



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0097780
(43) 공개일자 2013년09월03일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 49/04 (2006.01) A61K 51/08 (2006.01)
 A61K 103/10 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-7010727
 (22) 출원일자(국제) 2011년09월27일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2013년04월26일
 (86) 국제출원번호 PCT/EP2011/066789
 (87) 국제공개번호 WO 2012/041862
 국제공개일자 2012년04월05일
 (30) 우선권주장
 1016206.3 2010년09월27일 영국(GB)</p> | <p>(71) 출원인
 지이 헬스케어 리미티드
 영국 버킹엄셔셔주 에이취피이7 9엔에이 리틀 첼
 폰트 아머삼 플레이스
 (72) 발명자
 인드레볼 바르트
 노르웨이 엔-0401 오슬로 니달렌 포스트박스 4220
 니코비엔 2 지이 헬스케어 에이에스
 히스코크 둔칸
 영국 에이치피7 9엘엘 버킹엄셔셔 아머삼 화이트
 라이온 로드 더 그로브 센터 지이 헬스케어 리미
 티드
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 장수길, 양영준</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 **란타바이오틱 펩티드 기재의 세포자멸사 조영제**

(57) 요약

본 발명은, 세포자멸사를 생체내에서 영상화하는 방사성의약품에 관한 것이다. 본 발명은, 세포자멸 세포의 표면에 노출되는 아미노포스포리피드 포스파티딜에탄올아민(PE)으로의 선택적인 결합을 통하여 세포자멸 세포를 표적화하는 조영제를 제공한다. 상기 방사성의약품은 PE 결합하는 펩티드의 킬레이터 접합체의 방사성금속 착물을 포함한다. 생체 내에서 영상화하는 제약 조성물, 키트 및 방법이 또한 제공된다.

(72) 발명자

아르보 벤테 엘리자베쓰

노르웨이 엔-1356 베케스투아 호비크베이엔 44

발라 라지브

호주 4072 큐엘디 브리스베인 세인트 루시아 더 유니버시티 오브 퀸즈랜드 빌딩 60 센터 포 어드밴스드 이미징 게르만 래보러토리즈

글라세르 마티아스 에버하르트

영국 에이치피7 9엘엘 아머삼 화이트 라이온 로드 더 그로브 센터 지이 헬스케어 리미티드

맥로비 그래엄 왈터

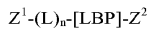
영국 에이치피7 9엘엘 버킹엄셔어 아머삼 화이트 라이온 로드 더 그로브 센터 지이 헬스케어 리미티드

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 I의 화합물을 포함하는 조영제(imaging agent):

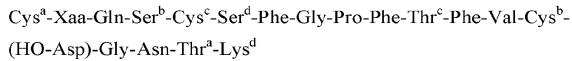
<화학식 I>



상기 화학식 I에서,

LBP는 하기 화학식 II의 란티바이오틱(lantibiotic) 펩티드이고:

<화학식 II>



(상기 화학식 II에서,

Xaa는 Arg 또는 Lys이고;

Cys^a-Thr^a, Ser^b-Cys^b 및 Cys^c-Thr^c는 티오에테르 결합을 통해 공유결합으로 결합되고;

Ser^d-Lys^d는 리시노알라닌 결합을 통해 공유결합으로 결합되고;

HO-Asp는 β-히드록시아스파르트산이다);

Z¹-(L)_n-은 LBP의 Cys^a에, 및 임의적으로 또한 Xaa에 부착되는데, 여기서 Z¹은 4개 이상의 금속 도너(donor) 원자를 갖는 킬레이트체의 방사성금속 착물을 포함하고;

Z²는 LBP의 C-말단에 부착되고, OH, OB^c, 또는 M^{IG}이고, 여기서 B^c는 생체적합성 양이온이며, M^{IG}는 LBP 펩티드의 생체내 대사를 억제하거나 저해하는 생체적합성 기인 대사 억제 기이고;

L은 식 -(A)_m-의 합성 링커 기이고, 여기서 각각의 A는 독립적으로 -CR₂-, -CR=CR-, -C≡C-, -CR₂CO₂-, -CO₂CR₂-, -NRCO-, -CONR-, -NR(C=O)NR-, -NR(C=S)NR-, -SO₂NR-, -NRSO₂-, -CR₂OCR₂-, -CR₂SCR₂-, -CR₂NRCR₂-, C₄₋₈ 시클로헥테로알킬렌 기, C₄₋₈ 시클로알킬렌 기, C₅₋₁₂ 아릴렌 기, 또는 C₃₋₁₂ 헤테로아릴렌 기, 아미노산, 당 또는 단분산 폴리에틸렌글리콜(PEG) 빌딩 블록이고;

각각의 R은 독립적으로 H, C₁₋₄ 알킬, C₂₋₄ 알케닐, C₂₋₄ 알키닐, C₁₋₄ 알콕시알킬 또는 C₁₋₄ 히드록시알킬로부터 선택되고;

m은 1 내지 20의 정수이고;

n은 0 또는 1의 정수이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 킬레이트체가 6개 이상의 도너 원자를 갖는 아미노카르복실레이트 리간드, 또는 N4 도너 세트를 갖는 네 자리 킬레이터인, 조영제.

청구항 3

제2항에 있어서, N4 도너 세트가 디아민디옥심 킬레이터 또는 테트라-아민 킬레이터인, 조영제.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, Z¹이 LBP의 Cys^a에만 부착되는, 조영제.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, Xaa가 Arg인, 조영제.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, Z^2 가 OH 또는 OB° 인, 조영제.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, n이 1이고, L이 식 $-(OCH_2CH_2)_x-$ (여기서, x는 6 내지 18의 정수이다)의 PEG 기를 포함하는, 조영제.

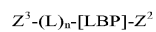
청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 방사성금속이 ^{99m}Tc 인, 조영제.

청구항 9

하기 화학식 III의 킬레이터 접합체(conjugate):

<화학식 III>



상기 식에서,

Z^3 은 4개 이상의 금속 도너 원자를 갖는 킬레이트제이고;

L, n, LBP 및 Z^2 는 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에서 정의된 바와 같다.

청구항 10

제9항의 킬레이터 접합체를 적합한 용매 중에서 목적하는 방사성금속의 공급물과 반응시키는 것을 포함하는, 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 조영제의 제조 방법.

청구항 11

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 조영제를, 생체적합성 캐리어와 함께, 포유동물로의 투여에 대해 적합한 형태로 포함하는, 방사성의약품(radiopharmaceutical) 조성물.

청구항 12

생체적합한 캐리어 중에서 방사성금속의 멸균성 공급물을 사용하여 재구성하는 경우에 용해(dissolution)되어 목적하는 방사성의약품 조성물을 생성시키도록 제9항의 킬레이터 접합체를 멸균성 고체 형태로 포함하는, 제11항의 방사성의약품 조성물의 제조를 위한 키트.

청구항 13

제12항에 있어서, 멸균성 고체 형태가 동결건조된 고체인, 키트.

청구항 14

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 조영제, 또는 제11항의 조성물이 분포된 인간 또는 동물 신체의 적어도 일부에 대한 영상(image)을 PET 또는 SPECT를 사용하여 생성시키는 것을 포함하고, 상기 조영제 또는 조성물이 상기 인간 또는 동물 신체에 미리 투여된, 인간 또는 동물 신체의 영상화 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 인간 또는 동물 신체의 일부가, 비정상적인 세포자멸사가 관련되는 질환 상태(disease stat

e)에 놓여 있는, 영상화 방법.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, 약물을 사용한 인간 또는 동물 신체의 치료 효과를 모니터하도록 반복적으로 실시되고, 상기 영상화가 상기 약물을 사용한 치료 전 및 후에, 및 임의적으로 또한 상기 약물을 사용한 치료 중에도 실시되는, 영상화 방법.

청구항 17

인간 또는 동물 신체의 진단 방법에 사용되는, 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 조영제, 제11항의 조성물, 또는 제12항의 키트의 용도.

청구항 18

제14항 또는 제15항의 영상화 방법을 포함하는, 인간 또는 동물 신체의 진단 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은, 세포자멸사 및 다른 형태의 세포 사를 생체 내에서 영상화하는 방사성의약품(radiopharmaceutical)에 관한 것이다. 본 발명은, 세포자멸 세포(apoptotic cell)의 표면 상에 노출되는 아미노포스포리피드 포스파티딜에탄올아민(PE)으로의 선택적인 결합을 통하여 세포자멸 세포를 표적화하는 조영제(imaging agent)를 제공한다. 생체 내에서 영상화하는 제약 조성물, 키트 및 방법이 또한 제공된다.

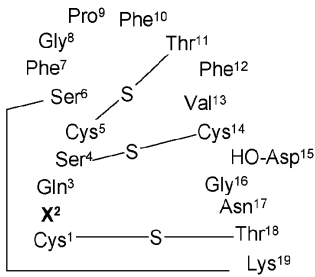
배경기술

[0002] 세포자멸사 또는 예정 세포 사(PCD)는 가장 일반적인 세포 사 경로이며, 이는 고도로 조절되고 에너지 보존된 메커니즘을 통해 진행된다. 건강한 상태에서, 세포자멸사는 세포 성장의 제어, 세포 수의 조절, 형태발생을 촉진시키고, 해롭거나 비정상적인 세포를 제거하는데 있어서 핵심적인 역할을 담당한다. PCD 과정의 조절장애(dysregulation)는, 세포자멸사의 억제와 관련된 질환 상태, 예컨대 암 및 자가면역 장애; 및 과활성 세포자멸사와 관련된 질환 상태, 예컨대 신경퇴행성 질환, 혈액학적 질환, AIDS, 허혈증 및 동종이식 거부를 포함하는 다수의 질환 상태에 관련되어 왔다. 따라서 세포자멸사의 확인 및 정량화는 그러한 세포자멸사와 관련된 병태생리의 진단에 유용하다.

[0003] 이러한 질환의 치료적 처리(therapeutic treatment)는, 상기 PCD 과정을 적절하게 자극하거나 억제함으로써 균형잡힌 세포자멸사를 회복하기 위한 것이다. 따라서, 세포 및 조직 내 세포자멸사의 생체 내에서의 비침습적인 영상화(imaging)는 치료 개입에 대한 반응의 조기 평가를 위해 매우 중요하며, 파괴적인 병리 과정에 새로운 식견을 제공할 수 있다. 악성 성장이, 상기 병태가 말기가 되기 전에 제어될 수 있도록, 암 치료의 효능을 조기에 모니터하는 것에 특히 관심이 집중되고 있다.

[0004] 결과적으로 세포자멸사에 대한 조영제를 개발하는 것에 큰 관심이 집중되고 있다(예를 들어, 문헌[Zeng *et al.*, Anti-cancer Agent Med. Chem., 9(9), 986-995(2009); Zhao, *ibid*, 9(9), 1018-1023(2009) and M. De Saint-Hubert *et al.*, Methods, 48, 178-187(2009)] 참조). 세포 사를 영상화하는데 사용가능한 프로브 중에서, 방사성표지된 아넥신(Annexin) V가 가장 주목되었다. 아넥신 V는 단지 음으로 하전된 인지질에만 결합하여, 세포자멸사와 괴사 사이를 구별할 수 없게 만든다.

[0005] 란티오닌-함유 항균 펩티드("란티바이오틱") 두라마이신 및 신나마이신은 치밀한 테트라시클릭 구조를 갖는 두 개의 밀접하게 관련된 19-합체(mer) 펩티드이다(문헌[Zhao, Amino Acids, DOI 10.1007/s00726-009-0386-9, Springer-Verlag(2009)], 및 그 내부에 인용된 참고 문헌). 상기 물질은 4개의 공유 결합, 분자내 가교를 통해 가교되고, 위치 2에 있는 하나의 아미노산 잔기에 의해서만 구분된다. 두라마이신 및 신나마이신의 구조는 이하에 개략적으로 도시되어 있는데, 여기서 숫자매김(numbering)은 19-합체 서열 내 연결된 아미노산 잔기의 위치를 지칭한다:



두라마이신 $X^2 = \text{Lys}$,

신나마이신 $X^2 = \text{Arg}$.

[0006]

[0007]

예정 세포 사 또는 세포자멸사는 세포의 분자내의 에너지 의존적인 자가 파괴이다. 세포 원형질막의 이중층을 가로지르는 인지질의 재분배는 세포자멸사에 대한 중요한 표지이다. 따라서, 생존가능한 세포에서, 아미노포스포리피드 포스파티딜에탄올아민(PE 또는 PtdE) 및 포스파티딜세린(PS)은 세포 원형질막의 내엽(inner leaflet)의 주요 구성성분이다. 세포자멸 세포에서는, PE 및 PS의 동시적인 외부화가 존재한다.

[0008]

두라마이신 및 신나마이신 둘 모두는, PE 헤드 기 주위에 꼭 맞는(fit) 소수성 포켓을 형성시킴으로써 유사한 특이성 및 높은 친화성을 갖는 중성의 아미노포스포리피드 PE에 결합한다. 상기 결합은, β -히드록시아스파르트산 잔기(HO-Asp¹⁵)와 에탄올아민 기 사이의 이온성 상호작용에 의해 안정화된다. 이러한 잔기를 변형시키면 두라마이신이 불활성화되는 것으로 알려져 있다(문헌[Zhao *et al.*, J. Nucl. Med, 49, 1345-1352(2008)]). 자오(Zhao)의 문헌[Amino Acids, DOI 10.1007/s00726-009-0386-9, Springer-Verlag(2009)]에서는, 와카마츠(Wakamatsu) 등의 문헌[Biochemistry, 29, 113-188(1990)]에 의한 더 앞선 연구를 인용하였는데, 상기 와카마츠의 문헌에서의 NMR 연구는, 신나마이신의 5개 말단 아미노산의 ¹H NMR 공명 중 어느 것도 PE로의 결합 상으로 이동되지 않음을 보여주는데, 이는 상기 신나마이신의 5개 말단 아미노산이 PE와의 상호작용에 관련되지 않음을 시사하는 것이다.

[0009]

US 2004/0147440 A1호(텍사스 시스템 유니버시티)에는, 사전-세포자멸 또는 세포자멸 세포를 검출하기 위해 또는 암을 영상화하는데 사용될 수 있는 표지된 항-아미노포스포리피드 항체가 기재되어 있다. 암 치료를 위한 비오틴, 단백질 또는 항바이러스 약물과 두라마이신의 접합체(conjugate)가 또한 제공된다.

[0010]

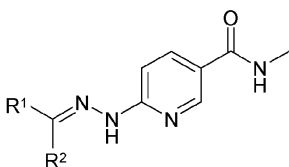
WO 2006/055855호에는, 단백질의 포스파티딜세린-결합 C2 도메인을 포함하는 방사성표지 화합물을 사용한 세포자멸사의 영상화 방법이 개시되어 있다.

[0011]

WO 2009/114549호에는,

[0012]

(i) CKQSCSFGPFTFVCDGNTK와 70% 이상의 서열 유사성을 갖는 폴리펩티드를 제공하는 단계로서, 상기 폴리펩티드가 아미노산 잔기 1-18, 4-14 및 5-11 사이에 티오에테르 결합, 및 아미노산 잔기 6-19 사이에 아마이드 결합을 포함하고, 하기 구조식의 하나 이상의 원위(distal) 모이어티가 상기 폴리펩티드의 위치 1, 위치 2, 또는 위치 1 및 위치 2에서 아미노산에 공유결합에 결합되는, 폴리펩티드 제공 단계:



[0013]

[0014]

(상기 식에서, R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 선형 또는 분지형의 포화 또는 불포화 C_{1-4} 알킬이다); 및

[0015]

(ii) 상기 원위 모이어티 중 하나 이상을 $^{99m}\text{Tc}^x$, ($^{99m}\text{Tc}=\text{O}$)³⁺, ($^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$)²⁺, ($\text{O}=\text{Tc}=\text{O}$)⁺, 또는 [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$]⁺(여기서, x는 +7, +6, +5, +4, +3, +2, +1, 0 및 -1로 이루어지는 군으로부터 선택된 산화환원 또는 산화 상태이다)로 킬레이트화하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된 방사성의약품, 또는 그의 염, 용매화물 또는 수화물이 개시되어 있다..

[0016]

WO 2009/114549호의 '원위 모이어티'는 히드라지노니코틴아미드(일반적으로 "HYNIC"로 약칭됨)를 기재로 하는,

방사성동위원소 ^{99m}Tc 에 대한 착화제이다. HYNIC는 문헌(예를 들어, 문헌[Banerjee *et al.*, Nucl.Med.Biol., 32, 1-20(2005)] 참조)에 널리 공지되어 있고, 펩티드 및 단백질을 ^{99m}Tc 로 표지하는 바람직한 방법이다[R. Alberto, Chapter 2, pages 19-40 in IAEA Radioisotopes and Radiopharmaceuticals Series 1: "Technetium-99m Radiopharmaceuticals Status and Trends"(2009)].

[0017] WO 2009/114549호에는 ^{99m}Tc -HYNIC-두라마이신이 구체적으로 개시되어 있고, 거기서 교시된 방사성의약품은 세포 자멸사 및/또는 괴사, 죽상동맥경화 플라크 또는 급성 심근 경색을 영상화하는데 유용하다고 제안되어 있다.

[0018] 자오 등의 문헌[J. Nucl. Med, 49, 1345-1352(2008)]에는, ^{99m}Tc -HYNIC-두라마이신의 제조가 개시되어 있다. 자오 등은, 두라마이신이 N-말단(Cys¹ 잔기) 및 Lys² 잔기의 엡실론-아민 측쇄에서 HYNIC에 접합되는데 이용가능한 2개의 아민기를 가짐에 주목하고 있다. 이들은 ^{99m}Tc 로 방사성표지하기 전에 비스-HYNIC-관능화된 두라마이신을 제거하기 위해 HYNIC-두라마이신 접합체를 HPLC로 정제하였다. 자오 등은, 연구된 ^{99m}Tc -표지된 모노-HYNIC-두라마이신 접합체가 아마도 이성질체의 혼합물 형태인 것을 인정한다.

[0019] HYNIC가 안정한 ^{99m}Tc 착물을 형성한다 하더라도, 테크네튬 금속 착물의 배위 구체를 완성하기 위해서는 추가적인 공동-리간드가 필요하다. HYNIC은 근방에 있는 아미노산 측쇄 관능성기의 특성에 따라 다르지만, 한 자리 리간드로 또는 두 자리 킬레이터로 기능할 수 있다(문헌[King *et al.*, Dalton Trans., 4998-5007(2007); Meszaros *et al.*[Inorg. Chim. Acta, 363, 1059-1069(2010)]). 따라서, 환경에 따라 다르지만, HYNIC은 1- 또는 2-금속 도너(donor) 원자를 갖는 금속 착물을 형성한다. 메스자로스 등은, HYNIC와 함께 사용된 공동-리간드의 특성은 시스템의 거동에 대해 큰 효과를 가질 수 있음에 주목하고, 공동-리간드 중 어느 것도 이상적이지 않음을 진술한다.

발명의 내용

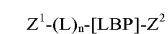
[0020] 본 발명은, 특히 비정상적인 세포자멸사가 관련되는 포유동물 신체의 질환 상태를 영상화하기 위한 방사성의약품 조영제를 제공한다. 상기 조영제는 란타바이오틱 펩티드의 방사성금속 킬레이터 접합체를 포함한다.

[0021] 본 발명은, 공동-리간드를 필요로 하지 않고 높은 방사성화학 순도(RCP)로 재현가능하게 형성되는 방사성금속 착물을 제공한다. 본 발명자들은 또한, N-말단에 인접한 아미노산(화학식 II의 Xaa)에서도 착물형성되지 않은 킬레이터를 부착시키는 것이 포스파티딜에탄올아민으로의 결합에 대해 유해한 효과를 갖기 때문에, 본원에서의 화학식 II의 란타바이오틱 펩티드의 N-말단(Cys³ 잔기)에 방사성금속 착물을 부착시키는 것이 매우 바람직함을 확인하였다. 이 효과는 선행 기술에서는 이전에 인식되지 않았으므로, 결합 친화도에 대한 충격 정도는 새로운 것으로 여겨진다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 제 1 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 I의 화합물을 포함하는 조영제를 제공한다:

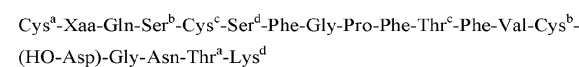
[0023] <화학식 I>



[0024] 상기 화학식 I에서,

[0025] LBP는 하기 화학식 II의 란타바이오틱 펩티드이고:

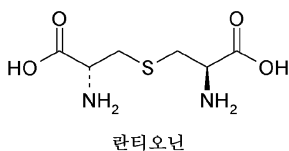
[0026] <화학식 II>



[0027] (상기 화학식 II에서, Xaa는 Arg 또는 Lys이고;

[0028] Cys^a-Thr^a, Ser^b-Cys^b 및 Cys^c-Thr^c는 티오에테르 결합을 통해 공유결합으로 결합되고;

- [0031] Ser^d-Lys^d는 리시노알라닌 결합을 통해 공유결합으로 결합되고;
- [0032] HO-Asp는 β-히드록시아스파르트산이다);
- [0033] Z¹-(L)_n-은 LBP의 Cys^a에, 및 임의적으로 또한 Xaa에 부착되는데, 여기서 Z¹은 4개 이상의 금속 도너 원자를 갖는 킬레이트제의 방사성금속 착물을 포함하고;
- [0034] Z²는 LBP의 C-말단에 부착되고, OH, OB^c, 또는 M^{IG}이고, 여기서 B^c는 생체적합성 양이온이며, M^{IG}는 LBP 펩티드의 생체내 대사를 억제하거나 저해하는 생체적합성 기인 대사 억제 기이고;
- [0035] L은 식 -(A)_n-의 합성 링커 기이고, 여기서 각각의 A는 독립적으로 -CR₂-, -CR=CR-, -C≡C-, -CR₂CO₂-, -CO₂CR₂-, -NRCO-, -CONR-, -NR(C=O)NR-, -NR(C=S)NR-, -SO₂NR-, -NRSO₂-, -CR₂OCR₂-, -CR₂SCR₂-, -CR₂NRCR₂-, C₄₋₈ 시클로헥테로알킬렌 기, C₄₋₈ 시클로알킬렌 기, C₅₋₁₂ 아릴렌 기, 또는 C₃₋₁₂ 헤테로아릴렌 기, 아미노산, 당 또는 단분산 폴리에틸렌글리콜(PEG) 빌딩 블록이고;
- [0036] 각각의 R은 독립적으로 H, C₁₋₄ 알킬, C₂₋₄ 알케닐, C₂₋₄ 알키닐, C₁₋₄ 알콕시알킬 또는 C₁₋₄ 히드록시알킬로부터 선택되고;
- [0037] m은 1 내지 20의 정수이고;
- [0038] n은 0 또는 1의 정수이다.
- [0039] 상기 용어 "조영제"는 포유동물 신체를 영상화하기에 적합한 화합물을 의미한다. 바람직하게는, 상기 포유동물은 생체 내에서 손상되지 않은(intact) 포유동물 신체이고, 더욱 바람직하게는 인간 대상체이다. 바람직하게는, 상기 조영제는, 즉 전문적인 의료 전문가 아래에서 실시되는 경우에 포유동물 대상체에 실질적인 건강상의 위험 없이 최소의 침습적인 방식으로 포유동물 신체로 투여될 수 있다. 그러한 최소의 침습적인 투여는, 국소 또는 전신 마취를 필요로 하지 않고, 바람직하게는 상기 대상체의 말초 혈관 내로의 정맥내 투여이다. 제 1 측면의 조영제는 제 6 측면(하기)에서 설명된 바대로, 세포자멸사 및 다른 형태의 세포 사를 영상화하는데 특히 적합하다.
- [0040] 본원에 사용된 상기 용어 "생체내 영상화"는, 포유동물 대상체의 내부 모습의 전부 또는 일부의 영상을 비침습적으로 생성시키는 그러한 기술을 의미한다.
- [0041] 상기 용어 "아미노산"은 자연 발생적이거나 순수하게 합성적인 기원을 가질 수 있고, 광학적으로 순수할 수 있거나(즉, 단일 거울상이성질체, 따라서 키랄) 거울상이성질체의 혼합물일 수 있는 L- 또는 D-아미노산, 아미노산 유사체(예를 들어, 나프틸알라닌) 또는 아미노산 모방체(mimetic)를 의미한다. 아미노산에 대해 통상적인 세 글자 또는 한 글자의 약어가 본원에서 사용된다. 바람직하게는 본 발명의 아미노산은 광학적으로 순수하다.
- [0042] 용어 "펩티드"는, 펩티드 결합(즉, 하나의 아미노산의 아민을 다른 것의 카르복실에 연결시키는 아미드 결합)에 의해 연결된, 이상에서 정의된 둘 이상의 아미노산을 포함하는 화합물을 의미한다.
- [0043] 상기 용어 "란티바이오틱 펩티드"는 하나 이상의 란티오닌 결합을 함유하는 펩티드를 지칭한다. "란티오닌"은 그 통상적인 의미를 가지며, 하기 제시된 화학 구조를 갖는 시스틴의 술폰드 유사체를 지칭한다:



- [0044]
- [0045] 상기 용어 "티오에테르 결합을 통해 공유결합으로 결합된"은, 관련되는 Cys 잔기의 티올 관능성 기가 Ser 또는 Thr 잔기의 히드록실 관능성 기의 탈수화를 통하여 표시된 Ser 또는 Thr 잔기로 티오에테르 결합으로 연결되어, 란티오닌 또는 메틸란티오닌 결합을 생성시키는 것을 의미한다. 상기 결합은 윌리(Willey) 등에 의해 기재되어 있다(문헌[Ann. Rev. Microbiol., 61, 477-501(2007)]).
- [0046] 상기 용어 "리시노알라닌 결합"은, Lys 잔기의 엡실론 아민 기가 Ser의 히드록실 관능성 기의 탈수화를 통하여 표시된 Ser 잔기로 아민 결합으로 연결되어, 아미노산 잔기의 두 개의 알파-탄소 원자를 연결시키는 -(CH₂)-NH-

$(CH_2)_4$ - 결합을 생성시키는 것을 의미한다.

[0047] 상기 용어 "방사성금속 착물"은, 킬레이터를 사용한 방사성금속의 배위 금속 착물을 의미하는데, 여기서 상기 킬레이터는 화학식 I의 링커 기(L)를 통하여 LBP펩티드로 공유결합으로 결합된다. 상기 배위 착물은 방사성금속에 결합된 히드라지노니코틴아미드(HYNIC) 리간드를 포함하지 않는다. 그러므로, 상기 킬레이터는 방사성 금속으로 결합되는 주요한 종이다 - 이것은 단순히 HYNIC에 대한 공동-리간드가 아니다.

[0048] 상기 용어 "킬레이트제"는 그 통상적인 의미를 가지며, 금속 배위 시에 킬레이트 고리, 바람직하게는 5- 내지 7원의 킬레이트 고리, 더욱 바람직하게는 5- 또는 6원의 킬레이트 고리가 생성되도록 배열된 2개 이상의 금속 도너 원자를 지칭한다. 상기 금속 도너 원자는 탄소 원자 또는 비-배위되는 헤테로원자의 비-배위되는 주쇄에 의해 공유결합으로 결합된다. 상기 킬레이트제는 거대고리형 또는 개방 사슬일 수 있다. 본 발명의 킬레이트제는 4개 이상의 금속 도너 원자, 적합하게는 4 내지 8개의 금속 도너 원자를 포함하는데, 여기서 4개 이상의 그러한 금속 도너 원자는 방사성금속 착물 내 방사성금속에 결합된다.

[0049] 본 발명의 적합한 방사성금속에는, ^{99m}Tc , ^{94m}Tc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{105}Rh , ^{101m}Rh , ^{111}In , ^{89}Zr 또는 ^{45}Ti 가 포함된다.

[0050] Z^1 이 Cys^a에 부착되면, Z^1 은 LBP 펩티드의 N-말단에 부착된다. Z^1 이 또한 Xaa에 부착되면, Xaa가 Lys임을 의미하고, Z^1 은 Lys 잔기의 엡실론 아미노 기에 부착된다.

[0051] Z^2 기는, LBP의 마지막 아미노산 잔기의 카르보닐 기, 즉 카르복시 말단을 치환한다. 따라서, Z^2 가 OH이면, LBP의 카르복시 말단은 마지막 아미노산 잔기의 유리 CO_2H 기로 종결되고, Z^2 가 OB^c 이면, 말단 카르복시 기는 CO_2B^c 기로 이온화된다.

[0052] 상기 용어 "생체적합성 양이온(B^c)"은, 이온화된 음으로 하전된 기와 염을 형성하는 양으로 하전된 반대이온을 의미하는데, 여기서 상기 양으로 하전된 반대이온 또한 비독성이고, 그에 따라 포유동물 신체, 특히 인간 신체로 투여하는데 적합하다. 적합한 생체적합성 양이온의 예에는, 알칼리 금속 나트륨 또는 칼륨; 알칼리 토금속 칼슘 및 마그네슘; 및 암모늄 이온이 포함된다. 바람직한 생체적합성 양이온은 나트륨 및 칼륨, 가장 바람직하게는 나트륨이다.

[0053] 상기 용어 "대사 억제 기"(M^{16})는, 카르복시 말단(Z^2)에서 LBP 펩티드의 생체 내 대사를 억제하거나 저해하는 생체적합성 기를 의미한다. 상기 기는 당업자에게 널리 공지되어 있고, 이는 적합하게는 카르복시아미드, tert-부틸 에스테르, 벤질 에스테르, 시클로헥실 에스테르, 아미노 알콜 또는 폴리에틸렌글리콜(PEG) 빌딩 블록으로부터 선택된다. 본 발명의 LBP 펩티드는 높은 생체내 대사 안정도(60분에 95%)를 나타내는 것으로 공지되어 있어서, Z^2 는 바람직하게는 OH 또는 OB^c 이다.

[0054] 바람직한 실시양태

[0055] 킬레이트제는 바람직하게는, 방사성금속을 사용한 착물형성시에 형성된 킬레이트 고리가 하나 이상의 5 또는 6원 고리, 더욱 바람직하게는 2 내지 4원의 그러한 고리, 가장 바람직하게는 3 또는 4원의 그러한 고리를 포함하도록 설계된다.

[0056] 킬레이트제는 바람직하게는 6개 이상의 도너 원자를 갖는 아미노카르복실레이트 리간드; 또는 N_3S , N_2S_2 또는 N_4 도너 세트를 갖는 네 자리 킬레이터로부터 선택된다. 킬레이트제는 더욱 바람직하게는 6개 이상의 도너 원자를 갖는 아미노카르복실레이트 리간드, 또는 N_4 도너 세트를 갖는 네 자리 킬레이터이며, 가장 바람직하게는 N_4 도너 세트를 갖는 네 자리 킬레이터이다.

[0057] 상기 용어 "아미노카르복실레이트 리간드"는 그 통상적인 의미를 가지며, EDTA, DTPA 유형의 킬레이트제를 지칭한다. 상기 킬레이터의 도너 원자는 아민(N) 도너와 카르복실산(O) 도너의 혼합물이다. 상기 킬레이터는 개방 사슬(예를 들어, EDTA, DTPA 또는 HBED), 또는 거대고리형(예를 들어, DOTA 또는 NOTA)일 수 있다. 적합한 그러한 킬레이터에는, 당업계에 널리 공지되어 있고 ^{67}Ga 또는 ^{68}Ga , ^{111}In 와 같은 방사성금속, 구리의 방사성동위원소, ^{89}Zr 및 ^{45}Ti 에 대해 바람직한 DOTA, HBED 및 NOTA가 포함된다.

[0058] 상기 용어 "네 자리 킬레이터"는 그 통상적인 의미를 가지며, 방사성금속이 네 자리 킬레이트제의 4개의 금속 도너 원자에 의해 배위되는 킬레이트제를 지칭한다.

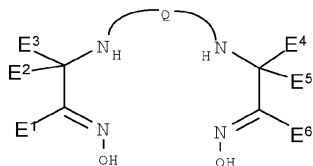
[0059] 상기 용어 "N3S 도너 세트"는, 네 자리 킬레이터의 4개의 금속 도너 원자가 3개의 질소 도너 원자 및 하나의 황 도너 원자로 구성됨을 의미한다. 적합한 그러한 N 도너 원자 유형의 예로는, 아민(특히 1차 또는 2차 아민); 아마이드 또는 옥심, 또는 그의 조합물이 있다. 적합한 그러한 S 도너 원자 유형의 예로는 티올 및 티오에테르가 있다. 바람직한 그러한 N3S 킬레이터는 티오트리아미드 도너 세트를 가지며, 바람직하게는 MAG3(머캅토아세틸 트리글리신)과 같은 개방 사슬 킬레이터이다.

[0060] 상기 용어 "N2S2 도너 세트"는, 네 자리 킬레이터의 4개의 금속 도너 원자가 2개의 질소 도너 원자 및 2개의 황 도너 원자로 구성됨을 의미한다. 적합한 N 및 S 도너 원자는 N3S(상기)에 대해서 기재된 바와 같다. 바람직한 그러한 N2S2 킬레이터는 디아민디티올 또는 아마이드아민디티올 도너 세트를 가지며, 바람직하게는 개방 사슬 킬레이터, 예컨대 BAT 또는 N,N'-에틸렌디-L-시스테인이다(문헌[Inorg Chem., 35(2): 404-414(1996)]).

[0061] 상기 용어 "N4 도너 세트"는, 네 자리 킬레이터의 4개의 금속 도너 원자가 모두 질소를 기재로 하고 있음을 의미한다. 적합한 그러한 N 도너 원자 유형의 예로는, 아민(특히 1차 또는 2차 아민); 아마이드 또는 옥심, 또는 그의 조합물이 있다.

[0062] N4 도너 세트는 바람직하게는 디아민디옥심; 테트라-아민; 아마이드트리아민, 또는 디아미드디아민으로부터 선택된다. 상기 N4 킬레이터는 개방 사슬이거나 거대고리형(예를 들어, 시클람, 시클렌, 모녹소시클람 또는 디옥소시클람)일 수 있다. 본 발명의 바람직한 N4 네 자리 킬레이트제는 디아민디옥심 또는 테트라-아민 도너 세트를 가지며, 더욱 바람직하게는 개방 사슬 디아민디옥심 또는 개방 사슬 테트라-아민이다.

[0063] 바람직한 디아민디옥심 킬레이터는 하기 화학식으로 표시된다:



[0064]

[0065] 상기 식에서, E¹ 내지 E⁶은 각각 독립적으로 R' 기이고;

[0066] 각각의 R'은 독립적으로 H 또는 C₁₋₁₀ 알킬, C₃₋₁₀ 알킬아릴, C₂₋₁₀ 알콕시알킬, C₁₋₁₀ 히드록시알킬, C₁₋₁₀ 플루오로알킬, C₂₋₁₀ 카르복시알킬 또는 C₁₋₁₀ 아미노알킬이거나, 두 개 이상의 R' 기는, 이러한 R' 기가 부착되는 원자와 함께, 카르보시클릭, 헤테로시클릭의 포화 또는 불포화 고리를 형성하고;

[0067] Q는 식 -(J)_f-의 가교 기인데, 여기서 f는 3, 4 또는 5이고, 각각의 J는 독립적으로 -O-, -NR'- 또는 -C(R')₂-이며, 단, -(J)_f-는 -O- 또는 -NR'-인 J 기를 최대 하나 함유할 수 있다.

[0068] 바람직한 Q 기는 다음과 같다:

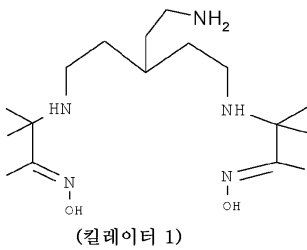
[0069] Q = -(CH₂)(CHR')(CH₂)-, 즉 프로필렌아민 옥심 또는 PnAO 유도체;

[0070] Q = -(CH₂)₂(CHR')(CH₂)₂-, 즉 펜틸렌아민 옥심 또는 펜트AO 유도체;

[0071] Q = -(CH₂)₂NR'(CH₂)₂-.

[0072] E¹ 내지 E⁶은 바람직하게는 C₁₋₃ 알킬, C₂₋₄ 알콕시알킬, C₁₋₃ 히드록시알킬, C₁₋₃ 플루오로알킬, C₂₋₆ 카르복시알킬 또는 C₁₋₃ 아미노알킬로부터 선택된다. 가장 바람직하게는, 각각의 E¹ 내지 E⁶ 기는 CH₃이다.

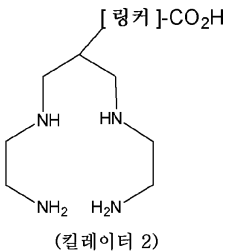
[0073] Q는 바람직하게는 -(CH₂)(CHR')(CH₂)-, -(CH₂)₂(CHR')(CH₂)₂- 또는 -(CH₂)₂NR'(CH₂)₂-, 가장 바람직하게는 -(CH₂)₂(CHR')(CH₂)₂-이다. 특히 바람직한 디아민디옥심 킬레이터는 하기 화학식으로 표시된다:



[0074]

[0075] 상기 식에서, 가교헤드 1차 아민 기는 $(L)_n$ (즉, 링커 기) 및/또는 LBP 펩티드에 접합된다.

[0076] 바람직한 테트라-아민 킬레이터는 하기 화학식으로 표시된다:



[0077]

[0078] 상기 식에서, 가교헤드 카르복실 기는 링커 기 및/또는 LBP 펩티드에 접합된다.

[0079] 킬레이터 2에서, [링커]는 바람직하게는 식 $(A')_{m1}$ 의 기이고, 여기서 $m1$ 은 0 내지 6의 정수이며, 각각의 A' 는 독립적으로 CH_2 또는 p-페닐렌이고, A' 기의 하나 이하가 p-페닐렌이다. 바람직하게는, A' 기의 각각은 CH_2 이고 $m1$ 은 1 내지 6이다. 바람직한 그러한 킬레이터는 킬레이터 2A이고, 여기서 [링커]는 $-(CH_2)-$ 이다.

[0080] 조영제의 방사성금속은 바람직하게는 ^{94m}Tc 또는 ^{99m}Tc 이고, 더욱 바람직하게는 ^{99m}Tc 이다. 이러한 테크네튬 방사성동위원소에 대해서, 킬레이터는 바람직하게는 이상에서 정의된 바와 같은 N4 도너 세트를 갖는 네 자리 킬레이터이다.

[0081] Z^2 는 바람직하게는 OH 또는 OB^c 이다.

[0082] 제 1 측면의 조영제에서, Z^1 은 바람직하게는 단지 LBP의 Cys^a 에만 부착된다. Xaa가 Arg인 경우에, Z^1 은 Cys^a 잔기의 유리 아미노 기에서 LBP N-말단에 부착된다. Xaa가 Lys인 경우에는,

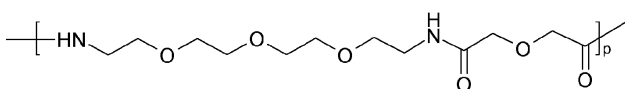
[0083] (i) Xaa 잔기의 엡실론 아민 기에 우선하여 Cys^a 잔기에서 LBP 펩티드를 선택적으로 관능화시키거나;

[0084] (ii) Cys^a 및 Xaa 둘 모두에서 Z^1 로 관능화된 LBP를 포함하는 조성물을 제조한 다음, Xaa 관능화된 종을 제거하는 단계가 취해진다.

[0085] 제 1 측면의 조영제에서, Xaa는 바람직하게는 Arg이다.

[0086] 제 1 측면의 조영제는 바람직하게는 링커 기(L)를 포함하는데, 즉 화학식 I에서의 n은 바람직하게는 1이다. L은 바람직하게는 식 $-(OCH_2CH_2)_x-$ 의 PEG 기를 포함하는데, 여기서 x는 6 내지 18, 바람직하게는 8 내지 14, 더욱 바람직하게는 10 내지 12의 정수이다. 그러한 링커 기는 생체내에서 조영제의 간 바탕 보유율(liver background retention)을 감소시키고 소변 배설을 증가시키는데 유리하다. 바람직하게는, L은 하기 화학식 IA 또는 IB의 생체개질제(biomodifier) 기를 포함한다:

[0087] <화학식 IA>

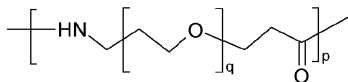


[0088]

[0089] 화학식 IA의 17-아미노-5-옥소-6-아자-3,9,12,15-테트라옥사헵타데칸산

[0090] 상기 식에서, p는 1 내지 10의 정수이다. 화학식 IA에서, p는 바람직하게는 1, 2 또는 3이다. 대안적으로, 하기 화학식 IB의 프로피온산 유도체 기재의 PEG 유사 구조가 사용될 수 있다:

[0091] <화학식 IB>



[0092]

[0093] 상기 식에서, p는 화학식 IA에 대해 정의된 바와 같고, q는 3 내지 15의 정수이다.

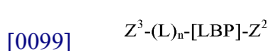
[0094] 화학식 IB에서, p는 바람직하게는 1 또는 2, 더욱 바람직하게는 1이고, q는 바람직하게는 5 내지 12, 더욱 바람직하게는 12이다.

[0095] 상기 용어 "생체개질제"는 생체 내에서 제제의 생체분포에 대해 효과를 갖는 기를 의미한다.

[0096] 제 1 측면의 조영제는 제 3 측면에서 기재된 바대로 얻을 수 있다.

[0097] 제 2 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 III의 킬레이터 접합체를 제공한다:

[0098] <화학식 III>



[0099]

[0100] 상기 식에서,

[0101] Z^3 은 4개 이상의 금속 도너 원자를 갖는 킬레이트제이고;

[0102] L, n, LBP 및 Z^2 는 제 1 측면에서 정의된 바와 같다.

[0103] 제 2 측면에서의 L, n, LBP 및 Z^2 및 킬레이트제(Z^3)의 바람직한 특징은 제 1 측면(상기)에서 정의된 바와 같다.

[0104] 특정의 LBP 펩티드는 상업적으로 입수가능하다. 따라서, 신나마이신 및 두라마이신은 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)로부터 입수가능하다. 두라마이신은 균주, 스트렙토버티실룸 신나모누스(*Streptovorticillium cinnamoneus*)로부터의 D3168 두라마이신에 의해 제조된다. 신나마이신은 여러 균주에 의해, 예를 들어 스트렙토마이세스 신나모누스(*Streptomyces cinnamoneus*)로부터 또는 스트렙토버티실룸 그리세오버티실라툼(*Streptovorticillium griseovorticillatum*)으로부터 생화학적으로 제조될 수 있다. 이에 대해서는 씨. 샤테지 등(C. Chatterjee) 등에 의한 리뷰(문헌[Chem. Rev., 105, 633-683(2005)])를 참고하기 바란다. 다른 펩티드는 문헌[P. Lloyd-Williams, F. Albericio and E. Girald; *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, CRC Press, 1997]에 기재된 바와 같이 고체 상 펩티드 합성에 의해 얻을 수 있다.

[0105] 제 2 측면의 킬레이터 접합체는 하기한 바와 같이 얻을 수 있다. 킬레이터가 디아민디옥심인 경우에, 적절한 디아민을

[0106] (i) 적절한 클로로니트로소 유도체 $Cl-C(R^1)_2-CH(NO)R^1$;

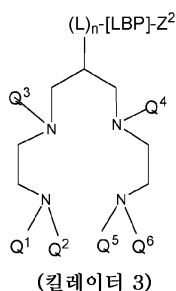
[0107] (ii) 식 $Cl-C(R^1)_2-C(=NOH)R^1$ 의 알파-클로로 옥심;

[0108] (iii) 식 $Br-C(R^1)_2-C(=O)R^1$ 의 알파-브로모케톤 중 어느 하나와 반응시킨 후에, 디아민디케톤 생성물을 히드록실아민을 사용하여 디아민디옥심으로 전환시킨다.

[0109] 상기 방법(i)은 에스. 주리슨(S. Jurisson) 등에 의해 기재되었다(문헌[Inorg. Chem., 26, 3576-82(1987)]). 클로로니트로소 화합물은 당업계에 공지된 대로 적절한 알켄을 니트로실 클로리드($NOCl$)로 처리함으로써 얻을 수 있다. 클로로니트로소 화합물의 합성에 대한 추가 상세사항은 하기 문헌에 주어지 있다: Ramalingam[Synth. Commun., 25(5), 743-752(1995)]; Glaser[J. Org. Chem., 61(3), 1047-48(1996)]; Clapp[J. Org. Chem., 36(8) 1169-70(1971)]; Saito[Shizen Kagaku, 47, 41-49(1995)] 및 Schulz[Z. Chem., 21(11), 404-405(1981)]. 방법(iii)은 노오토닉(Nowotnik) 등[Tetrahedron, 50(29), p. 8617-8632(1994)]에 의해 광범위한 견지에서 기재되었다. 알파-클로로-옥심은 상응하는 알파-클로로-케톤 또는 알데히드의 옥심화에 의해 얻을 수 있는데, 이

것은 상업적으로 입수가능하다. 알파-브로모케톤은 상업적으로 입수가능하다.

[0110] 더욱 바람직한 테트라-아민 킬레이터는 하기 화학식으로 표시된다:



[0111]

[0112] 상기 식에서,

[0113] L, LBP, n 및 Z^2 는 제 1 측면에서 정의된 바와 같고;

[0114] Q^1 내지 Q^6 은 독립적으로 Q 기이고, 여기서 Q는 H 또는 아민 보호기이다.

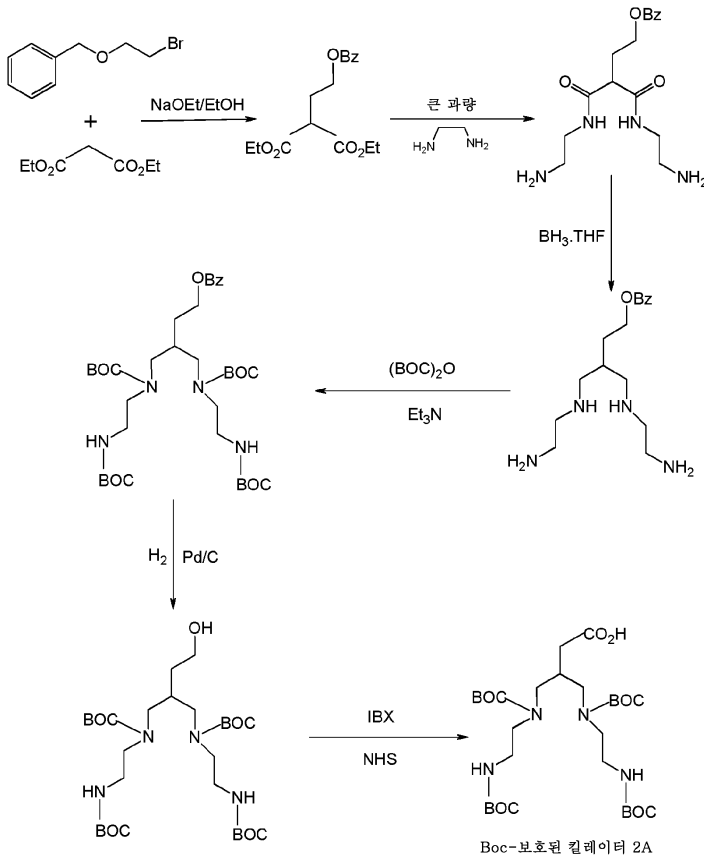
[0115] 상기 용어 "보호기"는, 바람직하지 않은 화학 반응을 억제하거나 저해하지만, 분자의 나머지를 변형시키지 않는 충분히 온화한 조건 하에서 해당 관능성 기로부터 분할될 수 있도록 충분히 반응성있게 설계되는 기를 의미한다. 탈보호 후에, 목적하는 생성물이 얻어진다. 아민 보호기는 당업자에게 널리 공지되어 있고, 이는 적합하게는 Boc(여기서, Boc는 tert-부틸옥시카르보닐), Fmoc(여기서, Fmoc는 플루오레닐메톡시카르보닐), 트리플루오로아세틸, 알릴옥시카르보닐, Dde[즉, 1-(4,4-디메틸-2,6-디옥소시클로헥실리덴)에틸] 또는 Npys(즉, 3-니트로-2-피리딘 술페닐)로부터 선택된다. 몇몇의 예에서, 보호기의 특성은, Q^1/Q^2 또는 Q^5/Q^6 기 둘 모두가, 즉 관련된 아민 질소 원자 상에 NH 결합이 존재하지 않게 할 수 있다. 추가 보호기의 사용은 문헌[Protective Groups in Organic Synthesis, 4th Edition, Theodorora W. Greene and Peter G. M. Wuts, [Wiley Blackwell,(2006)]에 기재되어 있다. 바람직한 아민 보호기는 Boc 및 Fmoc이고, 가장 바람직하게는 Boc이다. Boc가 사용되는 경우에, Q^1 및 Q^6 은 둘 모두 H이고, Q^2 , Q^3 , Q^4 및 Q^5 는 각각 tert-부톡시카르보닐이다.

[0116] 킬레이터 3에서 L, LBP, n 및 Z^2 의 바람직한 특징은 제 1 측면(상기)에서 정의된 바와 같다. 바람직한 킬레이터 3 킬레이터는 $(L)_n = (A')_{m1}$ 인데, 여기서 A' 및 m1, 및 그의 바람직한 특징들은 킬레이터 2(상기)에 대해서 기재된 바와 같다.

[0117] 테트라-아민 킬레이터는 하기 반응식 I에 기재된 바와 같이 얻을 수 있다. 아미노- 및 카르복시-관능화된 테트라-아민 킬레이터에 대한 추가 합성 정보는, 아비라지(Abiraj) 등(문헌[Chem. Eur. J., 16, 2115-2124(2010)])에 의해 제공된다. $-(CH_2)_5OH$ 가교헤드 치환기를 갖는 Boc-보호된 테트라-아민 유사체의 합성은 터핀(Turpin) 등(문헌[J. Lab. Comp. Radiopharm., 45, 379-393(2002)])에 의해 기재되었다. 테트라-아민 킬레이터의 생물학적 표적화 펩티드로의 접합은, 녹(Nock) 등(문헌[Eur. J. Nucl. Med., 30(2), 247-258(2003)])에 의해 그리고 마이나(Maina) 등(문헌[Eur. J. Nucl. Med., 30(9), 1211-1219(2003)])에 의해 기재되어 있다. 펜던트 활성 에스테르 기를 갖는 이관능성 HBED 유도체는 에더(Eder) 등(문헌[Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging, 35, 1878-1886(2008)])에 의해 교시되어 있다.

[0118] <반응식 I>

[0119] Boc-보호된 킬레이터 2A의 합성



[0120]

[0121] N_3S 이관능성 킬레이터는 수드하커(Sudhaker) 등의 방법(문헌[Bioconj. Chem., Vol. 9, 108-117(1998)])으로 제조될 수 있다. N_2S_2 디아미디디티올 화합물은 쿵(Kung) 등의 방법(문헌[Tetr. Lett., Vol 30, 4069-4072(1989)])에 의해 제조될 수 있다.

[0122] 모노아미드모노아민비스티올 화합물은 한센(Hansen) 등의 방법(문헌[Inorg. Chem., Vol 38, 5351-5358(1999)])에 의해 제조될 수 있다.

[0123] 제 3 측면에서, 본 발명은 제 2 측면의 킬레이터 접합체를 적합한 용매 중에서 목적하는 방사성금속의 공급물과 반응시키는 것을 포함하는, 제 1 측면의 조영제의 제조 방법을 제공한다.

[0124] 제 3 측면에서의 킬레이터 접합체 및 방사성금속의 바람직한 측면은 본 발명의 제 1 및 제 2 측면(상기)에서 기재된 바와 같다.

[0125] 적합한 용매는 전형적으로 성질이 수성이며, 바람직하게는 제 4 측면(하기)에서 정의된 바와 같은 생체적합성 캐리어 용매이다.

[0126] 제 4 측면에서, 본 발명은 제 1 측면의 조영제를 생체적합성 캐리어와 함께 포유동물로의 투여에 적합한 형태로 포함하는, 방사성의약품 조성물을 제공한다.

[0127] 제 4 측면에서 조영제의 바람직한 측면은 본 발명의 제 1 측면(상기)에서 기재된 바와 같다.

[0128] "생체적합성 캐리어"는, 상기 조성물이 생리학적으로 허용가능한, 즉 독성 또는 과도한 불편감없이 포유동물 신체에 투여될 수 있도록 조영제가 현탁되거나 바람직하게는 용해될 수 있는 유체, 특히 액체이다. 상기 생체적합성 캐리어는 적합하게는 주사가 가능한 캐리어 액체, 예컨대 주사를 위한 멸균성의 발열원 비함유 물; 식염수와 같은 수용액(이것은 유리하게는 주사를 위한 최종 생성물이 등장성이도록 평형화될 수 있다); 생체적합성 완충제(예를 들어, 포스페이트 완충제)를 포함하는 수성 완충제 용액; 하나 이상의 긴장성(tonicity)-조정 물질(예를 들어, 생체적합성 반대이온을 갖는 혈장 양이온의 염)의 수용액; 당(예를 들어, 갈락토스 또는 수크로스), 당 알콜(예를 들어, 소르비톨 또는 만니톨), 글리콜(예를 들어, 글리세롤), 또는 다른 비이온성 폴리올 물질(예를 들어, 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌 글리콜 등)이다. 바람직하게는, 상기 생체적합성 캐리어는 주사를 위한

발열원 비함유 물, 등장성 식염수 또는 포스페이트 완충제이다.

- [0129] 상기 표현 "포유동물로의 투여에 적합한 형태로"는, 멸균성의 발열원 비함유이고, 독성 또는 유해 효과를 나타내는 화합물이 결핍되어 있으며, 생체적합한 pH(대략 pH 4.0 내지 10.5)에서 제형화되는 조성물을 의미한다. 상기 조성물에는, 생체내에서 색전을 일으킬 위험이 있고 생물학적 유체(예를 들어, 혈액)와의 접촉시에 침전이 일어나지 않도록 제형화되는 미립자가 결핍되어 있다. 상기 조성물은 또한 단지 생물학적으로 친화성인 부형제만을 함유하며, 바람직하게는 등장성이다.
- [0130] 상기 조영제 및 생체적합성 캐리어는 각각, 멸균 완전성 및/또는 방사성활성 안전성을 유지할 수 있게 하는 밀봉된 용기 및 임의적으로 불활성 헤드스페이스 기체(예를 들어, 질소 또는 아르곤)를 포함하는 적합한 바이알(vial) 또는 용기로 공급되는데, 이와 동시에 주사기 또는 캐놀라에 의해 용액의 첨가 및 배출이 가능하다. 바람직한 그러한 용기는 격막 밀봉(septum-sealed) 바이알이며, 여기서 기밀 폐쇄부는 오버시일(overseal)(전형적으로는 알루미늄 재질)을 사용하여 크림핑된다(crimped). 상기 폐쇄부(예를 들어, 크림핑된 격막 밀봉 폐쇄부)는 멸균 완전성을 유지하면서 피하 주사침을 사용한 하나 또는 다수개 펀칭에 적합하다. 상기 용기는, 상기 폐쇄부가 필요한 경우(예를 들어, 헤드스페이스 기체를 교환하거나 용액을 탈기시키기 위해) 진공을 견딜 수 있고, 외부 대기 기체, 예컨대 산소 또는 수증기의 유입을 허용하지 않으면서 압력에서의 감소와 같은 압력 변화를 견딜 수 있다는 추가 이점을 갖는다.
- [0131] 바람직한 다수 투여(multiple dose) 용기는 다수개의 환자 투여량을 함유하는 단일의 벌크 바이알(예를 들어, 10 내지 30 cm³ 부피)을 포함하고, 이에 의해 1회 환자 투여량이 임상적 상황에 적합하도록 제조물의 생존가능한 수명 동안에 다양한 시간 간격에서 임상 등급의 주사기 내로 배출될 수 있다. 사전 충전된 주사기는 1회 인간 투여량, 또는 "단위 투여량(unit dose)"을 함유하도록 설계되며, 따라서 이는 바람직하게는 임상적 사용에 적합한 일회용 또는 다른 주사기이다. 본 발명의 제약 조성물은 바람직하게는 한 명의 환자에 대해 적합한 투여량을 지니며, 상술된 바와 같이 적합한 주사기 또는 용기로 제공된다.
- [0132] 상기 제약 조성물은 추가의 임의적인 부형제, 예컨대 항균 보존제, pH 조정제, 충전제, 방사성보호제, 가용화제 또는 삼투압 조정제를 함유할 수 있다. 상기 용어 "방사성보호제"는, 물의 방사성분해로부터 생성되는 산소 함유 자유 라디칼과 같은 고도의 반응성 자유 라디칼을 포획하여 분해 반응, 예컨대 산화환원 과정을 억제하는 화합물을 의미한다. 본 발명의 방사성보호제는 적합하게는, 아스코르브산, 파라-아미노벤조산(즉, 4-아미노벤조산), 겐티스산(즉, 2,5-디히드록시벤조산) 및 그의 상술된 생체적합성 양이온과의 염으로부터 선택된다. 상기 용어 "가용화제"는, 용매 내에서 조영제의 용해도를 증가시키는, 조성물 중에 존재하는 첨가제를 의미한다. 바람직한 그러한 용매는 수성 매질이며, 따라서 상기 가용화제는 바람직하게는 물에서의 용해도를 개선시킨다. 적합한 그러한 가용화제에는, C₁₋₄ 알콜; 글리세린; 폴리에틸렌 글리콜(PEG); 프로필렌 글리콜; 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트; 소르비탄 모노올로에이트; 폴리소르베이트; 폴리(옥시에틸렌)폴리(옥시프로필렌)폴리(옥시에틸렌) 블록 공중합체(플루로닉스(Pluronic)TM); 시클로텍스트린(예를 들어, 알파, 베타 또는 감마 시클로텍스트린, 히드록시프로필-β-시클로텍스트린 또는 히드록시프로필-γ-시클로텍스트린) 및 레시틴이 포함된다.
- [0133] 상기 용어 "항균 보존제"는, 잠재적으로 유해한 미생물, 예컨대 세균, 효모 또는 곰팡이의 성장을 억제하는 제제를 의미한다. 상기 항균 보존제는 또한 사용된 투여량에 따라 다르지만 몇몇의 항균 특성을 나타낼 수 있다. 본 발명의 항균 보존제(들)의 주요한 역할은, 제약 조성물 내에서 임의의 그러한 미생물의 성장을 억제하는 것이다. 그러나, 상기 항균 보존제는 또한 투여 전에 상기 조성물을 제조하는데 사용된 키트의 하나 이상의 성분 중에서 잠재적으로 유해한 미생물의 성장을 억제시키기 위해 임의적으로 사용될 수 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.
- [0134] 상기 용어 "pH 조정제"는, 조성물의 pH가 인간 또는 포유동물로의 투여에 대해 허용되는 한계치(대략 4.0 내지 10.5의 pH) 내에 있게 하는 화합물, 또는 화합물의 혼합물을 의미한다. 적합한 그러한 pH 조정제에는, 제약상 허용되는 완충제, 예컨대 트리신, 포스페이트 또는 TRIS[즉, 트리스(히드록시메틸)아미노메탄], 및 제약상 허용되는 염기, 예컨대 탄산나트륨, 중탄산나트륨 또는 그의 혼합물이 포함된다. 상기 조성물이 키트 형태로 사용되는 경우, pH 조정제가 임의적으로 개별 바이알 또는 용기로 제공되어, 상기 키트의 사용자가 다단계 과정의 일부로 pH를 조정할 수 있다.
- [0135] 상기 용어 "충전제"는, 제조 및 동결건조 동안에 물질 취급을 용이하게 할 수 있는 제약상 허용되는 벌크제

(bulking agent)를 의미한다. 적합한 충전제에는, 무기 염, 예컨대 염화나트륨, 및 수용성 당 또는 당 알콜, 예컨대 수크로스, 말토스, 만니톨 또는 트레할로스가 포함된다.

- [0136] 제 2 측면의 제약 조성물은 목적하는 멸균성의 비-발열원성 생성물이 얻어지도록 무균 제조(즉, 클린룸) 조건 하에서 제조될 수 있다. 중요 성분, 특히 관련된 시약 및 조영제와 접촉하게 되는 장치의 그러한 부분(예를 들어, 바이알)이 멸균성인 것이 바람직하다. 상기 성분 및 시약은, 멸균 여과, 예를 들어 감마 조사를 사용한 마지막 멸균, 오토클레이빙(autoclaving), 건식 가열 또는 화학 처리(예를 들어, 에틸렌 옥시드를 사용한)를 비롯한 당업계에 공지된 방법으로 멸균될 수 있다. 몇몇의 성분들을 미리 멸균시켜서, 최소 수의 조작의 실시가 필요하도록 하는 것이 바람직하다. 그러나, 예방책으로, 제약 조성물의 제조에서 최종 단계로서 적어도 하나의 멸균 여과 단계를 포함시키는 것이 바람직하다.
- [0137] 이상에서 주지된 바와 같이, 본 발명의 제약 조성물은 바람직하게는 가용화제를 포함하여, 결과적으로 필터 물질로 흡착된 방사성활성의 과도한 손실없이 멸균 여과 단계가 이용될 수 있다. 임상적 등급의 주사기 내에서 또는 플라스틱 튜빙(tubing)을 사용하여 제약 조성물을 조작하는 경우에도 유사한 고려가 적용되는데, 이 경우에 가용화제의 사용없이 흡착에 의해 방사성활성의 손실이 일어날 수 있다.
- [0138] 본 발명의 방사성의약품 조성물은 하기한 다양한 방법으로 제조될 수 있다:
- [0139] (i) 방사성금속 착물 형성이 클린룸 환경에서 실시되는 무균 제조 기술;
- [0140] (ii) 방사성금속 착물 형성이 무균 제조를 사용하지 않고 실시된 다음, 마지막 단계에서 [예를 들어, 감마 조사, 오토클레이빙, 건식 가열 또는 화학 처리(예를 들어, 에틸렌 옥시드를 사용한)에 의해] 멸균되는 마지막 멸균;
- [0141] (iii) 화학식 III의 킬레이터 접합체 및 임의적인 부형제를 포함하는 멸균성의 비-방사성활성 키트 제형을 목적하는 방사성금속의 공급물과 반응시키는 키트 방법.
- [0142] 방법(iii)이 바람직하며, 이 방법에 사용되는 키트는 제 5 측면(하기)에 기재되어 있다.
- [0143] 제 5 측면에서, 본 발명은, 생체적합한 캐리어 중에서 방사성금속의 멸균성 공급물을 사용하여 재구성하는 경우에 용해되어 목적하는 방사성의약품 조성물을 생성시키도록 제 2 측면의 킬레이터 접합체를 멸균성의 고체 형태로 포함하는, 제 4 측면의 방사성의약품 조성물의 제조를 위한 키트를 제공한다.
- [0144] 제 5 측면에서의 킬레이터 접합체의 바람직한 측면은 본 발명의 제 2 측면(상기)에서 기재된 바와 같다.
- [0145] 용어 "키트"는 실행되는 설명서와 함께, 목적하는 방사성의약품 조성물을 제조하는데 필요한 화학물질을 포함하는, 하나 이상의 비-방사성활성 제약 등급의 용기를 의미한다. 상기 키트는, 최소의 조작으로 인간 투여에 적합한 용액이 얻어지게끔 목적하는 방사성금속을 사용하여 재구성되도록 설계된다.
- [0146] 상기 멸균성의 고체 형태는 바람직하게는 동결건조된 고체이다.
- [0147] ^{99m}Tc 에 대해서, 상기 키트는 바람직하게는 동결건조되고, 추가 조작없이 인간 투여에 적합한 용액이 얻어지게끔, ^{99m}Tc 방사성동위원소 발생기로부터 멸균성의 ^{99m}Tc -페테크네이트(TcO_4^-)를 사용하여 재구성되도록 설계된다. 적합한 키트는 생체적합한 환원제, 예컨대 나트륨 디티오나이트, 나트륨 비술파이트, 아스코르브산, 포름아미딘 술폰산, 주석(stannous) 이온, Fe(II) 또는 Cu(I) 와 함께, 유리 염기 또는 산 염 형태로 킬레이터 접합체를 함유하는 용기(예를 들어, 격막 밀봉된 바이알)를 포함한다. 상기 생체적합성 환원제는 바람직하게는 주석 염, 예컨대 주석 클로라이드 또는 주석 타르트레이트이다. 대안적으로, 상기 키트는, 테크네튬의 첨가 시에 금속교환반응(transmetallation)(즉, 금속 교환)이 일어나서 목적하는 생성물이 얻어지는 비-방사성활성 금속 착물을 임의적으로 함유할 수 있다. 상기 비-방사성활성 키트는 추가 성분, 예컨대 트랜스킬레이터, 방사성 보호제, 항균 보존제, pH 조정제 또는 충전제(이들은 모두 이상에서 정의됨)를 임의적으로 추가로 포함할 수 있다.
- [0148] 제 6 측면에서, 본 발명은, 상기 제 1 측면의 조영제 또는 상기 제 4 측면의 조성물이 분포된 인간 또는 동물 신체의 적어도 일부에 대한 영상을 PET 또는 SPECT를 사용하여 생성시키는 것을 포함하는 인간 또는 동물 신체의 영상화 방법을 제공하고, 상기 조영제 또는 조성물은 상기 인간 또는 동물 신체에 미리 투여된다.
- [0149] 제 6 측면에서의 조영제 또는 조성물의 바람직한 측면은 본 발명의 제 1 및 제 4 측면(상기) 각각에서 기재된 바와 같다. 제 6 측면의 방법은 바람직하게는, 상기 신체의 일부가 비정상적인 세포자멸사가 관련되는 질환 상

태에 놓여 있는 경우에 실시된다. 상기 용어 "비정상적인 세포자멸사"는 프로그램화된 세포 사(PCD) 과정의 조절장애를 의미한다. 상기 조절장애는, 세포자멸사의 억제와 관련된 질환 상태, 예컨대 암 및 자가면역 장애; 및 과활성 세포자멸사와 관련된 질환 상태, 예컨대 신경퇴행성 질환; 혈액학적 질환; AIDS; 허혈증; 동종이식 거부 및 심장병(cardiology)(심근경색, 죽상경화증 및/또는 약물 치료에 뒤따르는 심장독성)을 포함하는 다수의 질환 상태에 관련되어 왔다. 따라서 세포자멸사의 확인 및 정량화는 그러한 세포자멸사-관련된 병태생리의 진단에 유용하다.

[0150] 제 6 측면의 영상화 방법은 임의적으로, 약물을 사용한 인간 또는 동물 신체의 치료 효과를 모니터링하도록 반복적으로 실시될 수 있는데, 상기 영상화는 상기 약물을 사용한 치료 전 및 후에 실시되고, 임의적으로는 또한 상기 약물을 사용한 치료 중에도 실시된다. 이러한 질환들의 치료적 처리는 상기 PCD 과정을 적절하게 자극하거나 억제함으로써 균형잡힌 세포자멸사를 회복하기 위한 것이다. 악성 성장이 상기 병태가 말기가 되기 전에 제어될 수 있도록, 암 치료의 효능을 조기에 모니터링하는 것에 특히 관심이 집중되고 있다.

[0151] 제 7 측면에서, 본 발명은, 인간 또는 동물 신체의 진단 방법에서 사용되는, 상기 제 1 측면의 조영제, 상기 제 4 측면의 조성물, 또는 상기 제 5 측면의 키트의 용도를 제공한다.

[0152] 제 8 측면에서, 본 발명은 상기 제 6 측면의 영상화 방법을 포함하는, 인간 또는 동물 신체의 진단 방법을 제공한다.

[0153] 제 7 및 제 8 측면에서 상기 조영제 또는 조성물의 바람직한 측면은 본 발명의 제 1 및 제 4 측면(상기)에서 각각 기재된 바와 같다. 둘 모두 측면의 인간 또는 동물 신체의 진단은 바람직하게는, 비정상적인 세포자멸사와 관련되는 질환 상태에 대해 이루어진다. 상기 "비정상적인 세포자멸사"는 제 6 측면(상기)에 기재된 바와 같다.

[0154] 본 발명을 하기 상술된 비제한적인 실시예로 설명한다. 실시예 1 내지 3은, 본 발명의 킬레이터 1(디아민디옥심)의 합성을 제공하고, 실시예 4는 킬레이터 1A(글루타르산으로 관능화된 디아민디옥심)의 합성, 및 상응하는 활성 에스테르 킬레이터 1A-TFTP 에스테르의 합성을 제공한다. 실시예 5는 킬레이터 1B(글루타릴-아미노-PEG12 프로피온산으로 관능화된 디아민디옥심)의 합성을 제공한다. 실시예 6은 본 발명의 Boc-보호된 테트라-아민 킬레이터(킬레이터 2A)의 합성을 제공한다. 실시예 7은 비교 목적을 위한 HYNIC-두라마이신 접합체(선행 기술)의 합성을 제공한다. 실시예 8은 킬레이터 1A(접합체 3A 및 접합체 3B)로 관능화된 두라마이신의 합성을 제공한다. 실시예 9는 킬레이터 1A(접합체 5)로 관능화된 신나마이신의 합성을 제공한다. 실시예 10은 킬레이터 1B(접합체 6)로 관능화된 두라마이신의 합성을 제공한다. 실시예 11은 킬레이터 1B(접합체 6)로 관능화된 신나마이신의 합성을 제공한다. 실시예 12는 킬레이터 2A(접합체 2A 및 접합체 2B)로 관능화된 두라마이신의 합성을 제공하고, 실시예 13은 킬레이터 2A(접합체 4)로 관능화된 신나마이신의 합성을 제공한다. 실시예 14는 본 발명의 킬레이터 접합체를 방사성금속 ^{99m}Tc 로 방사성표지하는 것을 제공한다. 상기 ^{99m}Tc 착물은 높은 RCP를 갖는 단일 종으로 형성된다. 이는 HYNIC/포스핀/트리신 표지가 사용되는 경우에 다수 종이 형성되는 HYNIC에 비해 이점이 있다. 상기 과정은 실온에서의 효율적인 표지와 함께 간단하다. RCP는 심지어 높은 방사성활성 농도에서도 매우 양호하다(500 MBq/mL 초과에서 90% 초과 RCP).

[0155] 실시예 15는 킬레이터가 접합되는 위치의 측정을 제공하고, 실시예 16은 킬레이터의 접합 위치가 포스파티딜에 탄올아민에 대한 결합 친화도에 대해 18배 차이(K_d 5 nM vs 90 nM)로 상당한 효과를 가짐을 입증한다. 이는 N-말단(화학식 II의 Cys^a)에서의 방사성금속 착물의 부착이 화학식 II의 Xaa에서의 부착보다 바람직함을 입증한다. 실시예 17의 EL4 림프종 마우스 이종이식 종양 모델이 화학치료후 세포자멸 반응을 모방하기 위한 모델로 사용되었다. 치료제-처리된 마우스(에토포시드/시클로포스파미드)는 비히클 대조 처리 동물과 비교하여 종양 세포자멸사에서 4배의 증가를 나타냈다. 실시예 17의 생체분포 결과는 화학치료제-처리된 종양에서 각각의 제제의 더욱 높은 흡수를 보여주는 동시에, 상관 분석은 더욱 높은 수준의 세포자멸사와 함께 종양에서 더욱 높은 결합체 흡수 경향을 나타낸다. ^{99m}Tc -[접합체 5]는 ^{99m}Tc -[접합체 3A]와 비교하여 유사한 종양을 지녔고 간 성능을 개선시켰다. ^{99m}Tc -[접합체 2A]는 ^{99m}Tc -[접합체 5]와 비교하여 유사한 종양을 보였지만 열악한 폐 성능을 나타냈다. ^{99m}Tc -[접합체 5]를 사용한 반복 영상화 연구로부터, 치료 후 종양:근육 비에서 일관된 증가가 나타났다. 실시예 18은, PEG 링커 기가 생체내에서 간 바탕 수치를 감소시키고 소변 배출을 증가시키는데 유리하다는 것을 보여준다.

- [0156] 약어
- [0157] 통상적인 한 단어 또는 세 단어 아미노산 약어가 사용된다:
- [0158] % id: 주입된 용량%,
- [0159] Ac: 아세틸,
- [0160] Acn: 아세트아미도메틸,
- [0161] ACN: 아세토니트릴,
- [0162] Boc: tert-부틸옥시카르보닐,
- [0163] Bz: 벤질,
- [0164] DCM: 디클로로메탄,
- [0165] DIPEA: N-디이소프로필에틸아민,
- [0166] DMF: N,N-디메틸포름아미드,
- [0167] DMSO: 디메틸설폭시드,
- [0168] Fmoc: 9-플루오레닐메톡시카르보닐,
- [0169] Glut: 글루타르산,
- [0170] HATU: O-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트,
- [0171] HOAt: 7-아자-1-히드록시벤조트리아졸,
- [0172] HPLC: 고성능 액체 크로마토그래피,
- [0173] IBX: 1-히드록시-1,2-벤즈아이오독솔-3(1H)-온-1-옥시드,
- [0174] MDP: 메틸렌디포스포산,
- [0175] NaPABA: 나트륨 파라-아미노벤조에이트,
- [0176] NHS: N-히드록시-숙신이미드,
- [0177] NMM: N-메틸모르폴린,
- [0178] NMP: 1-메틸-2-피롤리디논,
- [0179] PBS: 포스페이트-완충 식염수,
- [0180] PEG12: $-(OCH_2CH_2)_{12}-$,
- [0181] PyAOP: (7-아자벤조트리아졸-1-일-옥시-트리스-피롤리디노-포스포늄 헥사플루오로포스페이트),
- [0182] PyBOP: 벤조트리아졸-1-일-옥시트리피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트,
- [0183] RAC: 방사성활성 농도,
- [0184] RCP: 방사성화학 순도,
- [0185] tBu: tert-부틸,
- [0186] TFA: 트리플루오로아세트산,
- [0187] TFTP: 테트라플루오로티오페놀,
- [0188] THF: 테트라히드로푸란,
- [0189] TIS: 트리이소프로필실란,
- [0190] Trt: 트리틸.

[0191] 본 발명의 화합물

표 1

명칭	구조식
LBP1	Xaa = Lys인 두라마이신 화학식 II
LBP2	Xaa = Arg인 신나마이신 화학식 II
접합체 1 (선행 기술)	HYNIC가 Cys ^a 또는 Xaa 중 어느 하나에 부착된 [HYNIC]-LBP1(모노- 및 비스-관능화된 종의 혼합물)
접합체 1A	HYNIC가 Cys ^a 에 부착된 [HYNIC]-LBP1 (모노-관능화된 종)
접합체 1B	HYNIC가 Xaa에 부착된 [HYNIC]-LBP1 (모노-관능화된 종)
접합체 2A	킬레이터 2A가 Cys ^a 에 부착된 [킬레이터 2A]-LBP1 (모노-관능화된 종)
접합체 2B	킬레이터 2A가 Xaa에 부착된 [킬레이터 2A]-LBP1 (모노-관능화된 종)
접합체 3A	킬레이터 1A가 Cys ^a 또는 Xaa 중 어느 하나에 부착된 [킬레이터 1A]-LBP1(모노-관능화된 종의 혼합물)
접합체 3B	킬레이터 1A가 Cys ^a 및 Xaa 둘 모두에 부착된 [킬레이터 1A]-LBP1(비스-관능화된 종)
접합체 4	킬레이터 2A가 Cys ^a 에 부착된 [킬레이터 2A]-LBP2 (모노-관능화된 종)
접합체 5	킬레이터 1A가 Cys ^a 에 부착된 [킬레이터 1A]-LBP2 (모노-관능화된 종)
접합체 6	킬레이터 1B가 Cys ^a 또는 Xaa 중 어느 하나에 부착된 [킬레이터 1B]-LBP1(모노-관능화된 종의 혼합물)
접합체 7	킬레이터 1B가 Cys ^a 에 부착된 [킬레이터 1B]-LBP2 (모노-관능화된 종)

[0192]

[0193] 상기 표에서, 화학식 II(상기 제 1 측면에서 특정된 가교를 가짐):

[0194] $\text{Cys}^a\text{-Xaa-Gln-Ser}^b\text{-Cys}^c\text{-Ser}^d\text{-Phe-Gly-Pro-Phe-Thr}^c\text{-Phe-Val-Cys}^b\text{-(HO-Asp)-Gly-Asn-Thr}^a\text{-Lys}^d$

[0195] 실시예 1: 1,1,1-트리스(2-아미노에틸)메탄의 합성

[0196] 단계 1(a): 3-(메톡시카르보닐메틸렌)글루타르산 디메틸에스테르

[0197] 톨루엔(600 ml) 중의 카르보메톡시메틸렌트리페닐포스포란(167 g, 0.5 mol)을 디메틸 3-옥소글루타레이트(87 g, 0.5 mol)로 처리하고, 반응물을 36시간 동안 질소 분위기 하에서 120℃의 오일 조 상에서 100℃로 가열하였다. 그 후, 반응물을 진공에서 농축시키고, 오일상 잔여물을 40/60 석유 에테르/디에틸에테르 1:1, 600 ml로 정제처리(triturated)하였다. 트리페닐포스핀 옥시드를 침전시키고, 상청액을 경사분리/여과제거하였다. 진공 증발 시 잔여물을 고 진공 Bpt(0.2torr에서 오븐 온도 180-200℃) 하에서 쿠겔로흐(Kugelrohr) 증류시켜, 3-(메톡시카르보닐메틸렌)글루타르산 디메틸에스테르(89.08 g, 53%)를 수득하였다.

[0198] NMR $^1\text{H}(\text{CDCl}_3)$: δ 3.31(2H, s, CH₂), 3.7(9H, s, 3xOCH₃), 3.87(2H, s, CH₂), 5.79(1H, s, =CH,) ppm.

[0199] NMR $^{13}\text{C}(\text{CDCl}_3)$, δ 36.56, CH₃, 48.7, 2xCH₃, 52.09 및 52.5(2xCH₂); 122.3 및 146.16 C=CH; 165.9, 170.0 및 170.5 3xCOO ppm.

[0200] 단계 1(b): 3-(메톡시카르보닐메틸렌)글루타르산 디메틸에스테르의 수소화.

[0201] 메탄올(200 ml) 중의 3-(메톡시카르보닐메틸렌)글루타르산 디메틸에스테르(89 g, 267 mmol)를 30시간 동안 수소 기체(3.5 bar)의 분위기 하에서 10% 목탄 상 팔라듐: 50% 물(9 g)과 함께 흔들었다. 상기 용액을 키젤저

(kieselguhr)를 통해 여과시키고 진공에서 농축시켜, 3-(메톡시카르보닐메틸)글루타르산 디메틸에스테르를 오일로서 수율(84.9 g, 94 %)로 수득하였다.

[0202] NMR $^1\text{H}(\text{CDCl}_3)$, δ 2.48(6H, d, $J=8\text{Hz}$, $3\times\text{CH}_2$), 2.78 (1H, hextet, $J=8\text{Hz}$ CH,) 3.7(9H, s, $3\times\text{CH}_3$).

[0203] NMR $^{13}\text{C}(\text{CDCl}_3)$, δ 28.6, CH; 37.50, $3\times\text{CH}_3$; 51.6, $3\times\text{CH}_2$; 172.28, $3\times\text{COO}$.

[0204] 단계 1(c): 트리메틸 에스테르의 트리아세테이트로의 환원 및 에스테르화.

[0205] 질소 분위기 하의 3목 2L 둥근 바닥 플라스크 중에서, THF(400 ml) 중의 수소화 알루미늄 리튬(20 g, 588 mmol)을 1시간에 걸쳐 THF(200 ml) 중의 트리스(메틸옥시카르보닐메틸)메탄(40 g, 212 mmol)으로 조심스럽게 처리하였다. 강한 발열 반응이 일어나서, 용매가 강하게 환류되었다. 반응물을 3일 동안 환류시키면서 90℃의 오일 조 상에서 가열하였다. 수소 방출이 중단될 때까지 아세트산(100 ml)을 조심스럽게 적가하여 반응물을 킨칭시켰다. 교반된 반응 혼합물을, 완전한 환류가 일어나게 하는 속도에서 아세트산 무수물 용액(500 ml)으로 조심스럽게 처리하였다. 상기 플라스크를 증류를 위해 준비시키고, 교반시킨 다음, 90℃(오일 조 온도)에서 가열하여 THF를 증류제거하였다. 추가 부분의 아세트산 무수물(300 ml)을 첨가하고, 반응을 환류 구성으로 복귀시키고, 교반시키고, 140℃에서 5시간 동안 오일 조 중에서 가열하였다. 반응물을 냉각시키고 여과하였다. 산화 알루미늄 침전물을 아세트산 에틸로 세척하고, 합한 여액을 진공(5 mmHg)에서 50℃의 수조 온도에서 회전 증발기 상에서 농축시켜 오일을 수득하였다. 상기 오일을 아세트산 에틸(500 ml)에 용해시키고, 포화 탄산칼륨 수용액으로 세척하였다. 상기 아세트산 에틸 용액을 분리하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 진공에서 농축시켜 오일을 수득하였다. 상기 오일을 고 진공에서 쿠겔로흐 증류시켜, 트리스(2-아세톡시에틸)메탄(45.3 g, 95.9%)을 오일로 수득하였다. 0.1 mmHg에서 Bp. 220℃.

[0206] NMR $^1\text{H}(\text{CDCl}_3)$, δ 1.66(7H, m, $3\times\text{CH}_2$, CH), 2.08(1H, s, $3\times\text{CH}_3$); 4.1(6H, t, $3\times\text{CH}_2\text{O}$).

[0207] NMR $^{13}\text{C}(\text{CDCl}_3)$, δ 20.9, CH_3 ; 29.34, CH; 32.17, CH_2 ; 62.15, CH_2O ; 171, CO.

[0208] 단계 1(d): 트리아세테이트로부터 아세테이트 기의 제거.

[0209] 메탄올(200 ml) 및 880 암모니아(100 ml) 중의 트리스(2-아세톡시에틸)메탄(45.3 g, 165mmol)을 2일 동안 80℃의 오일 조 상에서 가열하였다. 반응물을 추가의 880 암모니아(50 ml)의 일부로 처리하고 24시간 동안 오일 조 내에서 80℃에서 가열하였다. 추가의 880 암모니아(50 ml)의 일부를 첨가하고, 반응물을 80℃에서 24시간 동안 가열하였다. 그 후, 반응물을 진공에서 농축시켜 모든 용매를 제거하여 오일을 얻었다. 이것을 880 암모니아(150 ml) 내로 용해시키고, 80℃에서 24시간 동안 가열하였다. 그 후, 반응물을 진공에서 농축시켜 모든 용매를 제거하여 오일을 얻었다. 쿠겔로흐 증류에 의해 아세트아미드 bp 170-180 0.2mm를 얻었다. 아세트아미드를 함유하는 벌브(bulb)를 깨끗하게 세척하고, 증류를 계속하였다. 트리스(2-히드록시에틸)메탄(22.53 g, 92%)은 bp 220℃ 0.2mm에서 증류되었다.

[0210] NMR $^1\text{H}(\text{CDCl}_3)$, δ 1.45(6H, q, $3\times\text{CH}_2$), 2.2(1H, quintet, CH); 3.7(6H, t $3\times\text{CH}_2\text{OH}$); 5.5(3H, brs, $3\times\text{OH}$).

[0211] NMR $^{13}\text{C}(\text{CDCl}_3)$, δ 22.13, CH; 33.95, $3\times\text{CH}_2$; 57.8, $3\times\text{CH}_2\text{OH}$.

[0212] 단계 1(e): 트리올의 트리스(메탄술포네이트)로의 전환.

[0213] 디클로로메탄(50 ml) 중의 트리스(2-히드록시에틸)메탄(10 g, 0.0676 mol)의 교반시킨 얼음 냉각 용액에, 온도가 15℃를 초과하여 상승하지 않게 하는 속도에서 질소 하에서 디클로로메탄(50 ml) 중의 메탄술포닐 클로라이드(40 g, 0.349 mol)의 용액을 천천히 적가하였다. 그 후, 디클로로메탄(50 ml)에 용해시킨 피리딘(21.4 g, 0.27 mol, 4 eq)을, 온도가 15℃를 초과하여 상승(발열 반응)하지 않게 하는 속도에서 적가하였다. 상기 반응물을 24시간 동안 실온에서 교반되게 둔 다음, 5N 염산 용액(80 ml)으로 처리하고, 층을 분리하였다. 수성 층을 추가의 디클로로메탄(50 ml)으로 추출하고, 유기 추출물을 합하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공에서 농축시켜, 과량의 메탄술포닐 클로라이드로 오염된 트리스[2-(메틸술포닐옥시)에틸]메탄을 수득하였다. 이론적 수율은 25.8 g이었다.

[0214] NMR $^1\text{H}(\text{CDCl}_3)$, δ 4.3(6H, t, $2\times\text{CH}_2$), 3.0(9H, s, $3\times\text{CH}_3$), 2(1H, hextet, CH), 1.85(6H, q, $3\times\text{CH}_2$).

- [0215] 단계 1(f): 1,1,1-트리스(2-아지도에틸)메탄의 제조.
- [0216] 질소 하의 무수 DMF(250 ml) 중의 트리스[2-(메틸술포닐옥시)에틸]메탄(단계 1(e)로부터의 것, 과량의 메틸술포닐 클로라이드로 오염됨)(25.8 g, 67 mmol, 이론적)의 교반시킨 용액을 15분에 걸쳐 나트륨 아지드(30.7 g, 0.47 mol)로 조금씩 나누어(portion-wise) 처리하였다. 발열이 확인되었고, 반응물을 얼음 조 상에서 냉각시켰다. 30분 후에, 반응 혼합물을 50℃의 오일 조 상에서 24시간 동안 가열하였다. 반응물의 색깔이 갈색이 되었다. 반응물을 냉각시키고, 묽은 탄산칼륨 용액(200 ml)으로 처리하고, 40/60 석유 에테르/디에틸에테르 10:1(3 x 150 ml)로 3회 추출하였다. 유기 추출물을 물(2 x 150 ml)로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하였다. 에탄올(200 ml)을 상기 석유/에테르 용액에 첨가하여 트리아지드를 용액 상태로 유지시키고, 진공에서 감소된 부피가 200 ml 이상이 되게 하였다. 에탄올(200 ml)을 첨가하고 진공에서 재농축시켜 석유의 마지막 흔적을 제거하여 200 ml 이상의 에탄올성 용액을 남겼다. 트리아지드의 이러한 에탄올성 용액을 단계 1(g)에 직접 사용하였다.
- [0217] **주의:** 아지드가 잠재적으로 폭발성이고 항상 묽은 용액으로 유지되어야 하기 때문에, 용매를 전부 제거하지 않음.
- [0218] 0.2 ml 미만의 용액을 진공에서 증발시켜 에탄올을 제거하고, 이러한 소량의 샘플에 대해 NMR을 실시하였다:
- [0219] NMR ^1H (CDCl₃), δ 3.35(6H, t, 3xCH₂), 1.8(1H, septet, CH,), 1.6(6H, q, 3xCH₂).
- [0220] 단계 1(g): 1,1,1-트리스(2-아미노에틸)메탄의 제조.
- [0221] 에탄올(200 ml) 중의 트리스(2-아지도에틸)메탄(15.06 g, 0.0676 mol)(이전 반응으로부터 100% 수율로 추정됨)을 10% 목탄 상 팔라듐(2 g, 50% 물)으로 처리하고, 12시간 동안 수소화시켰다. 상기 반응 용기를 매 2시간마다 비워서 반응으로부터 방출된 질소를 제거하고, 수소로 재충전하였다. 트리아지드가 트리아민으로 완전히 전환되었는지를 확인하기 위해, NMR 분석용 샘플을 취하였다.
- [0222] **주의: 미환원된 아지드는 중류 시에 폭발할 수 있었다.** 반응물을 셀라이트 패드를 통해 여과하여 촉매를 제거하고 진공에서 농축시켜 트리스(2-아미노에틸)메탄을 오일로 수득하였다. 이것을 0.4mm/Hg에서 쿠겔로흐 증류 bp. 180 내지 200℃에 의해 추가로 정제하여, 무색 오일(8.1 g, 트리올로부터의 82.7% 전체 수율)을 수득하였다.
- [0223] NMR ^1H (CDCl₃), δ 2.72(6H, t, 3xCH₂N), 1.41(H, septet, CH), 1.39(6H, q, 3xCH₂).
- [0224] NMR ^{13}C (CDCl₃), δ 39.8(CH₂NH₂), 38.2(CH₂.), 31.0(CH).
- [0225] **실시예 2: 3-클로로-3-메틸-2-니트로소부탄의 제조.**
- [0226] 2-메틸부트-2-엔(147 ml, 1.4 mol)과 이소아밀 니트라이트(156 ml, 1.16 mol)의 혼합물을 카디스(cardice) 및 메탄올 조 중에서 -30℃로 냉각시키고, 오버헤드형 공기 교반기를 사용하여 세계 교반시키고, 온도가 -20℃ 미만에서 유지되게 하는 속도에서 진한 염산(140 ml, 1.68 mol)으로 적가하여 처리하였다. 상당량의 발열이 존재하고 과열을 방지하기 위해 주의가 기울어져야 하기 때문에, 이 작업에는 약 1시간이 필요하였다. 첨가 마지막에 형성된 슬러리의 점도를 감소시키기 위해 에탄올(100 ml)을 첨가하고, 추가 2시간 동안 반응물을 -20 내지 -10℃에서 교반시켜 반응을 완료하였다. 침전물을 진공 하에서의 여과로 수집하고, 이것을 4 x 30 ml의 냉(-20℃) 에탄올 및 100 ml의 얼음 냉수로 세척하고, 진공 하에서 건조시켜, 3-클로로-3-메틸-2-니트로소부탄을 흰색 고체로 수득하였다. 상기 에탄올 여액 및 세척물을 합하고, 물(200 ml)로 희석시키고, 냉각시키고, 3-클로로-3-메틸-2-니트로소부탄의 추가 수확물이 결정화되어 나오는 경우에 -10℃에서 1시간 동안 정치시켰다. 상기 침전물을 여과로 수집하고, 최소량의 물로 세척하고, 진공 건조시켜 전체 수율의 3-클로로-3-메틸-2-니트로소부탄(115 g 0.85 mol, 73%)을 수득하였다. NMR에 의한 >98% 순도.
- [0227] NMR ^1H (CDCl₃), 이성질체의 혼합물로서(이성질체 1, 90%) 1.5 d,(2H, CH₃), 1.65 d, (4H, 2 xCH₃), 5.85,q, 및 5.95,q, 둘 다 1H. (이성질체 2, 10%), 1.76 s,(6H, 2x CH₃), 2.07(3H, CH₃).
- [0228] **실시예 3: 비스[N-(1,1-디메틸-2-N-히드록시이민 프로필)-2-아미노에틸]-(2-아미노에틸)메탄(킬레이터 1)의 합성.**

[0229] 질소 분위기 하에서 세계 교반시키면서 실온에서, 무수 에탄올(30 ml) 중의 트리스(2-아미노에틸)메탄(4.047 g, 27.9 mmol)의 용액에 무수 탄산칼륨(7.7 g, 55.8 mmol, 2 eq)을 첨가하였다. 3-클로로-3-메틸-2-니트로소부탄(7.56 g, 55.8 mol, 2 eq)의 용액을 무수 에탄올(100 ml)에 용해시키고, 이 용액 75 ml를 반응 혼합물 내로 천천히 적하하였다. 그 후, 반응물에 실리카 상에서의 TLC를 실시하였다[플레이트를 디클로로메탄, 메탄올, 농축(0.88 sg) 암모니아; 100/30/5 중에 위치시키고, 닐하이린으로 분무하고 가열하여 상기 TLC 플레이트를 전개시켰다]. 상기 모노-, 디-, 및 트리-알킬화 생성물이 이 순서로 RF가 증가하면서 확인되었다. 분석용 HPLC를 3% 수성 암모니아 중에서의 7.5 내지 75% 아세트니트릴의 구배로 RPR 역상 컬럼을 사용하여 실시하였다. 반응물을 진공에서 농축시켜 에탄올을 제거하고, 물(110 ml)에 재현탁시켰다. 수성 슬러리를 에테르(100 ml)를 사용하여 추출하여 트리알킬화 화합물의 일부 및 친지질성 불순물을 제거하여, 수 층에 모노 및 목적하는 디알킬화 생성물을 남겼다. 상기 수용액을 아세트산 암모늄(2 eq, 4.3 g, 55.8 mmol)으로 완충시켜 양호한 크로마토그래피가 이루어지게 하였다. 이 수용액을 밤새 4℃에서 저장한 후에, 자동화된 제조용 HPLC로 정제하였다.

[0230] 수율(2.2 g, 6.4 mmol, 23%).

[0231] 질량 분석; 양이온 10 V 콘 전압(cone voltage). 실측치: 344; 계산치 M+H= 344.

[0232] NMR ^1H (CDCl₃), δ 1.24(6H, s, 2xCH₃), 1.3(6H, s, 2xCH₃), 1.25-1.75(7H, m, 3xCH₂,CH), (3H, s, 2xCH₂), 2.58(4H, m, CH₂N), 2.88(2H, t CH₂N₂), 5.0(6H, s, NH₂, 2xNH, 2xOH).

[0233] NMR ^1H ((CD₃)₂SO) δ 1.1 4xCH; 1.29, 3xCH₂; 2.1(4H, t, 2xCH₂);

[0234] NMR ^{13}C ((CD₃)₂SO), δ 9.0(4xCH₃), 25.8(2xCH₃), 31.0 2xCH₂, 34.6 CH₂, 56.8 2xCH₂N; 160.3, C=N.

[0235] HPLC 조건: 25mm PRP 컬럼[A = 3% 암모니아 용액(비중 = 0.88)/물; B = 아세트니트릴]을 사용하여 유속 8 ml/min.

[0236] 시간 %B

[0237] 0 7.5

[0238] 15 75.0

[0239] 20 75.0

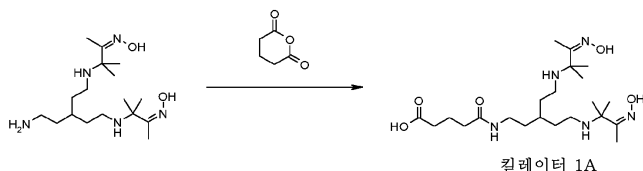
[0240] 22 7.5

[0241] 30 7.5

[0242] 회 당 3 ml의 수용액을 로딩시키고, 12.5 내지 13.5분의 시간 창에서 수집하였다.

[0243] **실시예 4: 킬레이터 1-글루타르산의 테트라플루오로티오펜일 에스테르(킬레이터 1A-TFTP 에스테르)의 합성.**

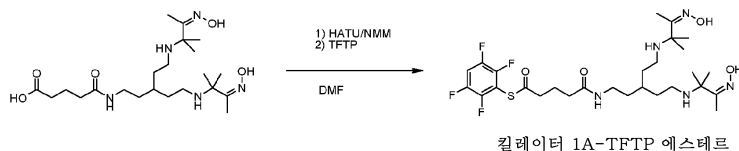
[0244] a) [킬레이터 1]-글루타르산(킬레이터 1A)의 합성.



[0245]

[0246] 킬레이터 1(100 mg, 0.29 mmol)을 DMF(10 ml)에 용해시키고, 글루타르산 무수물(33 mg, 0.29 mmol)을 교반시키면서 조금씩 첨가하였다. 상기 반응물을 23시간 동안 교반시켜, 목적하는 생성물로 완전히 전환시켰다. 그 후 RP-HPLC를 실시하여 순수 산을 양호한 수율로 수득하였다.

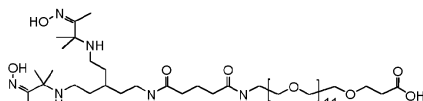
[0247] b) 킬레이터 1A-TFTP 에스테르의 합성.



[0248]

[0249] DMF(2 ml) 중의 킬레이터 1A(단계 a로부터의 것; 300 mg, 0.66 mmol)에 HATU(249 mg, 0.66 mmol) 및 NMM(132 μ l, 1.32 mmol)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 5분 동안 교반시킨 다음, 테트라플루오로티오펜올(0.66 mmol, 119 mg)을 첨가하였다. 이 용액을 10분 동안 교반시킨 다음, 반응 혼합물을 20% 아세토니트릴/물(8 ml)로 희석시키고, 생성물을 RP-HPLC로 정제하고 동결 건조시켜, 110 mg의 목적하는 생성물을 수득하였다.

[0250] **실시예 5: 킬레이터 1-글루타릴-아미노-PEG12 프로피온산(킬레이터 1B)의 합성.**



[0251]

[0252] Boc-아미노-PEG12 프로피온산(폴리퓨어(Polypure); 45 mg, 0.060 mmol)을 30분 동안 TFA/물(19:1)(1 mL)로 처리하였다. 그 후, TFA를 진공에서 증발시키고, 잔여물을 밤새 진공에서 건조시켜, 52 mg의 미정제 아미노-PEG12 프로피온산을 얻었다. 킬레이터 1A(46 mg, 0.10 mmol) 및 PyAOP(31 mg, 0.060 mmol)를 NMP(1 mL)에 용해시켰다. DIPEA(42 μ l, 0.24 mmol)를 첨가하고, 이 용액을 5분 동안 흔들고, 아미노-PEG12 프로피온산(0.06 mmol)에 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 흔들었다. 추가량의 킬레이터 1A(0.03 mmol)를 상기 반응 혼합물에 첨가하고, 1시간 후에 이 혼합물을 물/0.1% TFA(7 mL)로 희석시키고, 생성물을 제조용 RP-HPLC로 정제하였다.

[0253] 정제 및 특성결정

[0254] RP-HPLC(구배: 40분에 걸쳐 10-30% B, t_R : 34.5분)로 정제하고 동결건조 후에, 44 mg(67% 수율)의 킬레이터 1B를 얻었다. 킬레이터 1B를 LC-MS(구배: 5분에 걸쳐 10-40% B, t_R : 2.2분; 계산치 m/z 1057.7 $[MH]^+$, 실측치 m/z 1058.0)로 특성결정하였다.

[0255] **실시예 6: 킬레이터 2A의 합성.**

[0256] 단계 (a): 디에틸 [2-(벤질옥시)에틸]말로네이트.

[0257] 라말링검(Ramalingam) 등의 방법(문헌[Tetrahedron, 51, 2875-2894(1995)])을 변형시켜서 화합물을 제조하였다. 따라서, 나트륨(1.20 g)을 아르곤 하에서 무수 에탄올(25 ml)에 용해시켰다. 디에틸 말로네이트(14.00 g)를 첨가하고, 혼합물을 30분 동안 환류시켰다. 벤질 브로모에틸 에테르(10 g)를 첨가하고, 혼합물을 16시간 동안 환류에서 교반시켰다. 에탄올을 회전 증발로 제거하고, 잔여물을 에테르(100 ml)와 물(50 ml) 사이에 분배하였다. 에테르 층을 물(3 x 50 ml)로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조시켰다. 에테르를 회전 증발로 제거하고, 잔여물을 진공에서 증류시켰다. 40 내지 55°C에서 증류되는 분획(미반응 디에틸 말로네이트)을 폐기시켰다. 생성물은 140 내지 150°C(1mm)에서 증류되었다[lit. bp 138-140°C(1mm)]. 12.60 g의 무색 오일이 수득되었다.

[0258] 1H NMR(270 MHz, $CDCl_3$, 25°C, TMS) δ = 7.28(m, 5H C_6H_5), 4.47(s, 2H, CH_2 -Ph), 4.16(m, 4H, $COOCH_2$), 3.58(t, 1H, CH), 3.50(t, 2H, $O-CH_2-CH_2$), 2.21(t, 2H, $O-CH_2-CH_2$), 1.20(t, 6H, $COOCH_2-CH_3$). ^{13}C NMR(67.5 MHz, $CDCl_3$, 25°C, TMS) δ = 169.20(CO), 138.10, 128.60, 127.80(방향족), 73.00(CH_2 Ph), 67.30($O-CH_2-CH_2$), 61.70($COOCH_2$), 49.10(CH), 28.90($O-CH_2-CH_2$), 14.10($COOCH_2CH_3$).

[0259] 단계 (b): N,N'-비스(2-아미노에틸)-2-(2-벤질옥시-에틸)말론아미드.

[0260] 디에틸 [2-(벤질옥시)에틸]말로네이트(4.00 g)를 에틸렌 디아민(30 ml)에 첨가하고, 이 용액을 실온에서 2일 동안 교반시켰다. 과량의 에틸렌 디아민을 회전 증발로 제거하고, 잔여물을 고 진공 하에서 2일 동안 건조시켜, 정치 시에 결정화되는 황색 오일(4.28 g)을 수득하였다. NMR 스펙트럼에서 검출된 바와 같이, 생성물은 여전히

미량의 에틸렌디아민을 함유하고 있었다.

[0261] ^1H NMR(270 MHz, CDCl_3 , 25°C, TMS) δ = 7.74(br t, 2H, CO-NH), 7.32(m, 5H, C_6H_5), 4.46(s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 3.50(t, 2H, $\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 3.33(t 1H, CH), 3.23(m, 4H, CO-NH- CH_2), 2.74(t, 4H, $\text{CH}_2\text{-NH}_2$) 2.18(q, 2H, O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$) 1.55(br s 4H, NH_2). ^{13}C NMR(67.5 MHz, CDCl_3 , 25°C, TMS) δ = 171.10(CO), 138.20, 128.30, 127.70(방향족), 73.00($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 67.80(O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 51.40(CH), 42.40(CO-NH- CH_2), 41.20($\text{CH}_2\text{-NH}_2$), 31.90(O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$).

[0262] 단계 (c): N,N'-비스(2-아미노에틸)-2-(2-벤질옥시에틸)-1,3-디아미노프로판.

[0263] N,N'-비스(2-아미노에틸)-2-(2-벤질옥시-에틸)말론아미드(3.80 g)를 THF(20 ml)에 용해시키고, 플라스크를 얼음 조 중에 침지시켰다. 상기 플라스크를 아르곤으로 플러싱시키고, THF 보란 착물(80 ml, THF 중 1M)을 주사기를 통해 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온으로 가온시킨 다음, 40°C에서 2일 동안 교반시키고, 1시간 동안 환류시켰다. 메탄올(50 ml)을 적가하고, 용액을 40°C에서 밤새 교반시켰다. 용매를 회전 증발기로 제거하고, 잔여물을 메탄올(20 ml)에 용해시켰다. 수산화나트륨(15 ml 물 중의 10 g)을 첨가하고, 메탄올을 비등시켰다. CH_2Cl_2 (3 x 50 ml) 내로 추출된 무색 오일을 분리하였다. 용액을 Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. 용매를 제거하여 3.40 g의 무색 오일을 수득하였다.

[0264] ^1H NMR(270 MHz, CDCl_3 , 25°C, TMS) δ = 7.34(m, 5H, C_6H_5), 4.49(s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 3.55(t, 2H, $\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 2.76(t, 4H, N- CH_2), 2.63(m, 8H, N- CH_2), 1.84(m, 1H, CH), 1.58(m, 2H, CH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 1.41(br s, 6H, NH). ^{13}C NMR(67.5 MHz, CDCl_3 , 25°C, TMS) δ = 138.60, 128.30, 127.60(방향족), 72.80($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 68.70(O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 53.50(N- CH_2), 52.80(N- CH_2), 41.60(N- CH_2) 36.40(CH), 31.30(CH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$). MS-EI: 295 $[\text{M}+\text{H}]^+$, (계산치: 295.2).

[0265] 단계 (d): N,N'-비스(2-tert-부톡시카르보닐아미노-에틸)-2-(2-벤질옥시에틸)-1,3-디(tert-부톡시카르보닐아미노)프로판.

[0266] N,N'-비스(2-아미노에틸)-2-(2-벤질옥시-에틸)-1,3-디아미노프로판(3.30 g)을 CH_2Cl_2 (100 ml)에 용해시키고, 트리에틸아민(5.40 g) 및 tert-부틸 디카르보네이트(10.30 g)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2일 동안 교반시켰다. 혼합물을 물(100 ml), 시트르산 용액(100 ml, 수 중 10%) 및 물(2 x 100 ml)로 세척하였다. 유기 층을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 용매를 회전 증발로 제거하여 황색 오일을 수득하고, 이것을 고 진공 하에서 일정 질량으로 건조시켰다. 미정제 생성물(7.70 g)을 실리카 겔 컬럼(250 g, 230-400 mesh, CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-Et}_2\text{O}$ 1:1) 상에서 정제하여 6.10 g(78.3%)의 투명 오일을 수득하였다.

[0267] ^1H NMR(270 MHz, CDCl_3 , 25°C, TMS) δ = 7.32(m, 5H, C_6H_5), 5.12(br d, 2H, NH), 4.47(s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 3.49(t, 2H, $\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 3.24(br, 12H, N- CH_2), 2.14(br, 1H, CH), 1.59(m, 2H, CH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$) 1.45(s, 18H, t-Bu), 1.42(s, 18H, t-Bu). ^{13}C NMR(67.5 MHz, CDCl_3 , 25°C, TMS) δ = 155.90(NH-CO), 138.20, 128.30, 127.60, 127.50(방향족), 79.90, 78.90(CMe_3), 72.80($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 68.00(O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 50.00(br, N- CH_2), 46.90(br, N- CH_2), 39.20(N- CH_2), 34.40(br, CH), 29.80(CH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 28.30(t-Bu). MS-EI: 695 $[\text{M}+\text{H}]^+$, (계산치: 695.5)

[0268] 단계 (e): N,N'-비스(2-tert-부톡시카르보닐아미노-에틸)-2-(2-히드록시에틸)-1,3-디(tert-부톡시카르보닐아미노)프로판.

[0269] N,N'-비스(2-tert-부톡시카르보닐아미노-에틸)-2-(2-벤질옥시-에틸)-1,3-디(tert-부톡시카르보닐아미노)프로판(3.16 g)을 무수 에탄올(100 ml)에 용해시키고, 활성탄 상의 Pd(1.00 g, 건조, 10%)를 첨가하였다. 상기 혼합물을 35 psi에서 파르(Parr) 수소화 장치 중에서 2일 동안 수소화시켰다. 촉매를 여과제거하고, 에탄올(3 x 20 ml)로 세척하였다. 에탄올을 회전 증발로 제거하여 무색 오일을 수득하였는데, 이것을 고 진공 하에서 일정 질

량(2.67 g, 97.1%)으로 건조시켰다.

[0270] ^1H NMR(270 MHz, CDCl_3 , 25°C, TMS) δ = 5.25(br d, 2H, NH), 3.69(t, 2H, $\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 3.28(br, 12H, N-CH_2), 2.71(br, OH), 2.23(br, 1H, CH), 1.56(숄더, m, 2H, $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$) 1.48(s, 18H, t-Bu), 1.44(s, 18H, t-Bu). ^{13}C NMR(67.5 MHz, CDCl_3 , 25°C, TMS) δ = 156.10(NHCO), 80.00, 79.20(CMe_3), 59.60($\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$), 49.90(br, N-CH_2), 47.00(br, N-CH_2), 39.34(N-CH_2), 33.80(CH), 32.30($\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 28.30(t-Bu). MS-EI: 605 $[\text{M}+\text{H}]^+$, (계산치: 605.4).

[0271] 단계 (f): N,N'-비스(2-tert-부톡시카르보닐아미노-에틸)-2-(2-카르복시메틸)-1,3-디(tert-부톡시카르보닐아미노)프로판(Boc-보호된 킬레이터 2A).

[0272] 마지츠체크(Mazitschek) 등의 방법(문헌[*Ang. Chem. Int. Ed.*, 41, 4059-4061(2002)])을 사용하였다. 따라서, N,N'-비스(2-tert-부톡시카르보닐아미노-에틸)-2-(2-히드록시에틸)-1,3-디(tert-부톡시카르보닐아미노)프로판(2.60 g)을 DMSO(15 ml)에 용해시키고, 1-히드록시-1,2-벤즈아이오독솔-3(1H)-온-1-옥시드(IBX, 3.50 g)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반시킨 다음, N-히드록시숙신이미드(2.50 g)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2일 동안 교반하였다. 수산화나트륨 용액(2M, 40 ml)을 첨가하고, 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 상기 용액을 얼음 조 중에 침지시키고, 이것을 2M 염산을 사용하여 pH 2로 산성화시켰다. 수성 층을 에테르(4 x 100 ml)로 추출하고, 합한 에테르 추출물을 물(3 x 50 ml)로 세척하였다. 에테르 층을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 용매를 회전 증발로 제거하여 황색 고체 잔여물을 수득하였는데, 이것은 생성물 및 2-아이오도소벤조산을 함유하고 있었다. 상기 아이오도소벤조산(2.1 g)의 대부분을 클로로포름-헥산(1:3)(80 ml)으로부터의 재결정화에 의해 제거하였다. 클로로포름-헥산 모액(mother liquor)을 증발시켜, 실리카 컬럼(300 g, $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-Et}_2\text{O}$, 1:1) 상에 로딩된 황색 오일(3 g)을 수득하였다. 남아있는 아이오도소벤조산을 에테르로 용출시켰다. 생성물은 에테르-메탄올(9:1)로 용출시켰다. 생성물 함유 분획을 합하고, 용매를 제거하여 1.5 g의 담황색 오일을 얻었다. 이것을 실리카 컬럼(50 g, Et_2O) 상에서 다시 크로마토그래피하였다. 생성물을 에테르-아세트산(95:5)으로 용출시켰다. 생성물 함유 분획을 합하고, 용매를 회전 증발로 제거하여 오일을 수득하였는데, 이것을 고 진공 하에서 건조시켰다. 1.10 g(41.3%)이 얻어졌다.

[0273] ^1H NMR(270 MHz, CDCl_3 , 25°C, TMS) δ = 7.61(br s, 1H, COOH), 5.19(br d, 2H, NH), 3.22(br, 12H, N-CH_2), 2.47(br m, 1H, CH), 2.26(br, 2H, $\text{CH-CH}_2\text{-COOH}$), 1.41(s, 18H, t-Bu), 1.37(s, 18H, t-Bu). ^{13}C NMR(67.5 MHz, CDCl_3 , 25°C, TMS) δ = 175.90(COOH), 156.10(NHCO), 80.40, 79.10(CMe_3), 49.50(N-CH_2), 46.80(N-CH_2), 39.00(N-CH_2), 34.70($\text{CH-CH}_2\text{-COOH}$), 34.20($\text{CH-CH}_2\text{-COOH}$), 28.30, 28.20(t-Bu). MS-EI: 619 $[\text{M}+\text{H}]^+$, (계산치: 619.4).

[0274] 실시예 7: HYNIC-두라마이신(접합체 1A 및 접합체 1B)의 합성.

[0275] 두라마이신(시그마-알드리치; 5.0 mg, 2.5 μmol) 및 N-Boc-HYNIC 숙신이미딜 에스테르(에이비엑스 어드밴스드 바이오크미컬 컴파운즈(ABX Advanced Biochemical Compounds); 1.0 mg, 2.8 μmol)을 DMF(1 ml)에 용해시키고, DIPEA(2.0 μL , 13 μmol)를 상기 혼합물에 첨가하였다. 반응 과정을 LC-MS 분석으로 모니터하였다. 완만한(sluggish) 반응이 얻어지도록 3시간 후에 HOAt(1.1 eq)를 첨가하여, 밤새 약 60% 생성물이 형성되게 하였다. 실온에서 1일 그리고 4°C에서 3일 후에 약 80% HYNIC-접합체 형성을 얻기 위해, 추가의 N-Boc-HYNIC 숙신이미딜 에스테르(1 eq) 및 HOAt(2 eq)가 필요하였다. 비스-접합체(~35%)에 추가하여, 모노-접합체에 상응하는 2개의 기준선 분리된 피크가 LC-MS 분석으로 확인되었다.

[0276] 정제 및 특성결정.

[0277] 물/0.1% TFA(4 ml)를 반응 혼합물에 첨가하고, 2개의 모노-접합 생성물을 제조용 RP-HPLC(구배: 15분에 걸쳐 0% B; 10분에 걸쳐 0-45% B; 40분에 걸쳐 45-60% B, t_R : 47.9 및 49.3분)에 의해 정제한 다음, TFA 중에서 Boc를 탈보호시켜, 2개의 모노-접합 두라마이신 이성질체를 각각 1.7 mg 및 1.1 mg 수율로 수득하였다.

[0278] 상기 두 개의 이성질체를 LC-MS(구배: 5분에 걸쳐 20-40% B, t_R : 2.8분(접합체 1A), 실측치 m/z: 1074.8, 예측

치 MH_2^{2+} : 1074.4, t_R : 2.9분(접합체 1B), 실측치 m/z : 1074.8, 예측치 MH_2^{2+} : 1074.4)로 특성결정하였다.

[0279] **실시예 8: [킬레이터 1A]-두라마이신 모노-접합체(접합체 3A) 및 [킬레이터 1A]-두라마이신 비스-접합체(접합체 3B)의 합성.**

[0280] 킬레이터 1A(실시예 4; 3.0 mg, 6.6 μ mol), PyBOP(2.6 mg, 5.0 μ mol) 및 DIPEA(1.7 μ L, 9.7 μ mol)를 NMP(0.7 mL)에 용해시켰다. 상기 혼합물을 5분 동안 흔들고, NMP(0.5 mL) 중의 두라마이신(시그마-알드리치; 5.0 mg, 2.5 μ mol)의 용액에 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 40분 동안 흔들어 준 다음, 물/0.1% TFA(6 mL)로 희석시키고, 생성물을 제조용 HPLC를 사용하여 정제하였다.

[0281] 제조용 HPLC(구배: 40분에 걸쳐 5-35% B, 여기서 A = H_2O /0.1% $HCOOH$ 및 B = ACN/0.1% $HCOOH$)로 정제하여, 2.5 mg의 순수 접합체 3A(수율 41%) 및 1.7 mg의 순수 접합체 3B(수율 28%)를 수득하였다.

[0282] 상기 정제된 접합체 3A를 분석용 LC-MS(구배: 5분에 걸쳐 25-35% B, t_R : 1.93분, 실측치 m/z : 1227.0, 예측치 MH_2^{2+} : 1226.6)로 분석하였다.

[0283] 상기 정제된 접합체 3B를 분석용 LC-MS(구배: 5분에 걸쳐 25-35% B, t_R : 2.35분, 실측치 m/z : 1446.7, 예측치 MH_2^{2+} : 1446.3)로 분석하였다.

[0284] 상기 두 개의 모노-접합체(접합체 3A)의 분리는 분석용 또는 제조용 HPLC를 사용하여 실시될 수 없었다. 각각의 경우에, 두 개의 위치이성질체는 하나의 단일 피크로 용출되었다.

[0285] **실시예 9: [킬레이터 1A]-신나마이신 접합체(접합체 5)의 합성.**

[0286] 신나마이신(시그마-알드리치; 2.0 mg, 1.0 μ mol), 킬레이터 1A(실시예 4; 0.9 mg, 1.5 μ mol) 및 DIPEA(0.5 μ L, 2.9 μ mol)를, NMP(0.2 mL), DMF(0.2 mL) 및 DMSO(0.6 mL)의 용액에 용해시켰다. 반응 혼합물을 밤새 흔들었다. 그 후, 혼합물을 10% ACN/물/0.1% TFA(7 mL)로 희석시키고, 생성물을 제조용 HPLC를 사용하여 정제하였다.

[0287] 정제 및 특성결정

[0288] 제조용 HPLC(구배: 40분에 걸쳐 20-40% B)에 의해 정제하여, 1.9 mg의 순수 접합체 5(수율 78%)를 수득하였다. 상기 정제된 물질을 분석용 LC-MS(구배: 5분에 걸쳐 20-40% B, t_R : 2.86분, 실측치 m/z : 1241.0, 예측치 MH_2^{2+} : 1240.6)로 분석하였다.

[0289] **실시예 10: [킬레이터 1B]-두라마이신 접합체(접합체 6)의 합성.**

[0290] 킬레이터 1B(실시예 5; 1.6 mg, 1.5 μ mol), PyBOP(0.4 mg, 0.8 μ mol) 및 DIPEA(1 μ L, 6 μ mol)를 NMP(0.5 mL)에 용해시켰다. 상기 혼합물을 5분 동안 흔들고, NMP(0.5 mL) 중의 두라마이신(3.0 mg, 1.5 μ mol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 30분 동안 흔들었다. 2개의 추가 분취량의 활성화 킬레이터 1B(2 x 1.6 mg)를 30분 간격으로 첨가하였다. 상기 혼합물을 물/0.1% TFA(6 mL)로 희석시키고, 생성물을 제조용 RP-HPLC를 사용하여 정제하였다.

[0291] 정제 및 특성결정

[0292] 제조용 HPLC(구배: 40분에 걸쳐 20-50% B, 여기서 A = 물/0.1% 아세트산 암모늄 및 B = ACN)로 정제하여, 3.9 mg의 순수 접합체 6(수율 87%)을 수득하였다. 상기 정제된 물질을 LC-MS(구배: 5분에 걸쳐 20-40% B, t_R : 2.89분, 실측치 m/z : 1526.5, 예측치 MH_2^{2+} : 1526.2)로 분석하였다.

[0293] **실시예 11: [킬레이터 1B]-신나마이신 접합체(접합체 7)의 합성.**

[0294] 킬레이터 1B(실시예 5; 4.8 mg, 4.4 μ mol), PyBOP(2.1 mg, 4.0 μ mol) 및 DIPEA(2.3 μ L, 13.2 μ mol)를 DMF(0.5 mL)에 용해시켰다. 상기 혼합물을 5분 동안 흔들고, 고체 신나마이신(4.5 mg, 2.2 μ mol)에 첨가하였다. 반응이 4시간 이내에 거의 완료되도록 하기 위해서 추가량의 사전-활성화된 킬레이터 1B를 2시간 및 3.5시간 후에 첨가하였다. 혼합물을 20% ACN/물/0.1% TFA(8 mL)로 희석시키고, 생성물을 제조용 RP-HPLC를 사용하여 정제하였다.

[0295] 정제 및 특성결정

[0296] 제조용 RP-HPLC(구배: 40분에 걸쳐 25-35% B; t_R : 38.6분)로 정제하여, 3.9 mg의 정제된 접합체 7(수율 58%)을 수득하였다.

[0297] 상기 정제된 물질을 LC-MS(구배: 5분에 걸쳐 20-40% B; t_R : 2.9분, 실측치 m/z : 1028.0, 예측치 MH_2^{2+} : 1027.5 (순도 ~93.5%, ~3% 미반응 출발 물질)로 분석하였다.

[0298] **실시예 12: [킬레이터 2A]-두라마이신 접합체(접합체 2A 및 접합체 2B)의 합성.**

[0299] 두라마이신(시그마-알드리치; 7.5 mg, 3.8 μ mol), Boc-보호된 킬레이터 2A(실시예 6; 5.0 mg, 6.9 μ mol), HOAt(1.9 mg, 8.8 μ mol) 및 DIPEA(4.1 μ L, 20.0 μ mol)를 NMP(1.5 ml)에 용해시켰다. 상기 반응 혼합물을 밤새 흔들었다. 그 후, 혼합물을 20% ACN/물/0.1% TFA(6 ml)로 희석시키고, 생성물을 제조용 HPLC를 사용하여 정제하였다.

[0300] 정제 및 특성결정

[0301] 제조용 HPLC(구배: 10분에 걸쳐 0% B; 5분에 걸쳐 0-30% B; 40분에 걸쳐 30-70% B, t_R : 42.4 및 45.0분)에 의해 정제하고, TFA 중에서 Boc-탈보호시켜, 2개의 모노-접합 두라마이신 이성질체를 각각 2.0 mg 및 0.4 mg 수율로 수득하였다.

[0302] 상기 두 개의 이성질체를 LC-MS(구배: 5분에 걸쳐 20-60% B, t_R : 1.7분(접합체 2A), 실측치 m/z : 1107.5, 예측치 MH_2^{2+} : 1107.0, t_R : 1.6분(접합체 2B), 실측치 m/z : 1107.5, 예측치 MH_2^{2+} : 1107.0)로 특성결정하였다.

[0303] **실시예 13: [킬레이터 2A]-신나마이신 접합체(접합체 4)의 합성.**

[0304] 신나마이신(시그마-알드리치; 2.0 mg, 1.0 μ mol), Boc-보호된 킬레이터 2A(실시예 6; 1.1 mg, 1.5 μ mol) 및 DIPEA(0.5 μ L, 2.9 μ mol)를 DMF(1.0 ml)에 용해시켰다. 상기 반응 혼합물을 밤새 흔들었다. 그 후, 혼합물을 20% ACN/물/0.1% TFA(6 ml)로 희석시키고, 생성물을 제조용 HPLC를 사용하여 정제하였다.

[0305] 정제 및 특성결정

[0306] 제조용 HPLC(구배: 40분에 걸쳐 30-70% B)로 정제하여, 1.8 mg의 순수 Boc-보호된 접합체 4를 수득하였다. 상기 정제된 물질을 45분 동안 TFA/4% 물(2 ml) 중에서 Boc-탈보호시키고 50% ACN/물로부터 동결건조시켜, 1.6 mg 접합체 4(수율 73%)를 수득하였다. 이 물질을 분석용 LC-MS(구배: 5분에 걸쳐 10-40% B, t_R : 3.7분, 실측치 m/z : 1120.9, 예측치 MH_2^{2+} : 1121.0)로 분석하였다.

[0307] **실시예 14: 99m Tc-표지된 킬레이터-접합체의 제조.**

[0308] 방사성표지된 제조물을 (i) 정제하지 않거나(높은 RAC에서 높은 RCP); 또는 (ii) 정제하여 미표지된 LBP 펩티드를 제거하는데 사용하였다.

[0309] 접합체 3A(0.1 mg, 40 nmol)를 에탄올(100 μ L)과 물(100 μ L)의 혼합물에 용해시키고, 용해를 보조하기 위해 약 20분 동안 음속 조 중에 위치시켰다. 용액을 동결건조시킨 키트[제형: $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ (0.016 mg, 0.07 μ mol), MDP(H_4)(0.025 mg, 0.14 μ mol), $NaHCO_3$ (4.5 mg, 53.6 μ mol), Na_2CO_3 (0.6 mg, 5.66 μ mol) 및 NaPABA(0.2 mg, 1.26 μ mol)]에 첨가하였다.

[0310] 그 후, $^{99}Mo/^{99m}Tc$ 발생장치로부터의 [$^{99m}TcO_4$] $^-$ 용출물(~ 1 ml)을 첨가하고, 혼합물을 실온에서 약 10분 동안 정치시켰다. 미정제 생성물의 일부(~ 400 μ L)를 HPLC 컬럼(이하 HPLC 조건 참고) 상으로 주입하였다. 약 18분의 체류 시간을 갖는 방사성활성 피크를 PBS(목적하는 RAC에 따라 다양한 부피) 함유 바이알 내로 "컷(cut)"시킨 다음, 진공 건조시켜 과량의 이동상을 제거하였다.

[0311] 미정제 RCP = $93 \pm 6\%$ (n = 13). 제형화된 RCP(t = 0) = $99 \pm 1\%$ (n = 13).

[0312] 제형화된 RCP(t = 120분) = $97 \pm 3\%$ (n = 13).

[0313] 비 활성 = 4.2 ± 0.5 GBq/nmol ($n = 13$).

[0314] $RT(^{99m}\text{Tc-접합체 } 3A) = 18$ 분.

[0315] $^{99m}\text{Tc-접합체 } 5$ 를, 접합체 3A에 대해서와 동일한 절차를 실시하여 제조하였다:

[0316] 미정제 RCP = $> 85\%$ ($n = 12$). 제형화된 RCP($t = 0$) = $93 \pm 7\%$ ($n = 12$).

[0317] 제형화된 RCP($t = 120$ 분) = $91 \pm 7\%$ ($n = 6$).

[0318] 비 활성 = 3.5 ± 0.5 GBq/nmol ($n = 13$).

[0319] $R_T(^{99m}\text{Tc-접합체 } 5) = 18$ 분.

[0320] HPLC 조건

이동 상 A	50 mM 아세트산 암모늄
이동 상 B	메탄올
유속	1 ml/min
부피 사이즈	500 μ L
검출(UV)	254 nm
컬럼	페노메넥스 루나(Phenomenex Luna) C5 100R, 5 μ , 150 x 4.6 mm

구배 시스템	
0분	50% (B)
5분	50% (B)
20분	90% (B)
23분	90% (B)
24분	50% (B)
26분	50% (B)

[0321]

[0322] 선행 기술 HYNIC 대응물 $^{99m}\text{Tc-}$ [접합체 1]의 RCP는 78 내지 89%이었다(미정제).

[0323] 50 mM 아세트산 암모늄 대신에 0.1% TFA를 이동상 A로 사용하는 것을 제외하고 테트라-아민 킬레이터의 접합체 (접합체 2A 및 4)를 유사하게 제조하였다. $^{99m}\text{Tc-}$ [접합체 2A]의 체류 시간은 12.2분이었고, $^{99m}\text{Tc-}$ [접합체 4]의 체류 시간은 12.4분이었다.

[0324] **실시예 15: 접합체 2A 및 2B의 에드만 분해(Edman Degradation).**

[0325] MS-분석 기술의 단독 사용은 킬레이터의 공역화 위치를 측정하는데 용이하지 않은 것으로 확인되었기 때문에, LC-MS 분석과 조합된 수동 에드만 분해 화학을 적용하였다.

[0326] 변형시킨 문헌 방법[Xu et al; PNAS, 106, p. 19310-19315(2009)]; [Onisko et al., J. Am. Soc. Mass Spectrom., 18, p. 1070-1079(2007)] 및 [Hayashi et al., J Antibiotics, 43, 1421-1430(1990)]을 사용하였다.

[0327] 수득된 데이터로부터, 접합체 2A가 N^a 아미노 접합 이성질체에 상응하는 반면, 접합체 2B는 $Lys^2 N^e$ -아미노 접합체에 상응함이 입증되었다. 상기 데이터는 2차 아미노 접합체(화학식 II의 Lys^d)에 대해 예측된 분해 생성물에 대해서는 맞지 않았는데, 이는 이 위치가 킬레이터 접합에 사용된 조건 하에서는 반응성이 부족함을 입증하는 것이다. 그러나, 상기 2차 아미노 기는 에드만 분해 주기 동안에 사용된 더욱 강제적인(forcing) 커플링 조건 하에서는 페닐이소티오시아네이트와 반응함이 주목되었다.

[0328] **실시예 16: 포스파티딜 에탄올아민에 대한 친화도.**

[0329] 바이어코어(Biacore) 3000(옵살라, 지이 헬스케어(GE Healthcare))에 L1 칩을 구비시켰다. POPE/POPC(20% P E)로 제조된 리포솜을, 제조업자가 권장한 포획 기술을 사용하여 친화도 연구에 적용하였다. 각각의 시행은 칩 표면의 활성화, 리포솜의 부동화, 펩티드의 결합, 및 리포솜 및 펩티드 둘 모두의 세척(재생)으로 이루어졌다. 유사한 응용예가 프로스텔-칼슨(Frostell-Karlsson) 등의 문헌[Pharm. Sciences, V.94(1), (2005)]에서 확인될 수 있다. 흐르는 완충제를 사용한 바늘, 튜빙 및 액체 취급 시스템의 철저한 세척을 각각의 주기 후에 실시하였다.

[0330] 바이어코어 소프트웨어: 모든 방법 지시를 포함하는 바이어코어 컨트롤 소프트웨어를 적용하였다. 명령되는 방

법은 또한, 사전 프로그램된 지시에 대해 충분하게 제어되도록 바이어코어 방법 정의 언어(MDL)로 기록되었다. 바이어코어 평가 소프트웨어는 센서그램(sensorgram)을 분석하기 위해 적용되었다. 모든 물질은 포스파티딜 에탄올아민에 대한 양호한 결합제인 것으로 확인되었다. 모든 물질에 대한 K_D 는 100 nM 미만이었다. 그 결과가 하기 표 2에 기재되어 있다:

표 2

	두라마이신	접합체 2A	접합체 2B	접합체 4
k_d (1/s)	$\sim 8 \cdot 10^{-5}$	$\sim 7 \cdot 10^{-5}$	$\sim 8 \cdot 10^{-4}$	$\sim 1.5 \cdot 10^{-4}$
k_a (1/Ms)	$\sim 2 \cdot 10^4$	$\sim 1 \cdot 10^4$	$\sim 4 \cdot 10^3$	$\sim 8 \cdot 10^3$
K_D (nM)	~ 5	~ 6	~ 73	~ 16

실시예 17: 종양 흡수 연구.

^{99m}Tc -[접합체 2A], ^{99m}Tc -[접합체 3A] 및 ^{99m}Tc -[접합체 5]를 EL4 마우스 림프종 이종이식 모델에서의 생체분포로 평가하였다. 간단히, C57/B16 마우스에서 종양 성장을 확인한 후에, 이 동물을,

(i) 식염수/DMSO 용액으로; 또는

(ii) 화학치료제(50% 식염수/50% DMSO 중에서의 67 mg/kg 에토포시드 및 100 mg/kg 시클로포스파미드)로 처리하였다.

상기 치료제 또는 비히클로 처리하고 나서 24시간 후에, 적절하게 방사성표지된 화합물의 생체분포에 대해 동물을 평가하였다. 또한, 종양을 추출하고, 카스파제(caspase) 활성을 측정함으로써(카스파제-Glo 검정) 세포자멸사 수준에 대해 평가하였다. 그 후, 결합제 흡수 및 카스파제 활성의 상관성을 다양한 시점에 대해 도식화하였다. 주입 후 120분에서의 결과가 하기 표 3에 기재되어 있고, ^{99m}Tc -[접합체 5]에 대해서는 도 1 및 2에 도시되어 있다:

표 3

주입 후 120분에서의 비율		접합체의 ^{99m}Tc 착물		
		2A	3A	5
종양:혈액	비히클	1.3	1.3	1.2
	치료제	2	2	1.6
종양:근육	비히클	13.2	8	9.2
	치료제	20.8	20	10.8
종양:간	비히클	0.7	0.2	0.4
	치료제	1	0.4	0.8
종양:폐	비히클	0.4	1.6	1.6
	치료제	0.4	3	2.8

실시예 18: ^{99m}Tc -표지된 킬레이터-접합체.

상이한 화합물의 약물동력학 프로파일을 측정하기 위해 ^{99m}Tc -접합체를 순수(naive) 래트에서의 생체분포에 의해 평가하였다. 그 후, 상이한 기관/조직에서의 결합제 보유율의 상관성을 다양한 시점에 대해 도식화하였다. 생성된 데이터로부터, LBP1 및 LBP2 접합체에서 PEG의 혼입은 간 보유율을 감소시킴으로써 약물동력학을 개선시켰음이 입증되었다(하기 표 4 참고):

표 4

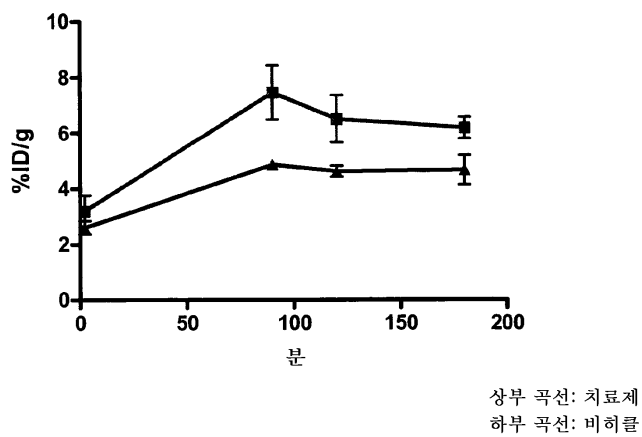
	접합체의 ^{99m}Tc 착물			
	3A	5	6	7
간 %ID/g	1.01 ± 0.25	1.11 ± 0.05	0.23 ± 0.03	0.26 ± 0.03
소변 %ID/g	40.28 ± 2.87	42.07 ± 2.28	60.83 ± 2.14	58.57 ± 3.62

[0340]

도면

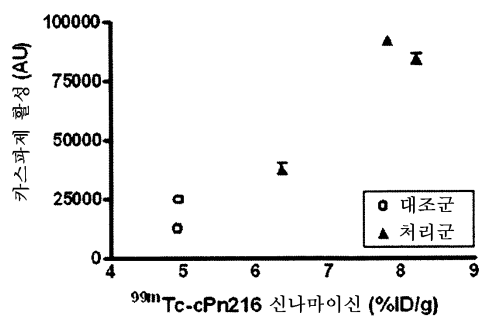
도면1

동물 모델에서 ^{99m}Tc -[접합체 5] 종양 흡수



도면2

^{99m}Tc -[접합체 5]와 종양 세포자멸사의 상관성



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GE Healthcare Limited

<120> Apoptosis Imaging Agents

<130> PZ1073 WO

<140> PCT/EP2011/??????

<141> 2011-09-27

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 19

<212> PRT

<213> Streptoveriticillium cinnamoneum

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> chelator conjugated

<220><221> THIOETH

<222> (1)..(18)

<220><221> THIOETH

<222> (4)..(14)

<220><221> THIOETH

<222> (5)..(11)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(19)

<223> lysinoalanine bond

<220><221> VARIANT

<222> (15)..(15)

<223> beta-hydroxyaspartic acid

<400> 1

Cys Arg Gln Ser Cys Ser Phe Gly Pro Pro Thr Phe Val Cys Xaa Gly

1 5 10 15

Asn Thr Lys

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Streptoveriticillium cinnamoneum

<220><221> THIOETH

<222> (1)..(18)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> chelator conjugated

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> chelator conjugated

<220><221> THIOETH

<222> (4)..(14)

<220><221> THIOETH

<222> (5)..(11)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(19)

<223> lysinoalanine bond

<220><221> VARIANT

<222> (15)..(15)

<223> beta-hydroxyaspartic acid

<400> 2

Cys Lys Gln Ser Cys Ser Phe Gly Pro Pro Thr Phe Val Cys Xaa Gly

1 5 10 15

Asn Thr Lys

<210> 3

<211> 19

<212> PRT

<213> Streptovercillium cinnamoneum

<220><221> THIOETH

<222> (1)..(18)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> chelator conjugated

<220><221> THIOETH

<222> (4)..(14)

<220><221> THIOETH

<222> (5)..(11)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(19)

<223> lysinoalanine bond

<220><221> VARIANT

<222> (15)..(15)

<223> beta-hydroxyaspartic acid

<400> 3

Cys Lys Gln Ser Cys Ser Phe Gly Pro Pro Thr Phe Val Cys Xaa Gly

1 5 10 15

Asn Thr Lys

<210> 4

<211> 19

<212> PRT

<213> Streptovercillium cinnamoneum

<220><221> THIOETH

<222> (1)..(18)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> chelator conjugated

<220><221> THIOETH

<222> (4)..(14)

<220><221> THIOETH

<222> (5)..(11)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(19)

<223> lysinoalanine bond

<220><221> VARIANT

<222> (15)..(15)

<223> beta-hydroxyaspartic acid

<400> 4

Cys Lys Gln Ser Cys Ser Phe Gly Pro Pro Thr Phe Val Cys Xaa Gly

1 5 10 15

Asn Thr Lys