



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년03월24일

(11) 등록번호 10-2231672

(24) 등록일자 2021년03월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/60 (2017.01) A61K 31/506 (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01) A61K 47/64 (2017.01)
A61K 47/65 (2017.01) A61K 47/69 (2017.01)
A61K 49/00 (2006.01) A61K 51/12 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 47/60 (2017.08)
A61K 31/506 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7034930(분할)

(22) 출원일자(국제) 2015년05월27일

심사청구일자 2020년05월20일

(85) 번역문제출일자 2019년11월26일

(65) 공개번호 10-2019-0133305

(43) 공개일자 2019년12월02일

(62) 원출원 특허 10-2016-7035356

원출원일자(국제) 2015년05월27일

심사청구일자 2018년12월14일

(86) 국제출원번호 PCT/US2015/032565

(87) 국제공개번호 WO 2015/183882

국제공개일자 2015년12월03일

(30) 우선권주장

62/004,738 2014년05월29일 미국(US)

62/094,923 2014년12월19일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2011003109 A1*

KR1020130040835 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

메모리얼 슬로안 케터링 캔서 센터

미국, 뉴욕 10065, 뉴욕, 요크 애비뉴 1275

코넬 유니버시티

미국 뉴욕 14850 이타카 스위트 310 파인 트리 로
드 395 옛 코넬 유니버시티(씨티엘) 센터 포 테크
놀로지 라이선싱

(72) 발명자

브래드버리, 미셸 에스.

미국 10065 뉴욕 뉴욕 요크 애비뉴 1275 메모리얼
슬로안 케터링 캔서 센터 (내)

유, 바르니

미국 10065 뉴욕 뉴욕 요크 애비뉴 1275 메모리얼
슬로안 케터링 캔서 센터 (내)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 10 항

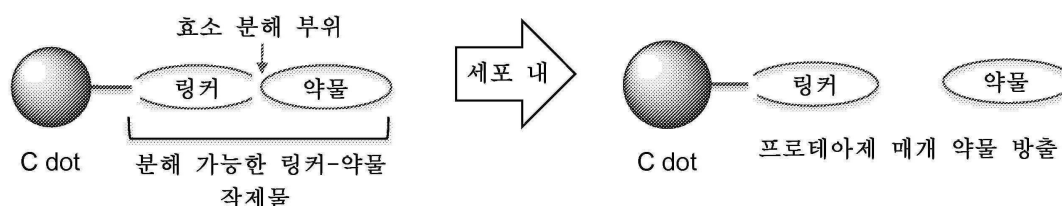
심사관 : 김강필

(54) 발명의 명칭 나노입자 약물 컨쥬게이트

(57) 요약

특정 구체예에서 공유적으로 부착된 약물 분자/모이어티를 갖는 비독성의 다중양식의 임상적으로 입증된 실리카-기반 나노입자 플랫폼을 포함하는 나노입자 약물 컨쥬게이트(NDC)가 본원에 기재된다. 나노입자 약물 컨쥬게이트(NDC)는 신장 전체에 걸쳐 효과적으로 투명화되는 영상화 능력 및 표적화 리간드를 나타낸다. 또한, 컨쥬게이트는 암 검출, 예방, 및/또는 치료를 위한 치료제가 혼입되어 있다.

대표도



반응식 1

(52) CPC특허분류

A61K 31/5377 (2013.01)

A61K 47/64 (2017.08)

A61K 47/65 (2017.08)

A61K 47/6923 (2017.08)

A61K 47/6929 (2017.08)

A61K 47/6935 (2017.08)

A61K 49/0093 (2013.01)

A61K 51/1244 (2013.01)

(72) 발명자

비즈너, 올리히

미국 14850 뉴욕 이타카 화이트 파크 로드 105

마, 카이

미국 14850 뉴욕 이타카 아파트먼트 엔2에이 노스
트리퍼머 로드 2250

명세서

청구범위

청구항 1

실리카-기반 코어 및 코어의 적어도 일부를 둘러싸는 실리카 껍질을 포함하고, 5 nm 내지 10 nm의 평균 직경을 갖는 나노입자;

링커 모이어티;

약물 모이어티; 및

하나 이상의 표적화 모이어티를 포함하는 나노입자 약물 컨쥬게이트(NDC)로서,

나노입자의 표면이 폴리에틸렌 글리콜 기로 공유결합으로 개질되고,

약물 모이어티 및 링커 모이어티가 나노입자에 공유결합으로 연결되는 분해 가능한 링커-약물 구조물(linker-drug construct)을 형성하고,

링커 모이어티가 효소 민감성인, 나노입자 약물 컨쥬게이트(NDC).

청구항 2

제 1항에 있어서, 링커 모이어티가 프로테아제 결합시 C-말단에서 가수분해를 겪을 수 있고, 이에 의해 나노입자로부터 약물 모이어티를 방출시킬 수 있는, NDC.

청구항 3

제 2항에 있어서, 프로테아제가 세린 프로테아제 또는 시스테인 프로테아제를 포함하는, NDC.

청구항 4

제 1항에 있어서, 나노입자에 대한 평균 약물 모이어티 비율은 1 내지 20의 범위인, NDC.

청구항 5

제 1항에 있어서, 1 내지 20개의 표적화 모이어티를 포함하는, NDC.

청구항 6

제 1항에 있어서, 표적화 모이어티가 종양 세포 상의 수용체에 결합하는, NDC.

청구항 7

제 1항에 있어서, 형광 화합물을 추가로 포함하는 NDC.

청구항 8

제 7항에 있어서, 형광 화합물이 Cy5.5인, NDC.

청구항 9

제 1항에 있어서, 나노입자가 오르가노-실리카 코어 껍질 나노입자인, NDC.

청구항 10

제 1항에 있어서, 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한 NDC.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 전후 참조

[0002] 본 출원은 각각 2014년 5월 29일 및 2014년 12월 19일에 출원된 미국 가특허 출원 번호 62/004,738호 및 62/094,923호에 대한 우선권 및 이익을 주장하며, 이들의 전체내용을 참조로서 본원에 포함한다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 일반적으로 암 및 다른 질병의 검출, 예방, 및 치료를 위한 치료제의 전달(예를 들어, 표적화된 약물 방출)을 위한 나노입자 컨쥬게이트에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 발명의 배경

[0006] 나노치료 전달 비히클은 본질적으로 치료적(예를 들어, 활성 약학 성분이 없음)이거나, 치료 전달 시스템으로 작용하는 1 - 1,000 nm 크기 범위의 통상적으로 거대분자 또는 초분자 다성분 시스템이다. 현재까지, 리포솜 나노입자 및 생물체제는 광범위한 비율의 FDA-승인된 생성물 또는 다양한 암 유형을 치료하는데 사용되는 임상 시험 중인 생성물의 수를 포함하는 반면, 다수의 중합체-기반 입자 제형은 현재 초기 시험 중이다.

[0007] 나노치료 전달 시스템을 위한 바람직한 후보는 조절된 방식으로 약물 화합물을 혼입하고 방출하는 공통된 특징을 공유하며, 이는 표적의 독성을 최소화시키면서 약물 생체이용률 및 약동학을 유리하게 변경시킬 수 있다. 이상적으로는, 질병 부위에서의 정확한 국소화 및 보유를 평가하기 위해 영상화 표지가 그 안에 혼입된다.

[0008] 그러나, 이들 시스템은 다양한 메커니즘을 이용하여 작용한다. 예를 들어, 항체 약물 컨쥬게이트(ADC)는 주로 종양 세포의 활성 표적화 및 약물 분자의 조건부 방출을 통해 약물 독성을 낮춘다. 세포 표면 항원 결합시, 활성 약물 방출은 세포 내재화 및 엔도솜 흡수 후에 발생한다. 다른 한편으로, 더 큰 페이로드(payload)(Doxil에 대해 ~10,000 약물 분자)로 수동적으로 로딩되는 통상적으로 훨씬 더 큰 어셈블리된 복합체(~20-150 nm 직경)인 리포솜 및 중합체-기반 약물 전달 시스템은 일반적으로 결핍된 표적화 능력을 갖는다(BIND-014는 예외이다). 따라서, 이들 복합체는 주로 나노-제형화된 약물의 성공적인 전달을 위해 널리 공지된 향상된 투과성 및 보유(EPR) 효과에 의존한다. 리포솜의 사이질 투과는 이들의 크기로 인해 불량할 수 있는 반면, 자유 약물은 완전히 이해되지 않은 다양한 메커니즘을 통해 방출된다. 예를 들어, 아브락산(Abraxane)(~140 nm)은 소수성 화합물의 생체이용률을 향상시키기 위해 다양한 접근법에 의존한다. 이러한 경우, 알부민 및 약물(파클리탁셀(paclitaxel))의 특정 제형이 최초 복합체를 형성하고, 이는 주입시 더 작은 단백질-약물 응집물로 분산되는 것으로 차례로 판단된다.

선행기술문헌

특허문헌

(특허문헌 0001) 국제공개공보 W02011/003109 (2011. 01. 06.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 따라서, 적절한 생물안정성을 제공하고, 바람직한 부위에서 생물활성 화합물의 조절된 방출을 나타내는 약물

전달을 위한 독특한 플랫폼이 필요하다.

과제의 해결 수단

발명의 개요

[0011] 나노입자 약물 컨쥬게이트(NDC), 특히 공유적으로 부착된 약물 분자를 갖는 실리카-기반 나노입자 플랫폼의 방법 및 조성물이 본원에 제공된다. NDC는 나노치료제로서 입증되었었다. 크기, 분자 조성 및 화학 작용(예를 들어, 약물 방출 방식)의 조합은 협소한 치료 지표, 용량-제한 독성, 및 제한된 임상적 유용성을 포함하는 전통적인 제형을 방해하는 주요 장애물을 극복하는 목적을 갖는 다른 나노치료 생성물에서 관찰된 이로온 특성에 영향을 줄 수 있다.

[0012] 한 양태에서, 본 발명은 나노입자(예를 들어, 1 nm 내지 25 nm의 범위 내의 직경을 가짐); 링커 모이어티; 및 약물 모이어티(예를 들어, 다사티니브(dasatinib) 또는 제피티니브(gefitinib), 및 이들의 임의의 유사체를 포함함)를 포함하는 나노입자 약물 컨쥬게이트(NDC)에 관한 것으로, 상기 나노입자는 유기 중합체(예를 들어, 유기 중합체는 적어도 하나의 링커-약물 작제물에 부착된 적어도 하나의 이기능화 말레이미드 실릴-폴리에틸렌 글리콜 기를 포함함)로 코팅되고, 상기 약물 모이어티 및 링커 모이어티는 나노입자에 공유적으로 연결(예를 들어, 링커 모이어티를 통합)되는 분해 가능한(예를 들어, 프로테아제를 통합) 링커-약물 작제물(예를 들어, 평균 약물 모이어티 대 나노입자 비는 1 내지 20의 범위임)을 형성한다.

[0013] 특정 구체예에서, 링커 모이어티는 하나 이상의 아미노산(예를 들어, 펩티드 또는 폴리펩티드)(예를 들어, 1 내지 10개의 아미노산)을 포함한다. 특정 구체예에서, 링커 모이어티는 (아미노-(스페이스)_x)-펩티드 또는 (스페이스)_z-펩티드[예를 들어, 디펩티드(예를 들어, 페닐알라닌-아르기닌(Phe-Arg) 또는 페닐알라닌-리신(Phe-Lys))]를 포함하며, 상기 스페이스는 2 내지 50개의 원자를 갖고(예를 들어, 스페이스는 PEG임), 여기서 x는 1 내지 5의 정수이고, y는 1 내지 5의 정수이고, z는 5 내지 15의 정수이고, 상기 링커 모이어티는 링커 모이어티와 약물 모이어티 사이에 분해 가능한 모이어티(예를 들어, 아마이드 결합)(예를 들어, 프로테아제의 존재하에서 약물 모이어티의 분해를 가능케 함)를 포함한다. 특정 구체예에서, 링커 모이어티는 펩티드와 약물 모이어티 사이에 스페이스(예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)), PEG₂, *파라*-아미노벤질옥시 카르바메이트(PABC))를 포함한다. 특정 구체예에서, NDC는 형광 화합물(예를 들어, 나노입자의 코어 내에서, 예를 들어, 나노입자와 회합됨)을 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, NDC는 방사선표지를 추가로 포함한다.

[0014] 특정 구체예에서, 링커 모이어티는 프로테아제(예를 들어, 세린 프로테아제(예를 들어, 트립신), 시스테인 프로테아제(예를 들어, 카텝신 B)) 결합시 C-말단에서 가수분해를 겪을 수 있고, 이에 의해 나노입자로부터 약물 모이어티를 방출시킬 수 있다.

[0015] 특정 구체예에서, 약물 모이어티는 수용체 티로신 키나제(RTK) 억제제(예를 들어, 다사티니브 또는 제피티니브, 및 약물 모이어티의 활성 결합 부위의 기초 화학 구조를 교란시키지 않고 링커 모이어티에 대한 부착을 제공하도록 변형된 다사티니브 또는 제피티니브의 임의의 유사체(예를 들어, 이들의 임의의 약학적 및/또는 치료적 동등물)을 포함함)를 포함한다.

[0016] 특정 구체예에서, NDC는 1 내지 20개의 표적화 모이어티(예를 들어, 고리형 아르기닐글리실아스파르트산(cRGD))을 추가로 포함하며, 상기 표적화 모이어티는 종양 세포 상의 수용체에 결합한다.

[0017] 특정 구체예에서, NDC는 진단치료용(theranostic) NDC이다.

[0018] 특정 구체예에서, 형광 화합물은 Cy5.5이다.

[0019] 특정 구체예에서, 약물 모이어티는 방사선표지에 부착된다.

[0020] 특정 구체예에서, 나노입자는 실리카-기반 코어 및 코어의 적어도 일부를 둘러싸는 실리카 껍질을 추가로 포함한다.

[0021] 본 발명의 제공된 양태와 관련되어 기재된 구체예의 요소는 본 발명의 또 다른 양태의 다양한 구체예에서 이용될 수 있다. 예를 들어, 하나의 독립적 청구항에 종속적인 종속 청구항의 특징이 다른 독립적 청구항 중 임의의 독립적 청구항의 장치 및/또는 방법에서 이용될 수 있는 것으로 생각된다.

발명의 효과

[0022] 본 발명은 적절한 생물안정성을 제공하고, 바람직한 부위에서 생물활성 화합물의 조절된 방출을 나타내는 약물 전달을 위한 독특한 플랫폼을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도면의 간단한 설명

도 1a는 제피티니브 및 유사체(APdMG 1 및 dPEG₂APdMG 2)의 화학 구조를 도시한다.

도 1b는 아마이드 결합을 통해 직접 연결된 링커-약물의 화학 구조(Phe-Arg-APdMG 3)를 도시한다.

도 1c는 dPEG₂ 스페이서를 통해 연결된 링커-약물의 화학 구조(Phe-Arg- dPEG₂APdMG 4)를 도시한다.

도 1d는 분해 가능한 PABC 스페이서를 통해 연결된 링커-약물의 화학 구조(Phe-Lys-PABC-APdMG 5)를 도시한다.

도 2a - 2c는 링커 유형을 제시한다.

도 2a는 Phe-Arg-APdMG가 약물 부착을 위해 아마이드 결합을 이용하는 것을 도시한다. 효소는 디펩티드 서열(Phe-Arg)을 인지하고, 이에 결합한 후, 디펩티드에 대해 C-말단의 아마이드 결합을 가수분해시키고, APdMG 1을 방출시킨다.

도 2b는 Phe-Arg-dPEG₂APdMG가 약물 방출을 향상시키기 위해 약물과 디펩티드 사이에 더 긴 10개 원자의 PEG 스페이서를 혼입시킨 dPEG₂APdMG 2를 이용하는 것을 제시한다.

도 2c는 Phe-Lys-PABC-APdMG가 디펩티드(Phe-Lys)와 아미노프로필-dMG 사이에 *파라*-아미노벤조시-카르바메이트(또는 PABC) 스페이서 기를 이용하는 것을 제시한다. 효소가 스페이서-약물의 방출을 촉매한 후, 스페이서는 약물로부터 자연적으로 분해된다.

도 3a - 3c는 링커-약물 작제물로부터의 약물의 대표적 효소(트립신) 촉매된 방출이다. 데이터는 APdMG 및 dPEG₂APdMG가 작제물로부터 방출되는 것을 나타낸다. 보유 시간은 괄호 내에 표시된다. 트립신 검정은 10 mM 포스페이트 완충액(pH 7.2) 중에서 37°C에서 수행되었다.

도 3a는 60분 동안의 Phe-Arg-APdMG 3(상부) 및 Phe-Arg-APdMG + 트립신(하부)의 LCMS 데이터를 제시한다.

도 3b는 10분 동안의 Phe-Arg-dPEG₂-APdMG 4(상부) 및 Phe-Arg-dPEG₂-APdMG + 트립신(하부)의 LCMS 데이터를 제시한다.

도 3c는 10분 동안의 Phe-Arg-PABC-APdMG 5(상부) 및 Phe-Arg-PABC-APdMG + 트립신(하부)의 LCMS 데이터를 제시한다.

도 4a 및 4b는 348 nm에서 HPLC에 의해 시간 경과에 걸쳐 모니터링된 자유 링커-약물 작제물 Phe-Arg-APdMG, Phe-Arg-dPEG₂APdMG, 및 Phe-Lys-PABC-APdMG에 대한 시험관내 약물 방출 검정을 제시한다. 자유 약물 %는 348 nm에서 결정된 링커-약물 작제물의 최초 약물 로드에서 나누어진 방출된 약물이다.

도 4a는 트립신으로 처리된 자유 링커-약물 작제물을 도시한다. 트립신 검정은 37°C에서 10 mM 포스페이트 완충액(pH 7.2) 중에서 수행되었다.

도 4b는 카텝신 B로 처리된 자유 링커-약물 작제물을 도시한다. 카텝신 B 검정은 25 mM 소듐 아세테이트 완충액(pH 5.0) 중에서 수행되었다.

도 5a 및 5b는 트립신의 존재하에서 NDC로부터의 시험관내 약물 방출의 대표적 HPLC 프로파일을 제시한다. NDC는 트립신으로 처리된 후, 5 및 120분 후에 HPLC에 의해 분석되었다. 데이터는 화합물 2 또는 3이 C'dots로부터 방출된 것을 나타낸다. 트립신 검정은 37°C에서 10 mM 포스페이트 완충액(pH 7.2) 중에서 수행되었다. 348 nm에서의 HPLC 분석.

도 5a는 NDC 6의 HPLC 프로파일을 제시한다.

도 5b는 NDC 7의 HPLC 프로파일을 제시한다.

도 6a 및 6b는 효소의 존재하에서의 NDC로부터의 시험관내 약물 방출을 도시한다. 효소 반응은 348 nm에서 HPLC에 의해 시간 경과에 따라 모니터링되었다. 트립신 검정은 37°C에서 10 mM 포스페이트 완충액(pH 7.2) 중에서 수

행되었고; 카텝신 B 검정은 37℃에서 25 mM 소듐 아세테이트 완충액(pH 5.0) 중에서 수행되었다.

도 6a는 트립신으로 처리된 C'dot-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG₂APdMG 6의 약물 방출을 제시한다.

도 6b는 카텝신 B로 처리된 C'dot-(Cy5)-PEG-Phe-Lys-PABC-APdM 7의 약물 방출을 제시한다.

도 7은 제피티니브, C'dot-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG₂APdMG 6, 및 C'dot-(Cy5)-PEG-Phe-Lys-PABC-APdMG 7로 처리된 H1650 세포의 웨스턴 블롯 분석을 제시한다. 세포는 18시간 동안 지정된 농도의 제피티니브 또는 특정된 NDC로 처리된 후, 5분 동안 EGF(50 ng/mL)로 처리되었다(pEGFR - 인산화된 EGFR; tEGFR - 전체 EGFR).

도 8은 C'dot-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG₂-Gly-D-Tyr(¹³¹I)-APdMG 8의 방사선GPC를 제시한다. 피크 적분을 기초로 한 >90%의 방사선화학 수율. 더 작은 피크는 잔여 자유 ¹³¹I인 것으로 추정된다.

도 9a 및 9b는 방사선표지를 부착시키기 위해 약물 성분에 D-티로신 잔기를 혼입시킨 링커-약물 작제물, Phe-Arg-dPEG₂-D-Tyr-아미노프로필-dMG 및 Phe-Lys-PABC-D-Tyr-아미노프로필-dMG를 제시한다(화합물 23 및 24).

도 10은 나노입자 약물 컨쥬게이트(NDC)로부터의 효소-매개 약물 방출을 예시하는 반응식 1을 제시한다.

도 11은 C'dots-(Cy5)-PEG-mal이 링커-약물 작제물 Phe-Arg-dPEG₂APdMG 4 및 Phe-Lys-PABC-APdMG 5와 반응되어 NDC C'dot-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG₂APdMG 6 및 C'dot-(Cy5)-PEG-Phe-Lys-PABC-APdMG 7을 발생시키는 것을 예시하는 반응식 2를 제시한다.

도 12는 APdMG 1의 합성 과정을 예시하는 반응식 3을 제시한다.

도 13은 dPEG₂APdMG 2의 합성 과정을 예시하는 반응식 4를 제시한다.

도 14는 Phe-Arg-APdMG 3 및 Phe-Arg-dPEG₂APdMG 4의 합성 과정을 예시하는 반응식 5를 제시한다.

도 15는 Phe-Lys-PABC-APdMG (5)의 합성 과정을 예시하는 반응식 6을 제시한다.

도 16a - 16d는 mal-PEG-C' dots 및 NDC 6 및 7의 특징을 제시한다.

도 16a는 348 nm에서의 분석 C18 역상 HPLC를 제시한다.

도 16b는 TEM 이미지를 제시한다.

도 16c는 흡광도 및 방출 스펙트럼을 제시한다.

도 16d는 FCS 상관 곡선을 제시한다.

본 발명의 개시의 특징 및 장점은 유사한 참조 문자가 전체에 걸쳐 해당 요소를 확인하는 도면과 함께 취해지는 경우 하기 기재되는 상세한 설명으로부터 더욱 명백해질 것이다. 도면에서, 유사한 참조 번호는 일반적으로 동일하고/하거나, 기능적으로 유사하고/하거나, 구조적으로 유사한 요소를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

본 발명의 개시가 더욱 용이하게 이해되도록 하기 위해, 특정 용어가 먼저 하기에서 정의된다. 하기 용어 및 다른 용어에 대한 추가 정의는 명세서 전체에 걸쳐 기재되어 있다.

본 출원에서, "또는"의 사용은 달리 언급하지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 본 출원에서 사용되는 용어 "-들을 포함하다" 및 이러한 용어의 변형, 예를 들어, "-들을 포함하는" 및 "-을 포함하다"는 다른 부가물, 성분, 정수 또는 단계를 배제하고자 하는 것이 아니다. 본 출원에서 사용되는 용어 "약" 및 "대략"은 동등하게 사용된다. 약/대략을 갖거나 갖지 않는 본 출원에서 사용되는 임의의 수는 관련 분야의 당업자에 의해 인지되는 임의의 일반적인 변동을 포함하는 것을 의미한다.

특정 구체예에서, 용어 "대략" 또는 "약"은 문맥으로부터 달리 언급되거나 달리 명백하지 않는 한 언급된 참조값의 어느 한 방향(초과 또는 미만)으로 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 그 미만 내에 해당하는 값의 범위를 나타낸다(상기 수가 가능한 값의

100%를 초과하는 경우는 예외이다).

- [0028] 용어 "투여"는 물질을 대상체로 도입시키는 것을 나타낸다. 일반적으로, 예를 들어, 비경구(예를 들어, 정맥 내), 경구, 국소, 피하, 복막, 동맥내, 흡입, 질, 직장, 비, 뇌척수액으로의 도입, 또는 신체 구획으로의 점적 주입을 포함하는 임의의 경로의 투여가 이용될 수 있다. 일부 구체예에서, 투여는 경구 투여이다. 추가로 또는 대안적으로, 일부 구체예에서, 투여는 비경구 투여이다. 일부 구체예에서, 투여는 정맥내 투여이다.
- [0029] 용어 "작용제"는, 예를 들어, 폴리펩티드, 핵산, 당류, 지질, 소분자, 금속, 또는 이들의 조합물을 포함하는 화합물 또는 임의의 화학 부류의 존재물을 나타낸다. 문맥으로부터 명백해질 바와 같이, 일부 구체예에서, 작용제는 세포 또는 유기체, 또는 이들의 분획, 추출물, 또는 성분이거나 이들을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 작용제는 자연에서 발견되고/되거나 자연으로부터 획득되는 천연 생성물이거나 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 작용제는 인간의 손의 작용을 통해 설계되고/되거나, 조작되고/되거나, 생성되고/되거나, 자연에서 발견되지 않는 인공의 하나 이상의 존재물이거나 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 작용제는 분리된 형태 또는 순수한 형태로 이용될 수 있고; 일부 구체예에서, 작용제는 미정제 형태로 이용될 수 있다. 일부 구체예에서, 잠재적 작용제는, 예를 들어, 이들 내에 활성 작용제를 확인하거나 특성규명하기 위해 스크리닝될 수 있는 집합물 또는 라이브러리로부터 제공된다. 이용될 수 있는 작용제의 일부 특정 구체예는 소분자, 항체, 항체 단편, 앵타머(aptamer), siRNA, shRNA, DNA/RNA 하이브리드, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임, 펩티드, 펩티드 모방체, 펩티드 핵산, 소분자 등을 포함한다. 일부 구체예에서, 작용제는 중합체이거나, 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 작용제는 적어도 하나의 중합체 모이어티를 함유한다. 일부 구체예에서, 작용제는 치료제, 진단제 및/또는 약물을 포함한다.
- [0030] 용어 "펩티드" 또는 "폴리펩티드"는 펩티드 결합에 의해 함께 연결된 적어도 2개(예를 들어, 적어도 3개)의 아미노산의 스트링(string)을 나타낸다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드는 자연 발생 아미노산을 포함하고; 대안적으로 또는 추가로, 일부 구체예에서, 폴리펩티드는 하나 이상의 비-자연 아미노산(즉, 자연적으로 발생하지 않으나, 폴리펩티드 사슬로 혼입될 수 있는 화합물; 예를 들어, 기능성 이온 채널로 성공적으로 혼입된 비-자연 아미노산의 구조를 나타내는 <http://www.cco.caltech.edu/~dadgrp/Unnatstruct.gif> 참조)을 포함하고/하거나, 당 분야에 공지된 바와 같은 아미노산 유사체가 대안적으로 이용될 수 있다. 일부 구체예에서, 단백질 내의 아미노산 중 하나 이상은, 예를 들어, 화학적 존재물, 예를 들어, 탄수화물 기, 포스페이트 기, 파르네실 기, 이소파르네실 기, 지방산 기, 컨쥬게이션, 기능화를 위한 링커의 첨가, 또는 다른 변형 등에 의해 변형될 수 있다.
- [0031] 본원에서 사용되는 용어 "회합된"은 통상적으로 2개 이상의 존재물이 직접적 또는 간접적(예를 들어, 연결 작용제로서 작용하는 하나 이상의 추가의 존재물을 통함)으로 서로 물리적으로 근접하여 관련 조건, 예를 들어, 생리학적 조건하에서 물리적으로 근접한 채로 존재물이 남아 있도록 하기에 충분히 안정적인 구조를 형성하는 것을 나타낸다. 일부 구체예에서, 회합된 모이어티는 서로 공유적으로 연결된다. 일부 구체예에서, 회합된 존재물은 비-공유적으로 연결된다. 일부 구체예에서, 회합된 존재물은 특정한 비-공유적 상호작용에 의해(즉, 예를 들어, 스트렙타비딘/아비딘 상호작용, 항체/항원 상호작용 등과 같이 상호작용 파트너와 사용 환경에 존재하는 다른 존재물 사이를 구별하는 상호작용 리간드 사이의 상호작용에 의해) 서로 연결된다. 대안적으로 또는 추가로, 충분한 수의 보다 약한 비-공유적 상호작용은 모이어티가 회합된 채로 유지되도록 하기에 충분한 안정성을 제공할 수 있다. 예시적인 비-공유적 상호작용은 정전기적 상호작용, 수소 결합, 친화성, 금속 배위결합, 물리적 흡착, 주인-손님 상호작용(host-guest interaction), 소수성 상호작용, pi 스택킹(stackings) 상호작용, 반 데르 발스 상호작용, 자기 상호작용, 정전기적 상호작용, 쌍극자-쌍극자 상호작용 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0032] 본원에서 사용되는 "생물분해 가능한" 물질은 세포로 도입되는 경우 세포 기구(예를 들어, 효소적 분해)에 의해 거나, 세포에 대한 유의한 독성 효과 없이 세포가 재사용하거나 배치할 수 있는 성분으로의 가수분해에 의해 분해되는 물질이다. 특정 구체예에서, 생물분해 가능한 물질의 분해에 의해 생성된 성분은 생체내에서 염증 및/또는 다른 유해 효과를 유도하지 않는다. 일부 구체예에서, 생물분해 가능한 물질은 효소적으로 분해된다. 대안적으로 또는 추가로, 일부 구체예에서, 생물분해 가능한 물질은 가수분해에 의해 분해된다. 일부 구체예에서, 생물분해 가능한 중합체 물질은 이들의 성분 중합체로 분해된다. 일부 구체예에서, 생물분해 가능한 물질(예를 들어, 생물분해 가능한 중합체 물질을 포함함)의 분해는 에스테르 결합의 가수분해를 포함한다. 일부 구체예에서, 물질(예를 들어, 생물분해 가능한 중합체 물질을 포함함)의 분해는 우레탄 결합의 분해를 포함한다.
- [0033] 본원에서 사용되는 "기능성" 생물학적 분자는 이를 특징짓는 특성 및/또는 활성을 나타내는 형태의 생물학적 분

자이다. 생물학적 분자는 2개 이상의 기능(즉, 이기능성) 또는 많은 기능(즉, 다기능성)을 가질 수 있다.

[0034] 본원에서 사용되는 용어 "시험관내"는 다세포 유기체 내가 아니라 인공 환경, 예를 들어, 시험관 또는 반응 용기, 세포 배양물 등에서 발생하는 사건을 나타낸다.

[0035] 본원에서 사용되는 "생체내"는 다세포 유기체, 예를 들어, 인간 및 비-인간 동물 내에서 발생하는 사건을 나타낸다. 세포-기반 시스템의 상황에서, 상기 용어는 살아 있는 세포(예를 들어, 시험관내 시스템과 반대됨) 내에서 발생하는 사건을 나타내기 위해 이용될 수 있다.

[0036] 본원에서 사용되는 용어 "영상화 작용제"는 이에 연결되는 작용제(예를 들어, 다당류 나노입자)의 검출을 촉진하는 임의의 요소, 분자, 기능성 기, 화합물, 이들의 단편, 또는 모이어티를 나타낸다. 영상화 작용제의 예는 다양한 리간드, 방사선헌종(예를 들어, ^3H , ^{14}C , ^{18}F , ^{19}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{135}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{64}Cu , ^{187}Re , ^{111}In , ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{177}Lu , ^{89}Zr 등), 형광 염료(특정한 예시적 형광 염료에 대함, 하기 참조), 화학발광 작용제(예를 들어, 아크리디늄 에스테르, 안정화된 디옥세탄 등), 생물발광 작용제, 스펙트럼적으로 분해 가능한 무기 형광 반도체 나노크리스탈(즉, 양자점), 금속 나노입자(예를 들어, 금, 은, 구리, 백금 등) 나노클러스터, 상자성 금속 이온, 효소(효소의 특정 예에 대함, 하기 참조), 비색 표지(예를 들어, 염료, 콜로이드성 금 등), 비오틴, 디옥시게닌, 합텐, 및 항혈청 또는 모노클로날 항체가 이용 가능한 단백질을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0037] 본원에서 사용되는 용어 "나노입자"는 1000 나노미터(nm) 미만의 직경을 갖는 입자를 나타낸다. 일부 구체예에서, 나노입자는 미국 국립 과학재단(National Science Foundation)에 의해 정의된 바와 같이 300 nm 미만의 직경을 갖는다. 일부 구체예에서, 나노입자는 미국 국립보건원(National Institutes of Health)에 의해 정의된 바와 같이 100 nm 미만의 직경을 갖는다. 일부 구체예에서, 나노입자는 공간 또는 구획을 둘러싸고 에워싸는(예를 들어, 내강을 규정하기 위함) 양친매성 존재물로 통상적으로 구성되는 마이셀 막에 의해 벌크 용액으로부터 분리된 에워싸인 구획을 포함하는 마이셀이다. 일부 구체예에서, 마이셀 막은 적어도 하나의 중합체, 예를 들어, 생체적합성 및/또는 생물분해 가능한 중합체로 구성된다.

[0038] 본원에서 사용되는 용어 "대상체"는 인간 및 포유동물(예를 들어, 마우스, 래트, 돼지, 고양이, 개, 및 말)을 포함한다. 많은 구체예에서, 대상체는 포유동물, 특히 영장류, 특히 인간이다. 일부 구체예에서, 대상체는 가축, 예를 들어, 축우, 양, 염소, 소, 돼지 등; 가금, 예를 들어, 닭, 오리, 거위, 칠면조 등; 및 길들여진 동물, 특히 애완동물, 예를 들어, 개 및 고양이이다. 일부 구체예에서(예를 들어, 특히 연구 상황에서), 대상체 포유동물은, 예를 들어, 설치류(예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터), 토끼, 영장류, 또는 돼지, 예를 들어, 순계 교배 돼지 등일 것이다.

[0039] 본원에서 사용되는 용어 "치료"(또는 "치료하다" 또는 "치료하는")는 특정 질병, 장애, 및/또는 질환의 하나 이상의 증상, 특징, 및/또는 원인을 부분적으로 또는 완전히 완화시키고/시킴거나, 개선시키고/시킴거나, 경감시키고/시킴거나, 억제하고/하거나, 이들의 발병을 지연시키고/시킴거나, 이들의 중증도를 감소시키고/시킴거나, 이들의 발병률을 감소시키는 물질의 임의의 투여를 나타낸다. 상기 치료는 관련 질병, 장애, 및/또는 질환의 징후를 나타내지 않는 대상체 및/또는 질병, 장애, 및/또는 질환의 단지 초기 징후만 나타낸 대상체의 치료일 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 상기 치료는 관련 질병, 장애 및/또는 질환의 하나 이상의 확립된 징후를 나타내는 대상체의 치료일 수 있다. 일부 구체예에서, 치료는 관련 질병, 장애, 및/또는 질환으로부터 고통받는 것으로 진단된 대상체의 치료일 수 있다. 일부 구체예에서, 치료는 관련 질병, 장애, 및/또는 질환의 증가된 발생 위험과 통계적으로 관련된 하나 이상의 민감성 인자를 갖는 것으로 공지된 대상체의 치료일 수 있다.

[0040] 상세한 설명

[0041] 특정 구체예에서 공유적으로 부착된 약물 분자/모이어티를 갖는 비독성의 다중양식의 임상적으로 입증된 실리카-기반 나노입자 플랫폼을 포함하는 나노입자 약물 컨쥬게이트(NDC)가 본원에 기재된다. 나노입자 약물 컨쥬게이트(NDC)는 신장 전체에 걸쳐 효과적으로 투명화되는 영상화 능력 및 표적화 리간드를 나타낸다. 또한, 컨쥬게이트는 암 검출, 예방, 및/또는 치료를 위한 치료제가 혼입되어 있다. 예를 들어, 특정한 수용체 티로신 키나제(RTK) 억제제를 함유하는 NDC가 합성되었고, 이는 조절되고 예측 가능한 방식으로 약물 화합물을 방출하는 것으로 입증되었다. 또한, 웨스턴 블롯 분석은 세포에서 감소된 RTK 인산화 수준을 나타내며, 이는 시험관 내에서의 NDC 기반 약물 전달을 암시한다.

[0042] 일부 구체예에서, 실리카-기반 나노입자 플랫폼은 초소형 나노입자 또는 일정 범위의 모듈형 기능과 함께 10 nm 아래 범위까지 조절 가능한 직경을 갖는 형광의 오르가노-실리카 코어 껍질 입자인 "C dots"를 포함한다. C

dots는 미국 특허 번호 8298677 B2호 "Fluorescent silica-based nanoparticles", 미국 공개 번호 2013/0039848 A1호 "Fluorescent silica-based nanoparticles", 및 미국 공개 번호 US 2014/0248210 A1호 "Multimodal silica-based nanoparticles"에 기재되어 있으며, 상기 특허들의 전체내용은 참조로서 본원에 포함된다. 별개의 광학 특성을 제공하는 근적외선 염료 분자, 예를 들어, Cy5.5가 코어의 실리카 매트릭스에 혼입된다. 코어를 둘러싸는 것은 실리카의 층 또는 껍질이다. 실리카 표면은 수성 및 생물학적 관련 조건에서 안정성을 향상시키기 위해 실릴-폴리에틸렌 글리콜(PEG) 기로 공유적으로 변형된다. 이들 입자는 생체내에서 평가되었고, 대부분 이들의 크기 및 비활성 표면으로 인해 우수한 청소 특성을 나타낸다. C dots로 혼입되는 추가 기능은 외과적 적용을 위한 림프절 시각화, 및 암에서의 흑색종 검출에서의 사용을 가능케 하는 화학 감지의 비-광학적(PET) 이미지 대조 및 시험관내/생체내 표적화 능력이다.

[0043] C dots는 이들의 물리적 특성 뿐만 아니라 입증된 인간 생체내 특징으로 인해 약물 전달을 위한 독특한 플랫폼을 제공한다. 이들 입자는 초소형이며, 바람직한 청소 및 약동학 특성을 보유하면서 종양 미세환경에서 EPR 효과로부터 이익을 얻는다. 이로 인해, 특정 구체예에서, 약물 작제물이 C dots(또는 다른 나노입자)에 공유적으로 부착된 나노입자 약물 전달 시스템이 본원에 기재된다. 약물 전달을 위한 C dot-기반 NDC는 우수한 생체안정성을 제공하고, 미성숙 약물 방출을 최소화시키며, 생체활성 화합물의 조절된 방출을 나타낸다. 특정 구체예에서, 펩티드-기반 링커는 NDC 적용에 사용된다. 항체 및 중합체의 상황에서 이들 링커는 시험관내 및 생체내 둘 모두에서 안정적이며, 리소좀 프로테아제에 의한 효소 촉매 가수분해에 의존하는 매우 예측 가능한 방출 동역학을 갖는다. 예를 들어, 리소좀에서 고도로 발현되는 프로테아제인 카텝신 B가 거대분자로부터의 약물 방출을 촉진시키기 위해 이용될 수 있다. 거대분자 백본과 약물 분자 사이에 짧은 프로테아제 민감성 펩티드를 혼입시킴으로써, 효소의 존재하에서 약물의 조절된 방출이 획득될 수 있다.

[0044] 특정 구체예에서, NDC는 초소형(예를 들어, 약 5 nm 내지 약 10 nm(예를 들어, 약 6 nm)의 평균 직경을 가짐)이며, 효소 민감성 링커를 이용하며, 예를 들어, 약물 방출은 프로테아제에 의해 촉매된다. 한 예에서, 중요한 표피 성장인자 수용체 돌연변이(EGFRmt+)-티로신 키나제 억제제(TKI) 암 약물인 제피티니브가 변형되고, 입자로 혼입되었다. 생성된 NDC는 우수한 시험관내 안정성, 용해도를 나타내었고, EGFRmt+ - 발현 NSCLC 세포에서 활성인 것으로 입증되었다.

[0045] 특정 구체예에서, NDC는, 예를 들어, 특정 조직 유형(예를 들어, 특정 종양)을 표적화하는 하나 이상의 표적화 모이어티를 포함한다. 표적 모이어티를 갖는 NDC는 종양 세포에서의 약물의 내재화를 향상시킨다(예를 들어, 표적화 리간드는 종양 세포 상의 수용체에 결합하고/하거나, 종양 세포로 약물을 전달(예를 들어, 증가된 투과도에 의함)한다). 예를 들어, 추가의 표적화 모이어티(예를 들어, cRGD)를 갖는 입자 치료제를 생성시키기 위해, 실리카 나노입자가 cRGD-PEG 컨쥬게이트 및 말레이미드 이기능화 PEG의 혼합물에 첨가된다. 말레이미드 이기능화 PEG는 약물-링커 컨쥬게이트의 추가의 부착을 뒷받침하여 진단치료용 생성물을 생성시킨다.

[0046] 일부 구체예에서, 초소형 입자는 PET 표지 및/또는 광학 프로브와 회합될 수 있다. 나노입자는 표적 부위 내의 약물 축적을 평가하기 위해 생체내에서 관찰(예를 들어, PET를 통합)될 수 있다. 예를 들어, PET 표지를 갖는 나노입자(예를 들어, 약물 물질이 없음)가 먼저 투여될 수 있다. 이후, 나노입자의 생체내 PET 이미지를 분석함으로써, 종양에서의 약물(예를 들어, 나노입자와 컨쥬게이션됨) 농도 및 축적률이 평가될 수 있다. 용량은 개인화된 의약을 제공하기 위해 획득된 평가(예를 들어, 환자의 체중이 아닌 종양 크기)를 기초로 하여 결정될 수 있다. 일부 구체예에서, 방사선 표지된 약물이 생체내에서 추적될 수 있다. 고도로 농축된 화학요법 약물은 표적화되지 않는 경우 잠재적으로 위험하다. 일부 구체예에서, 광학 프로브(예를 들어, 형광단)를 갖는 나노입자가 수술중 영상화(예를 들어, 조직/종양의 표면이 노출되는 경우) 및/또는 종양의 생검을 위해 이용될 수 있다.

[0047] 치료제 및 나노입자는 개별적으로 방사선 표지되거나 광학적으로 표지되어, 치료제 및 나노입자의 독립된 모니터링을 가능케 할 수 있다. 한 구체예에서, 방사선플루오르화된(즉, ¹⁸F) 다사티니브는 NHS 에스테르 결합을 통해 나노입자에 부착된 PEG-3400 모이어티와 커플링된다. 방사선플루오르는 방사선요오드화 C24I) 형광(Cy5) 나노입자로부터의 약물의 분포 및 방출에서의 시간-의존적 변화를 독립적으로 모니터링할 수 있는데 중요하다. 이러한 식으로, 프로드러그(다사티니브) 및 나노입자가 모니터링될 수 있다. 이는 이중-표지 접근법이 사용되지 않는 종래의 방법에 비해 프로드러그 설계의 최적화를 가능케 한다. 또 다른 구체예에서, 방사선치료 요오드 분자(예를 들어, ¹³¹I), 또는 다른 치료 감마 또는 알파 방출체는 말레이미드 작용기를 통해 PEG와 컨쥬게이션되며, 여기서 치료제는 생체내에서 PEG로부터 분리되지 않을 수 있다.

[0048] NDC는 분자 링커를 통해 C dot 나노입자(또는 다른 나노입자)에 공유적으로 부착된 약물 화합물이다. 특정 구체예에서, 링커는 트립신(대조군 효소) 및/또는 세포의 리소좀에서 주로 발견되는 효소인 카텝신 B에 민감한 펩티

드(예를 들어, 디펩티드) 서열이 혼입되어 있다. 조절된 약물 방출을 위해 2개 부류의 링커 화학을 수반하는 실험이 본원에 기재되어 있으며, 하나는 링커와 약물 사이에 아마이드 결합이 혼입되어 있고, 다른 하나는 링커와 약물 사이에 분해 가능한 모이어티를 이용한다. 일부 구체예에서, 링커는 특정 조건, 예를 들어, 단백질분해성 가수분해 하에서 나노입자(예를 들어, C dot)로부터 약물을 방출시키도록 설계된다.

[0049] 이용될 수 있는 예시적 약물은 RTK 억제제, 예를 들어, 다사티니브 및 제피티니브를 포함하며, 이는 인간 또는 무린 기원의 원발성 종양 세포(예를 들어, 높은 등급의 신경아교종의 유전학적으로 조작된 마우스 모델, 인간 환자 뇌종양 체외이식편으로부터의 신경구체) 및/또는 비-신경 기원의 종양 세포주에 의해 발현된 혈소판-유래 성장인자 수용체(PDGFR) 또는 EGFRmt+를 표적화할 수 있다. 다사티니브 및 제피티니브 유사체는 활성 결합 부위를 규정하는 기초 화학 구조를 교란시키지 않고 여러 링커에 대한 공유 부착을 가능케 하도록 합성될 수 있다.

[0050] 합성 접근법이 확인되었고, 바람직한 링커-약물 작제물 및 NDC가 획득되었다. NDC 특성규명을 위한 HPLC/LCMS 방법 및 효소 방출 검정이 또한 개발되었다. 시험관내 효소 약물 방출 검정은 NDC 설계에서 다수의 중요한 구조 인자를 나타내었다. 예를 들어, C dot와 링커 사이의 간격은 다양한 크기조절된 PEG 사슬을 이용하여 변화되었고, C dot와 링커 사이의 충분한 간격이 효소 촉매된 약물 방출을 가능케 하는데 중요한 것을 나타내었다. 유사하게, 링커와 약물 사이의 간격은 또한 효소 매개 방출에 중요한 것으로 밝혀졌다. 또한, 링커와 약물 사이에 분해 가능한 모이어티를 이용하는 링커 설계는 간단한 아마이드 결합이 사용된 것보다 유의하게 신속한 방출 동역학을 나타내었다. 일부 구체예에서, 분해 가능한 모이어티는 탄수화물 및/또는 효소적으로 분해되고/되거나 활성화될 수 있는 임의의 링커일 수 있다.

[0051] 세포-기반 검정이 또한 수행되었다. 다사티니브 또는 제피티니브 유사체가 혼입된 링커-약물 작제물 및 NDC가 원발성 뇌종양 세포(신경구체) 및/또는 뇌로 전이되는 종양 세포주(예를 들어, 폐암, 편평세포암)에 대해 시험되었다. EGFRmt+의 인산화 수준은 NDC 뿐만 아니라 자유 링커-약물 작제물에 노출된 세포주에서 감소되거나 제거되었고, NDC는 일부 경우에 천연 약물보다 더욱 효능 있는 억제 활성을 나타내었다.

[0052] 한 양태에서, 약물 모이어티가 링커 모이어티를 통해 나노입자에 공유적으로 연결된, 약물 모이어티, 링커 모이어티, 및 나노입자를 포함하는 나노입자 약물 컨쥬게이트(NDC)가 본원에 기재된다. 특정 구체예에서, NDC는 링커 모이어티와 약물 모이어티 사이에 아마이드 결합 및/또는 분해 가능한 모이어티를 포함한다. 특정 구체예에서, 링커 모이어티는 펩티드(예를 들어, 디펩티드)를 포함한다. 특정 구체예에서, 링커 모이어티는 프로테아제 결합 시 C-말단에서 가수분해를 제공하며, 이에 의해 나노입자로부터 약물 모이어티를 방출시킨다. 특정 구체예에서, 약물 모이어티는 수용체 티로신 키나제(RTK) 억제제(예를 들어, 다사티니브 또는 제피티니브, 및 약물 모이어티의 활성 결합 부위의 기초 화학 구조를 교란시키지 않고 링커 모이어티에 대한 부착을 제공하도록 변형된 다사티니브 또는 제피티니브의 임의의 유사체, 예를 들어, 이들의 임의의 약학적 및/또는 치료적 동등물)를 포함한다. 특정 구체예에서, 나노입자는 더 새로운 세대의 C dot 또는 C' dot이다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 구체예 중 임의의 구체예의 NDC의 투여 및/또는 검출을 포함하는 질병(예를 들어, 암)의 검출, 예방, 및/또는 치료 방법에 관한 것이다.

[0053] 나노-크기의 약물 전달 비히클은 (1) 신체 전체에 걸쳐서 뿐만 아니라 세포 내에서 트래피킹을 가능케 하는 이들의 작은 크기; (2) 카고 로딩 및 방출을 가능케 하는 이들의 높은 표면적 대 부피 비; 및 (3) 용해도를 향상시키고, 결합을 조절하고, 생물학적 활성 기능을 혼입시키는 이들의 조정 가능한 표면 화학으로 인해 매력적이다.

[0054] 생체내 나노입자 약물 전달은 입자 흡수(옵소닌화), 배출(신장) 또는 비특이적 손실(혈관외유출)을 야기시킬 수 있는 생물리학적 및 생화학적 시험감염의 숙주로 채워지며, 이는 치료 페이로드가 바람직한 세포에 도달하는 것을 방지한다. 약물 전달 작제물의 주요 파라미터 중 하나는 보다 작은 입자(예를 들어, 약 5 nm 유체역학 직경 이하의 입자)가 비특이적으로 혈관외 유출될 수 있는 반면, 훨씬 더 큰 입자 또는 응집물(예를 들어, 약 500 nm 직경 이상의 입자 또는 응집물)이 이들의 의도된 표적으로 트래피킹되는 것이 아니라 미세혈관계 내에 머물게 될 수 있는 이의 물리적 크기이다. 생체분해 가능하지 않은 물질에 대해, 바람직한 약동학을 가능케 하는 신장 청소의 속도를 제한하면서 입자 제거의 수단으로서 신장 여과를 가능케 하는 5 nm 내지 10 nm 범위의 직경이 바람직한 것으로 발견된다. 또한, 이러한 크기 요법의 입자는 또한 향상된 투과성 및 보유(EPR) 효과, 즉, 새끼 쉬운 혈관구조로 인해 종양 미세환경에서의 거대분자의 수동적 축적을 이용할 수 있는 것으로 밝혀졌다.

[0055] 예를 들어, 특정 구체예에서, 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 미국 공개 번호 2014/0248210 A1호에 기재된 바와 같이 초소형(예를 들어, 5 nm 내지 10 nm 범위의 직경을 가짐)이 인간에서 시험되었다. 이러한 예에서, 5명의 환자는 유해 사례가 없었고, 작용제는 연기 기간 전체에 걸쳐 잘 용인되었다. 주사후 시간 및 상응하는

평균 기관 흡수 용량에 비한 조직 그램 당 주사된 용량의 백분율(%ID/g)로 표현되는 약동학적 거동은 다른 일반적으로 사용되는 진단 방사선추적자에 대해 발견되는 것과 동등하였다. 이러한 대표 환자의 연속 PET 영상화는 주요 기관 및 조직으로부터 추정된 혈액 푸울 활성의 점진적 손실을 나타내었고, 주사 후(p.i.) 72시간까지 인지 가능한 활성이 관찰되지 않았다. 이들 환자에서의 전신 청소 하프타임은 13-21시간 범위인 것으로 평가되었다. 흥미롭게도, 많은 소수성 분자, 단백질, 및 더 큰 입자 플랫폼(10 nm 초과)과 대조적으로 간, 비장, 또는 골수에서 인지 가능한 국소화가 없었다. 환자는 갑상선 조직 흡수를 차단하기 위해 포타슘 아이오다이드(KI)로 전처리되었으나, 다른 조직에 비해 이러한 환자에서 더 높은 평균 흡수 갑상선 용량이 획득되었다. 입자는 또한 주로 신장에 의해 배출되었고, 신장 및 방광벽 둘 모두(갑상선 및 종양 뒤, 하기 참조)은 신장 배출된 방사선의약품에 대해 흔한 경우와 같이 72시간 p.i.까지 가장 높은 %ID/g 값 중 하나를 나타내었고, 방광 벽은 다른 주요 기관 및 조직보다 높은 평균 흡수 용량이 수용되었다. 이들 발견은 간쓸개가 아니라 신장 배출이 신체로부터의 청소의 주요 경로라는 사실을 강조한다.

[0056] 표피 성장인자 수용체(EGFR)가 표적화 요법에 이용된다. 항시적 활성화를 발생시키는 EGFR 돌연변이는 전이성 비소세포폐암(NSCLC)의 10-35%에서 발견되었고, EGFR 억제제는 전신 질병에 효과적이거나, 뇌 전이의 조절은 약물 전달에 의해 제한된 채로 남아 있다. EGFR 돌연변이는 또한 뇌암의 2개의 우세한 형태인 일차 다형성 아교모세포종(GBM)의 40-50%에서 발견된다. EGFR-티로신 키나제 억제제(TKI), 예를 들어, 제피티니브는 전임상 환경에서 유망한 것으로 밝혀졌으나, 이들은 뇌암 환자에서 대부분 비효과적인 것으로 나타났으며, 이는 불량한 조직 또는 중추신경계(CNS) 투과 및 용량-제한 독성으로 인한 것일 수 있다.

[0057] 제피티니브는 EGFR의 키나제 도메인 활성 부위에 결합하고 이를 억제한다. NDC의 상황에서 제피티니브를 이용하기 위해, 키나제 도메인에 대한 약물 결합을 유의하게 교란시키지 않는 화학적 반응기를 혼입시키는 것이 중요하다. X-선 결정학 및 SAR 연구는 모르폴리노-기를 아민으로 대체하는 것이 약물 활성을 유의하게 변경시키지 않으나, C dot 또는 C' dot에 대한 변형 및 중국적인 공유 부착을 위한 필요한 화학 작용기(아민)를 제공하는 것을 나타내었다(도 1a).

[0058] 실험예

[0059] 한 예는 나노입자 약물 컨쥬게이트(예를 들어, 공유적으로 부착된 약물 분자를 갖는 실리카-기반 나노입자 플랫폼)의 예시적 합성 및 이들의 특성규명 및 예비 생물학적 평가를 설명한다.

[0060] 데스-모르폴리노-제피티니브(dMG)의 상업적 이용가능성과 함께, Boc 보호된 아미노 프로필 브로마이드의 친핵성 치환(예를 들어, 1단계) 후, 산 탈보호에 의해 바람직한 아미노프로필-dMG(APdMG)를 획득하였다(도 1a, 도 10 (반응식 1)). 또한, 하기에 추가로 상세히 기재되는 제피티니브 유사체 2를 이후의 염기 탈보호 단계와 함께 Fmoc-dPEG2-COOH 커플링에 의해 1로부터 용이하게 획득하였다(도 1a, 도 11(반응식 2)). APdMG 1 및 dPEG₂APdMG 2가 EGFR에 대한 활성을 보유한 것을 보장하기 위해, H1650 세포에 화합물을 처리하였고, EGFR에서의 포스포-Tyr168 수준을 평가하기 위해 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. H1650 세포는 수용체의 항시적 활성을 발생시키는 돌연변이된 EGFR(L858R 및 ΔE746-A750)을 함유하는 모델 인간 종양-유래 비소세포폐암(NSCLC) 세포주(기관지폐암 종)이다. 둘 모두의 화합물은 1 및 10 μM 농도에서의 포스포-Tyr¹⁶⁸의 억제로 제피티니브와 유사한 효과를 나타낸 반면, dPEG₂APdMG 2는 감소된 활성을 나타내었다.

[0061] 3개의 링커 유형을 C dot 기반 약물 전달에 대해 연구하였다(도 1b - 1d). 3개의 링커 유형은 약물 방출을 위해 프로테아제를 이용하는 디펩티드 서열을 포함한다. 프로테아제는 디펩티드를 인지하고 이에 결합하여 C-말단에 서 가수분해를 야기시켜, 링커로부터 약물 성분을 방출시킨다. 본원에 기재된 링커-약물 작제물을 평가하기 위해 2개의 모델 프로테아제 트립신 및 카텝신 B를 이용하였다. 트립신을 대표적 세린 프로테아제로 선택하였다. 이는 염기성 아미노산, 예를 들어, 아르기닌 및 리신을 함유하는 펩티드에 대해 매우 활성이며, 이들 잔기의 C-말단을 분해한다. 카텝신 B는 더욱 엄격한 기질 특이성을 갖는 시스테인 프로테아제이다. 현재까지 기재된 최소 기질 컨센서스 서열은 소수성 및 염기성 잔기를 함유하는 디펩티드 모티프이다. 트립신과 유사하게, 카텝신 B는 염기성 아미노산의 C-말단을 분해한다. 디펩티드 페닐알라닌-아르기닌(Phe-Arg) 및 페닐알라닌-리신(Phe-Lys)은 트립신 및 카텝신에 대한 트립신/카텝신 B 인지 모티프이며, 링커-약물 작제물에 포함된다(도 1b-d).

[0062] Phe-Arg-APdMG는 프로테아제 민감성 링커-약물 작제물을 획득하기 위한 접근법의 한 예이다(도 2a 및 2b). 이러한 설계에서, 제피티니브 유사체 1은 디펩티드 서열의 C-말단에 직접 부착된다. 화합물 3을 고상 펩티드 합성(SPPS) 방법을 이용하여 합성한 후, 2를 이용한 C-말단의 변형, 및 최종 탈보호 단계로 3을 생성시켰다(도 11 (반응식 3)).

[0063] 디펩티드 모티프에 대한 약물 성분의 근접성을 고려할 때, 효소가 링커-약물에 결합하고 이를 가수분해시키는 것을 방해할 수 있는 잠재적 입체 문제를 다루었다. 디펩티드와 약물 사이의 거리를 증가시키기 위해, APdMG 1을 변형시켜 dPEG₂APdMG 2를 획득하였다(도 13, (반응식 4)). 디펩티드 성분과 dPEG₂APdMG 2 사이의 커플링 반응 후, 탈보호 단계로 Phe-Arg와 제피티니브 유사체 사이에 10개 원자의 짧은 PEG 스페이서를 함유하는 링커 약물 작제물 Phe-Arg-dPEG₂APdMG 4를 생성시켰다.

[0064] APdMG 1에 구조적 변화를 도입시키지 않고 디펩티드와 약물 성분 사이의 증가된 간격을 유지시키기 위해, Phe-Lys-PABC-APdMG 5를 합성하였다. 이러한 링커는 펩티드와 약물 사이에 자가-희생 파라-아미노벤질옥시 카르바메이트(PABC) 기가 혼입되어 있다(도 1d 및 2a - 2c). 효소적 가수분해시, 이러한 기는 파라-아미노벤질 알콜 및 CO₂로 추가로 분해되고, 이에 의해 APdMG를 방출시킨다. 화합물 5의 합성은 Fmoc-Lys(Mtt)-OH로 시작한다(도 13(반응식 6)). 보호된 아미노산은 파라-아미노벤질 알콜로 변형되어 Fmoc-Lys(Mtt)-PABA 18을 생성시킨다. Fmoc 기의 제거 및 Fmoc-Phe-OH와의 커플링 시, 보호된 디펩티드 Fmoc-Phe-Lys(Mtt)-PABA 19가 형성된다. -PABA의 자유 하이드록실 기는 이후 파라-니트로페놀 카르보네이트 클로라이드로 활성화되어 활성화된 카르보네이트 20을 발생시키고, 이는 이후 APdMG 1과 반응되어 화합물 21을 발생시킨다. 일 라운드의 탈보호 및 커플링 후, 화합물 22가 획득되었다. 최종 탈보호 단계는 산성 조건을 필요로 하였다. 그러나, 파라-아미노벤질옥시 카르바메이트 기 자체는 상기 조건(예를 들어, 산성 조건) 하에서 분해에 민감하다. 바람직한 생성물 16을 발생시키기 위해 링커를 보존시키면서 리신으로부터 Mtt 기를 제거하고, 말단 티올로부터 Mmt 기를 제거하기 위한 충분히 가벼운 조건(예를 들어, 0.5% TFA)이 발견되었다. 리신 측쇄를 가리는 Mtt 기는 상기 전체 합성 접근법에 매우 적합한데, 이는 파라-니트로페놀 카르보네이트 클로라이드의 존재하에서 안정적이거나, 가벼운 산성 조건하에서 제거에 대해 불안정하기 때문이다. 이는 파라-니트로페놀 카르보네이트 클로라이드의 존재하에서 용이하게 제거되는 리신 측쇄 보호에 대해 더욱 일반적으로 이용되는 과-불안정 Mmt 기와 대조적이다.

[0065] 3개의 링커-약물 작제물을 평가하기 위해, 화합물 3 - 5를 효소적 가수분해에 적용시켰다(표 1, 도 3a - 3c, 4a 및 4b). 약물-링커 작제물을 트립신 또는 카텡신 B와 함께 인큐베이션하고, 반응을 HPLC 또는 LCMS에 의해 모니터링하였다. 트립신은 3개 모두의 작제물에 대해 활성이었고, 60분까지 APdMG 1을 발생시키는 Phe-Arg-APdMG 3의 완전한 가수분해가 관찰되었고, Phe-Arg-dPEG₂APdMG 4로부터의 dPEG₂APdMG 2의 완전한 방출, 및 Phe-Lys-PABC-APdMG 5로부터의 APdMG 1의 방출에 단지 10분이 걸렸다. 그러나, 작제물을 카텡신 B로 처리한 경우, Phe-Arg-APdMG 3에 대해 가수분해가 관찰되지 않은 반면, Phe-Arg-dPEG₂APdMG 4는 완전한 가수분해되어 dPEG₂APdMG 2의 방출을 발생시켰다.

[0066] 하기 표 1은 링커-약물 작제물에 대한 약물 방출 검정에 의해 획득된 반감기를 예시한다.

[0067] 표 1

기질	트립신 $t_{1/2}$ ^a (분)	카텡신 B $t_{1/2}$ ^a (분)
Phe-Arg-APdMG (3)	9	NH
Phe-Arg-dPEG ₂ APdMG (4)	2	110
Phe-Lys-PABC-APdMG (5)	1	1

NH - 가수분해 없음

^a 348 nm 에서 HPLC 에 의해 결정시 약물의 50%가 링커 또는 입자로부터 방출되는 시간.

[0068]

[0069] 약물 방출 프로파일을 획득하기 위해 화합물 3-5에 대해 시험관내 검정을 수행하였고, 작제물의 효소 매개 가수분해를 다양한 시점에 걸쳐 모니터링하였다(도 4a 및 4b). Phe-Arg-APdMG 3에 대해, 약물 APdMG 1의 50%가 9분 내에 방출된 반면, Phe-Arg-dPEG₂APdMG 4는 2분 이내의 50% 약물 방출로 현저하게 더 신속하였다. 화합물 5가 또한 신속하였고, 이는 50% 약물 방출을 위해 1분 미만을 필요로 하였다. 카텡신 B의 존재하에서, Phe-Arg-APdMG 3은 불량한 기질인 것으로 입증되었는데, 이는 약물 방출이 관찰되지 않았기 때문이다. Phe-Arg-dPEG₂APdMG 4에 대해, 약물의 50%가 110분 내에 방출되었다. Phe-Lys-PABC-APdMG 5는 50% 약물에 대해 < 1분을 필요로 하였고, 이는 이것이 효소에 대한 매우 효과적인 기질임을 암시한다.

[0070] 트립신 및 카텡신 B 둘 모두에 대해, 3개의 링커-약물 작제물에 대한 약물 방출의 속도는 동일한 일반적인 경향을 따른다: Phe-Lys-PABC-APdMG **5** > Phe-Arg-dPEG₂APdMG **4** > Phe-Arg-APdMG **3** (가장 신속한 것으로부터 가장 느린 순서). Phe-Arg-APdMG **3** 및 Phe-Arg-dPEG₂APdMG **4**에 대한 결과는 디펩티드 단위에 대한 약물의 근접성이 효소 활성 및 약물 방출에 영향을 미치는 것을 암시한다. 약물과 디펩티드 사이의 간격(거리)이 10개 원자의 PEG 기의 혼입을 통해 증가되는 경우에 가수분해(약물 방출)가 향상된다. 이러한 효과는 카텡신 B를 이용하여 가장 현저하게 관찰되며, 이는 작제물 **3**을 가수분해시킬 수 없다. 그러나, 약물과 디펩티드 **4** 사이에 10개 원자의 PEG 스페이서를 혼입시킴으로써, 가수분해 및 약물 방출이 관찰된다.

[0071] NDC를 제조하기 위해, 말레이미드 기능화 C' dots(C' dots-(Cy5)-PEG-mal)를 합성하였다. Cy5 형광단으로 변형된 실란을 제조하고, NH₄OH의 희석 용액으로 테트라메틸오르토실란(TMOS)과 함께 적정(TMOS: Cy5:NH₃:H₂O의 몰비는 1:0.001:0.44:1215임)시키고, 24시간 동안 혼합시켰다(Urata C, Aoyama Y, Tonegawa A, Yamauchi Y, Kuroda K. Dialysis process for the removal of surfactants to form colloidal mesoporous silica nanoparticles. Chem Commun (Camb). 2009;(34):5094-6) (Yamada H, Urata C, Aoyama Y, Osada S, Yamauchi Y, Kuroda K. Preparation of Colloidal Mesoporous Silica Nanoparticles with Different Diameters and Their Unique Degradation Behavior in Static Aqueous Systems, Chem. Mater. 2012;24(8):1462-71.) (Wang J, Sugawara-Narutaki A, Fukao M, Yokoi T, Shimojima A, Okubo T. Two-phase synthesis of monodisperse silica nanospheres with amines or ammonia catalyst and their controlled self-assembly. ACS Appl Mater Interfaces. 2011;3(5):1538-44). 이는 Cy5 캡슐화된 실리카 입자를 발생시켰고, 이의 표면을 추가로 폐길화시키고, PEG-실란(500 g/mole)(Suzuki K, Ikari K, Imai H. Synthesis of silica nanoparticles having a well-ordered mesostructured using a double surfactant system. J Am Chem Soc. 2004;126(2):462-3.) 및 말레이미드-PEG-실란을 이용한 처리에 의해 말레이미드 기로 기능화시켰다(1:2.3:0.006의 PEG-실란:TMOS:mal-PEG-실란 몰비). 48시간 후, 반응 혼합물을 투석시키고, 여과시키고, 젤 여과에 의해 정제하였다. 나노입자를 직경, 형태, 및 전체 순도에 대해 형광 상관 분광법(FCS), 투과 전자 현미경검사(TEM), 및 분석 HPLC로 각각 특성규명하였다. 생성된 C' dots는 협소한 입자 크기 분포와 함께 직경에 있어서 10 nm 미만이었다(도 16a-16d).

[0072] Phe-Arg-dPEG₂APdMG (**4**) 및 Phe-Lys-PABC-APdMG (**5**)를 C' dots-(Cy5)-PEG-mal에 첨가하여 작제물 상의 말단 티올을 입자 상의 말레이미드 기와 반응시킴으로써 링커-약물 **4** 및 **5**가 혼입된 NDC(예를 들어, C' dot-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG₂APdMG (**6**) 및 C' dot-(Cy5)-PEG-Phe-Lys-PABC-APdMG (**7**))를 획득하였다(반응식 2). NDC 생성물을 젤 여과에 의한 정제 후에 분리시켜 NDC **6** 및 **7**을 생성시키고, TEM 및 HPLC에 의해 특성규명하였다(도 16a 및 도 16b). 오염물질의 존재를 평가할 뿐만 아니라 입자 당 약물 분자의 수 또는 약물 대 입자 비(DPR)를 결정하기 위해 분석 HPLC를 이용하였다(표 2). 제피티니브 유사체의 농도는 348 nm에서 용이하게 측정될 수 있는 반면, 입자 농도는 C' dots 내에 임베딩된 Cy5로 인해 650 nm에서 획득될 수 있다. 평균 DPR은 적당한 것으로 입증된 반면, NDC는 DPR이 1 미만 내지 15 초과 범위로 판단되는 측정 가능한 비균질성을 나타내었다. 제피티니브 유사체의 불량한 용해도로 인해 예상될 수 있는 바와 같이 NDC의 침전이 관찰되지 않았다. 링커-약물 컨쥬게이션으로 인한 입자 크기에서의 변화를 평가하기 위해 FCS를 이용하였다. 표 2에 제시된 바와 같이, NDC는 기본 mal- C' dot에 비해 직경에 있어서 최소 증가를 나타내었다.

[0073] 하기 표 2는 나노입자 특성규명의 개요를 예시한다.

[0074] 표 2

입자	직경 ^a (nm)	DPR 평균 ^b (범위)
C' dot-(Cy5)-PEG-Mal	6.3	—
C' dot-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG ₂ APdMG (6)	6.4	5 (1-15)
C' dot-(Cy5)-PEG-Phe-Lys-PABC-APdMG (7)	6.5	2 (1-15)

DPR - 약물 대 입자 비

^a FCS에 의해 결정됨

^b HPLC에 의해 결정됨

[0075]

[0076] 시간 경과에 따른 효소 의존적 약물 방출을 C' dot-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG₂APdMG 및 C' dot-(Cy5)-PEG-Phe-Lys-PABC-APdMG에 대해 측정하여, 시험관내 약물 방출 프로파일을 획득하였다(도 6a 및 6b). 트립신을 이용한 약물 방출을 나타내는 대표적 HPLC 데이터가 도 5a 및 5b에 제시된다. NDC 6 및 7은 50% 약물 방출을 달성하기 위해 각각 44분 및 6분을 필요로 하는 트립신에 대한 우수한 기질이였다(도 6a, 표 1). 카텡신 B의 존재하에서, 방출 동역학은 둘 모두의 NDC에 대해 현저히 더 느렸고, 약물 방출의 50%가 NDC 6에 대해 560분 내 및 NDC 7에 대해 510분 내에 달성되었다(도 6b, 표 1). 종합하면, 데이터는 약물 성분의 조절된 방출을 발생시키는 입자 표면 상의 링커-약물 작제물의 접근 가능성을 입증한다.

[0077] NDC의 안정성을 37°C에서 산성 및 중성 pH(5.0 및 7.2) 하에서 수성 조건에서 평가하였다. NDC 6 및 7 둘 모두는 HPLC에 의해 측정시 48시간 동안 분해 또는 약물 방출을 나타내지 않았다. 티올-말레이미드 기반 컨쥬게이션은 생체내에서 발생할 수 있는 가능한 역 마이클 또는 티올 교환 반응으로 인한 항체 약물 컨쥬게이트로부터의 링커 약물 작제물의 관찰된 손실로 인해 정밀 조사를 이끌어 냈다. 과량의 티올의 존재하에서 NDC의 시험관내 안정성을 평가하기 위해, NDC7을 pH 7.2에서 48시간 동안 37°C에서 30 mM 글루타티온과 함께 인큐베이션하였다. 링커-약물의 5% 미만이 48시간 후에 C dot로부터 분리되었다(표 4).

[0078] 하기 표 3은 링커-약물 작제물에 대한 약물 방출 검정에 의해 획득된 반감기를 예시한다.

[0079] 표 3

기질	트립신 $t_{1/2}^a$ (분)	카텡신 B $t_{1/2}^a$ (분)
C' dot-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG ₂ APdMG (6)	44	560
C' dot-(Cy5)-PEG-Phe-Lys-PABC-APdMG (7)	6	510

a 약물의 50%가 링커 또는 입자로부터 방출되는 시간. HPLC에 의해 결정됨

[0080]

[0081] 하기 표 4는 NDC 안정성 데이터를 예시한다.

[0082] 표 4

입자	pH 5.2 ^a 48 hr	pH 7.2 ^b 48 hr	글루타티온 ^c 48 hr	배지 18 hr
NDC 6	~ 1%	~ 2%	~ 5%	< 5%
NDC 7	~ 6%	~ 2%	~ 4%	< 1%

^a 25 mM 소듐 아세테이트 완충액

^b 50 mM 포스페이트 완충액

^c 50 mM 포스페이트 완충액 중 10 mM 글루타티온(환원됨)

^d DEM, 혈청 비함유, 세포 처리 18 시간 후

[0083]

[0084] C' dot-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG₂APdMG 및 C' dot-(Cy5)-PEG-Phe-Lys-PABC-APdMG의 생물학적 활성을 H1650 세포의 처리 후, EGFR에서의 포스포-Tyr¹⁶⁸의 웨스턴 블롯 검출에 의해 평가하고, 제피티니브와 비교하였다. 혈청 고갈된 세포를 18시간의 기간에 걸쳐 각각의 화합물과 함께 인큐베이션 한 후, EGF 자극에 적용시켰다. 제피티니브 대조군은 1 μ M에서 완전한 제거와 함께 EGFR의 Tyr¹⁶⁸ 인산화에서 용량 의존적 감소를 나타내었다(도 7). NDC 6 및 7은 또한 용량 의존적 억제제를 나타내었고, NDC 6으로 처리된 세포는 10 μ M에서 포스포-Tyr¹⁶⁸의 검출 가능한 수준을 나타내었다. 대조적으로, NDC7은 우수한 활성을 나타내었고, 100 nM에서 포스포-Tyr¹⁶⁸의 유의한 감소, 및 1 μ M의 NDC 농도에서 완전한 제거를 나타내었다. 조속한 약물 방출이 발생하고, 포스포-Tyr¹⁶⁸ EGFR에서 관찰된 감소를 발생시킬 수 있는 가능성을 고려하여, 이들 검정에서 이용된 NDC의 안정성을 모니터하였다. 18시간 동안 H1650 세포를 처리하는데 사용된 NDC 6 또는 7(10 μ M)을 갖는 배지의 분취량을 HPLC에 의해 분석하였다. 둘 모두의 입자는 이들 조건하에서 안정적인 것으로 입증되었는데, 이는 자유 약물이 배지에서 검출되지 않았고, NDC가 온전했기 때문이다(표 3). NDC 6 및 7에 더하여, 중국적 생체내 연구를 위한 이차 영상화 양

식의 혼입을 연구하였다. 방사선표지를 부착시키기 위해 약물 성분에 D-티로신 잔기를 혼입시켜 Phe-Arg-dPEG₂-D-Tyr-아미노프로필-dMG를 갖는 링커-약물 작제물을 합성하였다(화합물 **23** 및 **24**). NDC C' dot-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG₂-D-Tyr-APdMG를 제조하고, >90% 방사선회화 순도로 ¹³¹I로 성공적으로 방사선탐오드화시켰다(도 8).

[0085] 시약:

[0086] 상업적 공급원으로부터 구매한 용매 및 시약을 추가 정제 없이 이용하였다. 아세토니트릴, 디에틸 에테르, 디메틸포름아미드(DMF), 에틸 아세테이트, 헥산, 헥사플루오로이소프로판올(HFIP), 메탄올, 메틸렌 클로라이드(DCM), 및 트리플루오로아세트산(TFA)을 Fisher로부터 획득하였다. 디메틸설폭시드(DMSO), 디이소프로필에틸아민(DIEA), 트리에틸아민(TEA), 포타슘 카르보네이트, *N*-(*tert*-부틸옥시카르보닐)-아미노프로필브로마이드, (3-아미노프로필)트리에톡시실란(APTES), (3-머캅토프로필)트리에톡시실란(MPTMS), 테트라메틸 오르토실리케이트(TMOS), 소 트립신을 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다. 0-데스-모르폴리노프로필 제피티니브를 Toronto Research Chemicals(TRC)로부터 획득하였다. 2-(7-아자-1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(HATU)를 Genescript로부터 구입하였다. 클로로트리틸-수지 및 보호된 아미노산(Fmoc-Arg-OH, Fmoc-Lys(Mtt)-OH, Fmoc-Phe-OH)을 EMD Chemicals로부터 획득하였다. Fmoc-N-dPEG₂OH, Mmt-S-dPEG₃-OH, mal-dPEG₁₂-NHS를 Quanta Biosciences로부터 구입하였다. Cy5 말레이미드 및 Superdex 200(prepare 등급)을 GE Life Sciences로부터 획득하였다. DMSO-*d* 및 CDCl₃을 Cambridge Isotopes로부터 구입하였다. 고상 합성을 Torviq로부터의 폴리프로필렌 프릿화 주사기에서 수행하였다. 실리카, TLC 플레이트, 4 g, 12 g, 24 g, 및 40 g RediSep Rf 정상상 카트리지를 Teledyne ISCO로부터 획득하였다.

[0087] 플래시 크로마토그래피:

[0088] 정상상(실리카 겔) 정제를 4 g, 12 g, 24 g, 및 40 g 카트리지를 이용하여 Teledyne ISCO CombiFlash Rf에서 수행하였다.

[0089] 분석 HPLC:

[0090] 샘플을 C4 또는 C18 4.6x50mm 역상 XBridge 분석 컬럼(Waters) 상에서 1.2 mL/분으로 10분 동안 물 중 5-95% 아세토니트릴(0.5% TFA)의 선형 구배를 이용하여 Waters Alliance HPLC System 또는 Autopure LCMS System(2767 Sample Manager, 2996 Photodiode Array Detector, 2420 ELS Detector, Micromass ZQ, 2525 Binary Gradient Module, Column Fluidics Organizer, 515 HPLC Pump, Pump Control Module II)에서 영동시켰다. 샘플을 348 nm 또는 650 nm에서 분석하였다.

[0091] 분취용 HPLC:

[0092] 샘플을 C18 19x150mm 역상 XBridge 분취용 컬럼(Waters) 상에서 20 mL/분으로 30분 동안 물 중 5-95% 아세토니트릴(0.5% TFA)의 선형 구배를 이용하여 Waters Preparative System(2996 Photodiode Array Detector, 2545 Binary Gradient Module) 또는 Autopure LCMS System에서 정제하였다. 샘플을 220 또는 348 nm에서 분석하였다.

[0093] 핵 자기 공명(NMR):

[0094] ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 데이터를 Bruker Ultrashield 500 Plus에서 획득하였다.

[0095] 트립신을 이용한 약물 방출 검정:

[0096] 검정을 25 μM NDC(예를 들어, **6** 또는 **7**) 또는 자유 링커-약물(예를 들어, **3**, **4**, 또는 **5**) 및 200 nM 트립신을 이용하여 37°C에서 25 mM 포스페이트 완충액(pH 7.2) 중에서 수행하였다. 분석을 위해, 70 μL의 일부를 분리시키고, 특정 시점(예를 들어, 5, 15, 30, 60, 120분 또는 그 이상)에서 산(HCl)으로 켄칭시킨 후, HPLC/LCMS에서 영동시켰다. NDC를 4°C에서 물 중에 저장하였다. 트립신 스톡을 다음과 같이 제조하였다: 1 mg의 트립신을 1 mL 물에 용해시키고, 분취시킨 후, 즉시 급속 동결시키고, 4주 이하 동안 -80°C에서 저장하였다. 효소 활성을 기질 Z-Arg-Arg-파라-니트로-아닐린을 이용한 약물 방출 검정 전에 시험하였다. 자유 약물 %(도 3 및 S3)는 링커-약물 작제물 또는 NDC에 대해 로딩된 약물의 최초량에 의해 나누어진 자유 약물의 양이다. 자유 약물의 양은 348 nm에서 방출된 약물에 해당하는 HPLC 피크의 영역에 의해 결정된다. 로딩된 약물의 양은 효소 처리 전에 링커-약물 작제물 또는 NDC에 대한 348 nm에서의 HPLC 피크의 영역이다. C' dot-(Cy5)-PEG-mal은 348 nm에서 백그라운드 흡광도를 가짐에 따라, NDC에 대한 백그라운드 공제가 필요하다. 모든 완충액 및 용액을 초순수(18 MΩ-

cm 저항률)를 이용하여 제조하였다.

[0097] 카텝신 B를 이용한 약물 방출 검정:

[0098] 검정을 25 μ M NDC(예를 들어, **6** 또는 **7**) 또는 자유 링커-약물(예를 들어, **3**, **4**, 또는 **5**) 및 200 nM 카텝신 B를 이용하여 37°C에서 25 mM 소듐 아세테이트 완충액(pH 5.0) 중에서 수행하였다. 이러한 검정을 위해 DTT를 사용하지 않았다. 분석을 위해, 70 μ L의 일부를 분리시키고, 특정 시점(예를 들어, 5, 15, 30, 60, 120분 또는 그 이상)에서 산(HCl)으로 켄칭시킨 후, HPLC/LCMS에서 영동시켰다. NDC를 4°C에서 물 중에 저장하였다. 카텝신 B 스톱을 다음과 같이 제조하였다: 1 mg의 카텝신 B를 1 mL 50 mM 소듐 아세테이트 및 2.5 mM EDTA에 용해시키고, 분취시킨 후, 즉시 급속 동결시키고, 수주 동안 -80°C에서 저장하였다. 효소 활성을 기질 Z-Arg-Arg-파라-니트로-아닐린을 이용한 약물 방출 검정 전에 시험하였다. 자유 약물 %(**도 4a**, **4b**, **6a** 및 **6b**)는 이전 단락에 기재된 바와 같이 링커-약물 작제물 또는 NDC에 대해 로딩된 약물의 최초량에 의해 나누어진 자유 약물의 양이다. 모든 완충액 및 용액을 초순수(18 M Ω -cm 저항률)를 이용하여 제조하였다.

[0099] NDC 안정성 검정:

[0100] 검정을 7.5 μ M NDC(예를 들어, **6** 또는 **7**)와 함께 25 mM 소듐 아세테이트 완충액(pH 5.0) 또는 50 mM 포스페이트 완충액(pH 7.2)에서 수행하고, 48시간 이하 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 포스페이트 완충액(pH 7.2) 중 10 mM 글루타티온(환원됨)을 또한 평가하였다. 이후, 20 μ L 분취액을 HPLC에 의해 분석하였다. 한 실험에 대해, H1650 세포를 18시간 동안 혈청 비함유 DEM 중 10 μ M NDC(하기 포스포EGFR 검정 참조)로 처리한 후, 배지를 회수하고, HPLC에 의해 분석하였다.

[0101] H1650 세포를 이용한 포스포EGFR 검정:

[0102] H1650 세포를 2 mL의 10% FBS DEM 배지와 함께 6-웰 플레이트에 시딩(150만개 세포)하고, 24시간 동안 성장시켰다. 세포를 1 mL의 혈청 비함유 DEM 배지로 세척한 후, 밤새(18시간) 지정된 농도의 제피티니브 또는 NDC와 함께 인큐베이션하였다. 이후, 세포에 5분 동안 50 ng/mL EGF를 처리한 후, 1 mL의 PBS로 세척하였다. 트립신(0.5mL, 0.25%)을 각각의 웰에 첨가하고, 세포 분리때까지(~5분) 인큐베이션하였다. 1 mL의 10% FBS DEM 배지를 웰에 첨가하고, 세포를 10 mL의 10% FBS DEM 배지를 함유하는 15 mL 코니컬 튜브로 옮겼다. 세포를 4°C에서 5분 동안 3000 rpm에서 스핀 다운시켰다. 세포 펠렛을 1 mL 저온 PBS로 세척하고, 1.5 mL 튜브로 옮기고, 스핀 다운시켰다. PBS를 판 그릇에 옮기고, 70 μ L의 RIPA(프로테아제 및 포스포타제 억제제를 함유함)를 펠렛에 첨가하고, 분쇄시키고, 얼음 상에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 튜브를 4°C에서 10분 동안 최대 속도에서 회전시켰다. 용해질을 새로운 1.5mL 튜브로 옮기고, -80°C에서 저장하였다. 단백질 농도를 Bradford 검정에 의해 결정하였다. 웨스턴 블롯을 Novex 8% 트리스-글리신 젤(1.5mm X 15웰), 트리스-글리신 SDS 영동 완충액, NuPAGE 전달 완충액, 1x TBS 세척 완충액 중 0.1% Tween-20, 및 블로킹 완충액으로서 세척 완충액 중 5% 밀크를 이용하여 Life Technologies 장치에서 영동시켰다. 일차 항체를 다음과 같이 적용시켰다: 항-인산화-EGFR(pEGFR, Tyr¹⁰⁶⁸)(1:1000 희석액; Cell Signaling), 항-EGFR(D38B1)(1:5000 희석액; Cell Signaling), 모노클로날 항- β -액틴 클론 AC-15(1:5000 희석액; Sigma-Aldrich). 적용된 이차 항체는 염소 항-마우스 IgG-HRP(1:10000 희석액; Santa Cruz Biotechnology) 및 염소 항-토끼 IgG-HRP(1:5000 희석액; Santa Cruz Biotechnology)였다.

[0103] O-데스-모르폴리노-제피티니브, dMG의 제조(**도 12**(반응식 3)에서 **8**):

[0104] 화합물을 상업적으로 획득하였다.

[0105] ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*6): δ 9.69 (s, 1H), 9.47 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.22 (dd, *J* = 6.9, 2.7 Hz, 1H), 7.84 (ddd, *J* = 9.1, 4.4, 2.7 Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.41 (t, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.22 (s, 1H), 3.98 (s, 3H). ¹³C-NMR (500 MHz, DMSO-*d*6): δ 155.83, 153.91, 151.89, 146.73, 146.20, 122.74, 121.69, 116.50, 116.33, 109.51, 107.18, 105.25, 55.92. C₁₅H₁₁ClFN₃O₂에 대한 ESI-MS (*m/z*)(정확한 질량 319.1): [M+H]⁺ 계산치 320.1, 관측치 320.2.

[0106] N-(테르-부틸옥시카르보닐)-아미노프로필-dMG 합성(**도 12**(반응식 3)에서 **9**):

[0107] 500 mg의 화합물 **8**을 100 mL의 무수 DMF에 용해시켰다. K₂CO₃(mg, mmol)를 용액에 첨가하였다. 반응을 16시간 동안 60°C에서 진행시키고, TLC 및/또는 HPLC에 의해 확인하였다. 용매를 진공하에서 제거하여 갈색 오일을 남기고, 이를 DCM으로부터 DCM 중 20% MeOH의 선형 구배를 이용한 24 g RediSep Rf 정상상 카트리지에서 급속 정

제하였다. 최종 생성물을 백색 고체로서 분리시켰다(312 mg, 62% 수율).

[0108] $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 9.57 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 8.12 (dd, $J = 6.8, 2.7$ Hz, 1H), 7.81 (m, 1H), 7.44 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.20 (s, 1H), 6.92 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.17 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.15 (q, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.95 (p, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.38 (s, 9H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 156.01, 155.59, 154.39, 152.61, 146.92, 123.40, 122.29, 118.62, 116.54, 116.37, 107.23, 102.59, 77.51, 66.69, 55.84, 37.22, 35.75, 28.95, 28.22. $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{ClFN}_4\text{O}_4$ 에 대한 ESI-MS (m/z)(정확한 질량 476.2): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 계산치 477.2, 관측치 477.3.

[0109] 아미노프로필-0-테스-포르폴리노-제피티니브, APdMG의 제조(도 1a 및 도 12(반응식 3)에서 1):

[0110] 화합물 9(100 mg, 0.21 mmol)에 30분 동안 1 mL TFA:물(9:1)을 처리하였다. TFA:물을 진공하에서 제거하여, 밝은 황색 오일을 남겼다. 오일을 디에틸 에테르로 세척한 후, 물:아세트니트릴(1:1)의 용액에 용해시키고, 동결시키고, 동결건조시켰다. 황갈색 고체를 획득하였다(TFA 염, 98 mg, 95% 수율).

[0111] $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 10.73 (s, 1H), 8.80 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 8.05 - 8.00 (m, 1H), 7.88 (s, 3H), 7.72 (ddd, $J = 9.0, 4.3, 2.6$ Hz, 1H), 7.54 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 4.27 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.04 (p, $J = 6.7, 6.3$ Hz, 2H), 2.13 (dt, $J = 12.2, 6.0$ Hz, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 158.02, 148.80, 116.96, 116.79, 107.60, 103.66, 66.17, 56.42, 36.39, 26.59. $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{ClFN}_4\text{O}_2$ 에 대한 ESI-MS (m/z)(정확한 질량 376.1): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 계산치 377.1, 관측치 377.2.

[0112] 9-플루오레닐메톡시카르보닐-N-아미도-dPEG₂-아미노프로필-dMG, Fmoc-dPEG₂APdMG의 제조(도 13(반응식 4)에서 10):

[0113] DMF (500 μL) 중 dPEG₂APdMG 2(25 mg, 0.05 mmol, TFA 염) 및 Fmoc-N-아미도-dPEG₂-COOH(20 mg, 0.05 mmol)를 함유하는 용액을 제조하였다. DIEA(19 mg, 0.15 mmol, 26 μL)를 첨가한 후, DMF(100 μL) 중 HATU(19 mg, 0.05 mmol)의 용액을 첨가하였다. 반응을 실온에서 30분 동안 진행시키고, LCMS에 의해 완료된 것을 결정하였다. 부피를 진공하에서 감소시키고, 에틸 아세테이트 및 에틸 아세테이트 중 10% 메탄올의 구배를 이용한 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 분획을 수거하고, 푸울링시키고, 용매를 진공하에서 제거하였다. 분리된 생성물은 백색 고체(84% 수율)였다.

[0114] $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 9.55 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 8.51 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.18 - 8.07 (m, 1H), 7.96 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.87 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.83 - 7.76 (m, 2H), 7.67 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.49 - 7.36 (m, 3H), 7.31 (td, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 3H), 7.21 (s, 1H), 4.28 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 4.24 - 4.10 (m, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.60 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.46 (s, 4H), 3.36 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.27 (q, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.10 (q, $J = 5.9$ Hz, 2H), 2.32 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.97 (p, $J = 6.5$ Hz, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 170.08, 143.85, 127.54, 126.98, 125.10, 120.05, 102.60, 69.42, 69.04, 66.78, 66.58, 55.87, 46.69, 40.01, 39.94, 39.85, 39.77, 39.68, 39.60, 39.51, 39.43, 39.35, 39.25, 39.18, 39.07, 39.01, 36.16, 35.69, 28.67, 0.08. $\text{C}_{40}\text{H}_{41}\text{ClFN}_5\text{O}_7$ 에 대한 ESI-MS (m/z)(정확한 질량 757.27): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 계산치. 758.3, 관측치 758.4.

[0115] 아미노-dPEG₂-아미노프로필-dMG, dPEG₂APdMG의 제조(도 1a 및 도 13(반응식 4)에서 2):

[0116] 화합물 10(10 mg, 0.013 mmol)을 DMF(1 mL) 중 30% 피페리딘에 용해시키고, 실온에서 15분 동안 반응시켰다. 용매를 진공하에서 제거하고, 물/아세트니트릴에 용해시키고, 역상(C18) HPLC에 의해 정제하였다. 생성물을 백색 분말로서 회수하였다(7 mg, 80% 수율).

[0117] $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 10.66 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.05 - 7.97 (m, 3H), 7.80 (s, 3H), 7.72 (ddd, $J = 9.0, 4.3, 2.6$ Hz, 1H), 7.54 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 4.20 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.65 - 3.48 (m, 7H), 3.27 (q, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.96 (q, $J = 5.5$ Hz, 2H), 2.34 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.98 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 116.96, 69.55, 69.29, 66.73,

66.61, 56.38, 38.57, 36.03, 35.63, 28.58. $C_{25}H_{31}ClFN_5O_5$ 에 대한 ESI-MS (m/z)(정확한 질량 535.20): $[M+H]^+$ 계산치 536.2, 관측치 536.3.

[0118] *Boc-N-아미노-(dPEG)₃-Phe-Arg(Pbf)-OH*의 제조(도 14(반응식 5)에서 11):

[0119] 클로로트리틸 수지(100 mg, 0.1 mmol, 1 mmol/g)를 프릿화된 주사기 반응 용기로 옮기고, 10분 동안 2 mL 무수 DCM에 현탁시켰다. 용매를 분배시키고, 무수 DCM 중 DIEA의 용액 및 이후 무수 DCM 중 Fmoc-Arg(Pbf)-OH(97.5 mg, 1.5 eq)의 용액을 주사기로 빨아들이고, 40분 동안 진탕시켰다. 용액을 분배하고, 수지를 2분 동안 DCM으로 2회, 및 이후 DMF로 2회 세척하였다. 표준 고상 펩티드 합성 절차를 수행하여 최종 펩티드를 획득하였다. 요컨대, 10분 동안 30% 피페리딘/DMF(1 mL)를 이용하여 수지를 2회 세척함으로써 Fmoc 탈보호를 달성하였다. 이후 각각 2분 동안 4회로 DMF(1 mL) 세척하였다. 커플링 반응을 순서대로 주사기에 첨가되는 3 당량 과량의 보호된 아미노산(2 mL DMF 중), 9 당량 과량의 DIEA(120 mg, 0.9 mmol, 160 μ L, 1 mL DMF 중), 3 당량 과량의 HATU(mmol, mg, μ L, 2 mL DMF 중)를 이용하여 실온에서 수행하고, 1시간 동안 진탕시켰다. 이후 각각 2분 동안 4회로 DMF(1 mL) 세척하였다. Fmoc-Phe(116 mg)를 첨가한 후, Fmoc-N-dPEG₂-OH의 3개의 잔여물(120 mg)을 첨가하였다. 최종 Fmoc 탈보호 및 세척의 순서의 완료 후, 2 mL의 DMF 중 BOC 무수물(mmol, mg) 및 DIEA(mmol, mg, μ L)를 N-말단 아민을 캡핑하는데 이용하였다. 펩티드-수지를 DMF(1 mL, 2분, 2x), 및 이후 DCM(1 mL, 2분, 4x)으로 세척하였다. 이후, 주사기로 DCM(2 mL) 중 50% HFIP를 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 진탕시켜, 보호된 펩티드 생성물을 수지로부터 분리시켰다. 이후, 미정제 펩티드를 역상 HPLC에 의해 정제하였다. $C_{54}H_{86}N_8O_{17}S$ 에 대한 ESI-MS (m/z)(정확한 질량 1150.56): $[M+H]^+$ 계산치 1151.6, 관측치 1151.7.

[0120] *Boc-N-아미노-(dPEG)₃-Phe-Arg(Pbf)-APdMG*의 제조(도 14(반응식 5)에서 12):

[0121] DMF(1 mL) 중 화합물 11(23 mg, 0.02 mmol, 1 eq) 및 APdMG 1(9 mg, 0.024 mmol, 1.2 eq)을 함유하는 용액을 제조하였다. 여기에 DIEA(10 mg, 0.08 mmol, 14 μ L, 4 eq)를 첨가한 후, HATU(9 mg, 0.024 mmol, 1.2 eq)를 첨가하였다. 반응을 HPLC에 의해 모니터링하였고, 30분 이내에 완료되었다. 용매를 진공하에서 제거한 후, DCM에 재현탁시켰다. DCM 용액을 물로 4회 세척한 후, 증발시켜, 황갈색 오일을 남겼다. $C_{72}H_{102}ClFN_{12}O_{18}S$ 에 대한 ESI-MS (m/z)(정확한 질량 1508.68): $[M+H]^+$ 계산치 1509.7, 관측치 1509.7; $[M+2H]^{2+}$ 계산치 755.4, 관측치 755.0.

[0122] *Boc-N-아미노-(dPEG)₂-Phe-Arg(Pbf)-dPEG₂APdMG*의 제조(도 14(반응식 5)에서 13):

[0123] DMF(1 mL) 중 화합물 11(30 mg, 0.026 mmol, 1 eq) 및 dPEG₂APdMG 2(18 mg, 0.034 mmol, 1.3 eq)를 함유하는 용액을 제조하였다. 여기에 DIEA(14 mg, 0.1 mmol, 18 μ L, 4 eq)를 첨가한 후, HATU(13 mg, 0.034 mmol, 1.3 eq)를 첨가하였다. 반응을 HPLC에 의해 모니터링하였고, 30분 이내에 완료되었다. 용매를 진공하에서 제거한 후, DCM에 재현탁시켰다. DCM 용액을 물로 4회 세척한 후, 증발시켜, 황갈색 오일을 남겼다. $C_{79}H_{115}ClFN_{13}O_{21}S$ 에 대한 ESI-MS (m/z)(정확한 질량 1667.77): $[M+2H]^{2+}$ 계산치 834.9, 관측치 834.7.

[0124] *H₂N-(dPEG)₃-Phe-Arg-APdMG*의 제조(반응식 6에서 14):

[0125] TFA/물(9:1, 1 mL)을 화합물 12(이전 단계로부터 ~0.02 mmol)에 첨가하고, 1시간 동안 실온에서 두었다. 반응물을 증발시킨 후, ACN/물에 용해시키고, 동결시키고, 동결건조시켜, 황갈색 고체를 남겼다. 미정제 물질을 역상 HPLC에 의해 정제하였다. 최종 생성물을 백색 고체로서 남겼다(14 mg). $C_{54}H_{78}ClFN_{12}O_{13}$ 에 대한 ESI-MS (m/z)(정확한 질량 1156.55): $[M+H]^+$ 계산치 1157.6, 관측치 1157.8; $[M+2H]^{2+}$ 계산치 579.3, 관측치 579.1.

[0126] *H₂N-(dPEG)₂-Phe-Arg-(dPEG)₂-APdMG*의 제조(도 14(반응식 5)에서 15):

[0127] TFA/물(9:1, 1 mL)을 화합물 13(이전 단계로부터 ~0.026 mmol)에 첨가하고, 1시간 동안 실온에서 두었다. 반응물을 증발시킨 후, ACN/물에 용해시키고, 동결시키고, 동결건조시켜, 황갈색 고체를 남겼다. 미정제 물질을 역상 HPLC에 의해 정제하였다. 최종 생성물을 백색 고체로서 남겼다(24 mg). $C_{61}H_{91}ClFN_{13}O_{16}$ 에 대한 ESI-MS (m/z)(정확한 질량 1315.64): $[M+H]^+$ 계산치 1316.7, 관측치 1316.5; $[M+2H]^{2+}$ 계산치 658.6, 관측치 658.5.

[0128] *S-아세틸-머캅토아세트아미노-(dPEG)₃-Phe-Arg-APdMG*의 제조(도 14(반응식 5)에서 16):

- [0129] DMF(200 μ L) 중 화합물 **14**(5 mg, 0.004 mmol, 1 eq) 및 DIEA(1.5 mg, 0.012 mmol, 2 μ L, 3 eq)를 함유하는 용액을 제조하였다. DMF(100 μ L) 중 SAMA-OPfp(2 mg, 0.006 mmol, 1.5 eq)를 용액에 첨가하고, 1시간 동안 반응시켰다. 용매를 진공하에서 제거한 후, 역상 HPLC에 의해 정제하였다. 3 mg의 백색 고체를 회수하였다. $C_{61}H_{91}ClFN_{13}O_{16}$ 에 대한 ESI-MS (m/z)(정확한 질량 1315.64): $[M+H]^+$ 계산치 1316.7, 관측치 1316.5; $[M+2H]^{2+}$ 계산치 658.6, 관측치 658.5.
- [0130] *S*-아세틸-머캅토아세트아미도- $-(dPEG_2)_3$ -Phe-Arg-dPEG₂APdMG의 제조(도 14(반응식 5)에서 17):
- [0131] DMF(200 μ L) 중 화합물 **15**(5 mg, 0.004 mmol, 1 eq) 및 DIEA(1.5 mg, 0.012 mmol, 2 μ L, 3 eq)를 함유하는 용액을 제조하였다. DMF(100 μ L) 중 SAMA-OPfp(2 mg, 0.006 mmol, 1.5 eq)를 용액에 첨가하고, 1시간 동안 반응시켰다. 용매를 진공하에서 제거한 후, 역상 HPLC에 의해 정제하였다. 3 mg의 백색 고체를 회수하였다. $C_{65}H_{95}ClFN_{13}O_{18}S$ 에 대한 ESI-MS (m/z)(정확한 질량 1431.63): $[M+2H]^{2+}$ 계산치 716.8, 관측치 716.7.
- [0132] 머캅토아세트아미도- $-(dPEG_2)_3$ -Phe-Arg-APdMG, Phe-Arg-APdMG의 제조(도 1b 및 도 14(반응식 5)에서 3):
- [0133] 본 단계는 사용 직전에 수행하였다. 1 mg의 화합물 **16**을 100 μ L의 물/MeOH(1:1)에 용해시키고, 여기에 2 μ L의 1 N NaOH를 첨가하였다. 15분 후, 2 μ L의 1 M HCl을 첨가하여 중화시켰다. 용액을 직접 사용하였다. $C_{56}H_{80}ClFN_{12}O_{14}S$ 에 대한 ESI-MS (m/z)(정확한 질량 1230.53): $[M+H]^+$ 계산치 1231.5, 관측치 1231.4; $[M+2H]^{2+}$ 계산치 616.3, 관측치 616.3.
- [0134] 머캅토아세트아미도- $-(dPEG_2)_3$ -Phe-Arg-dPEG₂APdMG, Phe-Arg-dPEG₂APdMG의 제조(도 1c 및 도 14(반응식 5)에서 4):
- [0135] 본 단계는 사용 직전에 수행하였다. 1 mg의 화합물 **17**을 100 μ L의 물/MeOH(1:1)에 용해시키고, 여기에 2 μ L의 1 N NaOH를 첨가하였다. 15분 후, 2 μ L의 1 M HCl을 첨가하여 중화시켰다. 용액을 직접 사용하였다. $C_{66}H_{93}ClFN_{13}O_{17}S$ 에 대한 ESI-MS (m/z)(정확한 질량 1389.62): $[M+H]^+$ 계산치 1390.6, 관측치 1390.5; $[M+2H]^{2+}$ 계산치 695.8, 관측치 695.7.
- [0136] Fmoc-Lys(Mtt)-PABOH의 제조(도 15(반응식 6)에서 18):
- [0137] DMF(5 mL) 중 Fmoc-Lys(Mtt)-OH(748 mg, 1.2 mmol, 1 eq) 및 파라-아미노 벤질 알콜(300 mg, 2.4 mmol, 2 eq)의 용액을 제조하였다. DIEA(465 mg, 3.6 mmol, 630 μ L, 3 eq)를 첨가한 후, DMF(2 mL) 중 HATU(502 mg, 1.3 mmol, 1.1 eq)의 용액을 첨가하였다. 반응은 30분 이내에 완료되었고, HPLC/LCMS에 의해 결정되었다. 용매를 진공하에서 부분적으로 제거하고, 에틸 아세테이트/물로 추출하였다. 에틸 아세테이트 층을 물로 4회 세척한 후, 증발시켜, 오렌지색 고체를 생성시켰다. 미정제 물질을 헥산 및 에틸 아세테이트의 선형 구배를 이용하여 40 g RediSep Rf 정상상 카트리지에서 정제하였다. 최종 생성물을 백색 고체로서 분리시켰다(850 mg, 97% 수율).
- [0138] ^1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.96 (s, 1H), 7.73 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.54 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.47 - 7.41 (m, 6H), 7.39 - 7.20 (m, 12H), 7.18 - 7.11 (m, 2H), 7.05 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 5.29 (s, 1H), 4.63 (s, 1H), 4.44 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.11 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 1.88 (s, 1H), 1.58 (s, 5H), 1.51 (s, 1H), 1.38 (s, 2H). ^{13}C -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 146.36, 143.22, 141.32, 135.70, 128.57, 128.52, 128.49, 127.79, 127.74, 127.12, 126.14, 124.92, 120.16, 120.02, 77.27, 77.02, 76.76, 70.62, 64.92, 60.41, 47.16, 43.30, 30.57, 23.43, 21.07, 20.93, 14.21, 0.01. $C_{48}H_{47}N_3O_4$ 에 대한 ESI-MS (m/z)(정확한 질량 729.36): $[M+H]^+$ 계산치 730.4, 관측치 730.2.
- [0139] Fmoc-Phe-Lys(Mtt)-PABOH의 제조(도 15(반응식 6)에서 19):
- [0140] Fmoc 기를 10분 동안 9 mL의 DMF 중 30% 피페리딘을 이용하여 Fmoc-Lys(Mtt)-PABOH **18**(425 mg, 0.6 mmol, 1 eq)로부터 제거하였다. 용매를 진공하에서 제거하고, 생성된 오일을 10 mL의 DMF에 재현탁시켰다. DMF(5 mL) 중 Fmoc-Lys(Mtt)-OH(748 mg, 1.2 mmol, 1 eq) 및 파라-아미노 벤질 알콜(300 mg, 2.4 mmol, 2 eq)의 용액을 제조하였다. DIEA(465 mg, 3.6 mmol, 630 μ L, 3 eq)를 첨가한 후, DMF(2 mL) 중 HATU(502 mg, 1.3 mmol, 1.1 eq)의 용액을 첨가하였다. 반응은 30분 이내에 완료되었고, HPLC/LCMS에 의해 결정되었다. 용매를 진공하에서 부

분적으로 제거하고, 에틸 아세테이트/물로 추출하였다. 에틸 아세테이트 층을 물로 4회 세척한 후, 증발시켜, 오렌지색 고체를 생성시켰다. 미정제 물질을 헥산 및 에틸 아세테이트의 선형 구배를 이용한 40 g RediSep Rf 정상상 카트리지에서 정제하였다. 최종 생성물을 백색 고체로서 분리시켰다(850 mg, 97% 수율).

[0141] $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.20 (s, 1H), 7.73 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.50 (s, 2H), 7.48 - 7.34 (m, 8H), 7.34 - 7.20 (m, 11H), 7.20 - 7.07 (m, 7H), 7.04 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 6.28 (s, 1H), 5.22 (s, 1H), 4.62 (s, 2H), 4.43 (dd, $J = 10.7, 6.7$ Hz, 1H), 4.32 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 3.05 (s, 2H), 2.27 (s, 3H), 2.11 - 2.02 (m, 2H), 1.89 (s, 1H), 1.46 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H), 1.26 (s, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 146.35, 141.31, 136.97, 135.70, 129.10, 128.93, 128.57, 128.50, 127.82, 127.74, 127.71, 127.39, 127.12, 126.14, 124.91, 124.84, 120.10, 120.04, 77.28, 77.23, 77.02, 76.77, 70.60, 67.15, 64.96, 54.06, 47.08, 43.35, 31.30, 30.60, 23.52, 20.93. $\text{C}_{57}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_5$ 에 대한 ESI-MS (m/z)(정확한 질량 876.43): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 계산치 877.4, 관측치 877.3.

[0142] *Fmoc-Phe-Lys(Mtt)-PABC-APdMG*의 제조(도 15(반응식 6)에서 21):

[0143] 화합물 19(420 mg, 0.5 mmol, 1 eq)를 무수 DCM(20 mL)에 용해시켰다. 피리딘(216 mg, 2.7 mmol, 5.4 eq)을 첨가한 후, 무수 DCM 중 4-니트로페닐 클로로포르메이트(180 mg, 0.9 mmol, 1.8 eq)의 용액을 첨가하였다. 반응을 실온에서 2시간 동안 진행시킨 후, HPLC 및 TLC에 의해 확인하였다. 용매를 진공하에서 제거한 후, 헥산 및 에틸 아세테이트의 선형 구배를 이용하여 24 g RediSep Rf 정상상 카트리지에서 정제하였다. 생성물 *Fmoc-Phe-Lys(Mtt)-PABC-pNP*(20)를 황색 고체로서 분리시켰다(360 mg, 70% 수율). *Fmoc-Phe-Lys(Mtt)-PABC-pNP*(50 mg, 0.05 mmol, 1 eq)를 무수 DCM(3 mL)에 용해시켰다. 무수 DCM 중 DIEA(65 mg, 0.5 mmol, 90 μL , 10 eq)를 갖는 APdMG 1(25 mg, 0.05 mmol, TFA 염, 1 eq)의 용액을 이후 *Fmoc-Phe-Lys(Mtt)-PABC-pNP*에 첨가하였다. 반응을 4시간 동안 실온에서 진행시킨 후, HPLC 및 TLC에 의해 확인하였다. 용매를 진공하에서 제거하고, 미정제 물질을 헥산 및 에틸 아세테이트의 선형 구배로 4 g RediSep Rf 정상상 카트리지에서 정제하였다. 최종 생성물을 황색 고체로서 분리시켰다(38 mg, 60% 수율). $\text{C}_{76}\text{H}_{72}\text{ClFN}_8\text{O}_8$ 에 대한 ESI-MS (m/z)(정확한 질량 1278.51): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 계산치 1279.5, 관측치 1279.4; $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 계산치 640.3, 관측치 640.3.

[0144] *Mmt-S-dPEG₈-Phe-Lys(Mtt)-pABC-dMG*의 제조(도 15(반응식 6)에서 22):

[0145] 18 mg의 화합물 21(0.014 mmol, 1 eq)을 2 mL의 DMF 중 30% 피페리딘으로 탈보호시켰다. 5분 후, HPLC/LCMS에 의해 반응이 완료된 것을 확인하고, 용매를 진공하에서 제거하였다. 생성된 오일을 DMF(0.5 mL)에 용해시키고, 여기에 *Mmt-S-dPEG₈-COOH*(13 mg, 0.017 mmol, 1.2 eq) 및 DIEA(9 mg, 0.070 mmol, 13 μL , 5 eq)를 첨가하였다. DMF(200 μL) 중 HATU(6 mg, 0.014 mmol, 1.2 eq)의 용액을 제조하고, 반응물에 첨가하였다. 1시간 후, 반응을 HPLC/LCMS에 의해 완료된 것으로 간주하고, 용매를 진공하에서 제거하였다. 남은 오일을 DCM으로부터 DCM 중 10% MeOH로의 선형 구배를 이용한 4 g RediSep Rf 정상상 카트리지에서 급속 정제하였다. 최종 생성물을 백색 고체로서 분리시켰다(23 mg, 92% 수율). $\text{C}_{100}\text{H}_{114}\text{ClFN}_8\text{O}_{16}\text{S}$ 에 대한 ESI-MS (m/z)(정확한 질량 1768.77): $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 계산치 885.9, 관측치 886.0.

[0146] *HS-dPEG₈-Phe-Lys-PABC-아미노프로필-dMG*의 제조(도 15(반응식 6)에서 5):

[0147] 10 mg의 화합물 22(5.6 μmol)에 2시간 동안 2 mL의 DCM 중 0.5% TFA/5% TIS를 처리한 후, HPLC/LCMS에 의해 확인하여 완전한 탈보호를 확인하였다. 용액을 진공하에서 제거한 후, 저온 에테르로 3회 세척하였다. 백색 고체를 물/아세트니트릴(1:1)에 용해시키고, 동결시키고, 동결건조시켰다. 생성된 백색 고체를 추가 정제 없이 이용하였다(6 mg, 86% 수율). $\text{C}_{60}\text{H}_{82}\text{ClFN}_8\text{O}_{15}\text{S}$ 에 대한 ESI-MS (m/z)(정확한 질량 1240.53): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 계산치 1241.5, 관측치 1241.6; $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 계산치 621.3, 관측치 621.3.

[0148] *C'dot-(Cy5)-PEG-말레이미드의 제조:*

[0149] 말레이미드 및 NHS 에스테르 기능화 폴리에틸렌 글리콜(mal-dPEG₁₂-NHS)을 DMSO 중 아미노실란(APTES)과 컨쥬게이션시켰다(물비 mal-PEG-NHS:APTES:DMSO 1:0.9:60). 반응 혼합물을 48시간 동안 실온에서 질소하에 두어, 실

란 기능화된 mal-dPEG(mal-dPEG-APTES)를 생성시켰다. 말레이미드 기능화 Cy5(mal-Cy5)를 DMSO 중 티올-실란(MPTMS)과 반응시켰다(몰비 Cy5:MPTMS:DMOS 1:25:1150). 반응물을 24시간 동안 실온에서 질소하에 두어, 실란 기능화 Cy5(Cy5-MPTMS)를 생성시켰다. 이후, TMOS 및 Cy5-MPTMS를 암모니아 하이드록시드 용액(~pH 8)으로 적정시켰다(몰비 TMOS: Cy5:NH₃:H₂O 1:0.001:0.44:1215). 용액을 24시간 동안 실온에서 600 rpm에서 교반하여 균일한 Cy5 캡슐화 실리카 나노입자를 형성시켰다. 이후, mal-dPEG-APTES 및 실란 기능화 폴리에틸렌 글리콜(PEG-실란, MW 약 500, Gelest)을 합성 용액에 첨가하여 폐길화시키고, 입자를 표면 기능화시켰다(PEG-실란:TMOS:mal-PEG-APTES 1:2.3:0.006). 용액을 24시간 동안 실온에서 600 rpm에서 교반한 후, 교반 없이 또 다른 24시간 동안 80℃에서 인큐베이션하였다. 용액을 2일 동안 2000 mL 탈이온수(10k MWC0)에서 투석시키고, 200 nm 주사기 필터로 여과시키고, 최종적으로 크로마토그래피 정제(Superdex 200)하여, 바람직한 mal-C'dots를 생성시켰다.

[0150] *C' dot-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG₂-Gly-D-Tyr-APdMG*의 제조:

[0151] 화합물 6을 획득하기 위해 이용된 동일한 전체 합성 전략을 이용하였다. 링커-약물 작제물 Phe-Arg-dPEG₂-Gly-D-Tyr-APdMG(23)을 합성하였다. (C₇₄H₁₀₅ClFN₁₅O₂₀S (정확한 질량 1609.71)에 대한 ESI-MS (*m/z*): [M+2H]²⁺ 계산치 805.9, 관측치 805.6). 이러한 작제물을 NDC 6 및 7에 대해 기재된 바와 같이 C' dot-(Cy5)-PEG-mal에 부착시켰다.

[0152] *C' dot-(Cy5)-PEG-Phe-Lys-PABC-Gly-D-Tyr-APdMG*의 제조:

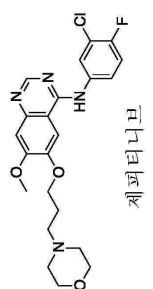
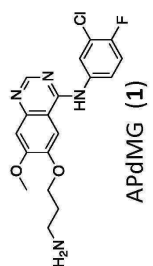
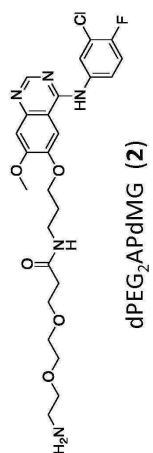
[0153] 화합물 7을 획득하기 위해 이용된 동일한 전체 합성 전략을 이용하였다. 링커-약물 작제물 Phe-Lys-PABC-Gly-D-Tyr-APdMG(24)를 합성하였다. (C₇₁H₉₄ClFN₁₀O₁₈S (정확한 질량 1460.61)에 대한 ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ 계산치 1461.6, 관측치 1461.3; [M+2H]²⁺ 계산치 731.3, 관측치 731.5). 이러한 작제물을 NDC 6 및 7에 대해 기재된 바와 같이 C' dot-(Cy5)-PEG-mal에 부착시켰다.

[0154] *C' dot-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG₂-Gly-D-Tyr-아미노프로필-APdMG*의 방사선요오드화의 제조:

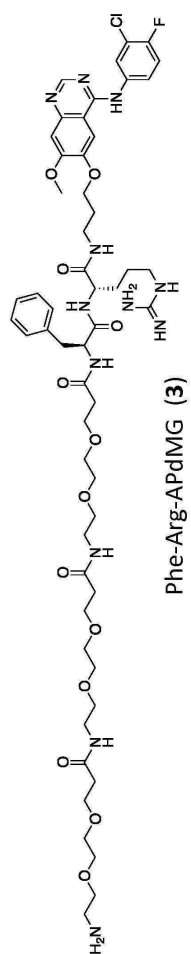
[0155] 방사선요오드화를 Iodogen 프로토콜을 이용하여 C' dot-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG₂-Gly-D-Tyr-APdMG에서 수행하였다. 요오드화 반응물을 PD10 컬럼에서 정제한 후, GPC(Superdex)에 의해 분석하였다.

도면

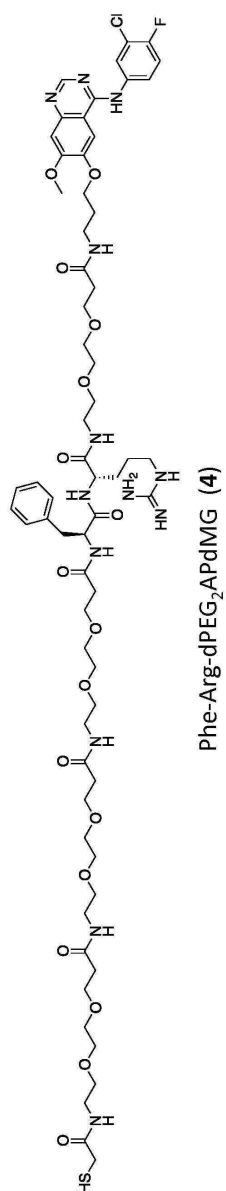
도면1a



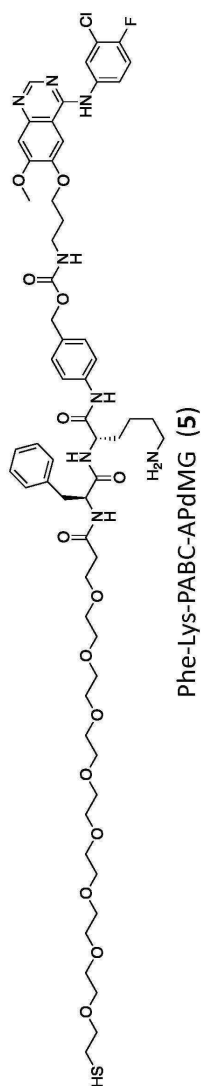
도면1b



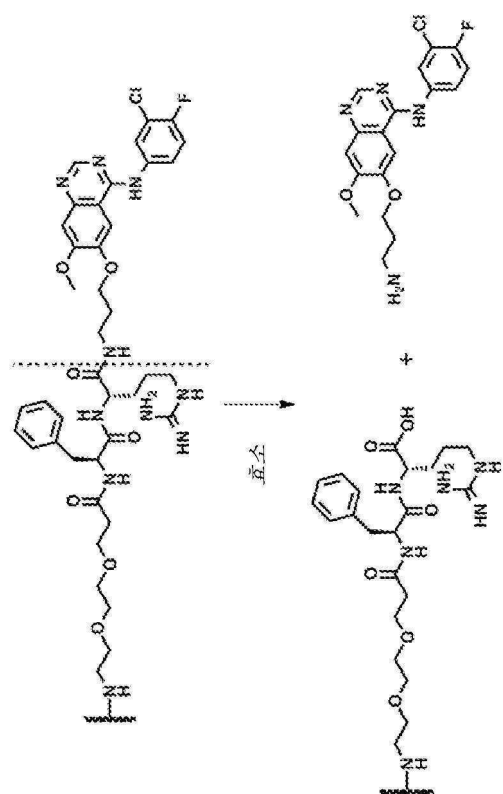
도면 1c



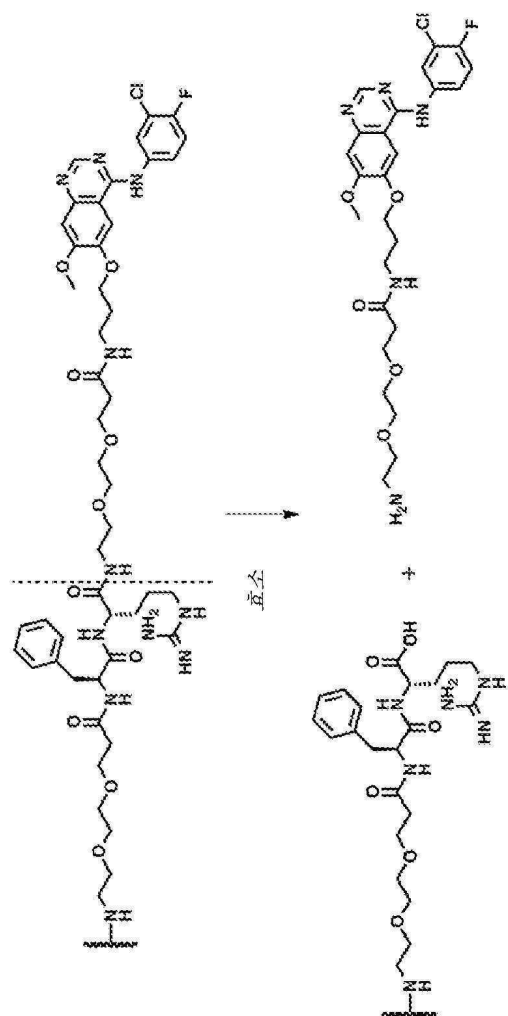
도면 1d



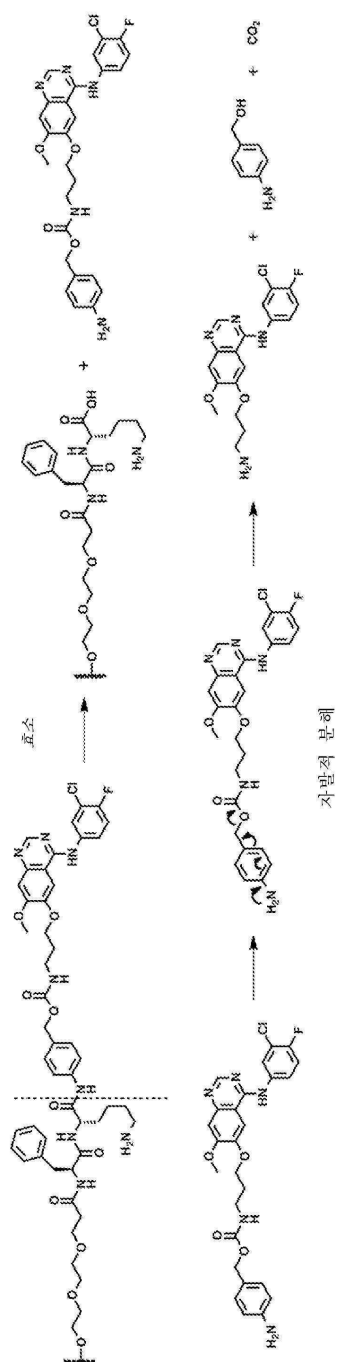
도면2a



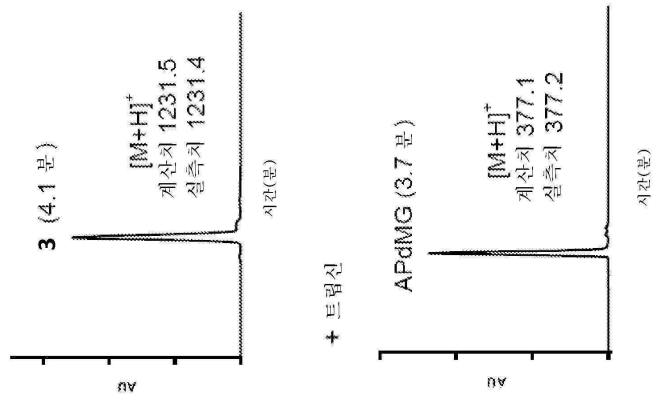
도면2b



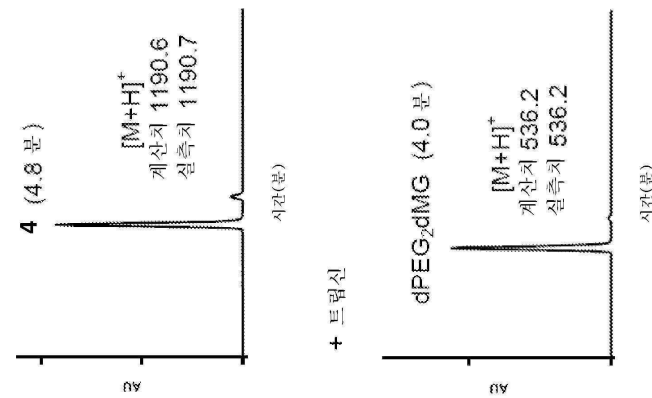
도면2c



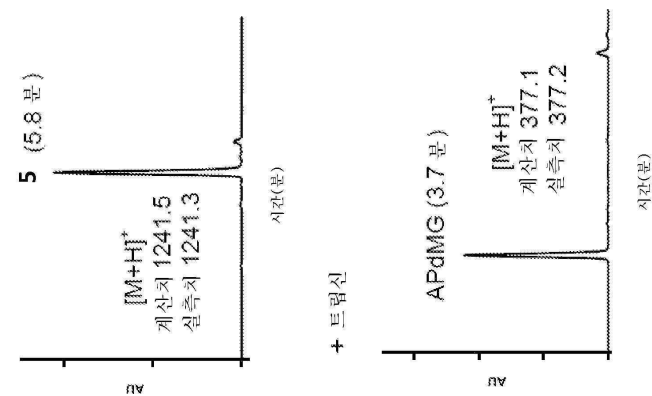
도면3a



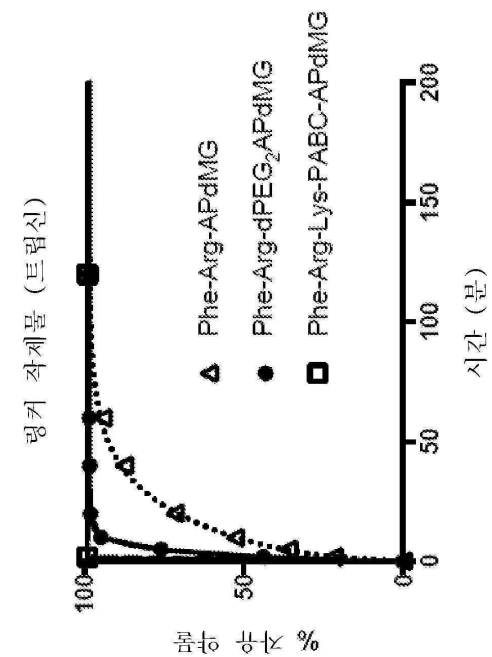
도면3b



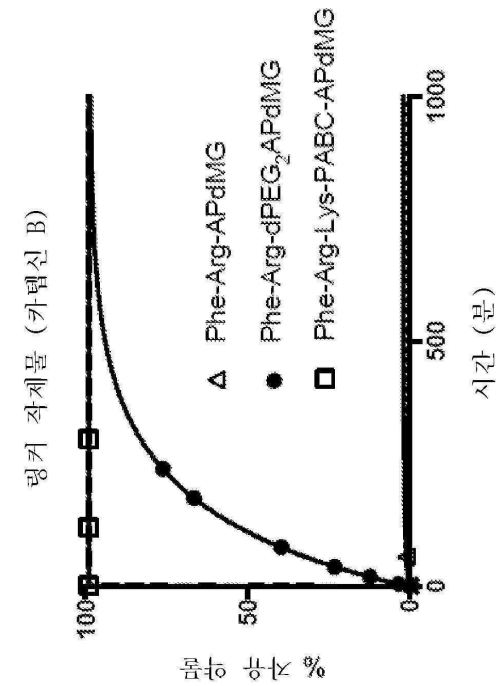
도면3c



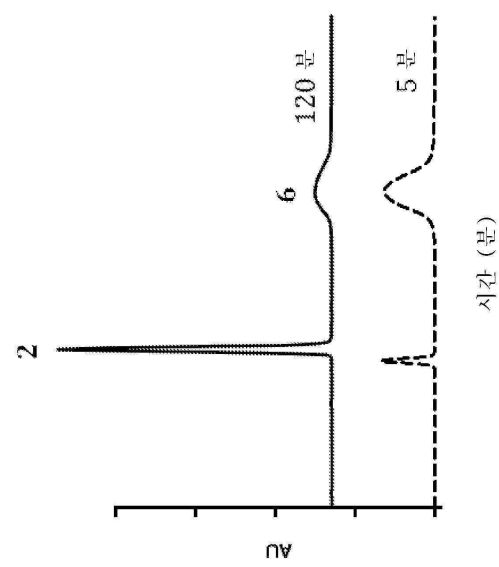
도면4a



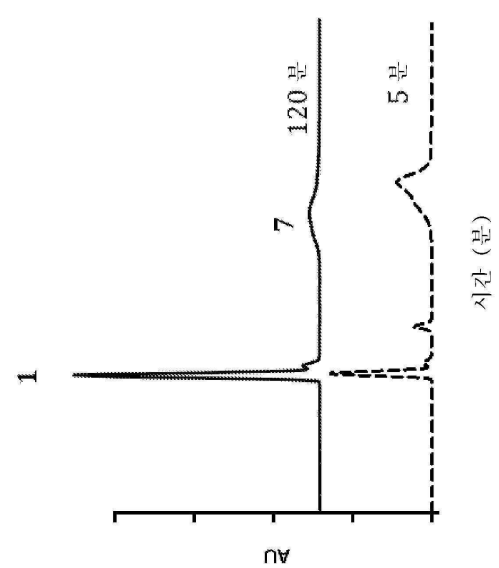
도면4b



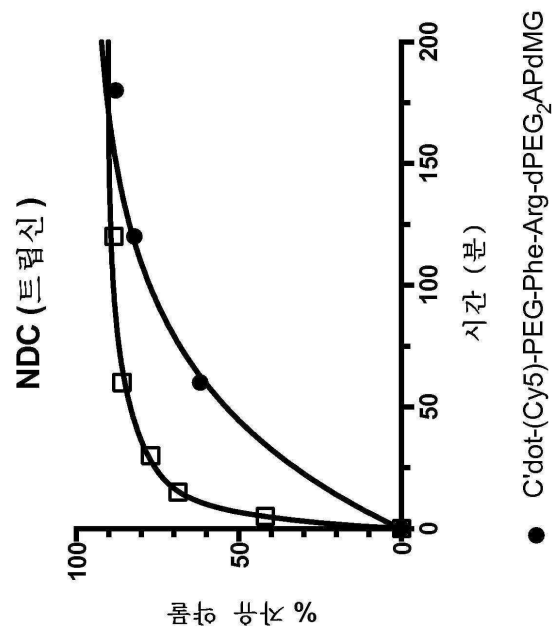
도면5a



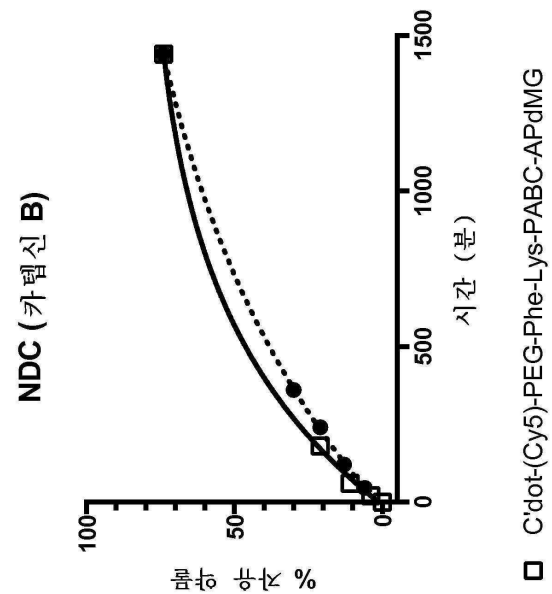
도면5b



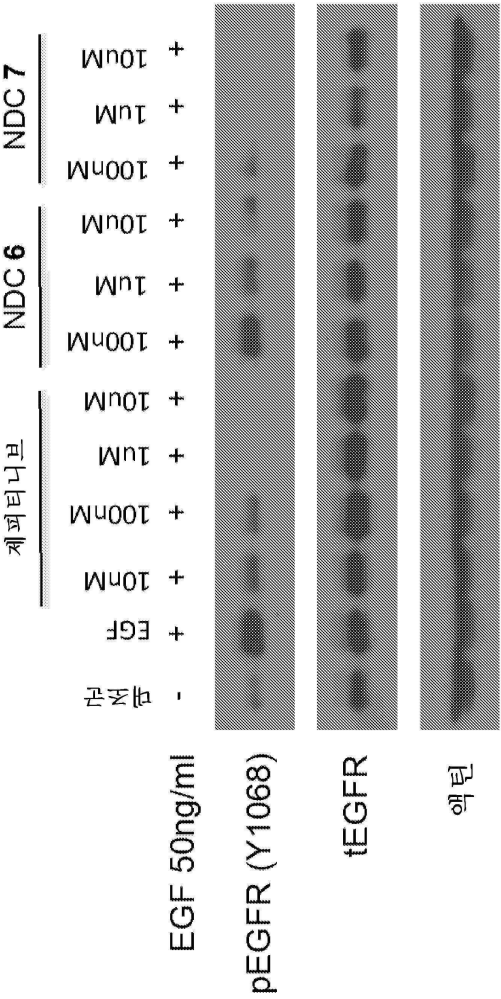
도면6a



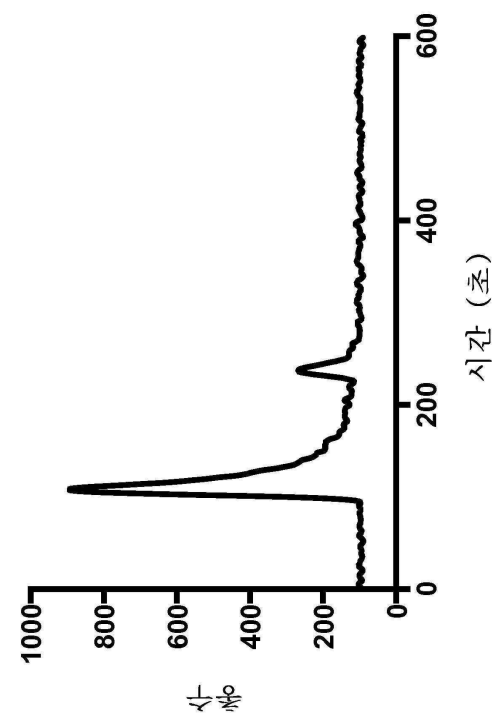
도면6b



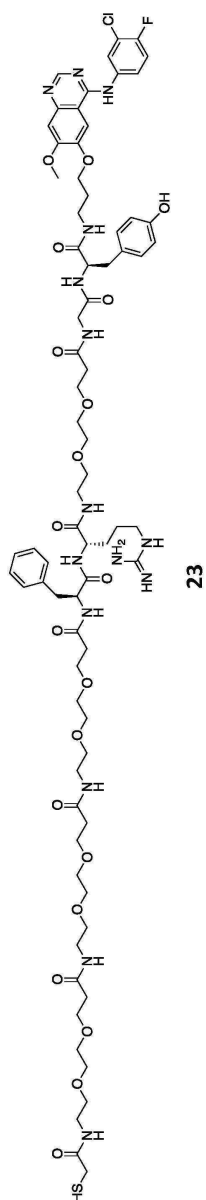
도면7



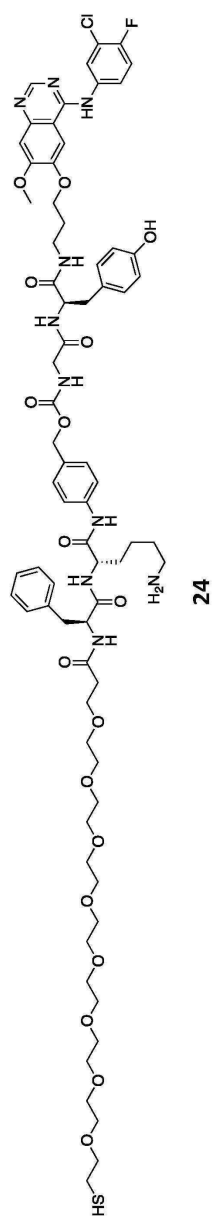
도면8



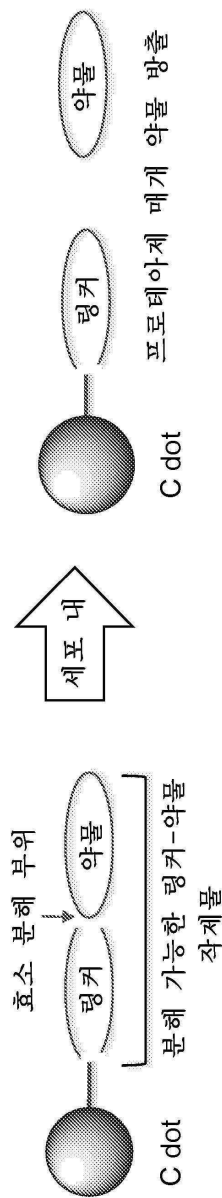
도면 9a



도면9b

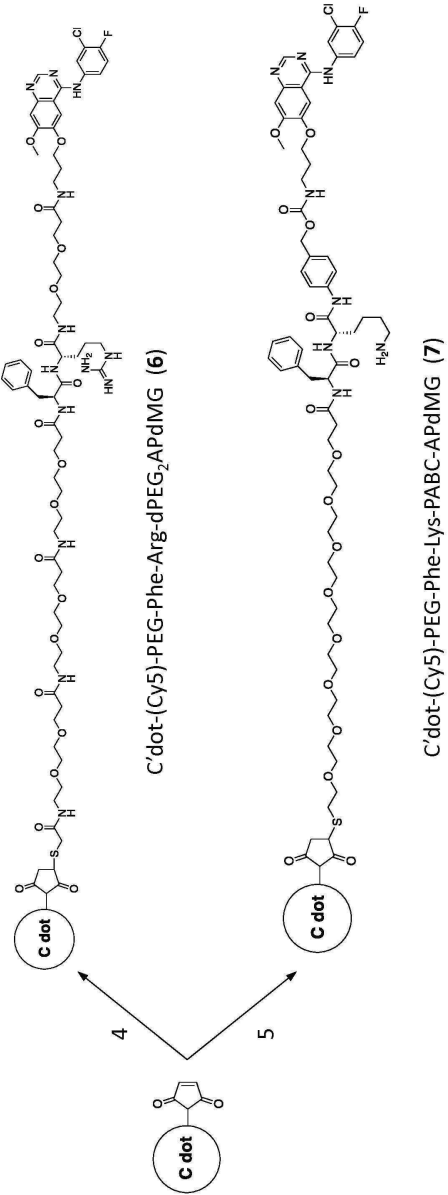


도면10



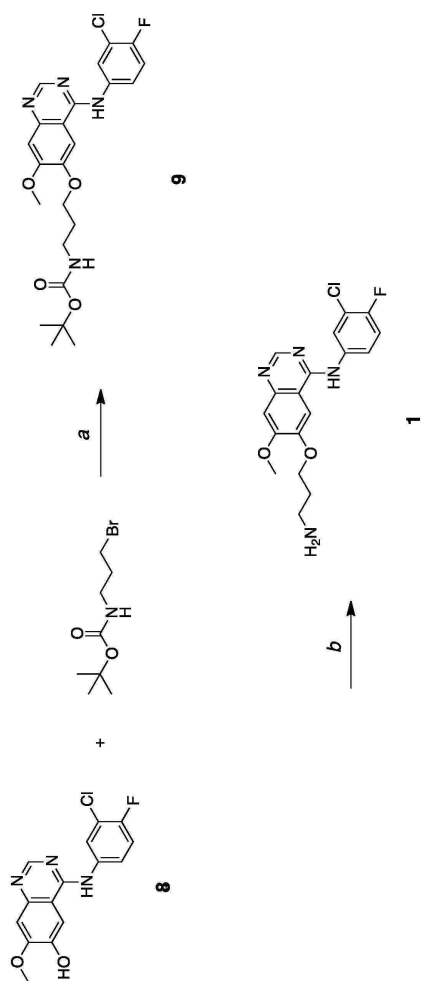
반응식 1

도면11



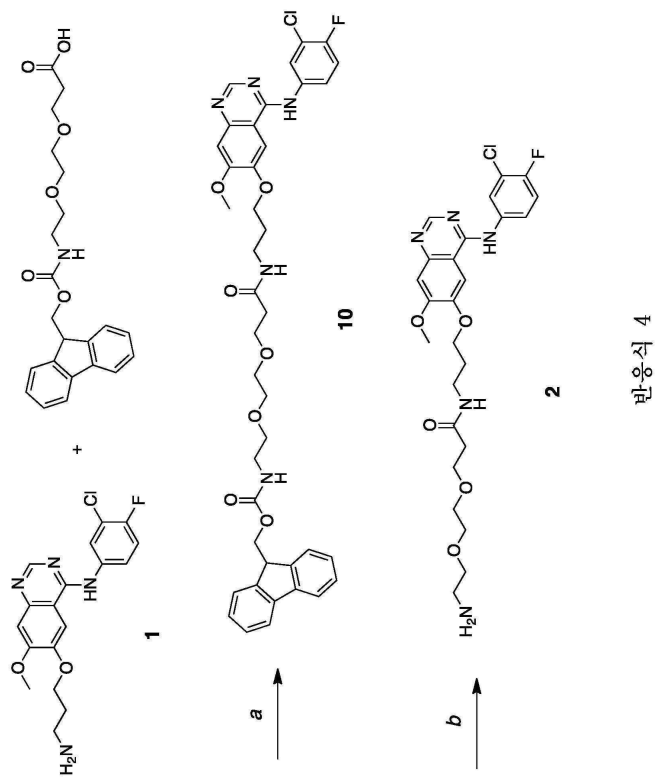
반응식 2

도면12

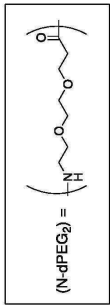


반응식 3

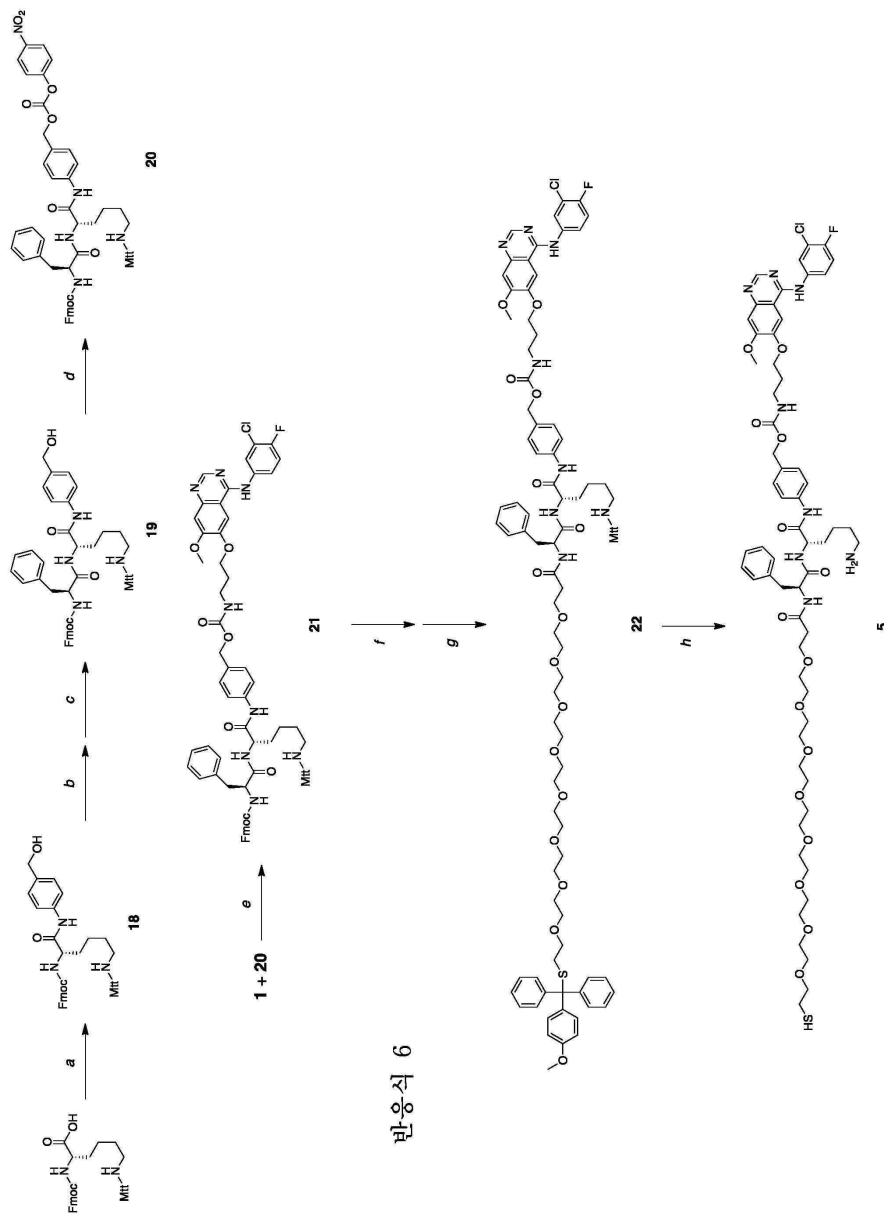
도면13



도면14

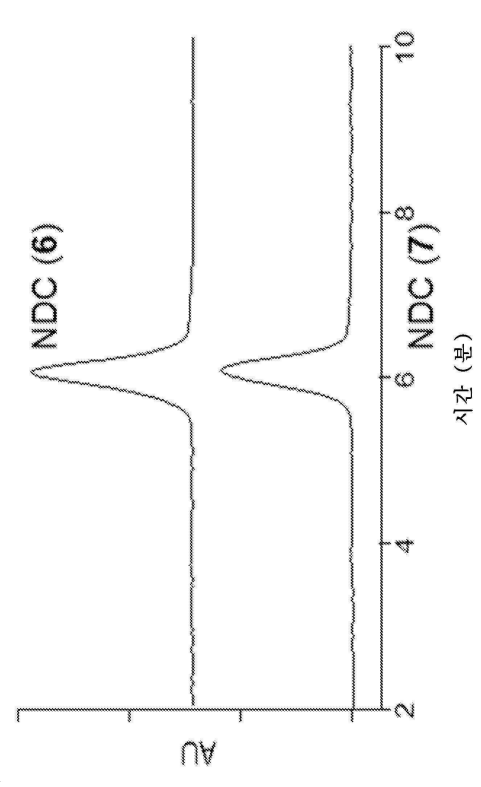


도면15

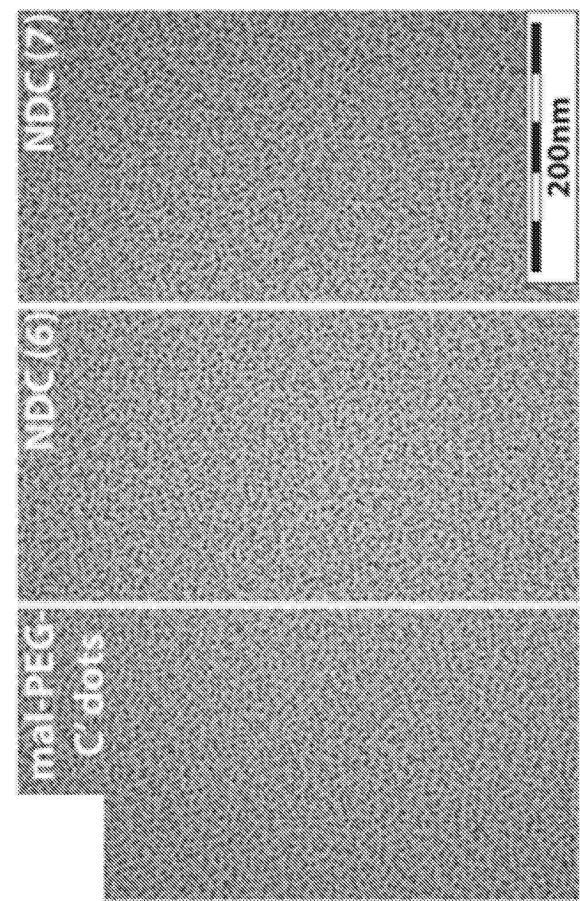


반응식 6

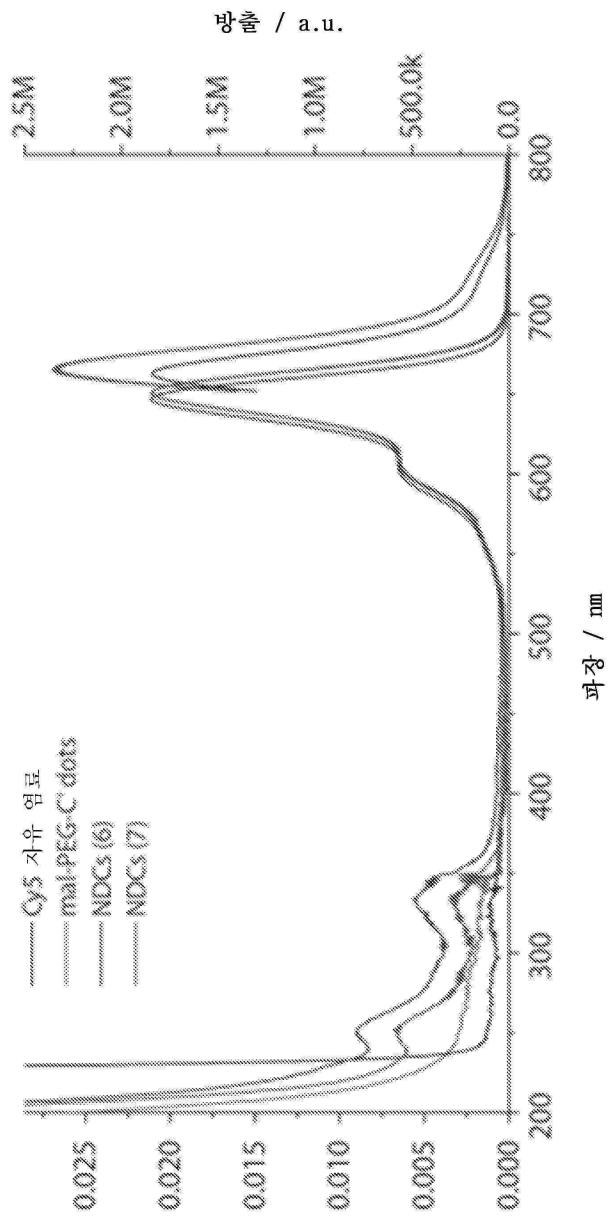
도면16a



도면16b



도면16c



도면16d

