동물은 CO_2 질식으로 죽이고 심장 천자(cardiac puncture)로 채혈하며 절개하였다. 선택된 조직은 떼어내고 칭량하며 자동 감마 계측기에서 계산하여 ^{99m}Tc 분포를 확인하였다. 습식 중량 조직의 주사 용량 비율(% ID/g)의 측면에서 방사성약물의 흡수는 주사 제제의 회석액으로부터 준비된 표준을 기준하여 산정하였다.
- [0177] 표 5에 도시된 바와 같이, 엽산염 수용체-특이적 표적화가 입증되었는데, 그 이유는 ^{99m}Tc -EC11, ^{99m}Tc -EC13, ^{99m}Tc -EC14가 FR-양성 KB 종양과 신장에 집중적으로 축적되었기 때문이다. 이런 축적은 유리 엽산염의 동시-투여에 의해 차단되었다. 이들 결과는 ^{99m}Tc -EC11, ^{99m}Tc -EC13, ^{99m}Tc -EC14가 FR-특이적인 방식으로 생체내에서 종양을 표적할 수 있음을 입증한다.
- [0178] ^{99m}Tc -EC53의 분량이 대략 $50 \mu\text{g/kg}$ 이고 대략 100배 과량의 유리 엽산염 또는 냉각된 EC53이 사용된 점을 제외하고 유사한 프로토콜을 활용하여, ^{99m}Tc -EC53(EC20의 D-거울상이성질체)에서 유사한 결과(참조: 표 6)를 얻었다. 표 6에 도시된 바와 같이, 엽산염 수용체-특이적 표적화가 입증되었는데, 그 이유는 ^{99m}Tc -EC53이 FR-양성 KB 종양과 신장에 집중적으로 축적되었기 때문이다. 이런 축적은 유리 엽산염의 동시-투여에 의해 차단되었다. 이들 결과는 ^{99m}Tc -EC53이 FR-특이적인 방식으로 생체내에서 종양을 표적할 수 있음을 입증한다.

	Peptide A ₁ -Folate (EC 11)		Percentage of Injected ^{99m} Tc Dose per Gram (Tissue Wet Mass)				HYNIC-Folate
	0.112 ± 0.027	0.125 ± 0.032	Peptide A ₁ -Folate (EC14)	0.160 ± 0.037	0.171 ± 0.044	Peptide A ₁ -Folate (EC15)	0.179 ± 0.060
Tumor mass (g):	0.112 ± 0.027	0.125 ± 0.032	0.160 ± 0.037	0.171 ± 0.044	0.213 ± 0.067	0.0773 ± 0.041	0.150 ± 0.068
Animal mass (g):	28.9 ± 1.3	27.1 ± 1.6	27.6 ± 0.6	27.3 ± 2.7	30.0 ± 1.3	27.5 ± 1.4	29.0 ± 2.0
Animal Quantity & Gender:	4M	4M	4M	4M	4M	4M	4M
Folate-Conjugate Dose (µg/kg):	11.9 ± 0.5	13.04 ± 1.12	12.6 ± 0.4	12.87 ± 1.53	11.7 ± 0.9	13.03 ± 1.05	1.46 ± 0.08
Folic Acid Dihydrate Dose† (µg/kg):	0	195.1 ± 17.9	0	192.6 ± 22.9	0	191.7 ± 15.5	169.6 ± 9.4
(µmol/kg):	0	0.41 ± 0.04	0	0.40 ± 0.05	0	0.40 ± 0.03	0.36 ± 0.02
Blood:	0.21 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.25 ± 0.03	0.16 ± 0.02	0.31 ± 0.06
Heart:	2.5 ± 0.3	0.36 ± 0.03	3.0 ± 0.5	0.24 ± 0.01	1.6 ± 0.1	0.20 ± 0.03	3.4 ± 0.3
Lungs:	1.2 ± 0.2	0.35 ± 0.03	1.6 ± 0.3	0.24 ± 0.02	1.1 ± 0.1	0.23 ± 0.02	1.2 ± 0.2
Liver & Gall Bladder:	5.4 ± 1.4	1.6 ± 0.1	4.5 ± 1.0	0.66 ± 0.07	3.5 ± 0.7	0.65 ± 0.04	3.9 ± 0.9
Spleen:	0.38 ± 0.03	0.23 ± 0.01	0.41 ± 0.06	0.15 ± 0.01	0.39 ± 0.06	0.15 ± 0.02	0.39 ± 0.12
Kidney (one):	67.8 ± 6.9	55.5 ± 2.3	44.2 ± 6.4	20.6 ± 2.4	54.5 ± 2.4	29.1 ± 2.2	41.2 ± 8.4
Stomach, Intestines & Contents:	1.4 ± 0.1	1.1 ± 0.3	1.4 ± 0.1	0.50 ± 0.10	2.5 ± 0.2	3.7 ± 0.7	1.5 ± 0.2
Muscle:	1.8 ± 0.1	0.38 ± 0.06	2.4 ± 0.4	0.26 ± 0.02	1.7 ± 0.2	0.21 ± 0.03	2.2 ± 0.3
Tumor:	2.95 ± 0.57	1.47 ± 0.24	5.57 ± 0.76	2.0 ± 0.5	5.46 ± 0.45	1.67 ± 0.24	4.64 ± 0.67
Tumor/Blood:	13.7 ± 2.1	5.9 ± 0.9	29.3 ± 5.2	17.0 ± 4.5	22.5 ± 1.4	10.2 ± 1.5	15.1 ± 2.1
Tumor/Liver:	0.57 ± 0.14	0.94 ± 0.09	1.3 ± 0.3	3.0 ± 0.6	1.6 ± 0.2	2.6 ± 0.3	1.3 ± 0.3
Tumor/Kidney:	0.043 ± 0.005	0.027 ± 0.005	0.13 ± 0.03	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.058 ± 0.010	0.069 ± 0.003
Tumor/Muscle:	1.6 ± 0.3	3.9 ± 0.08	2.4 ± 0.6	7.7 ± 1.7	3.3 ± 0.3	8.2 ± 2.0	6.5 ± 1.3

도시된 수치는 평균±표준 편차이다. 혈액은 전체 체중의 5.5%를 차지한다고 가정하였다.

상용하는 주사 분량 %/g 데이터에 기초한 중앙/배경 조직 비율

+ ^{99m}Tc-엽산염-공액체와 동시-투여된 엽산 .
n=3

표 6

	^{99m} Tc-EC53		^{99m} Tc-EC53 plus Folic Acid		^{99m} Tc-EC53 plus EC53	
	Average	STD	Average	STD	Average	STD
Test Article Dose (μg/kg)	50.0		50.0		50.0	
(nmol/kg)	67.0		67.0		67.0	
Co-dosed competitor (nmol/kg)			6700.0		6700.0	
Tumor mass (g)	0.2	0.17	0.20	0.14	0.19	0.15
Animals	3F		3F		3F	
blood	0.38	0.03	0.244	0.028	0.24	0.06
heart	1.09	0.28	0.15	0.03	0.19	0.03
lung	0.89	0.30	0.23	0.04	0.26	0.07
liver	3.86	0.96	4.49	1.15	3.77	0.48
intestine	3.53	0.86	4.33	3.67	3.96	1.86
kidney	77.99	6.19	10.12	6.91	7.97	1.52
muscle	0.76	0.31	0.11	0.04	0.12	0.06
spleen	0.67	0.22	0.27	0.06	0.41	0.11
stomach	1.04	0.36	0.30	0.15	0.18	0.01
Tumor	11.77	4.26	0.53	0.11	1.88	1.56
Tumor/Blood	31.4	13.7	2.2	0.6	4.5	4.8
Tumor/Liver	3.4	2.2	0.1	0.0	0.3	0.4
Tumor/Muscle	17.1	7.0	5.2	1.4	8.5	8.0
Tumor/Kidney	0.2	0.07	0.07	0.05	0.14	0.16

고찰

본 발명은 영상제로써 임상 개발된 비타민과 방사성핵종 킬레이터의 공액체를 제공한다. 이런 영상제의 전형은 새로이 설계되고 합성되며 방사화학적으로 특성화된 엽산염-기초한 방사성핵종 킬레이터, ^{99m}Tc-EC20이다.

D-γ-Glu 펩티드 결합을 보유하는 엽산염의 소형 분자량 펩티드인 ^{99m}Tc-EC20(도 1)은 효율적인 고체-상 합성 과정을 이용하여 합성하였다. 자연 상태에서 엽산염(또는 프테로일-글루타메이트)은 L 배열로 존재하는 단일 글루타미드 잔기를 보유한다. 하지만, D-Glu 거울상이성질체 잔기가 EC20 분자에 통합되었다. EC20과 유사하게, 엽산에서 L-Glu 잔기의 D-Glu 잔기로의 치환은 높은 친화성으로 FR과 결합하는 엽산의 능력을 변화시키지 않았다.

EC20은 α-D-글루코헵토네이트와 tin(II) 클로라이드의 존재하에서 ^{99m}Tc를 효과적으로 킬레이트하는 것으로 밝혀졌다. 방사화학적 HPLC에 의한 분석에서, 생성 ^{99m}Tc-EC20 제제의 > 95%가 동등하게 높은 친화성으로 FR과 결합할 수 있는 *syn*과 *anti* 입체이성질체의 혼합물로 구성되었다(도 3). 상기 제제에서 ^{99m}Tc의 대략 3%는 EC20 분자의 예상 Dap-Asp-Cys 부분이 아닌 다른 위치에서 EC20에 킬레이트되었다. 이런 구성요소는 최적 특성화에 충분한 양으로 분리되지는 않았지만, 높은 친화성으로 FR에 결합하는 것으로 밝혀졌다(도 6). 최종적으로, ^{99m}Tc-EC20 제제에서 나머지 2%의 방사능은 유리 ^{99m}Tc에 기인하였다.

^{99m}Tc-EC20은 FR-양성 세포에 시간-과 농도-의존성 결합을 보였다. ^{99m}Tc-EC20은 혈액에서 신속하게 제거되는데

($t_{1/2} \sim 4$ 분), 이는 진단 영상제에서 중요하며, ^{99m}Tc -EC20은 FR-양성 종양 내에서 다량으로 집중적으로 축적되었다.

[0188] ^{99m}Tc -EC20의 효능은 2가지 상이한 방법을 이용하여 유사한 FR 표적화 약물, ^{111}In -DTPA-엽산염의 효능과 비교하였다. 첫째, 양 엽산염-기초한 방사성약물은 KB FR에 대한 결합에서 엽산과 동등하게 경쟁하는 것으로 밝혀졌다(도 3과 표 1). 둘째, 종양-보유 생쥐에서 각 약물의 체내분포가 거의 동일하였다(표 2). ^{99m}Tc -EC20에서 높은 종양 흡수와 종양-대-혈액 비율이 측정되었다. 종합적으로, 이들 결과는 ^{111}In -DTPA-엽산염과 유사하게, ^{99m}Tc -EC20이 환자에 임상적으로 투여되면 FR-양성 종양에 효과적으로 집중된다는 것을 암시한다.

[0189] 여러 엽산염-기초한 ^{99m}Tc -공액체가 이미 보고되었다. ^{99m}Tc -12-아미노-3,3,9,9-테트라메틸-5-옥사-4,8 디아자-2,10-도데칸디노에 디녹심(OXA) 엽산염 공액체에 관한 제한된 생체분포 데이터가 가용하긴 하지만, KB 종양에서 경미한 수준($\sim 7\%$ ID/g)의 추적자 흡수가 보고되었다. 유선 종양-보유 쥐에서 ^{99m}Tc -에틸렌디시스테인-엽산염 공액체의 체내분포와 관련된 연구가 또한 보고되었다. 상기 연구에서 쥐는 엽산염-풍부한 사료를 공급하였다. 이에 따라, 종양 흡수와 종양-대-혈액 비율이 낮게 나타났다. 마지막으로, ^{99m}Tc -6-하이드라지노니코틴아미도-하이드라지도(HYNIC) 엽산염 유도체(HYNIC-엽산염)가 24JK-FBP 종양 내에 다량으로 축적되는 것으로 밝혀졌다. 흥미롭게도, ^{99m}Tc -EC20은 24JK-FBP 종양에서 HYNIC-엽산염의 수준($\sim 17\%$ ID/g)과 거의 동일한 수준으로 M109 종양 내에 축적되었다(표 2). 또한, 이들 두 약물은 정맥내 주사후 4시 시점에 거의 50:1의 종양-대-혈액 비율을 보였다.

[0190] 요약하면, ^{99m}Tc 를 효과적으로 킬레이트하는 엽산염의 신규한 펩티드 유도체를 만들었다. 이 신규한 화합물, ^{99m}Tc -EC20은 생체내와 시험관내에서 FR-양성 종양 세포에 강하게 결합한다. EC20은 시간-과 농도-의존성 방식으로 매우 높은 친화성($K_D \sim 3$ nM)으로, 배양된 엽산 수용체(FR)-양성 종양 세포와 결합하는 것으로 밝혀졌다. 시험관내 상대적 친화성 분석에서, EC20은 단독으로 또는 제제화된 금속 킬레이트로 제공되는 경우에 세포 결합에 대하여 ^3H -엽산과 효과적으로 경쟁하는 것으로 밝혀졌다. Balb/c 생쥐에 정맥내 주사후, ^{99m}Tc -EC20은 순환계로부터 급속하게 제거되고(혈장 $t_{1/2} \sim 4$ 분) 대사되지 않은 형태로 소변으로 배출되었다. M109 종양-보유 Balb/c 생쥐에서 실시된 감마 신티그래피 연구와 정량적 체내분포 연구로부터 얻은 데이터는 ^{99m}Tc -EC20이 FR-양성 종양과 신장 조직에 집중적으로 축적됨을 입증하였다. 이들 결과는 ^{99m}Tc -EC20이 FR-양성 종양의 감지를 위한 효과적인 비-침입성 방사진단 영상제임을 보여준다. EC11, EC13, EC14, EC53을 비롯한 다른 EC20-관련된 영상제 역시 유효한 것으로 밝혀졌다.

[0191] 미국에서는 매년 $\sim 26,000$ 명의 여성이 난소암 진단을 받고, 이들 여성중 50% 미만이 5년 이상 생존한다. 낮은 생존율의 한가지 이유는 이런 형태의 암을 진단하는 것이 어렵다는 점이다. 확인되지 않은 복부 종양의 파열 우려 및 복강 전체로 암이 확산될 가능성으로 인하여, 미세한 바늘 생검은 별로 실시되지 않고 있다. 오히려, 의심스런 난소 종양의 진단과 스테이징(staging)은 전형적으로 외과적 개복술에 의해 실시되고 있는데, 이는 침입성이고 많은 비용이 소요된다. ^{99m}Tc -EC20은 특히 난소암에서 다량으로 존재하는 FR에 강하게 결합하기 때문에, 저렴하고 비-침입성이며 신뢰할 수 있는 악성 난소암의 조기 진단 방법을 제공한다. 또한, ^{99m}Tc -EC20은 재발성이나 잔류 질환의 좀더 명확한 조기 진단을 가능하게 함으로써 임상적 결정 과정을 보조(輔導)할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1. 본 발명에서 영상제로 사용되는 전형적인 화합물, EC20의 구조.

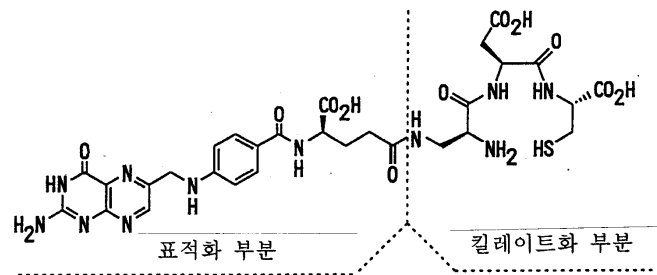
[0032] 도 2. ^{99m}Tc -EC20의 HPLC 방사선크로마토그램. ^{99m}Tc -EC20의 시료는 20% 메탄올과 0.2% 트리플루오르아세트산을 함유하는 수성 이동상을 이용하여 Waters Nova-Pak C18(3.9 x 150 mm) 칼럼에서 1 ml/min의 유속으로 등용매 용리하였다. HPLC 분석 결과는 UV 감지기(280 nm)와 Bioscan FC-3200 방사선감지기로 모니터하였다. 피크 A, 유리 ^{99m}Tc ; 피크 B, 미지 구조의 엽산염-포함 킬레이트; 피크 C와 D, EC20의 Dap-Asp-Cys 킬레이트 고리에서 테크

네튬-산소 결합의 *syn* 또는 *anti* 배열을 보유하는 부분입체이성질체.

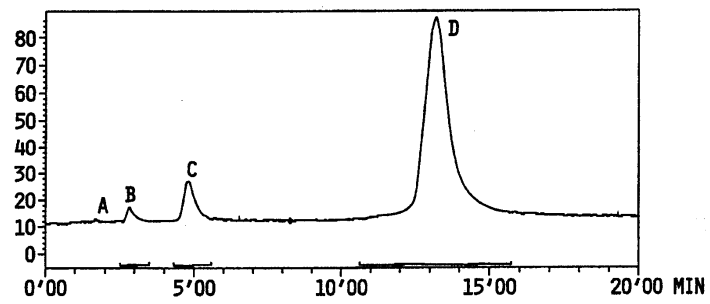
- [0033] 도 3. Re-EC20과 ^{99m}Tc -EC20 이성질체(금속-산소 결합의 *syn* 또는 *anti* 위치)의 구조.
- [0034] 도 4. 다양한 엽산염-포함 경쟁물질로 KB 세포에 대한 ^3H -엽산 결합의 차단. KB 세포는 증가하는 농도의 경쟁물질의 존재하에 100 nM ^3H -엽산과 함께 얼음 위에서 15분동안 배양하였다. (●) 엽산; (■) EC20; (▲) EC20:Re 이성질체 A; (▼) EC20:Re 이성질체 B; (□) DTPA-엽산염. 오차 막대는 1 표준 편차를 나타낸다($n = 3$).
- [0035] 도 5. ^{99m}Tc -EC20의 시간-의존성 결합. KB 세포는 37°C에서 증가하는 시간동안 10 nM ^{99m}Tc -EC20과 함께 배양하였다. 수회 세척이후, 세포는 수거하고 결합된 방사능을 계산하였다. 오차 막대는 1 표준 편차를 나타낸다($n=3$).
- [0036] 도 6. ^{99m}Tc -EC20의 농도-의존성 결합. KB 세포는 증가하는 농도의 ^{99m}Tc -EC20의 존재하에 37°C에서 2시간동안 배양하였다. 수회 세척이후, 세포는 수거하고 결합된 방사능을 계산하였다. 오차 막대는 1 표준 편차를 나타낸다($n=3$).
- [0037] 도 7. ^{99m}Tc -EC20 "피크 B"의 농도-의존성 결합. KB 세포는 ^{99m}Tc -EC20 제제로부터 크로마토그래피 분리된 증가하는 농도의 "피크 B"의 존재하에 37°C에서 2시간동안 배양하였다. 수회 세척이후, 세포는 수거하고 결합된 방사능을 계산하였다. 오차 막대는 1 표준 편차를 나타낸다($n=3$). (●), 피크 B; (o), 피크 B + 1 mM 엽산.
- [0038] 도 8. Balb/c 생쥐에서 ^{99m}Tc -EC20의 혈액 제거. 짧은 디에틸 에테르 마취동안 대략 0.1 ml에서 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EC20(67 nmol/kg)의 정맥내 분량을 각 동물에 투여하였다. 주사이후 지정된 시점에서, 각 동물은 CO_2 질식으로 안락사시키고 혈액을 수거하며 결합된 방사능을 계산하였다. 오차 막대는 1 표준 편차를 나타낸다($n=3$).
- [0039] 도 9. 전신 감마 영상(복부 관찰). 영상은 피하 엽산염 수용체-양성 M109 종양을 보유하는 Balb/c 생쥐에 ^{99m}Tc -EC20을 정맥내 투여하고 4시간후에 얻었다. 신장(K)과 종양(T)에서만 상기 방사선추적자(radiotracer)의 현저한 축적이 관찰된다.
- [0040] 도 10. EC11, EC13, EC14, EC15, EC19, EC20, EC31, EC53의 구조.
- [0041] 도 11. FR-양성 M109 종양과 FR-음성 4T1 종양을 보유하는 Balb/c 생쥐에서 ^{99m}Tc -EC20의 조직 분포.
- [0042] 도 12. EC11의 HPLC 분석.
- [0043] 도 13. EC11의 질량 분광 분석.
- [0044] 도 14. EC11의 NMR 분석.
- [0045] 도 15. EC13의 HPLC 분석.
- [0046] 도 16. EC14의 NMR 분석.
- [0047] 도 17. EC15의 질량 분광 분석.
- [0048] 도 18. EC19의 HPLC 분석.
- [0049] 도 19. EC19의 질량 분광 분석.
- [0050] 도 20. EC31의 HPLC 분석.
- [0051] 도 21. EC53의 HPLC 분석.
- [0052] 도 22. EC53의 질량 분광 분석.
- [0053] 도 23. EC53의 질량 분광 분석.

도면

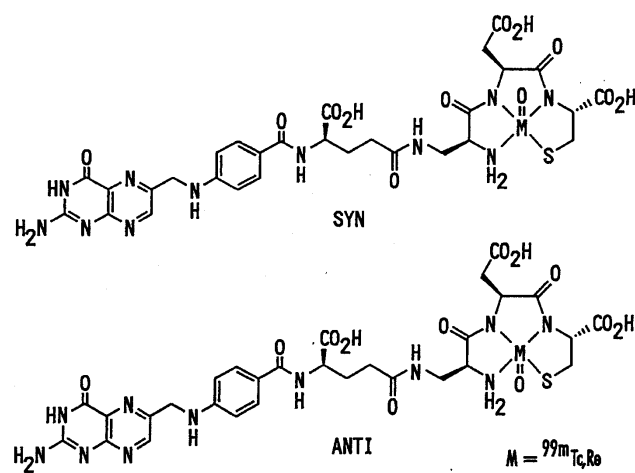
도면1



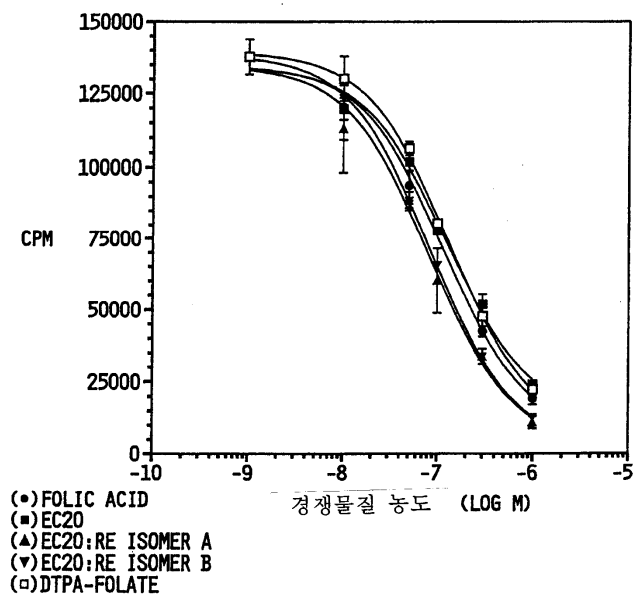
도면2



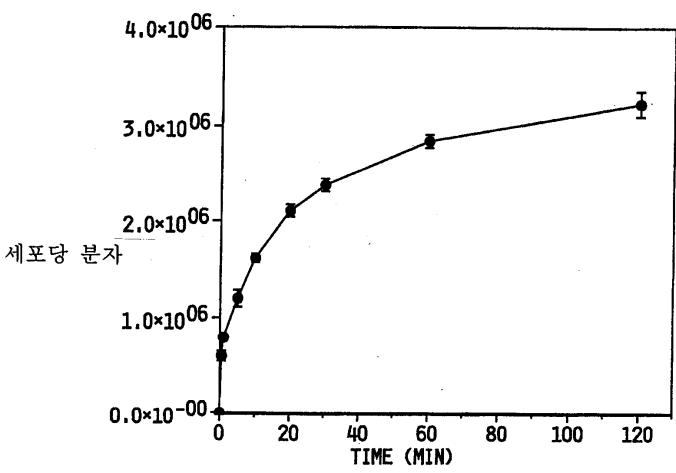
도면3



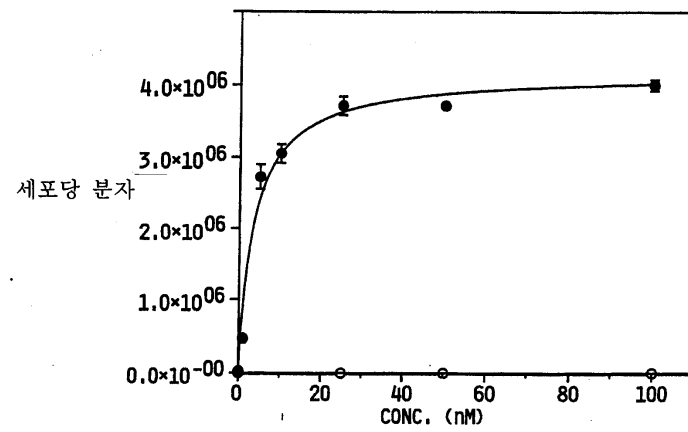
도면4



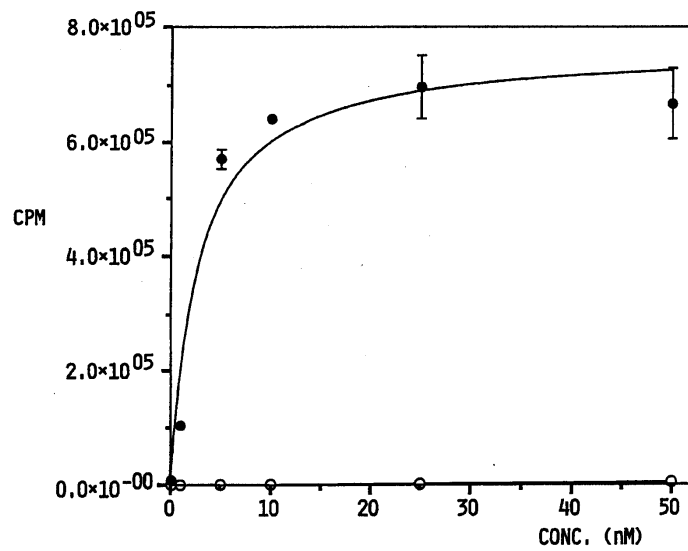
도면5



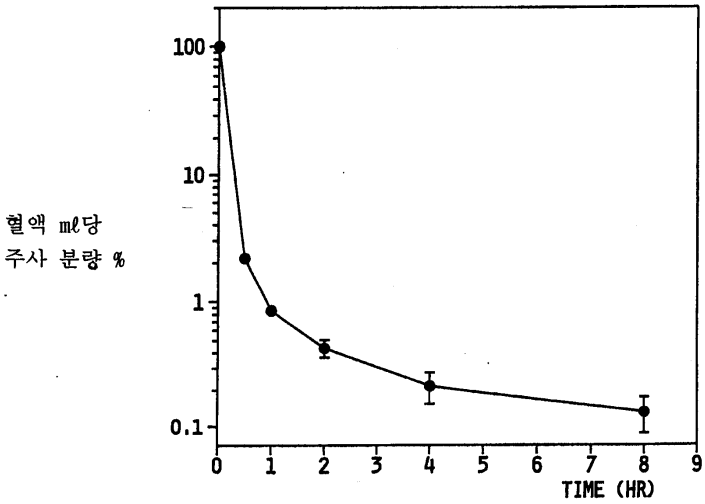
도면6



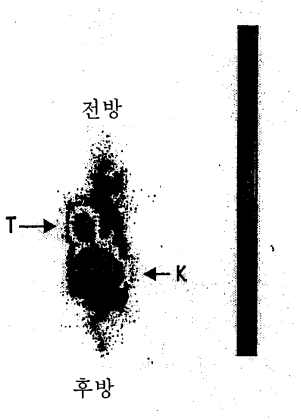
도면7



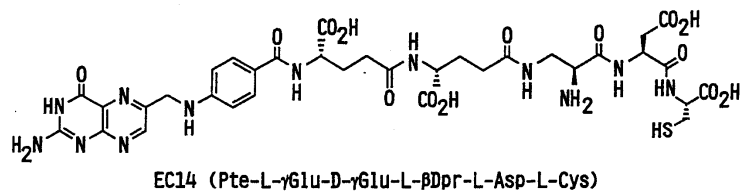
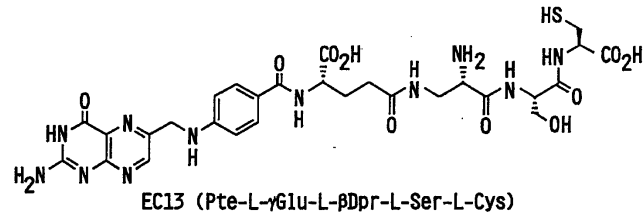
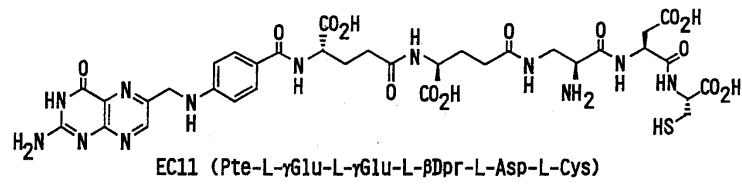
도면8



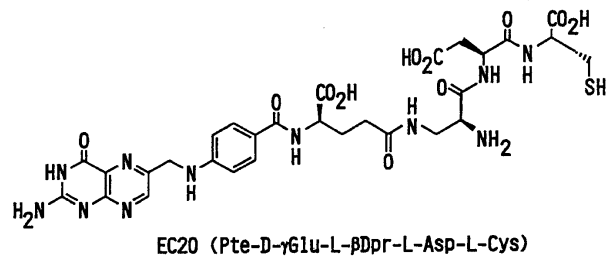
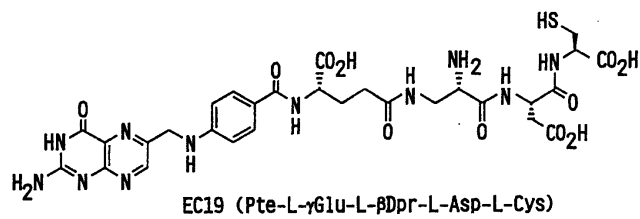
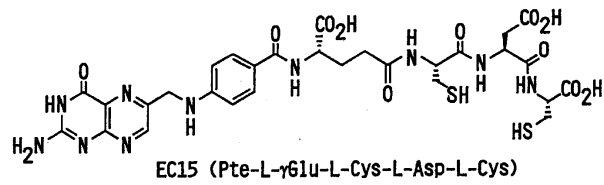
도면9



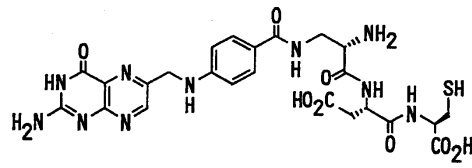
도면10a



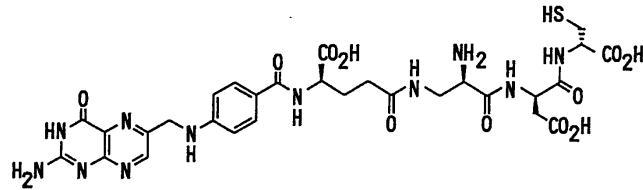
도면10b



도면10c

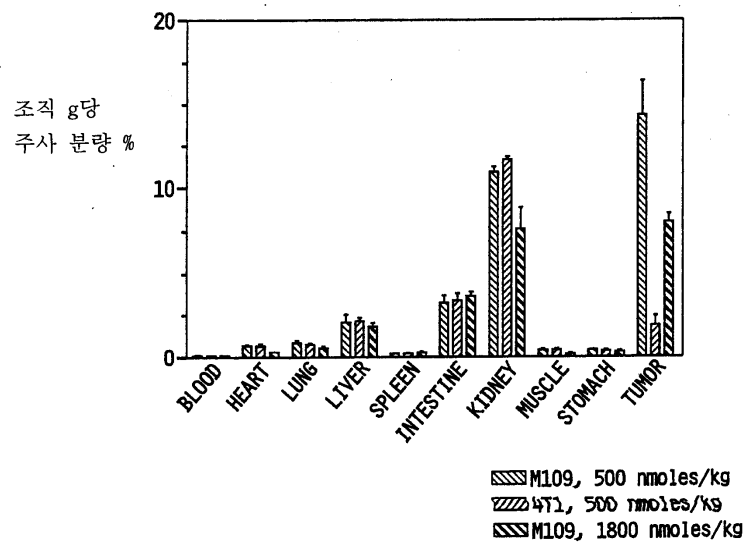


EC31 (Pte-L-βDpr-L-Asp-L-Cys)

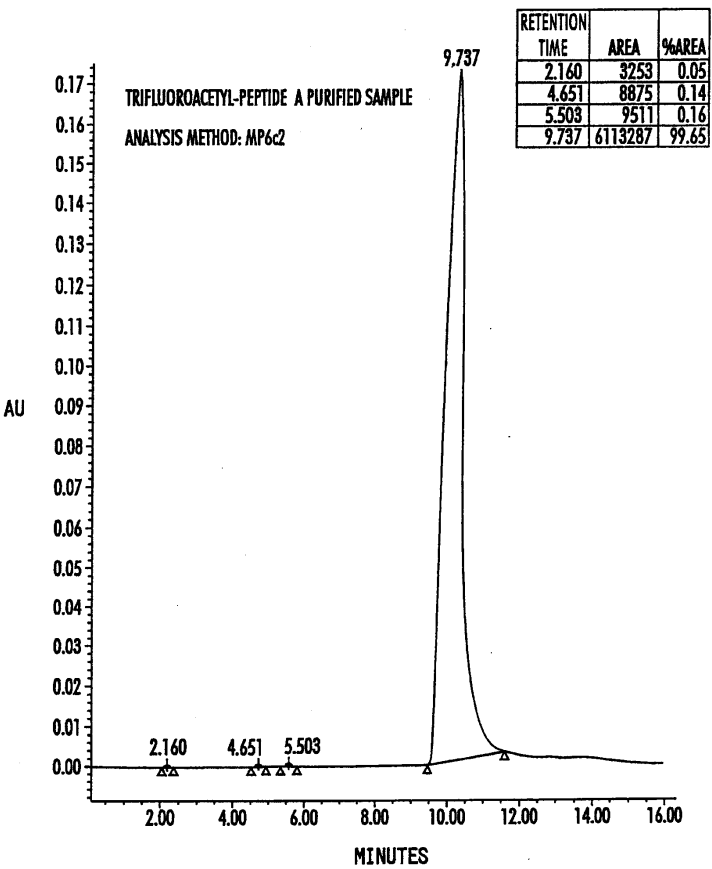


EC53 (Pte-D-γGlu-D-βDpr-D-Asp-D-Cys)

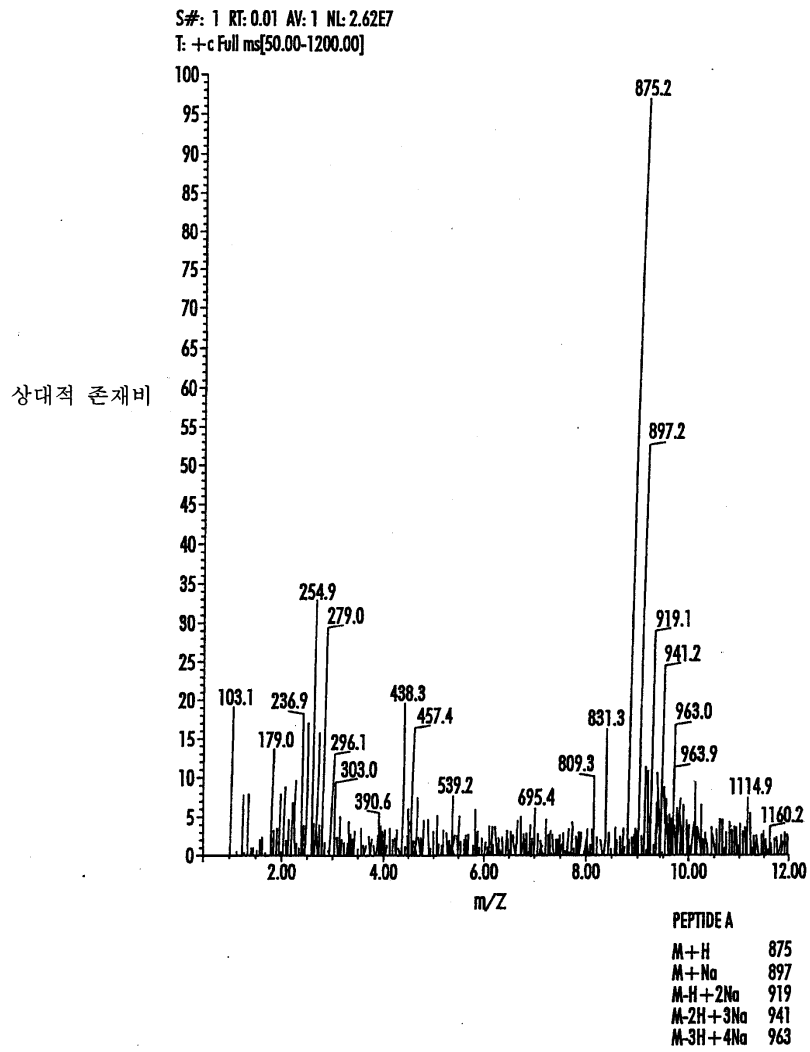
도면11



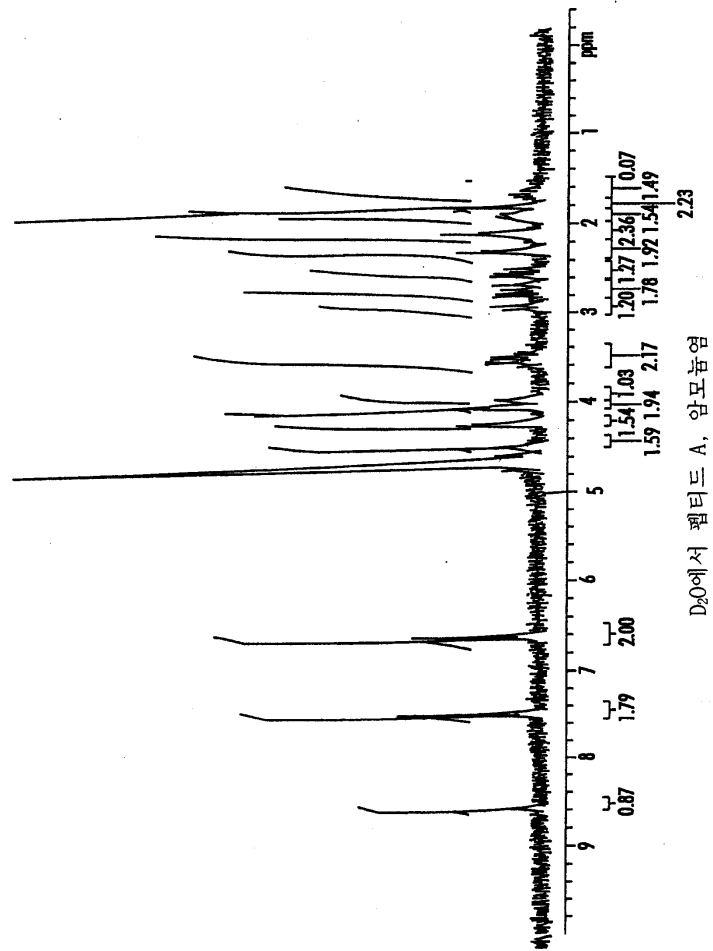
도면12



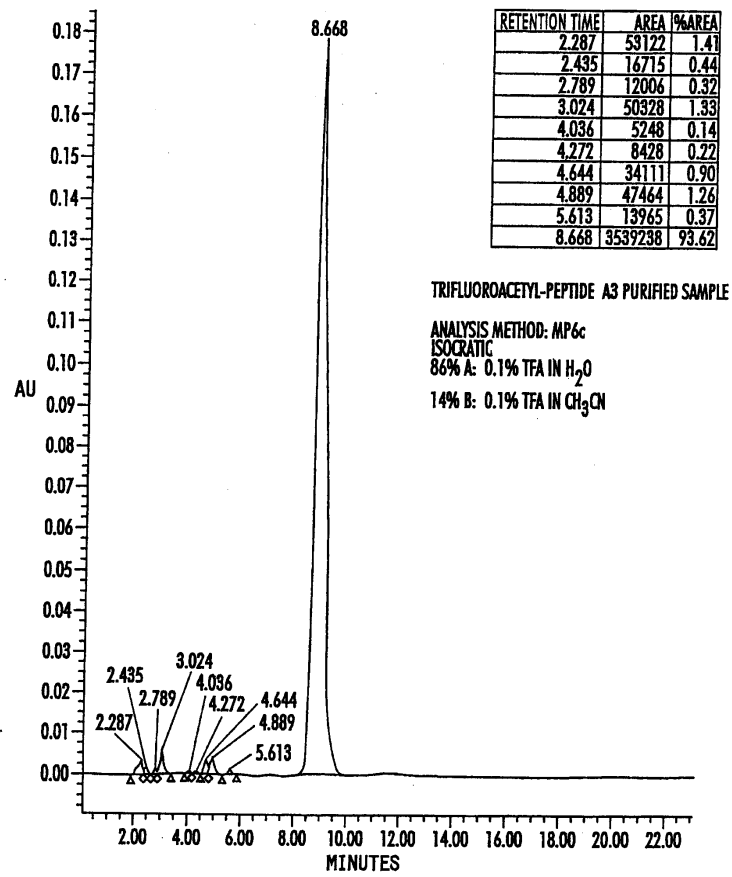
도면13



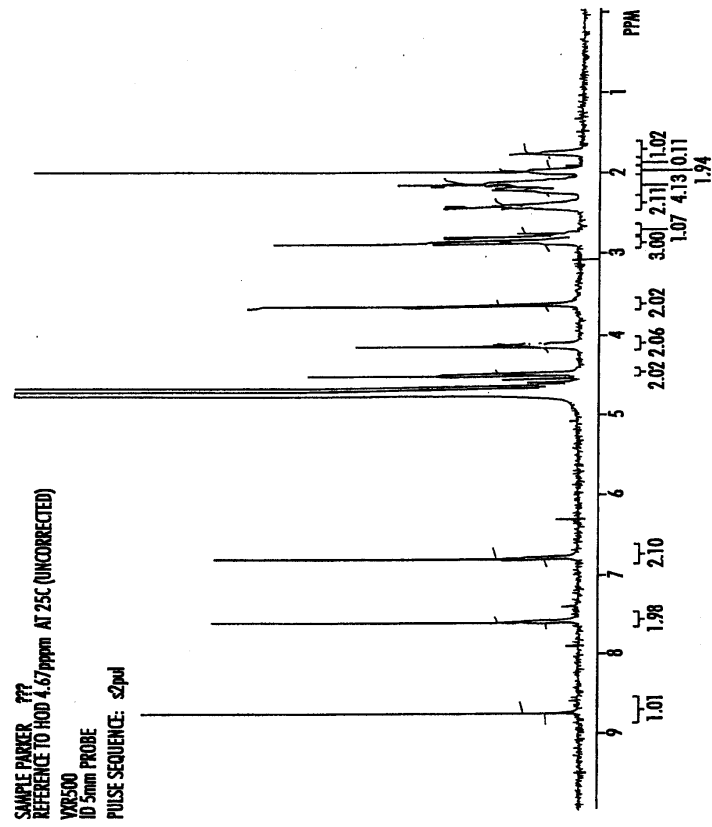
도면14



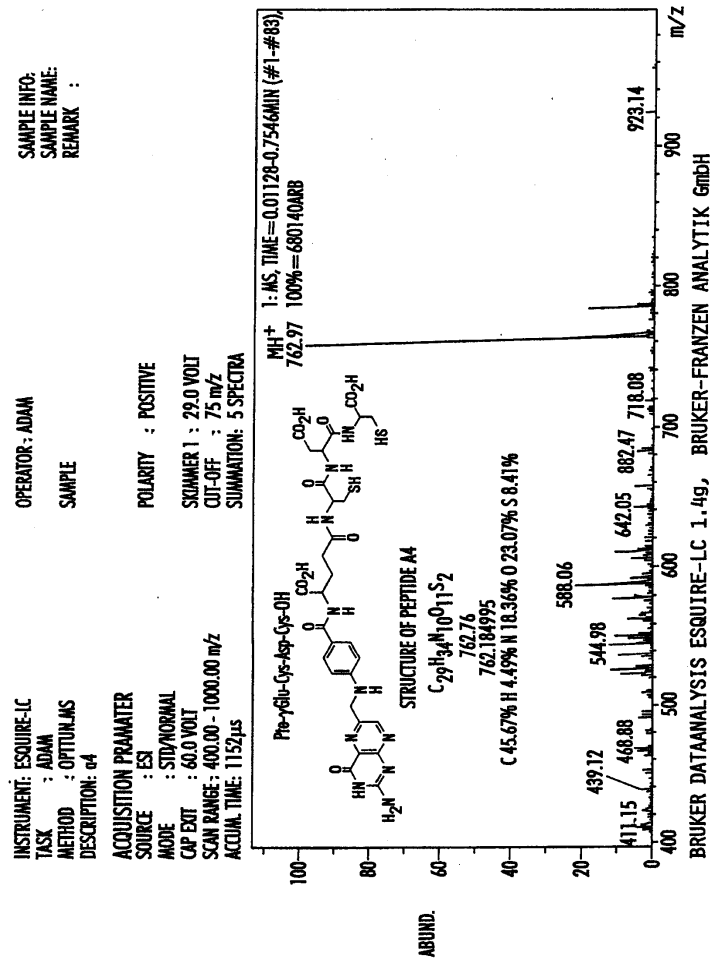
도면15



도면16



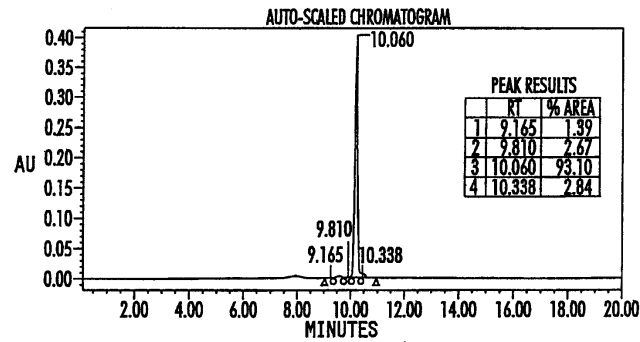
도면17



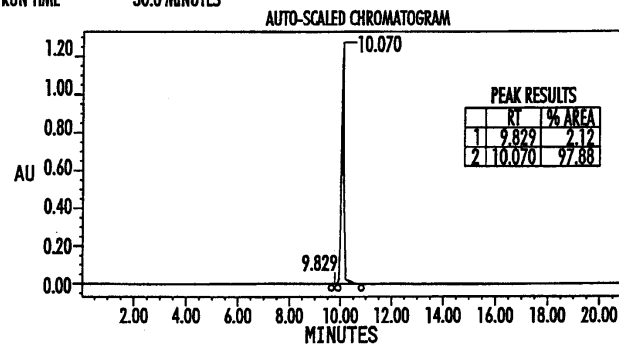
도면18

MOBILE PHASE: A=0.1%TFA IN H₂O
 B=0.1%TFA IN CH₃CN
 COLUMN: SYMMETRY C18 (4.6X150 mm). INJECTION: 20ul.
 GRADIENT 0%B - 100%B 30MIN. FLOW RATE: 1 ml/min.
 CHROMATOGRAM AT 280 nm.
 BY LE-CUN XU, Ph.D. ENDOCYTE, INC.

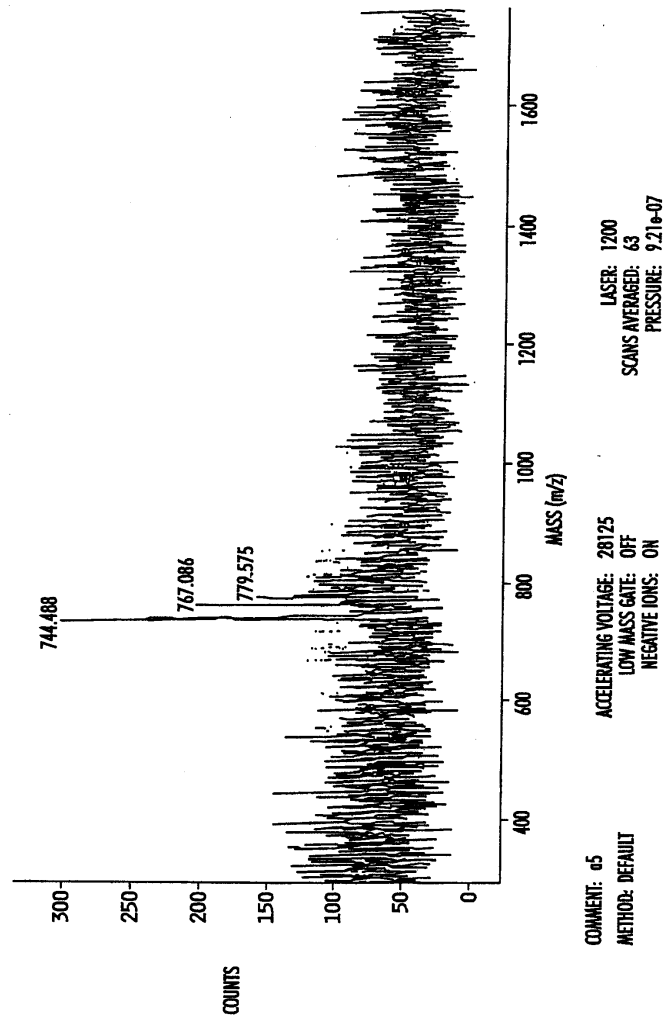
SAMPLE NAME	A5(OLD SAMPLE)	SAMPLE TYPE	UNKNOWN
VIAL	1	DATE ACQUIRED	
INJECTION	1	ACQ METHOD SET	60%B 100%B30MIN1MLMIN
INJECTION VOLUME	20.00µL	PROCESSING METHOD	LC DEFAULT PROCESSING
CHANNEL	996	DATE PROCESSED	
RUN TIME	20.0 MINUTES		



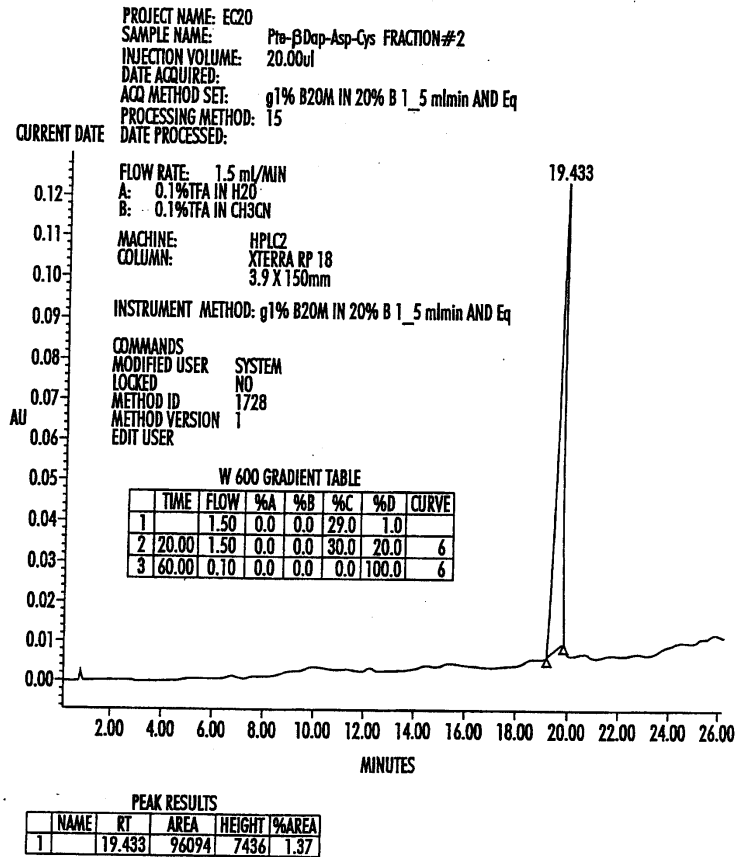
SAMPLE NAME	A5(RE-PURIFIED SAMPLE)	SAMPLE TYPE	UNKNOWN
VIAL	1	DATE ACQUIRED	
INJECTION	1	ACQ METHOD SET	60%B 100%B30MIN1MLMIN
INJECTION VOLUME	20.00µL	PROCESSING METHOD	LC DEFAULT PROCESSING
CHANNEL	996	DATE PROCESSED	
RUN TIME	30.0 MINUTES		



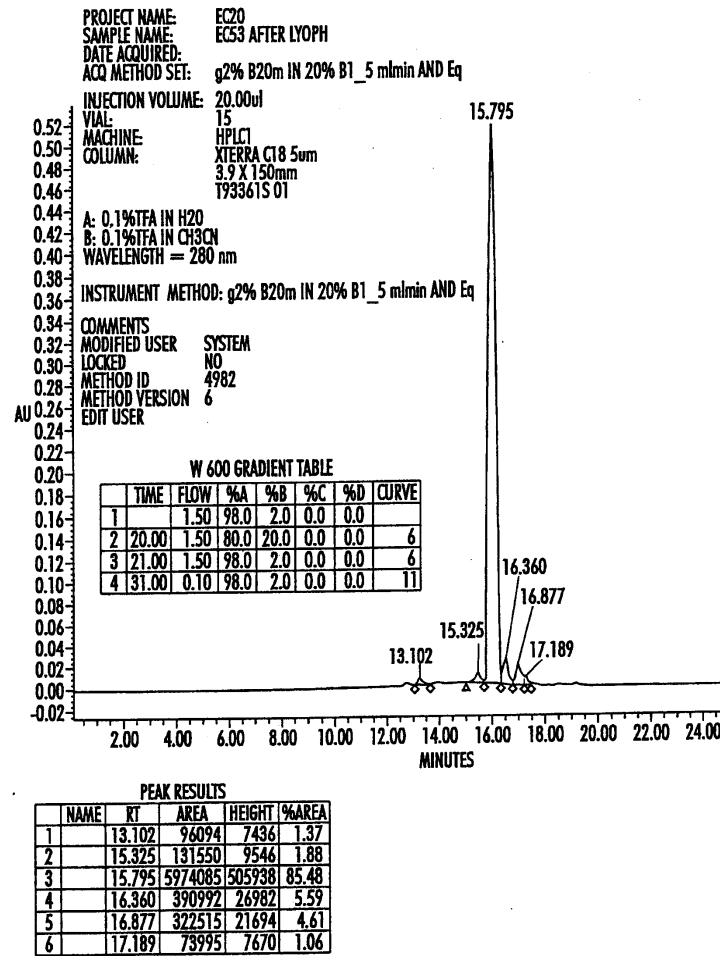
도면19



도면20



도면21



도면22a

#1 STATUS LOG TIME: 0.01

API SOURCE

SOURCE VOLTAGE (KV) : 3.52
 SOURCE CURRENT (uA) : 0.24
 VAPORIZER THERMOCOUPLE OK : NO
 VAPORIZER TEMP (C) : -0.00
 SHEATH GAS FLOW RATE (L) : 58.98
 AUX GAS FLOW RATE (L) : 3.17
 CAPILLARY RTD OK : YES
 CAPILLARY VOLTAGE (V) : 20.64
 CAPILLARY TEMP (C) : 224.60
 8 kV SUPPLY AT LIMIT : NO

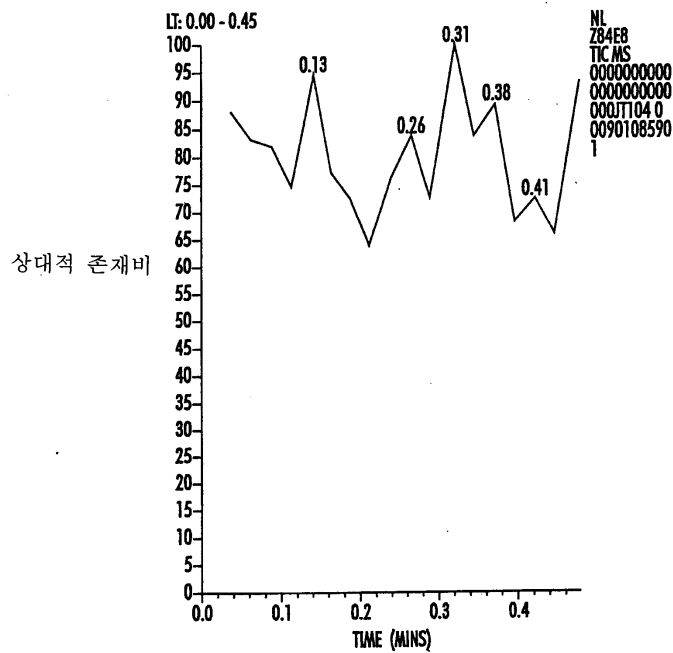
VACUUM

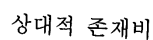
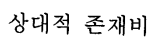
VACUUM OK : YES
 ION GAUGE PRESSURE OK : YES
 ION GAUGE STATUS : ON
 ION GAUGE (x10e-5 TORR) : 1.52
 CONVECTION PRESSURE OK : YES
 CONVECTION GAUGE (TOR) : 0.84

TURBO PUMP

STATUS : RUNNING
 LIFE (HOURS) : 16359.00
 SPEED (RPM) : 60000.00
 POWER (WATTS) : 39.20
 TEMPERATURE (C) : 40.00

ION OPTICS





도면23a

#1 STATUS LOG TIME: 0.03

API SOURCE

SOURCE VOLTAGE (KV) : 4.52

SOURCE CURRENT (uA) : 19.48

VAPORIZER THERMOCOUPLE OK : NO

VAPORIZER TEMP (C) : -0.00

SHEATH GAS FLOW RATE (L) : 58.93

AUX GAS FLOW RATE (L) : 3.06

CAPILLARY KTD OK : YES

CAPILLARY VOLTAGE (V) : -10.10

CAPILLARY TEMP (C) : 225.60

8 KV SUPPLY AT LIMIT : NO

VACUUM

VACUUM OK : YES

ION GAUGE PRESSURE OK : YES

ION GAUGE STATUS : ON

ION GAUGE (x10⁻⁵ TORR) : 1.52

CONVECTION PRESSURE OK : YES

CONVECTION GAUGE (TOR) : 0.84

TURBO PUMP

STATUS : RUNNING

LIFE (HOURS) : 16359.00

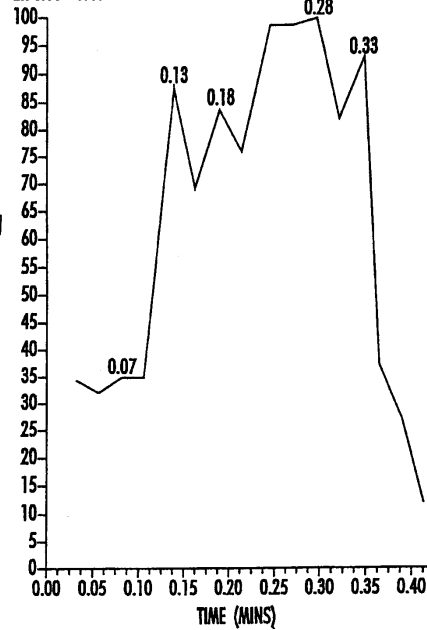
SPEED (RPM) : 60000.00

POWER (WATTS) : 39.20

TEMPERATURE (C) : 40.00

ION OPTICS

LT: 0.00 - 0.41



NL
Z9968
TIC MS
0000000000
0000000000
0001104 0
0090109633
8

도면23b

