



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0138246
(43) 공개일자 2011년12월26일

(51) Int. Cl.

A61K 49/04 (2006.01) A61K 49/06 (2006.01)

A61K 49/12 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7024519

(22) 출원일자(국제출원일자) 2010년03월19일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2011년10월18일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2010/053619

(87) 국제공개번호 WO 2010/106169

국제공개일자 2010년09월23일

(30) 우선권주장

61/161,535 2009년03월19일 미국(US)

(71) 출원인

제너럴 일렉트릭 캄파니

미합중국 뉴욕, 웨벡테디, 원 리버 로우드

(72) 발명자

카터, 랜달, 리

미국 12309 뉴욕주 니스카유나 케이1-5디23 원 리
서치 서클 지이 글로벌 리서치

캐슬, 제이슨, 윌리엄

미국 12309-1027 뉴욕주 니스카유나 케이1 5디54
에이 원 리서치 서클 지이 글로벌 리서치

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 19 항

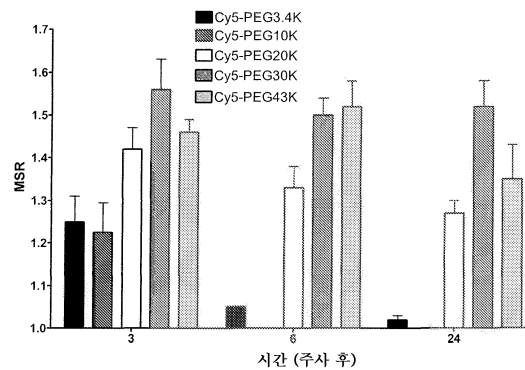
(54) 광학 영상화제

(57) 요약

본 발명은 광학 영상화 조영제를 포함하는, 종양 둘레 변연의 생체내 광학 영상화 방법에 관한 것이다. 광학 영상화제는 근적외선 염료와 15-45 kDa 범위의 분자량을 갖는 합성 폴리에틸렌글리콜 (PEG) 중합체의 컨쥬게이트를 포함한다. 또한 광학 영상화 조영제, 제약 조성물 및 키트가 기재된다.

대표도 - 도1

MSR 비율에 대한 PEG 분자량의 효과



(72) 발명자

피쉬, 케네스, 마이클

미국 12309 뉴욕주 니스카유나 케이1-5디33 원 리
서치 서클 지이 글로벌 리서치

수드, 애덤

미국 12309-1027 뉴욕주 니스카유나 케이1 4디55
원 리서치 서클 지이 글로벌 리서치

스테이플스, 나탈리, 앤

미국 12309 뉴욕주 니스카유나 케이1-5비30 원 리
서치 서클 지이 글로벌 리서치

리, 브라이언 더-란

미국 12309-1027 뉴욕주 니스카유나 케이1-5836에
이 원 리서치 서클 지이 글로벌 리서치

특허청구의 범위

청구항 1

(i) 분자량이 15 내지 45 kDa인 합성 폴리에틸렌글리콜 중합체와 1 또는 2개의 기 Opt^R 의 컨주게이트를 포함하는, 생체내 (*in vivo*) 영상화에 적합한 광학 영상화 조영제를 제공하는 단계;

(ii) 상기 조영제가 투여된, 하나 이상의 종양을 갖는 것으로 알려진 살아있는 대상체의 상기 종양을 포함하는 관심 영역의 광학 영상을 생성하는 단계

를 포함하며, 여기서 각각의 Opt^R 은 독립적으로, 파장 600-850 nm의 광을 사용하여 광학 영상화 절차 중에 직접 또는 간접적으로 탐지가능한 생체적합성 광학 리포터 기인,

상기 대상체에서의 종양의 종양 변연(margin)의 생체내 광학 영상화 방법.

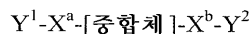
청구항 2

제1항에 있어서, 중합체에 오직 Opt^R 기(들)만이 컨주게이팅되는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 컨주게이트가 하기 화학식 I의 것인 방법:

<화학식 I>



식 중,

[중합체]는 합성 폴리에틸렌글리콜 중합체이고;

X^a 및 X^b 는 상기 폴리에틸렌글리콜 중합체의 말단에 부착되며 독립적으로 결합 또는 L 기이며;

여기서 L은 화학식 $-(A)_m$ -의 링커 기이며,

여기서 각각의 A는 독립적으로 $-CR_2-$, $-CR=CR-$, $-C\equiv C-$, $-CR_2CO_2-$, $-CO_2CR_2-$, $-NRCO-$, $-CONR-$, $-NR(C=O)NR-$, $-NR(C=S)NR-$, $-SO_2NR-$, $-NRSO_2-$, $-CR_2OCR_2-$, $-CR_2SCR_2-$, $-CR_2NRCR_2-$, C_{4-8} 시클로헥테로알킬렌기, C_{4-8} 시클로알킬렌기, C_{5-12} 아릴렌기 또는 C_{3-12} 헤테로아릴렌기, 아미노산 또는 당이며;

여기서 각각의 R은 독립적으로 H, C_{1-4} 알킬, C_{2-4} 알케닐, C_{2-4} 알키닐, C_{1-4} 알콕시알킬 또는 C_{1-4} 히드록시알킬로부터 선택되고;

m은 1 내지 20의 정수이고;

Y^1 및 Y^2 는 독립적으로 Opt^R 또는 $-OH$; $-O(C_{1-10}$ 알킬); $-NH_2$ 또는 $-NH(CO)(C_{1-10}$ 알킬)로부터 선택되는 관능기이며;

여기서 Opt^R 은 제1항에 정의된 바와 같으며;

단, Y^1 및 Y^2 중 적어도 하나는 Opt^R 이어야 한다.

청구항 4

제3항에 있어서, Y^1 및 Y^2 가 각각 Opt^R 인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, Y^1 및 Y^2 각각의 Opt^R 기가 동일한 생체적합성 광학 리포터를 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 생체적합성 광학 리포터가 시아닌 염료인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 생체적합성 광학 리포터 기가 벤조피릴륨 염료인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리에틸렌글리콜 중합체가 22 내지 40 kDa의 분자량을 갖는 것인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리에틸렌글리콜 중합체가 선형 중합체인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 조영제가 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 정의된 컨쥬게이트의 제약 조성물을 생체적합성 담체와 함께 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

- (i) 제1항에 정의된 살아있는 대상체내의 관심 영역을 포함하는 조직 표면에 여기 광을 비추는 단계;
- (ii) Opt^R 의 여기에 의해 생성되는 조영제로부터의 형광을 형광 검출기를 사용하여 검출하는 단계;
- (iii) 형광 검출기로 검출된 빛을 임의로 여과하여 형광 성분을 분리해내는 단계;
- (iv) 상기 조직 표면의 영상이 단계 (ii) 또는 (iii)의 형광 빛으로부터 형성되는 단계를 포함하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 단계 (i)의 여기 광이 본질적으로 연속파 (CW)인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

- (a) 상기 살아있는 대상체의 관심 영역을 형성하는, 이질의 조성을 갖는 광-산란 생물학적 조직을, 광원으로부터의 빛에 세기를 달리하여 소정의 시간 동안 노출시켜 조영제를 여기시키고, 조직이 여기 광을 배가-산란시키는 단계;
- (b) 상기 노출에 응한 조직으로부터의 배가-산란 광 방출을 탐지하는 단계;
- (c) 조직 내의 상이한 위치에서의, 조직의 이질의 조성에 따라 달라지는 형광 특징의 수준에 각각 상응하는 여러 수치를 프로세서 사용하여 수립함으로써 조직에 걸쳐 방출로부터의 형광 특징을 수량화하는 단계; 및
- (d) 단계 (c)의 수치에 따라 조직의 이질의 조성을 맵핑하여 조직의 영상을 생성하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 외과의사가 상기 대상체로부터 종양을 절제하는 것을 보조하기 위하여 광학 영상화를 수술 중에 수행하는 방법.

청구항 15

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 정의된 컨쥬게이트를 포함하는, 포유동물체의 생체내 광학 영상화에 적합한 조영제.

청구항 16

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 정의된 컨쥬게이트를 생체적합성 담체와 함께 포함하는 제약 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 한 명의 환자에 적합한 투약량을 포함하며 적합한 주사기 또는 용기에 제공되는 제약 조성물.

청구항 18

생체적합성 담체를 살균 공급하여 재형성하면 용해가 이루어져 목적하는 제약 조성물을 제공하도록 하는, 멸균 고체 형태의 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 정의된 컨쥬게이트를 포함하는 제16항 또는 제17항에 따른 제약 조성물의 제조를 위한 키트.

청구항 19

제18항에 있어서, 멸균 고체 형태가 동결건조된 고체인 키트.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 광학 영상화 조영제를 포함하는, 종양 둘레 변연(margin)의 생체내 (*in vivo*) 광학 영상화 방법에 관한 것이다. 광학 영상화제는 근적외선 염료와 15-45 kDa 범위의 분자량을 갖는 합성 폴리에틸렌글리콜 (PEG) 중합체의 컨쥬게이트를 포함한다. 또한 광학 영상화 조영제, 제약 조성물 및 키트가 기재된다.

배경기술

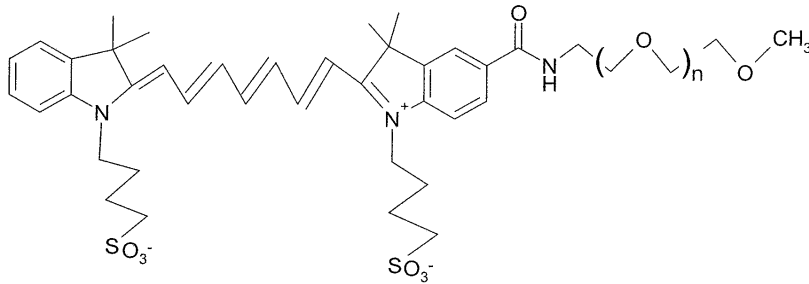
[0002] 과학적 지식의 큰 진전 및 다양한 치료 양식의 개발에도 불구하고, 여전히 수술이 초기 단계인 고형 종양에 가장 흔히 사용되며 가장 효과적인 치료이다. 종양을 물리적으로 제거하면, 증상을 감소시키고, 암이 전이될 기회를 감소시키고, 체내의 암의 양을 감소시키고 다른 치료가 더욱 효과적이도록 돕는다. 암 환자의 60 내지 70%는 수술 자체만을 받거나 (모든 암의 40%는 수술만으로 치료됨), 다른 요법, 통상적으로 방사선요법 또는 화학요법과 병용하여 수술을 받을 것이다. 모든 암 환자의 90% 초과에서 질환을 앓는 동안 진단, 병기 결정, 치료 또는 합병증을 관리하는데 수술을 사용한다. 수술이 가장 오래되고 가장 통상적인 형태의 암 치료법이지만, 여러 면에서 이는 또한 가장 덜 표준화된 중재적시술이며, 병든 기관을 추적하고 정상 조직과 암 조직을 구별하는 것을 돕는 새로운 도구를 필요로 한다.

[0003] 외과의사는 전통적으로 종양의 위치를 알기 위하여 시각 및 촉각 (시진 및 촉진), 및 임의의 이용가능한 수술전 진단적 영상 정보에 의존한다. 그러나, 암 조직은 종종 정상 조직으로부터 구별해내기 어렵거나, 탐지하기 너무 작다 (예, 잠복 종양). 따라서, 전통적인 수술 기법은 모든 암 조직을 발견하거나 제거하는 것을 보장하지 못하며, 암 조직, 특히 종양 변연을 매우 높은 해상도 및 감도로 구체적으로 식별할 수 있는 제제가 필요하다.

[0004] 뵐러 (Wohrle) 등 (문헌 [Makromol. Symp., 59, 17-33 (1992)])은 암의 광역학적 치료법을 위한 생체내 표적 조직에서의 흡수율을 개선시키는 잠재적인 방법으로서 포르피린 광과민제에 대한 중합체-컨쥬게이팅을 연구하였다. 연구한 중합체는 래트 혈청 알부민, 합성 폴리에테르 및 폴리알콜이었다. 뵐러 등은 중합체 담체의 컨쥬게이팅이 종양에서의 흡수율을 개선시킬 수 있다고 결론내렸다.

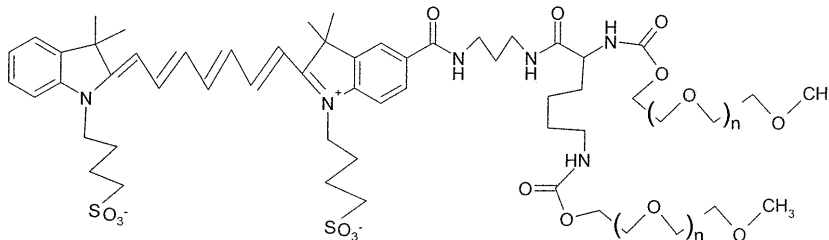
[0005] US 제5,622,685호에는, 생체내 종양 진단 및 치료 모두에 있어서 개선된 특성을 가지는, 포르피린, 프탈로시아닌 또는 나프탈로시아닌을 포함하는 폴리에테르-치환된 종양 치료제가 개재되어 있다. 폴리에테르 치환체는, 말단 히드록실기가 각각 C₁₋₁₂ 알킬 또는 C₁₋₁₂ 아실기로 에테르화 또는 에스테르화된 폴리에틸렌글리콜 (PEG)을 포함한다. 알킬기는 가장 바람직하게는 메틸기이다. US 제5,622,685호 (컬럼 2)에는 컨쥬게이트의 총 분자량이 바람직하게는 10,000 Da (10 kDa) 이상임이 교시되어 있다.

- [0006] US 제6,083,485호 및 이에 상응하는 문헌에는, 옥탄올-물 분배 계수가 2.0 이하인 시아닌 염료를 사용하는 생체 내 근적외선 (NIR) 광학 영상화 방법이 개시되어 있다. 또한, 분자량이 30 kDa이하이고, 특정 세포 개체군에 결합되거나 수용체에 선택적으로 결합되거나 조직 또는 종양에 축적되는 "생물학적 탐지 단위"와 상기 염료의 컨쥬게이트가 개시되어 있다. US 제6,083,485호의 염료는 또한 "비-선택적으로 결합하는" 거대분자의 범위, 예컨대 폴리리신, 텍스트란, 카르복시텍스트란, 폴리에틸렌 글리콜, 메톡시폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐 알콜 또는 캐스케이드 중합체-형 구조에 컨쥬게이팅될 수 있다. 컨쥬게이트의 분자량은 100 Da 내지 100,000 Da 초과까지의 범위 (0.1 내지 100 kDa 초과)로 교시되어 있다. 특정 염료-거대분자 컨쥬게이트가 개시되어 있지 않다.
- [0007] US 제6,350,431호 (니코메드 이미징 에이에스 (Nycomed Imaging AS))에는, 2개 이상의 발색단 (즉, 염료 분자)이 연결된 분자량이 60 내지 100,000 Da인 폴리알킬렌 옥시드 (PAO)를 포함하는, 분자량이 500 내지 500,000 Da 범위인 경량 영상화 조영제가 개시되어 있다. 폴리알킬렌 옥시드 (PAO) 잔기의 바람직한 분자량 범위는 200 내지 100,000 Da, 더 바람직하게는 250 내지 50,000 Da, 특히 바람직하게는 250 내지 25,000 Da, 가장 바람직하게는 400 내지 15,000 Da임이 교시되어 있다. US 제6,350,431호의 조영제는 표적화 백터를 추가로 포함할 수 있다. US 제6,350,431호의 실시예에는 하기 PAO 중합체가 적용된다:
- [0008] (i) 분자량이 3,400 Da인 PEG-디아민: 실시예 1, 2, 6, 16, 18 및 25;
- [0009] (ii) 분자량이 5,000 Da인 PEG-디아민: 실시예 3, 4 및 20;
- [0010] (iii) 분자량이 10,000 Da인 PEG-디아민: 실시예 7, 15, 17 및 26;
- [0011] (iv) 분자량이 3,400 Da인 PEG-디티올: 실시예 12;
- [0012] (v) 분자량이 10,000 Da인 PEG-디티올: 실시예 13;
- [0013] (vi) 평균 분자량이 약 14,600인 폴리(옥시에틸렌-코-옥시프로필렌-코-옥시에틸렌) 블록 공중합체: 실시예 27.
- [0014] 따라서, US 제6,350,431호의 실시예의 분자량 범위는 모두 3.4 내지 14.6 kDa이다. PEG 중합체 단독에 있어서, 예시되는 분자량 범위는 3.4 내지 10 kDa이다.
- [0015] 유안 (Yuan) 등 (문헌 [Cancer Res., 55, 3752-3756 (1995)])은 염료-라벨링된 거대분자에 대한 인간 종양 세포의 혈관 투과성을 연구하였고, 종양 혈관은 일반적으로 정상 세포보다 쉽게 누출되며 덜 선택투과성인 것으로 결론내렸다. 종양 세포 투과성은 거대분자 분자량 범위 25 kDa 내지 160 kDa에서 두 배로 차이나는 것으로 보고되어 있다.
- [0016] 델리안 (Dellian) 등 (문헌 [Br.J.Cancer, 82(9), 1513-1518 (2000)])은 인간 종양 세포의 혈관 투과성에 대한 분자 전하의 효과를 연구하였다. 이들은 양으로 하전된 분자가 유사한 분자량의 중성 또는 음으로 하전된 화합물과 비교하여, 고형 종양으로 보다 빨리 삼출되는 것으로 결론내렸다.
- [0017] 리차 (Licha) 등의 문헌 [SPIE Vol 3196 p. 98-102 (1998)]에는 메톡시폴리에틸렌글리콜 (MPEG) 기체의 폴리(에틸렌글리콜) (PEG) 중합체를 포함하는 생체내 형광 영상화를 위한 조영제가 개시되어 있다. 따라서, 컨쥬게이트는, PEG 중합체의 한 말단에 컨쥬게이팅된 헵타메틴 시아닌 염료, 및 다른 말단에 메틸기를 갖는다.



염료 컨쥬게이트	n	분자량 (kDa)
NIR96017	22-28	1.83
NIR96008	100-150	6.15
NIR96486	240-320	13.2
NIR96016	420-530	20.7

또한, 리차에 의해, 2 MPEG 사슬이 단일 시아닌 염료에 컨쥬게이팅된 염료 컨쥬게이트가 개시되었다 (NIR96307, 분자량 대략 41 kDa).



NIR96307

NIR96307에 있어서, n은 확정되어 있지 않으나, 컨쥬게이트의 평균 분자량은 41 kDa인 것으로 언급되었다. 리차의 중합체 컨쥬게이트는 상응하는 MPEG 아민, 즉 $H_2NCH_2[CH_2OCH_2]_nCH_2OCH_3$ 으로부터 합성되었다.

관련 문헌 [Licha *et al.*, SPIE Vol 3196, p. 103-110 (1998)]에는 상기 MPEG 컨쥬게이트를 사용하는 동물에서의 중앙 탐지가 기재되어 있다. 특히, 관심사는 PEG 컨쥬게이트의 분자량의 (i) 그의 허용성; (ii) 약물동력학 거동; 및 (iii) 약성 조직과 정상 조직 사이의 대비에 대한 효과였다. 상기 문헌의 발명자들은 분자량이 증가할수록 생체내에서의 혈액 순환 시간을 연장시킴을 관찰하였다. 그들은 중앙 환경에서의 증가된 보유율 및 개선된 중앙 대비가 분자량이 6 kDa 초과인 염료-MPEG 컨쥬게이트에 있어서, 후기에 관찰되는 것으로 결론내렸다.

몬텟 (Montet) 등의 문헌 [Radiology, 242(3), 751-758 (2007)]에는 근적외선 프로브 엔지오센스 (AngioSense) 680 및 엔지오센스 750을 사용하는 혈관신생의 형광 분자 단층촬영법 (FMT)이 보고되어 있다. 이는 비-켄칭에 최적화된 인도시아닌-유형 형광단이 있는 고분자량 (250 kDa) PEG화 그래프트 공중합체로 기술되어 있다. 제제는 폴리리신 골격에 부착된 MPEG를 함유한다. 몬텟 등은 상기 제제가 투여 30분 후까지 중앙 삼출 없이 연장된 혈액 반감기 (5시간 초과)를 나타내었으며, 그 이후의 시간에는 증가된 중앙 흡수율 (그에 따라 영상 광도)을 나타내는 것으로 보고한다.

새드 (Sadd) 등 (문헌 [J.Control.Rel., 130, 107-114 (2008)])은 시험관내 및 생체내에서의 화학요법의 효능 및 영상화에 대한 3가지의 상이한 나노담체 (선형 중합체; 덴드리머 및 리포솜)의 특징을 연구하였다. 연구된 선형 중합체는 하기 유형의 표적화 PEG 중합체를 포함하였다:

[LHRH]-[PEG 중합체]-Cy5.5,

(식 중, LHRH는 황체형성 호르몬-방출 펩티드의 합성 유사체이고;

Cy5.5는 특정 시아닌 염료임).

사용된 PEG 중합체는 분자량이 약 3 kDa이었다. 새드 등의 도 4 (p. 111)에서는 상기 컨쥬게이트와 비-표적화 유사체인 PEG-Cy5.5의 중앙 흡수율을 비교한다. 새드 등은 LHRH 표적화 중합체 컨쥬게이트가 비-표적화 유사체

와 비교하여 암 세포에서 증강된 축적을 나타내는 것으로 결론내렸다.

- [0030] 치료적 수술시에는 어떠한 종양도, 심지어 미세 크기의 종양도 남기지 않는 것이 중요하다. 1차적 수술시 탐지 불가능한 잔여 및 잠복 종양 조직은 재발 암으로 발전할 수도 있다. 이것이 외과 의사가, 확실히 종양이 남아 있지 않도록 해야하며 절개된 종양 주변의 "변연"이 음성이어야 하는 이유이다. "절제의 변연"으로도 알려진 변연은 종양과 이와 함께 제거되는 조직 주변의 가장자리 사이의 거리를 지칭한다. 절개된 종양 및 주변 조직은 후속하여 병리학자가 시험관내에서 검사한다. 이것을 특수 잉크에 굴러 현미경 아래에서 변연이 명확하게 보이도록 한다. 임상 시험에서, 수술-절개된 종양 주변 변연은 하기와 같이 기술된다:
- [0031] (i) 양성 변연: 잉크가 있는 조직의 가장자리까지 암 세포가 뻗어나왔음;
- [0032] (ii) 음성 변연: 잉크 내에서 암 세포가 발견되지 않음;
- [0033] (iii) 근접 변연: 양성과 음성 사이에 들어가는 모든 상황을 "근접"으로 고려함.
- [0034] 암 세포가 절개된 조직의 가장자리에 얼마나 근접한지 아는 것은 환자의 치료를 결정하는데 도움을 준다. 만약 변연이 양성이면, 추가적인 수술이 필요하다. 만약 변연이 근접이면 수술이 필요할 수도 또는 필요 없을 수도 있고, 또는 추가적 수술 및 방사선요법 또는 화학요법의 추가가 필요할 수도 있다. 만약 변연이 음성이면, 수술은 충분하다. "음성 변연"의 정의는 병원마다 다르다. 일부 병원에서는 잉크와 암 세포 사이에 하나라도 정상 세포가 있으면, 이를 음성 변연으로 고려한다. 다른 병원에서는, 병리학자는 잉크와 종양 사이에 암 세포가 없는 조직이 2 mm 이상 있어야 "음성 변연"이라는 범주를 사용할 것이다. 통상적으로, 이러한 분석은 수술이 끝난 후 수행하므로, 환자가 수술대에서 내려오기 전에 "음성 변연"을 확인할 수 있다면 큰 혜택이 될 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

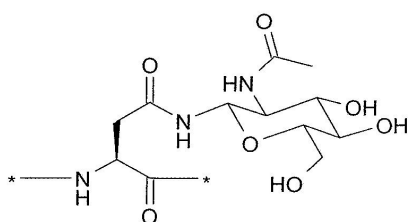
- [0035] **본 발명**
- [0036] 본 발명은 광학 영상화 조영제를 사용하는, 종양 둘레 변연의 생체내 광학 영상화 방법을 제공한다. 광학 영상화제는 근적외선 염료와 15-45 kDa 범위의 분자량을 갖는 합성 폴리에틸렌글리콜 (PEG) 중합체의 컨쥬게이트를 포함한다. 또한 광학 영상화 조영제, 제약 조성물 및 키트를 개시한다.
- [0037] MatBIII 정위적 (orthotopic) 래트 유방암 모델 및 원형 (prototype) 형광 영상 유도 수술 시스템을 사용하여, 종양 변연을 하이라이팅하는 본 발명의 제제의 효능을 측정하였다. 수량화는 변연 대 주변 피부 비율 (MSR)을 통해 달성하였다. 능동적 표적화제와 비교하여, 거대분자 피동적 표적화제가 개선된 결과를 제공하였다.
- [0038] 본 발명은 단면 수준에서 질환의 밀리미터 이하 (0.2-0.3 mm까지 내려감)의 부위를 탐지할 수 있는 영상화제를 제공한다. 따라서 암 부위의 탐지가 외과 의사에 의해 수술 중에 달성될 수 있다. 상기 제제는 수술 안내 및/또는 잔여 질환의 확인을 제공한다. 이러한 영상화제는, 한 외과 의사에 의해 수술을 받는 암 환자의 수 및/또는 병리학자의 경험과는 관계없이 수술을 표준화시키는 것을 돕는다. 상기 제제는 "음성 변연" (상기 정의한 바와 같음)을 최대화하면서 환자로부터의 정상 조직의 불필요한 절제를 최소화하여, 종양 수술의 효율을 개선시키는 것을 돕는다.

과제의 해결 수단

- [0039] **발명의 상세한 설명**
- [0040] 제1 측면에서, 본 발명은,
- [0041] (i) 분자량이 15 내지 45 kDa인 합성 폴리에틸렌글리콜 중합체와 1 또는 2개의 기 Opt^R 의 컨쥬게이트를 포함하는, 생체내 영상화에 적합한 광학 영상화 조영제를 제공하는 단계;
- [0042] (ii) 상기 조영제가 투여된, 하나 이상의 종양을 갖는 것으로 알려진 살아있는 대상체의 상기 종양 및 종양 변연을 포함하는 관심 영역의 광학 영상을 생성하는 단계
- [0043] 를 포함하며, 여기서 각각의 Opt^R 은 독립적으로, 파장 600-850 nm의 광을 사용하여 광학 영상화 절차 중에 직접 또는 간접적으로 탐지가능한 생체적합성 광학 리포터 기인,

- [0044] 상기 대상체에서의 종양의 종양 변연의 생체내 광학 영상화 방법을 제공한다.
- [0045] 용어 "광학 영상화"는 녹색 내지 근적외선 영역 (파장 500-1200 nm)에서 빛과의 상호작용을 기초로 하는 질환의 탐지, 병기 결정 또는 진단, 질환 발달의 추적 또는 질환 치료의 추적을 위한 영상을 형성하는 임의의 방법을 의미한다. 광학 영상화는 어떠한 장치도 사용하지 않는 직접 시각화에서부터, 다양한 스코프, 카테터 및 광학 영상화 장비, 예를 들어 단층 촬영 프리젠테이션을 위한 컴퓨터-지원 하드웨어와 같은 장치를 사용하는 것을 필요로 하는 방법까지의 모든 방법을 추가로 포함한다. 양식 및 측정 기법에는, 비제한적으로 다음이 포함된다: 루미네스스 (luminescence) 영상화; 내시경; 형광 내시경; 광학 간섭 단층촬영법; 투과 영상화; 시분해 투과 영상화; 공초점 영상화; 비선형 현미경 검사; 광청 영상화; 음향-광학 영상화; 분광법; 반사 분광법; 간섭 측정; 결맞음 간섭 측정; 확산 광학 단층촬영법 및 형광 확산 광학 단층촬영법 (연속파, 시간 영역 및 주파수 영역 시스템), 및 광 산란, 흡수율, 편광, 루미네스스, 형광 수명, 양자 수율 및 켄칭의 측정. 상기 기법에 대한 추가적인 상세사항은 문헌 [(Tuan Vo-Dinh (editor): "Biomedical Photonics Handbook" (2003), CRC Press LCC]; 문헌 [Mycek & Pogue (editors): "Handbook of Biomedical Fluorescence" (2003), Marcel Dekker, Inc.]; 문헌 [Splinter & Hopper: "An Introduction to Biomedical Optics" (2007), CRC Press LCC]에 제공된다.
- [0046] 용어 "광학 영상화 조영제"는 전체 (즉, 손상되지 않은) 포유동물체내의 관심 영역의 생체내 광학 영상화에 적합한 화합물을 의미한다. 바람직하게는, 포유류는 살아있는 인간 대상체이다. 영상화는 침습성 (예, 수술중 또는 내시경)이거나 비-침습성일 수 있다. 영상화는, 종양 변연 확인을 통해 종양 절제를 용이하게 하는데 (즉, 수술중 절차 도중에) 사용된다.
- [0047] 용어 "종양 변연"은 종양의 외변부 상의 신규 종양 혈관의 내강과 종양 덩어리 주변의 종양 및 정상 세포의 사이 공간을 의미하며, 신규 종양 혈관의 누출성은 보다 큰 거대분자가 혈액으로부터 삼출되어 사이 공간에 트래핑되거나 일시적으로 농축될 수 있게 한다. 이러한 현상은 증강된 투과 및 저류 (EPR)로 공지되어 있다. 따라서, 암 세포는 그의 증가된 성장 속도를 유지하는데 부가적인 영양분을 필요로하며, 이를 혈관신생을 통해 달성한다. 혈관신생은 새로운 혈관 형성의 절차이다. 이러한 새로운 혈관은 또한 이미 형성되어 있는 혈관보다 구조를 덜 가지는 경향이 있으며, 이러한 혈관을 라이닝하는 내피 세포 사이의 접합이 이미 형성되어 있는 혈관만큼 고정되어 있고 단단하지는 않으므로, 종종 "누출성" 맥관구조라는 용어로 표현된다. 누출성 미세혈관계의 혈관신생 전개는 모든 고형 종양에 있어서 공통이다 (문헌 [Folkman, Semin. Cancer Biol., 3, 65-71 (1992)] 및 문헌 [Folkman, Nature Med., 1, 27-31 (1995)]).
- [0048] 용어 "살아있는 대상체"는 살아있는 포유류 환자, 바람직하게는 살아있는 인간 대상체를 의미한다.
- [0049] 용어 "합성"은 그의 통상적 의미를 가지는데, 즉 천연 공급원으로부터 단리된 것과는 대조적으로 사람이 만든 것을 의미한다. 이러한 화합물은 그의 생산 및 불순물 프로파일을 완전히 제어할 수 있다는 장점을 갖는다.
- [0050] 용어 "폴리에틸렌글리콜 중합체" 또는 "PEG"는, 예를 들어 문헌 ["The Merck Index", 14th Edition entry 7568]에 기재된 바와 같은 그의 통상적 의미를 갖는데, 즉 화학식 $H(OCH_2CH_2)_nOH$ (식 중, n 은 4 이상의 정수임)의 액체 또는 고체 중합체를 의미한다. 본 발명의 폴리에틸렌글리콜 중합체는 선형 또는 분지형 (즉, 덴드리머)일 수 있으며, 바람직하게는 선형이다. 폴리에틸렌글리콜 중합체는 적합하게는 다분산계이다. 용어 "중합체 말단"은 PEG 중합체 사슬의 폴리에테르 사슬의 끝을 형성하는 관능기(들)를 의미하며, 상기 식에서는 두 히드록시 (-OH)기이다.
- [0051] 용어 "컨쥬게이트"는 "광학 리포터" (Opt^R)가 폴리에틸렌글리콜 중합체에 공유 결합된 유도체를 의미한다.
- [0052] 용어 "생체적합성"은 비-독성이어서, 포유동물체, 특히 인간 생체에 투여시 부작용 또는 통증 또는 불편함 없이 투여하기에 적합함을 의미한다.
- [0053] 용어 "광학 리포터" (즉, Opt^R)는 파장 600-850 nm의 빛을 사용하여 광학 영상화 절차 중 직접 또는 간접적으로 탐지할 수 있는 형광 염료 또는 발색단을 의미한다. 광학 리포터는 포유동물체내에서 영상화하기에 적합해야 하므로, 이 또한 생체적합성이어야 한다. 바람직하게는, Opt^R 은 형광 특성을 가지고, 바람직하게는 형광 생체적합성 염료를 포함한다.
- [0054] 용어 "관심 영역" 또는 ROI는 생체내 의학 영상화 분야에서의 그의 통상적인 의미를 가진다.
- [0055] **바람직한 특징부.**

- [0056] 폴리에틸렌글리콜 중합체의 분자량은 바람직하게는 20-43 kDa, 더 바람직하게는 22-40 kDa, 가장 바람직하게는 25-38 kDa이며, 27-35 kDa이 이상적이다. 폴리에틸렌글리콜 중합체는 바람직하게는 선형 중합체이다.
- [0057] 폴리에틸렌글리콜 중합체에는 바람직하게는 오직 Opt^R 기(들)만이 컨주게이팅된다. 따라서, 중합체에는 바람직하게는 생물학적 표적화 분자 또는 다른 중합체가 컨주게이팅되어 있지 않다. 용어 "생물학적 표적화 잔기"는 투여 후에 포유동물체의 특정 사이트에서 선택적으로 흡수되거나 국지화되는 화합물을 의미한다. 이러한 사이트는, 예를 들어 특정 질환 상태에 연관된 것이어서, 기관 또는 대사 과정이 어떻게 기능하는지를 나타낼 수 있다. 생물학적 표적화 잔기에는 통상적으로, 3-100량체 펩티드, 펩티드 유사체, 펩토이드 또는 선형 펩티드 또는 환형 펩티드 또는 그의 조합일 수 있는 펩티드 모방체; 또는 효소 기질, 효소 길항제 또는 효소 저해제; 합성 수용체-결합 화합물; 올리고뉴클레오타이드 또는 올리고-DNA 또는 올리고-RNA 조각이 포함된다.
- [0058] 제1 측면의 컨주게이트는 바람직하게는 하기 화학식 I이다:
- [0059] <화학식 I>
- [0060] $Y^1-X^a-[중합체]-X^b-Y^2$
- [0061] 식 중,
- [0062] [중합체]는 합성 폴리에틸렌글리콜 중합체이고;
- [0063] X^a 및 X^b 는 상기 폴리에틸렌글리콜 중합체의 말단에 부착되며 독립적으로 결합 또는 L 기이며;
- [0064] 여기서 L은 화학식 $-(A)_m-$ 의 링커 기이며,
- [0065] 여기서 각각의 A는 독립적으로 $-CR_2-$, $-CR=CR-$, $-C\equiv C-$, $-CR_2CO_2-$, $-CO_2CR_2-$, $-NRCO-$, $-CONR-$, $-NR(C=O)NR-$, $-NR(C=S)NR-$, $-SO_2NR-$, $-NRSO_2-$, $-CR_2OCR_2-$, $-CR_2SCR_2-$, $-CR_2NRCR_2-$, C_{4-8} 시클로헥테로알킬렌기, C_{4-8} 시클로알킬렌기, C_{5-12} 아릴렌기 또는 C_{3-12} 헤테로아릴렌기, 아미노산 또는 당이며;
- [0066] 여기서 각각의 R은 독립적으로 H, C_{1-4} 알킬, C_{2-4} 알케닐, C_{2-4} 알키닐, C_{1-4} 알콕시알킬 또는 C_{1-4} 히드록시알킬로부터 선택되고;
- [0067] m은 1 내지 20의 정수이고;
- [0068] Y^1 및 Y^2 는 독립적으로 Opt^R 또는 $-OH$; $-O(C_{1-10}$ 알킬); $-NH_2$ 또는 $-NH(CO)(C_{1-10}$ 알킬)로부터 선택되는 관능기이며;
- [0069] 여기서 Opt^R 은 상기 정의된 바와 같으며;
- [0070] 단, Y^1 및 Y^2 중 적어도 하나는 Opt^R 이어야 한다.
- [0071] 용어 "아미노산"은 L- 또는 D-아미노산, 아미노산 유사체 (예, 나프틸알라닌) 또는 천연 발생 또는 순수하게 합성 유래일 수 있고, 광학적으로 순수한, 즉 단일 거울이성질체, 따라서 키랄이거나 거울이성질체의 혼합물일 수 있는 아미노산 모방체를 의미한다.
- [0072] 용어 "당"은 단당류, 이당류 또는 삼당류를 의미한다. 적합한 당에는 글루코스, 갈락토스, 말토스, 만노스 및 락토스가 포함된다. 임의로, 당은 아미노산에 대한 쉬운 커플링을 가능하게 하도록 관능화시킬 수 있다. 따라서, 예를 들어 아미노산의 글루코사민 유도체를 펩티드 결합을 통해 다른 아미노산에 컨주게이팅시킬 수 있다. 아스파라긴의 글루코사민 유도체 (노바바이오켄 (NovaBiochem)으로부터 시판됨)가 이의 한 예이다:



[0073]

[0074] 화학식 I에서, Y^1 및 Y^2 중 오직 하나가 Opt^R 인 경우, 다른 하나는 바람직하게는 -OH 및 -NH₂로부터 선택되는 관능기, 더 바람직하게는 -OH이다.

[0075] 화학식 I에서, Y^1 및 Y^2 가 각각 Opt^R 인 것이 바람직하다. 이러한 경우, X 및 X'는 바람직하게는 -NHCO- 또는 -CONH-로부터 선택되어, 컨쥬게이트가 디아미노-PEG 또는 디카르복시-PEG 중합체로부터 제조된다. 따라서, 이러한 PEG 중합체는 각각 H₂N-[중합체]-NH₂ 또는 HOOC-[중합체]-COOH에 상응하며, 여기서 Opt^R 의 생체적합성 염료는 아마이드 결합을 통해 각각의 말단에서 중합체에 컨쥬게이팅 된다.

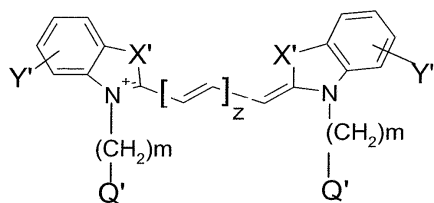
[0076] Y^1 및 Y^2 가 각각 Opt^R 인 경우, Y^1 및 Y^2 각각의 Opt^R 기가 동일한 생체적합성 리포터를 포함하는 것이 바람직하다. 이는 3가지 장점을 가진다. 먼저, 생체적합성 리포터의 두 발색단이 동일한 경우, 조영제는 유효하게 동일한 분자량에 대해 증강된 형광 신호를 나타낸다 (이는 리포터의 분자량이 중합체의 분자량보다 훨씬 더 작기 때문이다). 두번째로는, 두 생체적합성 리포터로부터의 신호들 사이의 있을 수 있는 원치않는 형광의 간섭 및/또는 켄칭이 회피된다. 세번째로, 대칭 2관능성-PEG가 합성하기 쉽다.

[0077] 화학식 I에서, L 기의 m은 바람직하게는 1 내지 5의 정수, 가장 바람직하게는 1 내지 3의 정수이다.

[0078] Opt^R 은 바람직하게는 파장 610-800 nm, 더 바람직하게는 700-780 nm, 가장 바람직하게는 730-770 nm의 빛을 사용하여 광학 영상화 절차 중 직접 또는 간접적으로 탐지할 수 있는 생체적합성 염료를 포함한다. Opt^R 의 생체적합성 염료는 바람직하게는 형광 특성을 가진다. 이러한 염료의 특정 예에는, 인도시아닌 그린, 시아닌 염료 Cy5, Cy5.5, Cy7, 및 알렉사 플루오르 (Alexa Fluor) 633, 알렉사 플루오르 647, 알렉사 플루오르 660, 알렉사 플루오르 680, 알렉사 플루오르 700 및 알렉사 플루오르 750이 포함된다.

[0079] 생체적합성 염료는 바람직하게는 시아닌 염료 또는 벤조피릴륨 염료, 가장 바람직하게는 시아닌 염료이다. 형광단인 바람직한 시아닌 염료는 하기 화학식 II이다:

[0080] <화학식 II>



[0081]

[0082] 식 중,

[0083] 각각의 X'는 독립적으로 -C(CH₃)₂-, -S-, -O- 또는 -C[(CH₂)_aCH₃][(CH₂)_bM]-으로부터 선택되며, 여기서 a는 0 내지 5의 정수이고, b는 1 내지 5의 정수이고, M은 기 G이거나 SO₃M¹ 또는 H로부터 선택되고;

[0084] 각각의 Y'는 독립적으로 H, -CH₂NH₂, -SO₃M¹, -CH₂COOM¹, -NCS, F 및 기 G로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 내지 4개의 기이며, 여기서 Y' 기는 방향족 고리의 임의의 위치에 놓이고;

[0085] Q'는 독립적으로 H, SO₃M¹, NH₂, COOM¹, 암모늄, 에스테르기, 벤질 및 기 G로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0086] M¹은 H 또는 B^c이며; 여기서 B^c는 생체적합성 양이온이고;

[0087] z는 2 또는 3의 정수이고;

[0088] m은 1 내지 5의 정수이고;

[0089] 여기서 X', Y' 및 Q' 중 하나 이상은 기 G를 포함하고;

[0090] G는 PEG 중합체에 부착하기에 적합한 반응성 기 또는 관능기이다.

[0091] 용어 "생체적합성 양이온" (B^c)는 이온화되고 음으로 하전된 기와 염을 형성하는 양으로 하전된 반대이온을 의미

하며, 상기 양으로 하전된 반대이온은 또한 비-독성이고 따라서 포유동물체, 특히 인간 생체에 투여하기에 적합하다. 적합한 생체적합성 양이온의 예에는, 알칼리 금속 나트륨 또는 칼륨; 알칼리성 토금속 칼슘 및 마그네슘; 및 암모늄 이온이 포함된다. 바람직한 생체적합성 양이온은 나트륨 및 칼륨, 가장 바람직하게는 나트륨이다.

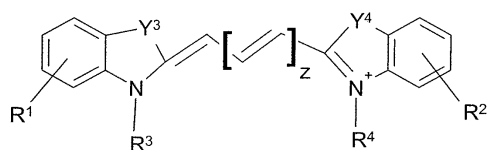
[0092] G 기는 PEG 중합체의 상보적 (complementary) 기와 반응하여 시아닌 염료 형광단과 중합체 사이의 공유 결합을 형성한다. 화학식 II에서 G 기의 위치는 PEG가 Q', X' 또는 Y'의 위치에서 적합하게 컨쥬게이팅될 수 있게 하는 위치이다. G는 PEG의 상보적 관능기와 반응할 수 있는 반응성 기일 수 있거나, 대안적으로 PEG의 반응성 기와 반응할 수 있는 관능기를 포함할 수 있다. 반응성 기 및 관능기의 예에는 활성 에스테르; 이소티오시아네이트; 말레이미드; 할로아세트아미드; 산 할라이드; 히드라지드; 비닐술포; 디클로로트리아진; 포스포르아미다이트; 히드록실; 아미노; 술폰; 카르보닐; 카르복실산 및 티오포스페이트가 포함된다. 바람직하게는 G는 활성 에스테르이다.

[0093] 용어 "활성화된 에스테르" 또는 "활성 에스테르"는 보다 나은 이탈기이도록 설계되어 아민과 같은 친핵체와 보다 쉬운 반응을 가능하게 하는, 회합된 카르복실산의 에스테르 유도체를 의미한다. 적합한 활성 에스테르의 예에는, N-히드록시숙신이미드 (NHS), 술폰-숙신이미드 에스테르, 펜타플루오로페놀, 펜타플루오로티오펜올, *파라*-니트로페놀, 히드록시벤조트리아졸 및 PyBOP (즉, 벤조트리아졸-1-일-옥시트리피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트)가 있다. 바람직한 활성 에스테르는 N-히드록시숙신이미드 또는 펜타플루오로페놀 에스테르, 특히 N-히드록시숙신이미드 에스테르이다.

[0094] **시아닌 염료의 바람직한 특징부.**

[0095] 화학식 II를 기제로 하는 바람직한 시아닌 염료는 하기 화학식 IIa에 정의된 바와 같다:

[0096] <화학식 IIa>



[0097]

[0098] 식 중,

[0099] Y³ 및 Y⁴는 독립적으로 -O-, -S-, -NR⁵- 또는 -CR⁶R⁷-이며, Y³ 및 Y⁴ 중 하나 이상이 -CR⁶R⁷-이도록 선택되고;

[0100] R¹ 및 R²는 독립적으로 H, -SO₃M¹ 또는 R^a이고;

[0101] R³ 내지 R⁵는 독립적으로 C₁₋₅ 알킬, C₁₋₆ 카르복시알킬 또는 R^a이고;

[0102] R⁶은 H 또는 C₁₋₃ 알킬이고;

[0103] R⁷은 R^a 또는 C₁₋₆ 카르복시알킬이고;

[0104] R^a는 독립적으로 C₁₋₄ 술폰알킬이고;

[0105] 여기서 M¹ 및 z는 화학식 II에서 정의된 바와 같으며,

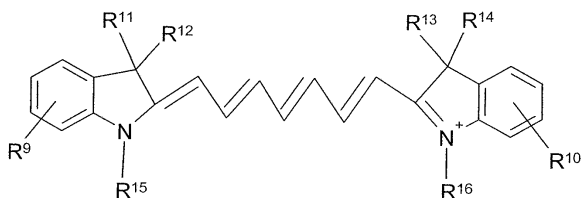
[0106] 단, 화학식 IIa의 시아닌 염료는 하나 이상의 R^a 기를 포함하고, R¹, R² 및 R^a 기로부터 총 1 내지 6개의 술폰산 치환체를 포함한다.

[0107] 용어 "술폰산 치환체"는 화학식 -SO₃M¹ (식 중, M¹은 상기 정의된 바와 같음)의 치환체를 의미한다. 화학식 IIa의 바람직한 염료는 z=3을 갖는다. 바람직한 이러한 염료는 또한 2 내지 6개의 술폰산 치환체를 갖는다. -SO₃M¹ 치환체는 탄소 원자에 공유 결합되고, 탄소 원자 아틸 (예컨대, R¹ 또는 R² 기), 또는 알킬 (즉, R^a 기)일

수 있다. 화학식 IIa에서, R^a 기는 바람직하게는 화학식 $-(CH_2)_kSO_3M^1$ 이며, 여기서 M^1 은 상기 정의된 바와 같고, k 는 1 내지 4의 정수이다. k 는 바람직하게는 3 또는 4이다. 화학식 IIa에서 더욱 바람직한 시아닌 염료는 $z=3$ 을 가지며, 즉 이는 헵타메틴 시아닌 염료이다.

[0108] 특히 바람직한 시아닌 염료는 하기 화학식 IIb이다:

[0109] <화학식 IIb>



[0110]

[0111] R^9 및 R^{10} 은 독립적으로 H 또는 SO_3M^1 이고, R^9 및 R^{10} 중 적어도 하나는 SO_3M^1 이고;

[0112] R^{11} 및 R^{12} 는 독립적으로 C_{1-4} 알킬 또는 C_{1-6} 카르복시알킬이고;

[0113] R^{13} , R^{14} , R^{15} 및 R^{16} 은 독립적으로 R^b 기이며;

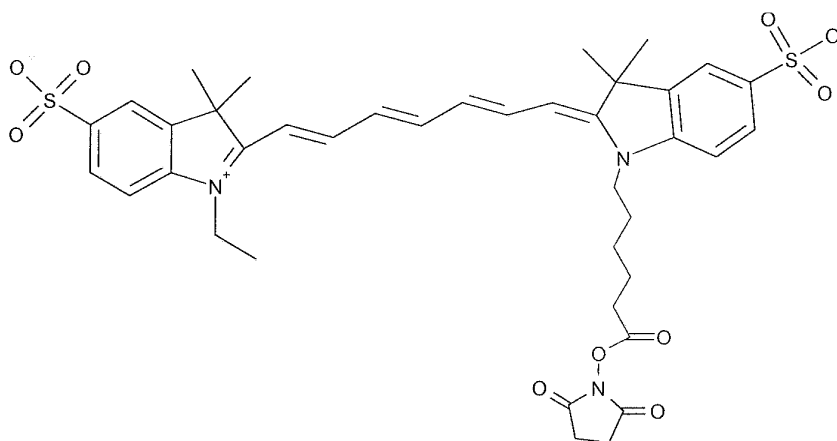
[0114] 여기서 R^b 는 C_{1-4} 알킬, C_{1-6} 카르복시알킬 또는 $-(CH_2)_qSO_3M^1$ 이며,

[0115] 여기서 q 는 3 또는 4의 정수이고;

[0116] 여기서 M^1 은 화학식 II 및 IIa에 정의된 바와 같으며,

[0117] 단, 시아닌 염료는 R^9 , R^{10} 및 R^b 기 중에 총 1 내지 4개의 SO_3M^1 치환체를 가진다.

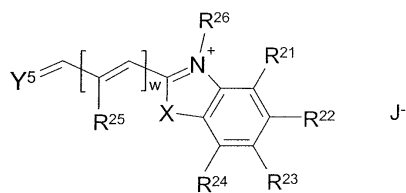
[0118] 화학식 IIb의 바람직한 시아닌 염료는, PEG 중합체에 대한 컨쥬게이팅을 용이하게 하기 위하여, 하나 이상의 C_{1-6} 카르복시알킬기 또는 그의 활성화된 에스테르를 포함하도록 선택된다. 화학식 IIb의 염료 중 특히 바람직한 이러한 것은 Cy7이다:



[0119] Cy7-NHS 에스테르

[0120] 용어 "벤조피릴륨 염료"는 그의 통상적 의미를 갖는다. 본 발명의 적합한 벤조피릴륨 염료는 Bzp^M으로 표시되며 하기 화학식 III이다:

[0121] <화학식 III>

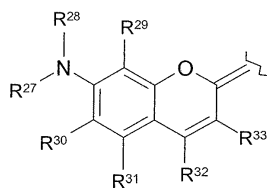


[0122]

[0123] 식 중,

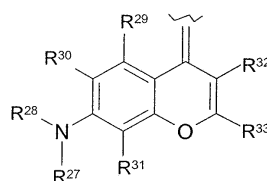
[0124] Y⁵는 하기 화학식 Y^a 또는 Y^b의 기이고;

[0125] <화학식 Y^a>



[0126]

[0127] <화학식 Y^b>



[0128]

[0129] X는 -CR³⁴R³⁵-, -O-, -S-, -Se-, -NR³⁶- 또는 -CH=CH-이며, 여기서 R³⁴ 내지 R³⁶은 R^g 기이고;

[0130] R²¹-R²⁴ 및 R²⁹-R³³은 독립적으로 H, -SO₃M¹, Hal, R^g 또는 C₃₋₁₂ 아릴로부터 선택되고;

[0131] R²⁵는 H, C₁₋₄ 알킬, C₁₋₆ 카르복시알킬, C₃₋₁₂ 아릴술폰닐, Cl이거나, R²⁵는 R²⁶, R³⁴, R³⁵ 또는 R³⁶ 중 하나와 함께 5- 또는 6-원 불포화 지방족, 불포화 헤테로지방족 또는 방향족 고리를 임의로 형성할 수 있으며;

[0132] R²⁶ 및 R³⁶은 독립적으로 R^g 기이고;

[0133] R²⁷ 및 R²⁸는 독립적으로 C₁₋₄ 알킬, C₁₋₄ 술폰알킬 또는 C₁₋₆ 히드록시알킬이거나, Y^a에 있어서, R²⁹ 및/또는 R³⁰ 중 하나 또는 둘 다와 함께 5- 또는 6-원 N-함유 헤테로환형 또는 헤테로아릴 고리를 임의로 형성할 수 있거나, Y^b에 있어서, R³⁰ 및/또는 R³⁰ 중 하나 또는 둘 다와 함께 5- 또는 6-원 N-함유 헤테로환형 또는 헤테로아릴 고리를 임의로 형성할 수 있고;

[0134] R^g는 C₁₋₄ 알킬, C₁₋₄ 술폰알킬, C₁₋₆ 카르복시알킬 또는 C₁₋₆ 히드록시알킬이고;

[0135] w는 1 또는 2이고;

[0136] J는 생체적합성 음이온이고;

[0137] M¹은 화학식 II에 정의된 바와 같으며,

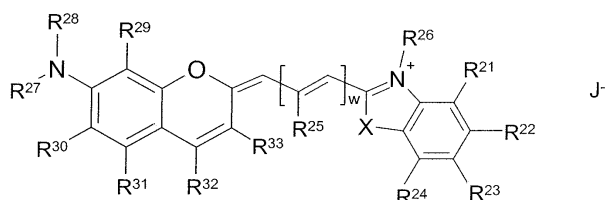
[0138] 단, Bzp^M은 R²¹ 내지 R³⁶ 기로부터 선택되는 하나 이상의 술폰산 치환체를 포함한다.

[0139] 용어 "생체적합성 음이온" (J)은 이온화되고 양으로 하전된 기 (이 경우 인돌리늄기)와 염을 형성하는 음으로

하전된 반대이온을 의미하며, 상기 음으로 하전된 반대이온은 또한 비-독성이고 따라서 포유동물체, 특히 인간 생체에 투여하기에 적합하다. 반대이온 (J^-)은 몰 당량으로 존재하는 음이온을 나타내며, 따라서 Bzp^M 염료 상의 양성 전하와 균형을 이룬다. 음이온 (J^-)은 적합하게는, 전하-균형량이 존재하는 한 단일 또는 다중-하전된다. 음이온은 적합하게는 무기산 또는 유기산으로부터 유도된다. 적합한 음이온의 예에는, 할라이드 이온, 예컨대 클로라이드 또는 브로마이드; 술페이트; 니트레이트; 시트레이트; 아세테이트; 포스페이트 및 보레이트가 포함된다. 바람직한 그러한 음이온은 클로라이드이다.

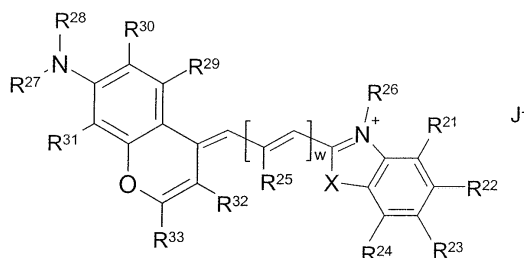
[0140] 본 발명의 적합한 조영제는 Bzp^M 이 하기 화학식 IIIa 또는 IIIb인 것이다:

[0141] <화학식 IIIa>



[0142]

[0143] <화학식 IIIb>



[0144]

[0145] 식 중, X, w, J 및 $R^{21}-R^{33}$ 은 화학식 III에 정의된 바와 같다.

[0146] R^{25} 가 $R^{26}/R^{34}-R^{36}$ 중 하나와 함께 5- 또는 6-원 불포화 지방족, 불포화 헤테로지방족 또는 방향족 고리를 형성하는 경우, 적합한 그러한 방향족 고리에는 페닐, 푸란, 티아졸, 피리딜, 피롤 또는 피라졸 고리가 포함된다. 적합한 불포화 고리는 R^{25} 가 부착되는 곳에 적어도 C=C를 포함한다.

[0147] R^{27} 및/또는 R^{28} 이 R^{29} , R^{30} 또는 R^{31} 중 하나 이상과 함께 (Y^1 이 상기한 바와 같은 Y^a 또는 Y^b 인지의 여부에 따라) 5- 또는 6-원 N-함유 헤테로환형 또는 헤테로아릴 고리를 형성하는 경우, 적합한 그러한 고리에는 티아졸, 피리딜, 피롤 또는 피라졸 고리 또는 그의 부분 수소화 형태가 포함된다. 바람직하게는 피리딜 또는 디히드로피리딜이다.

[0148] **벤조피릴륨 염료의 바람직한 특징부.**

[0149] PEG 중합체는 바람직하게는 화학식 III의 Bzp^M 의 위치 R^{25} , R^{26} , R^{34} , R^{35} 또는 R^{36} . 더 바람직하게는 R^{26} , R^{34} , R^{35} 또는 R^{36} , 가장 바람직하게는 R^{26} , R^{34} 또는 R^{35} 에 부착된다. 부착을 용이하게 하기 위하여 관련 R^{25} , R^{26} , R^{34} , R^{35} 또는 R^{36} 치환체는 바람직하게는 C_{1-6} 카르복시알킬, 더 바람직하게는 C_{3-6} 카르복시알킬을 포함한다.

[0150] 벤조피릴륨 염료 (Bzp^M)는 바람직하게는 2개 이상의 술폰산 치환체, 더 바람직하게는 2 내지 6개의 술폰산 치환체, 가장 바람직하게는 2 내지 4개의 술폰산 치환체를 갖는다. 바람직하게는, 술폰산 치환체 중 하나 이상은 C_{1-4} 술포알킬기이다. 이러한 술포알킬기는 바람직하게는 화학식 III의 위치 R^{26} , R^{27} , R^{28} , R^{34} , R^{35} 또는 R^{36} ; 더 바람직하게는 R^{26} , R^{27} , R^{28} , R^{34} 또는 R^{35} ; 가장 바람직하게는 R^{27} 및 R^{28} 중 하나 또는 둘 다와 함께 R^{26} 에 위치한다. 화학식 III의 술포알킬기는 바람직하게는 화학식 $-(CH_2)_kSO_3M^1$ (식 중, M^1 은 H 또는 B^c 이고, k는 1 내지 4의

정수이고, B^c 는 생체적합성 양이온 (상기 정의된 바와 같음)임)이다. k 는 바람직하게는 3 또는 4이다.

[0151] 화학식 III에서, w 는 바람직하게는 2이다. R^{25} 는 바람직하게는 H 또는 C_{1-4} 카르복시알킬, 가장 바람직하게는 H이다. X 는 바람직하게는 $-CR^{34}R^{35}-$ 또는 $-NR^{36}-$, 가장 바람직하게는 $-CR^{34}R^{35}-$ 이다. $w=2$ 를 갖는 특히 바람직한 벤조피릴륨 염료는 DY-750 및 DY-752이고, 이는 디�믹스 게엠베하 (Dyomics GmbH)로부터 시판된다.

[0152] 제1 측면의 방법에서, 조영제는 바람직하게는 생체적합성 담체와 함께 컨주게이트의 제약 조성물을 포함한다. 이러한 제약 조성물은 제3 측면 (하기)에 기재되어 있다.

[0153] 제1 측면의 방법은 바람직하게는, 외과의사가 상기 대상체로부터 종양을 절제하는 것을 보조하기 위하여 수술 중에 수행한다. 제6 측면의 바람직한 광학 영상화 방법은 형광 반사 영상화 (FRI)이다. FRI에서, 본 발명의 조영제는 진단할 대상체에게 투여하고, 후속하여 대상체의 조직 표면을 여기 광 (excitation light) (통상적으로 연속파 (CW) 여기)으로 비춘다. 빛은 조영제의 Opt^R 을 여기시킨다. 여기 광에 의해 생성된 조영제로부터의 형광을 형광 검출기를 사용하여 검출한다. 돌아오는 빛을 바람직하게는 여과하여 형광 성분 (단독으로 또는 부분적으로)을 분리해낸다. 영상이 형광 빛으로부터 형성된다. 통상적으로 최소한의 프로세스를 수행하며 (광학 파라미터, 예컨대 수명, 양자 수율 등을 산출하기 위하여 프로세서를 사용하지 않음), 영상은 형광 세기를 맵핑 (mapping)한다. 조영제는 질환 부분에서 농축되어 보다 높은 형광 세기를 나타내도록 설계된다. 따라서, 병든 부분은 형광 세기 영상에서 양성 대비를 만들어낸다. 영상은 바람직하게는 실시간 영상화가 가능한 CCD 카메라 또는 칩을 사용하여 취득한다.

[0154] 여기 파장은 사용되는 특정 염료에 따라 달라진다. 여기 광을 생성하기 위한 장치는 통상적인 여기 광원, 예컨대 레이저 (예, 이온 레이저, 염료 레이저 또는 반도체 레이저); LED의 어레이; 할로겐 광원 또는 제논 광원일 수 있다. 다양한 광학 필터를 임의로 사용하여 최적의 여기 파장을 취득할 수 있다.

[0155] 제1 실시양태에서, 바람직한 FRI 방법은 하기 단계들을 포함한다:

- [0156] (i) 살아있는 대상체내의 관심 영역을 포함하는 조직 표면에 여기 광을 비추는 단계;
- [0157] (ii) Opt^R 의 여기에 의해 생성되는 조영제로부터의 형광을 형광 검출기를 사용하여 검출하는 단계;
- [0158] (iii) 형광 검출기로 검출된 빛을 임의로 여과하여 형광 성분을 분리해내는 단계;
- [0159] (iv) 상기 조직 표면의 영상이 단계 (ii) 또는 (iii)의 형광 빛으로부터 형성되는 단계.

[0160] 단계 (i)-(iv)를 포함하는 방법에서, 단계 (i)의 여기 광은 바람직하게는 본질적으로 연속파 (CW)이다.

[0161] 제2 실시양태에서, 광학 영상화는 바람직하게는 FDPM (주파수-영역 광자 이동)을 포함한다. 이는 조직 내의 염료의 보다 깊은 탐지가 중요한 경우 연속파 (CW) 방법에 비해 장점을 갖는다 (문헌 [Sevick-Muraca *et al.*, Curr.Opin.Chem.Biol., 6, 642-650 (2002)]). 그러한 주파수/시간 영역 영상화에 있어서, Opt^R 이 영상화할 병소의 조직 깊이에 따라 그리고 사용되는 기구의 유형에 따라 조절할 수 있는 형광 특성을 갖는 것이 유리하다. 바람직한 FDPM 방법은 하기 단계들을 포함한다:

- [0162] (a) 상기 살아있는 대상체의 관심 영역을 형성하는, 이질의 조성을 갖는 광-산란 생물학적 조직을, 광원으로부터의 빛에 세기를 달리하여 소정의 시간 동안 노출시켜 조영제를 여기시키고, 조직이 여기 광을 배가-산란시키는 단계;
- [0163] (b) 상기 노출에 응한 조직으로부터의 배가-산란 광 방출을 탐지하는 단계;
- [0164] (c) 조직 내의 상이한 위치에서의, 조직의 이질의 조성에 따라 달라지는 형광 특징의 수준에 각각 상응하는 여러 수치를 프로세서를 사용하여 수립함으로써 조직에 걸쳐 방출로부터의 형광 특징을 수량화하는 단계; 및
- [0165] (d) 단계 (c)의 수치에 따라 조직의 이질의 조성을 맵핑하여 조직의 영상을 생성하는 단계.

[0166] 단계 (c)의 형광 특징은 바람직하게는 조영제의 흡수율에 상응하고, 바람직하게는 상기 조영제의 투여 이전 조직의 흡착 및 산란 계수에 상응하는 여러 수치를 맵핑하는 것을 추가로 포함한다. 단계 (c)의 형광 특징은 바람직하게는 형광 수명, 형광 양자 효율성, 형광 수율 및 조영제 흡수율 중 하나 이상에 상응한다. 형광 특징은 바람직하게는 방출의 세기로부터 독립적이며 조영제 농도로부터 독립적이다.

- [0167] 단계 (c)의 수량화는 바람직하게 하기 단계를 포함한다: (i) 수치의 추정치를 수립하는 단계, (ii) 추정치의 합수로서 계산된 방출량을 결정하는 단계, (iii) 계산된 방출량을 상기 탐지한 방출량과 비교하여 오차를 결정하는 단계, (iv) 오차의 함수로서 형광 특징의 수정된 추정치를 제공하는 단계. 수량화는 바람직하게는 조직의 배가 광-산란 거동을 모델링하는 수학적 관계로부터 수치를 결정하는 단계를 포함한다. 제1 옵션의 방법은 바람직하게는 상기 형광 특징의 변동을 탐지함으로써 생체내 조직의 대사 특성을 모니터링하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0168] 제1 측면의 조영제를 하기와 같이 제조할 수 있다:
- [0169] Opt^R 의 PEG 중합체로의 컨쥬게이팅을 촉진하기 위하여, Opt^R 의 염료에는 적합하게는 반응성 관능기 (Q^a)가 부착되어 있다. Q^a 기는 중합체의 상보적 관능기와 반응하도록 설계되어, 염료와 중합체 사이의 공유 결합을 형성한다. 적합한 Q^a 기는 다음으로부터 선택할 수 있다: 카르복실; 활성화된 에스테르; 이소티오시아네이트; 말레이미드; 할로아세트아미드; 히드라지드; 비닐술폰, 디클로로트리아진 및 포스포르아미다이트. 바람직하게는, Q^a 는 다음과 같다: 카르복실산의 활성화된 에스테르; 이소티오시아네이트; 말레이미드 또는 할로아세트아미드. 가장 바람직하게는 Q^a 는 활성화된 에스테르이다. 이러한 활성화된 에스테르의 바람직한 측면은 상기 기재한 바와 같다.
- [0170] 시아닌 염료를 생물학적 분자에 컨쥬게이팅시키는 일반적인 방법은 리차 등의 문헌 [Topics Curr.Chem., 222, 1-29 (2002); Adv.Drug Deliv.Rev., 57, 1087-1108 (2005)]에 기재되어 있다. 시아닌 염료를 PEG 중합체에 컨쥬게이팅시키는 방법은 리차 등의 문헌 [SPIE Vol 3196 p. 98-102 (1998)]에 교시되어 있다.
- [0171] 컨쥬게이트가 2개의 Opt^R 기를 포함하는 경우, 이는 PEG 중합체의 각각의 말단에 하나씩 있으며, 바람직한 출발 물질은 디아미노-PEG이다. 엘버트 (Elbert) 등의 문헌 [Elbert & Hubbell; Biomacromol., 2, 430-441 (2001)]에 기재된 바와 같이, 이러한 디아미노-PEG 물질은 순도가 낮을 수 있다. 본 발명의 컨쥬게이트에 있어서, PEG-디아민의 순도는 바람직하게는 90% 초과, 더 바람직하게는 95% 초과, 가장 바람직하게는 99% 초과이다. 엘버트에 의해 기재된 합성은 요구되는 순도의 PEG-디아민을 제공한다. 실시예 1은 추가적인 상세사항을 제공한다.
- [0172] 펩티드에 컨쥬게이팅하기에 적합하게 관능화시킨 시아닌 염료는 지이 헬스케어 리미티드 (GE Healthcare Limited), 아토-테크 (Atto-Tec), 디오믹스, 분자클라 프로브스 (Molecular Probes) 등으로부터 시판된다. 대부분의 이러한 염료는 NHS 에스테르로 입수할 수 있다. 링커 기 (L)를 중합체에 컨쥬게이팅시키는 방법은 염료 단독일 때와 유사한 화학 반응을 사용하며 (상기 참고), 이는 당업계에 공지되어 있다. 벤조피릴륨 염료는 디오믹스 게엠베라 (독일 예나 D-07745 빈체르라에르 슈트라쎄 2A 소재; (www.dyomics.com))로부터 시판된다.
- [0173] 제2 측면에서, 본 발명은 제1 측면에 정의된 바와 같은 컨쥬게이트를 포함하는 포유동물체의 생체내 광학 영상화에 적합한 조영제를 제공한다. 조영제 중의 컨쥬게이트의 바람직한 실시양태는 제1 측면에 기재된 바와 같다.
- [0174] 제3 측면에서, 본 발명은 생체적합성 담체와 함께 제1 측면에 정의된 바와 같은 컨쥬게이트를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 제약 조성물 중의 컨쥬게이트의 바람직한 실시양태는 제1 측면에 기재된 바와 같다.
- [0175] "생체적합성 담체"는 영상화제가 현탁 또는 용해될 수 있어 조성물에 생리학적으로 허용되는, 즉 독성 또는 지나친 불쾌함 없이 포유동물체에 투여할 수 있도록 하는 유체, 특히 액체이다. 생체적합성 담체는 적합하게는 주사가능 담체 액체, 예컨대 주사용 멸균 발열원-미함유 물; 수용액, 예컨대 염수 (이는 주사용 최종 생성물이 등장성이라도 유리하게 균형맞출 수 있음); 긴장성-조절 물질 (예, 혈장 양이온과 생체적합성 반대이온의 염), 당 (예, 글루코스 또는 수크로스), 당 알콜 (예, 소르비톨 또는 만니톨), 글리콜 (예, 글리세롤) 또는 다른 비-이온성 폴리올 물질 (예, 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌 글리콜 등) 중 하나 이상의 수용액. 거대분자 폴리올이 사용되는 경우, 분자량은 적합하게는 10 kDa 이하, 바람직하게는 5 kDa 미만이며, 이는 보다 높은 분자량 화학 종이 본 발명의 조영제와 경쟁할 수 있기 때문이다. 바람직하게는, 생체적합성 담체는 주사용 발열원-미함유 물 또는 등장성 염수이다.
- [0176] 조영제 및 생체적합성 담체는 각각 주사기 또는 캐뉼러로 용액을 첨가하거나 회수할 수 있으면서, 멸균 완전성 및/또는 방사능 안정성을 유지할 수 있는 밀봉된 용기 및 또한 임의로 불활성 상부공간 기체 (예, 질소 또는 아르곤)를 포함하는 적합한 바이알 또는 용기에 담겨 공급된다. 바람직한 그러한 용기는 격막-밀봉된

바이알이고, 기체가 새지 않는 마개를 오버실 (전형적으로 알루미늄)로 그 위에 주름을 잡는다. 마개는 멸균 완전성을 유지하면서 피하 주사침으로 한번 또는 여러번 뚫기에 적합하다 (예, 주름잡은 격막 밀봉 마개). 이러한 용기는 필요시 마개가 진공을 견딜 수 있고 (예를 들어, 상부공간 기체 또는 가스제거 용액을 바꾸기 위해), 외부 대기 기체, 예컨대 산소 또는 수증기의 진입을 허용하지 않으면서 압력 감소와 같은 압력 변화를 견딜 수 있다는 추가의 장점을 갖고 있다.

[0177] 바람직한 다회 투약량 용기는 다회 분의 환자 투약량을 함유하는 단일 벌크 바이알 (예를 들어, 10 내지 30 cm³ 부피)을 포함하고, 이에 의해 임상 상황에 적합하도록 제제의 실행가능한 수명 동안에 다양한 시간 간격으로 1 회분 환자 투약량을 임상 등급 주사기 내로 뽑아낼 수 있다. 미리 충전된 주사기는 1회분 인간 투약량 또는 "단위 투약량"을 함유하도록 설계되고, 따라서 이는 바람직하게는 일회용 또는 임상 사용을 위해 적합한 기타 주사기이다. 본 발명의 제약 조성물은 바람직하게는 한 명의 환자에 적합한 투약량을 포함하며 상기 기재된 바와 같이 적합한 주사기 또는 용기에 담겨 제공된다.

[0178] 제약 조성물은 임의로 항균 보존제, pH-조절제, 충전제, 안정화제 또는 삼투압 조절제와 같은 부가적 부형제를 함유할 수 있다. 용어 "항균 보존제"는 세균, 이스트 또는 곰팡이와 같은 잠재적으로 유해한 미생물의 성장을 저해하는 제제를 의미한다. 항균 보존제는 또한 사용되는 투약량에 따라 일부 살균 특성을 나타낼 수도 있다. 본 발명의 항균 보존제(들)의 주요 역할은 제약 조성물에서 이러한 임의의 미생물의 성장을 저해하는 것이다. 그러나, 투여 전에 상기 조성물을 제조하기 위해 사용되는 키트의 하나 이상의 성분에서 잠재적으로 유해한 미생물의 성장을 저해하기 위하여 항균 보존제가 임의로 사용될 수도 있다. 적합한 항균 보존제(들)에는 파라벤, 즉 메틸, 에틸, 프로필 또는 부틸 파라벤 또는 그의 혼합물; 벤질 알콜; 페놀; 크레졸; 세트리미드 및 티오머살이 포함된다. 바람직한 항균 보존제(들)는 파라벤이다.

[0179] 용어 "pH-조절제"는 조성물의 pH가 인간 또는 포유류 투여에 허용되는 한계 (대략 pH 4.0 내지 10.5) 이내가 되도록 보장하는데 유용한 화합물 또는 화합물의 혼합물을 의미한다. 적합한 그러한 pH-조절제에는 제약상 허용되는 완충액, 예컨대 트리신, 포스페이트 또는 트리스 [즉, 트리스(히드록시메틸)아미노메탄] 및 제약상 허용되는 염기, 예컨대 탄산나트륨, 중탄산나트륨 또는 그의 혼합물이 포함된다. 조성물이 키트 형태로 사용될 때, pH 조절제는 임의로 별도의 바이알 또는 용기에 제공될 수 있고, 그 결과 키트의 사용자가 다단계 절차의 일부로서 pH를 조절할 수 있다.

[0180] 용어 "충전제"는 제조 및 동결건조 동안에 재료 취급을 쉽게 할 수 있는 제약상 허용되는 팽화제를 의미한다. 적합한 충전제에는 무기 염, 예컨대 염화나트륨 및 수용성 당 또는 당 알콜, 예컨대 수크로스, 말토스, 만니톨 또는 트레할로스가 포함된다.

[0181] 제약 조성물은 목적하는 멸균 비-발열성 제품을 제공하기 위하여 멸균 생산 조건 (즉, 청정실) 하에서 제조할 수 있다. 주요 성분, 특히 관련 시약 및 영상화제와 접촉되는 장치의 부분 (예를 들어, 바이알)이 살균된 것이 바람직하다. 성분 및 시약은 살균 여과, 예를 들어 감마선 조사를 사용한 최종 살균, 오토클레이브처리, 건열 또는 화학 처리 (예, 에틸렌 옥사이드 사용)를 비롯한 당업계에 공지된 방법으로 살균할 수 있다. 최소의 조작만이 필요하도록 미리 일부 성분들을 살균하는 것이 바람직하다. 그러나, 예방책으로서, 제약 조성물의 제조에서 최종 단계로서 적어도 살균 여과 단계를 포함하는 것이 바람직하다.

[0182] 제약 조성물은 하기 제4 측면에 기재된 바와 같이 키트로부터 바람직하게 제조된다.

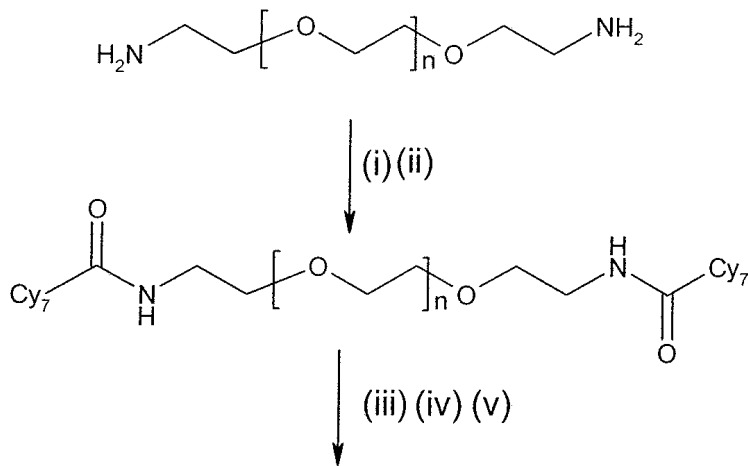
[0183] 제4 측면에서, 본 발명은 (제3 측면에 기재된 바와 같은) 생체적합성 담체를 살균 공급하여 재형성하면 용해가 이루어져 목적하는 제약 조성물을 제공하도록 하는, 멸균 고체 형태의 제1 측면의 조영제를 포함하는 제2 측면의 제약 조성물의 제조를 위한 키트를 제공한다.

[0184] 이러한 경우, 조영제와 상기한 바와 같은 다른 임의적 부형제는 적합한 바이알 또는 용기 중에 동결건조된 분말로서 제공될 수 있다. 그 후 제제는 목적하는 생체적합성 담체를 사용하여 재형성되어 포유류에 투여할 준비가 된 멸균 비-발열성 형태로 제약 조성물을 제공하도록 설계된다.

[0185] 조영제의 바람직한 멸균 고체 형태는 동결건조된 고체이다. 멸균 고체 형태는 바람직하게는 (상기) 제약 조성물에 기재한 바와 같이 제약 등급 용기에 담겨 공급된다. 키트가 동결건조되는 경우, 제형은 당류, 바람직하게는 만니톨, 말토스 또는 트리신으로부터 선택되는 냉동보호제를 임의로 포함할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0186] 본 발명은 하기 비-제한적 실시예를 통해 예시된다. 실시예 1은 본 발명의 PEG-비스(염료) 컨쥬게이트의 합성을 제공한다. 실시예 2는 본 발명의 다른 PEG-염료 컨쥬게이트의 합성을 제공한다. 실시예 3은 사용된 생물학적 스크리닝 모델을 제공한다. 결과는 도 1에 나타내었다. 초기 시점이 임상적 상황에 더 들어맞기 때문에, 초기 시점이 약간 더 중요하게 고려되었다. PEG3.4k 컨쥬게이트가 항상 현저하게 열등한 MSR 수치를 지녔다. PEG30k 컨쥬게이트는 모든 시점에서 양호한 MSR 수치를 나타내어 우수했다. PEG20k 및 PEG43k 컨쥬게이트는 초기에는 우수한 MSR 수치를 나타냈으나 24시간 후에는 열화되었다.
- [0187] 실시예 4는 Cy5 범위 (여기: 650 nm, 방출: 670 nm)에서부터 Cy7 (여기: 743 nm, 방출: 767 nm)까지 염료를 변화시킨 효과를 검사하였다. Cy7 컨쥬게이트에 있어서, MSR 점수는 높아지거나 유사하였다. 디옉믹스로부터 시판되는 Cy7-유사 염료를 추가적으로 평가하자 DY752 및 DY750은 Cy7과 비교하여 주목할 만큼 유사한 MSR 점수를 나타내었다.
- [0188] **약어.**
- [0189] 통상적 3-문자 및 1-문자 아미노산 약어를 사용하였다.
- [0190] Acn: 아세트아미도메틸
- [0191] ACN: 아세트니트릴
- [0192] Boc: *tert*-부틸옥시카르보닐
- [0193] DMF: N,N'-디메틸포름아미드
- [0194] DMSO: 디메틸설폭시드
- [0195] GFC: 겔 여과 크로마토그래피
- [0196] HCl: 염산
- [0197] HPLC: 고성능 액체 크로마토그래피
- [0198] MALDI: 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화법.
- [0199] MSR: 변연 대 주변 피부 비율.
- [0200] NHS: *N*-히드록시-숙신이미드.
- [0201] PBS: 포스페이트-완충 염수.
- [0202] TFA: 트리플루오로아세트산.
- [0203] **실시예 1: 비스-Cy7 PEG-31k 컨쥬게이트 (화합물 1)의 합성.**
- [0204] 디아미노-PEG를 공급자 레이슨바이오 (LaysanBio)로부터 구입하였다. 이는 엘버트 등의 문헌 [Biomacromolecules, 2, p 430-441 (2001)]의 방법을 이용하여 상응하는 PEG-디올 (시그마/알드리치 (Sigma/Aldrich))로부터 합성하였다. 디아민-PEG의 평균 질량은 GFC로 분석했을 때 ~31 kDa이었고, MALDI로 분석했을 때는 ~35 kDa이었다. 아민 치환은 양자 NMR로 검출되는 다른 불순물 없이, 특히 관찰되는 CH₂-OM 또는 CH₂-OH 양자 없이 대략 100%이었다.
- [0205] 형광 염료인 Cy7-NHS를 GE 헬스케어로부터 입수하였다. 이는 활성 에스테르 함량이 81.3%이었다. 컨쥬게이트를 하기와 같이 제조하였다:



정제된 컨쥬게이트

[0206]

[0207] (i) 디아미노-PEG-31k (10 mg/ml)를 0.1 M NaHCO₃ 완충제 중에 용해시켰다. 1M NaOH를 사용하여 pH를 8.5-8.8로 조정하였다;

[0208] (ii) 3 당량의 Cy7-NHS 용액 (DMSO 중 대략 1 mg/100 μ l)을 첨가하였다 (사용하기 전에 농도를 UV/VIS로 측정함). 실온에서 밤새 교반하였다;

[0209] (iii) AKTA 정제장치를 사용하여 제조용 RP-LC를 수행하였다;

[0210] (iv) 실온의 진공에서 농축시킨 후, 물 (x3)과 함께 공증발시켜 건조시키거나 동결건조시켰다;

[0211] (v) PBS 중에서 75 μ M 농도로 제형화시켰다.

[0212] Cy5 컨쥬게이트, 및 벤조피릴롤 염료 Dy750 및 Dy752 (디오믹스 게엠베하, 독일 예나 D-07745 소재)와의 컨쥬게이트를 유사한 방식으로 제조하였다.

[0213] 실시예 2: 다른 PEG-염료 컨쥬게이트의 합성

[0214] 단일 염료 분자로 관능화시킨 PEG를, 적절한 PEG-모노아민과 염료 활성 에스테르 (~ 1.2-1.5 당량)를 사용하여 실시예 1과 유사한 방식으로 합성하였다.

[0215] PEG 43 kDa 컨쥬게이트를, 3.33:1의 몰비로 모노-아미노 PEG20K와 2관능성 염료 (Cy5-비스 NHS 에스테르)를 반응시켜 제조하였다. 따라서, PEG20K (100 mg)를 무수 DMF (3x)와 공증발시키고, 무수 DMF (5ml) 중에 재용해시켰다. 상기 용액에 N-메틸모르폴린 (4 μ l)을 첨가한 후, Cy5-비스 NHS (146 μ l의 DMSO 중 0.3 당량)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 암실에서 밤새 교반한 후, HPLC로 정제하였다. 순수한 분획을 아미콘 (Amicon) 5K MWCO 필터를 사용하여 농축시켰다.

[0216] 실시예 3: 스크리닝 모델

[0217] 모든 세포주를 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (American Type Culture Collection; ATCC, 버지니아 주 머내서스 소재)으로부터 입수하고 권고되는 대로 배양하였다. 13762 Mat B III (래트 유선 선암; ATCC #CRL-1666) 세포주를 10% FBS 및 1% Pen/Strep과 함께 DMEM (기브코 (Gibco) #10564-011) 중에서 배양하였다. 세포를 공기:CO₂ (95%:5%)의 혼합물 중 37°C에서 인큐베이션하였다. 세포가 80% 초과 of 단층증식 (confluency)에 도달한 후, 세포를 수집하고, 계수하고, 주사를 위해 배양 배지 1 mL 당 10 x 10⁶ 세포로 농축시켰다.

[0218] 동물 및 생체내 종양 모델

[0219] 생체내 연구를, 각각 4 내지 8주령의 암컷 피셔 (Fischer) 344 래트 또는 중증 복합성 면역결핍 장애 (SCID) 마우스를 사용하여 수행하였다. 동물과 비-형광 먹이 (할랜 랩스 (Harlan Labs), cat. #TD.97184) 및 물을 자유롭게 먹도록 우리에 넣고, 표준 12시간 밤-낮 조명 사이클로 사육했다. 27 게이지 바늘을 사용하여 동물의 유방 지방체 안으로 직접 정위적으로 1 x 10⁶ 개의 세포 (100 μ L)를 주사하였다. MatBIII 종양이 성장 (~1 cm의 직

경)하도록 7일 동안 둔 후, 동물에 시험 제제를 주사하고 영상화하였다.

영상화.

동작음을 최소화하기 위하여 가장 짧은 노출 시간 60 ms로 동물의 영상 250개를 취득하도록 찍었다. 영상을 분석 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 변연이 자동으로 선택되고 변연으로부터 41 픽셀 바깥의 변연 부분이 하이라이트되었다. 결과는 영상의 배경으로부터의 변연과 종양의 식별이었다. 변연-대-피부 비율 (MSR)을 하기 식을 사용하여 계산하였다:

$$MSR = \left(\frac{I_{\text{변연}}}{I_{\text{배경}}} \right)^2$$

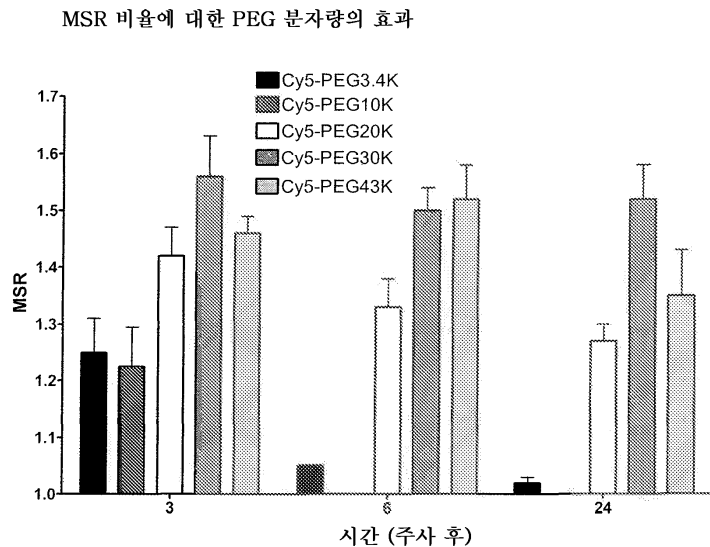
도 1은 다양한 분자량의 PEG의 효과를 나타낸다. 각각의 PEG의 번호는 제제의 분자량을 나타낸다 (즉, PEG30K의 MW는 30 kDa임).

실시예 4: 염료의 효과

보다 긴 여기 및 방출 파장을 갖는 다양한 염료를 비스-디아미노-PEG31K 골격에 실시예 1에 기재한 바와 같이 컨쥬게이팅시켰다. MSR 결과를 도 2에 나타내었다.

도면

도면1



도면2

비스-디아미노-PEG31K 컨쥬게이트에 대한 염료 효과

