



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년02월21일
 (11) 등록번호 10-1236124
 (24) 등록일자 2013년02월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 51/04 (2006.01) **A61K 51/08** (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2006-7010133
 (22) 출원일자(국제) 2004년11월26일
 심사청구일자 2009년11월26일
 (85) 번역문제출일자 2006년05월24일
 (65) 공개번호 10-2006-0123196
 (43) 공개일자 2006년12월01일
 (86) 국제출원번호 PCT/GB2004/005003
 (87) 국제공개번호 WO 2005/053752
 국제공개일자 2005년06월16일
 (30) 우선권주장
 0327494.1 2003년11월26일 영국(GB)
 (56) 선행기술조사문헌
 W02001089584 A1
 US6589503 A

(73) 특허권자
지이 헬쓰케어 리미티드
 영국 버킹엄셔어주 에이취피이7 9엔에이 리틀 쉐
 폰트 아머샴 플레이스
 (72) 발명자
히스콕크, 둔칸
 영국 에이취피이7 9엘엘 아머샴 버킹엄셔어 화이트
 라이온 로드 더그로브 센터 지이 헬쓰케어
 바이오-사이언시스
뉴튼, 벤
 영국 에이취피이7 9엘엘 아머샴 버킹엄셔어 화이트
 라이온 로드 더그로브 센터 지이 헬쓰케어
 바이오-사이언시스
길베르, 베네딕트
 영국 에이취피이7 9엘엘 아머샴 버킹엄셔어 화이트
 라이온 로드 더그로브 센터 지이 헬쓰케어
 바이오-사이언시스
 (74) 대리인
김영, 장수길

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 김은희

(54) 발명의 명칭 **신규 조영제**

(57) 요약

본 발명은 생체내 영상화를 위한 진단 조영제에 관한 것이다. 상기 조영제는 생체내 진단 영상화에 적합한 영상화 잔기로 표지된 합성 카스파제-3 억제제를 포함한다. 또한, 본 발명은 상기 조영제를 포함하는 제약 조성물 및 방사성약물 조성물, 및 방사성약물의 제조를 위한 키트를 제공한다. 또한, 방사성 또는 상자성 금속 이온을 포함하는 조영제의 제조에 적합한, 카스파제-3 억제제의 킬레이터 결합체가 기술되어 있다. 상기 조영제는 카스파제-3이 관여하는 다양한 질환 상태를 진단 영상화하고(하거나) 생체내 모니터링하는 요법에 유용하다.

특허청구의 범위

청구항 1

영상화 잔기로 표지된 합성 카스파제-3 억제제를 포함하며,

상기 영상화 잔기는 생체내 SPECT 또는 PET 영상화에 적합하고

(a) ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga 또는 ^{68}Ga 로부터 선택된 방사성 금속 이온,

(b) ^{123}I 인 감마선-방출 방사성 할로겐,

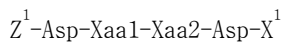
(c) ^{18}F , ^{11}C , ^{124}I 또는 ^{13}N 로부터 선택된 양전자-방출 방사성 비금속

으로부터 선택된 것이고,

상기 합성 카스파제-3 억제제는 카스파제-3에 대한 K_i 가 500 nM 미만이고 (i) 하기 화학식 III의 테트라펩티드 유도체 및 (ii) 하기 화학식 VI의 디펩티드로 정의된 카스파제-3 억제제 중 하나 이상을 포함하는 것인

조영제.

<화학식 III>



(상기 식에서,

Z^1 은 테트라펩티드의 N-말단에 부착된 대사 억제기이며, 아세틸, 3급-부틸옥시카보닐, 플루오레닐메톡시카보닐, 벤질옥시카보닐, 트리플루오로아세틸, 알릴옥시카보닐, 1-(4,4-디메틸-2,6-디옥소시클로헥실리덴)에틸 또는 3-니트로-2-피리딘 술페닐 중에서 선택되고;

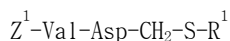
Xaa1 및 Xaa2는 독립적으로 임의의 아미노산이고;

X^1 은 테트라펩티드의 카르복시 말단에 부착된 $-R^1$ 기 또는 $-\text{CH}_2\text{OR}^2$ 기이고;

R^1 은 H, $-\text{CH}_2\text{F}$, $-\text{CH}_2\text{Cl}$, C_{1-5} 알킬, C_{1-5} 알콕시 또는 $-(\text{CH}_2)_q\text{Ar}^1$ [여기서, q는 1 내지 6의 정수이고, Ar^1 은 C_{6-12} 아릴, C_{5-12} 알킬-아릴, C_{5-12} 플루오로-치환된 아릴 또는 C_{3-12} 헤테로아릴임]이고;

R^2 는 C_{1-5} 알킬, C_{1-10} 아실 또는 Ar^1 이다.)

<화학식 VI>



(상기 식에서,

$-\text{CH}_2\text{-S-R}^1$ 기는 디펩티드의 카르복시 말단에 부착되고,

Z^1 및 R^1 은 화학식 III에 대해 정의된 바와 같다.)

청구항 2

제1항에 있어서, 합성 카스파제-3 억제제의 분자량이 150 내지 3000 Da인 조영제.

청구항 3

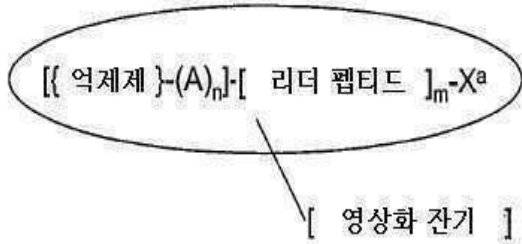
제1항에 있어서, 포유동물 세포의 외부로부터 내부로의 생체내 세포막 전달을 용이하게 하고, Tat 펩티드, 타킬 플레신(tachylplexin) 및 프로테그린(protegrin)으로부터 선택된 4-mer 내지 20-mer 리더 펩티드 서열을 추가

로 포함하는 조영제.

청구항 4

제3항에 있어서, 합성 카스파제-3 억제제 결합체(conjugate)가 하기 화학식 I의 화합물인 조영제.

<화학식 I>



(상기 식에서,

{억제제}는 제1항에 정의된 카스파제-3 억제제이고;

[리더 펩티드]는 제3항에 정의된 바와 같고, 이것의 아민 또는 카르복실 말단에 의해 부착되어 있고;

-(A)_n-는 링커기(linker group)이고, 각각의 A는 독립적으로 -CR₂-, -CR=CR-, -C≡C-, -CR₂CO₂-, -CO₂CR₂-, -NRCO-, -CONR-, -NR(C=O)NR-, -NR(C=S)NR-, -SO₂NR-, -NRSO₂-, -CR₂OCR₂-, -CR₂SCR₂-, -CR₂NR₂CR₂-, C₄₋₈ 시클로헥테로알킬렌기, C₄₋₈ 시클로알킬렌기, C₅₋₁₂ 아틸렌기, C₃₋₁₂ 헤테로아틸렌기, 아미노산 또는 단분산형 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 빌딩 블록(building block)이고;

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

n은 0 내지 10의 정수이고;

m은 0 또는 1이고;

X^a는 H, OH, Hal, NH₂, C₁₋₄ 알킬, C₁₋₄ 알콕시, C₁₋₄ 알콕시알킬 또는 C₁₋₄ 히드록시알킬이거나, X^a는 영상화 잔기이다.)

청구항 5

제1항의 조영제를 생체적합성 담체와 함께 포함하는, 포유동물 투여에 적합한 형태이며 생체내에서 심근경색, 종양 또는 이식 거부를 영상화하는데 적합한 방사성약물 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 영상화 잔기가 양전자-방출 방사성 비금속 또는 감마선-방출 방사성 할로젠을 포함하는 것인 방사성약물 조성물.

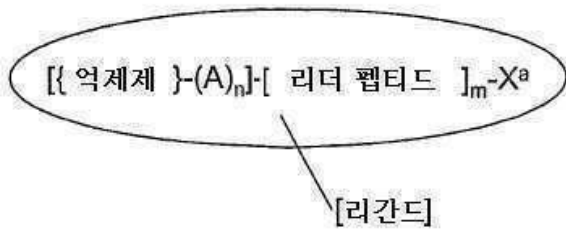
청구항 7

제5항에 있어서, 영상화 잔기가 방사성 금속 이온을 포함하는 것인 방사성약물 조성물.

청구항 8

하기 화학식 Ib의 합성 카스파제-3 억제제와 리간드의 결합체.

<화학식 Ib>



상기 식에서,

{억제제}는 제1항에 정의된 카스파제-3 억제제이고;

[리더 펩티드]는 제3항에 정의된 바와 같고, 이것의 아민 또는 카르복실 말단에 의해 부착되어 있고;

[리간드]는 디아민디옥심, N₂S₂ 또는 N₃S 공여체 세트를 갖는 킬레이팅제이고;

-(A)_n-는 링커기이고, 각각의 A는 독립적으로 -CR₂-, -CR=CR-, -C≡C-, -CR₂CO₂-, -CO₂CR₂-, -NRCO-, -CONR-, -NR(C=O)NR-, -NR(C=S)NR-, -SO₂NR-, -NRSO₂-, -CR₂OCR₂-, -CR₂SCR₂-, -CR₂NR₂CR₂-, C₄₋₈ 시클로헥테로알킬렌기, C₄₋₈ 시클로알킬렌기, C₅₋₁₂ 아릴렌기, C₃₋₁₂ 헤테로아릴렌기, 아미노산 또는 단분산형 폴리에틸렌글리콜 (PEG) 빌딩 블록이고;

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

n은 0 내지 10의 정수이고,

m은 0 또는 1이고;

X^a는 H, OH, Hal, NH₂, C₁₋₄ 알킬, C₁₋₄ 알콕시, C₁₋₄ 알콕시알킬 또는 C₁₋₄ 히드록시알킬이거나, X^a는 상기 리간드이다.

청구항 9

삭제

청구항 10

제8항의 결합체를 생체적합성 담체와 함께 포함하며 영상화 잔기가 방사성 금속 이온을 포함하는 것인, 포유동물 투여에 적합한 형태이며 생체내에서 심근경색, 종양 또는 이식 거부를 영상화하는데 적합한 방사성약물 조성물의 제조를 위한 키트.

청구항 11

제10항에 있어서, 방사성 금속 이온이 ^{99m}Tc이고, 생체적합성 환원제를 추가로 포함하는 키트.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 정의된 카스파제-3 억제제의 비-방사성 유도체인 전구체를 포함하고, 상기 비-방사성 유도체는 양전자-방출 방사성 비금속 또는 감마선-방출 방사성 할로겐의 공급원과 반응하여 방사성약물 조성물을 생성할 수 있으며, 양전자-방출 방사성 비금속 또는 감마선-방출 방사성 할로겐의 공급원은 a. 할라이드 이온 또는 F⁺ 또는 I⁺; 또는 b. 알킬 또는 플루오로알킬 할라이드, 토실레이트, 트리플레이트 또는 메실레이트 중에서 선택된 알킬화제로부터 선택되는 것인, 제6항의 방사성약물 조성물의 제조를 위한 키트.

청구항 13

제12항에 있어서, 전구체가 멸균된 비발열성 형태인 키트.

청구항 14

삭제

청구항 15

제12항에 있어서, 비-방사성 유도체가

- a. 트리알킬스탄난(trialkylstannane) 또는 트리알킬실란;
- b. 친핵성 치환을 위한 알킬 할라이드, 알킬 토실레이트 또는 알킬 메실레이트;
- c. 친핵성 또는 친전자성 치환이 일어나도록 활성화되는 방향족 환;
- d. 알킬화가 용이한 관능기;
- e. 티올-함유 화합물을 알킬화시켜서 티오에테르-함유 생성물을 생성하는 알킬화제로부터 선택된 것인 키트.

청구항 16

제12항에 있어서, 전구체가 고체상에 결합되어 있는 것인 키트.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 생체내 영상화를 위한 진단 조영제에 관한 것이다. 상기 조영제는 생체내 진단 영상화에 적합한 영상화 잔기로 표지된 합성 카스파제-3 억제제를 포함한다.

배경기술

[0002] 아포토시스(apoptosis)에 의한 프로그래밍된 세포 사멸은 다양한 수준의 조절을 갖는 많은 세포 절차를 수반하는 복잡한 과정이다. 이는 2가지 경로 중 하나에 의해 개시된다. 하나는 세포 표면 사멸 수용체를 통해 개시되는 외적 경로를 통하는 것이고, 다른 하나는 UV 방사선에 의한 DNA 손상과 같은 내적 개시자를 통하는 것이다. 이들 경로 모두 에너지를 필요로 하는 일원화된 세포 사멸에 이르며, 괴사에 의한 세포 사멸과는 다르게 염증 반응을 수반하지 않는다. 아포토시스가 일어날 세포는 그들의 세포 표면에 '나를 먹으세요(eat me)'란 시그널을 나타내며, 이는 이들 세포를 식세포 작용으로 처리할 다른 세포를 끌어들이는다.

[0003] 아포토시스는 신체 내에서의 다양한 과정에 필수적인 사건이다. 예를 들어, 태아 발생은 전적으로 아포토시스에 의존하며, 빠르게 전환하는 조직은 심각한 병리학적 결과를 피하기 위해서 엄격한 조절을 필요로 한다. 아포토시스의 조절이 실패하면 암 (불충분한 세포 사멸) 및 신경병리학적 사건, 예를 들어 알츠하이머 (과다한 세포 사멸)을 일으킬 수 있다. 또한, 아포토시스는 허혈/재관류 상해 후 심장 내의 부위와 같은 손상된 조직을 나타낼 수도 있다.

[0004] 안넥신-5는 아포토시스 세포의 외막에 있는 포스파티딜세린 (PS)에 약 10^{-9} M의 친화도로 결합하는 내인성 인간 단백질 (RMM 36 kDa)이다. ^{99m}Tc -표지된 안넥신-5는 아포토시스를 생체내 영상화하는데 사용되어 왔다 [Blankenberg et al., J. Nucl. Med., 40, 184-191 (1999)]. 그러나, 이러한 접근에는 수개의 문제점이 있다. 첫째로, 안넥신-5는 괴사 세포에 들어가 세포막의 내부 소엽(leaflet)에 노출된 PS를 결합하여, 가양성 결과를 이룰 수 있다. 두번째는 높은 혈액 풀을 활성이며, 이는 표지된 안넥신-5 주입 후 적어도 2 시간 동안 유지된다. 이는 영상화의 최적 시간이 주입한 지 10 내지 15 시간 후라는 것을 의미하므로 [Reutelingsperger et al., J. Immunol. Meth., 265 (1-2), 123-32 (2002)], 급성 관상 증후군을 갖는 환자에서의 임상적 결정에 부적합하다. 또한, 안넥신-5의 정화는 신장 및 간을 통해 일어나며 복부에 매우 강한 백그라운드 시그널 남긴다. 이는 (예를 들어, 신장 이식 및 중앙 모니터링에서) 복부 세포의 사멸에 대한 영상화를 불가능하게 한다.

[0005] WO 01/89584는 실시예 16 내지 18 및 21에서 카스파제-3 기질 테트라펩티드 DEVD (즉, Asp-Glu-Val-Asp)의 길레이터 결합체(conjugate)가 MRI 또는 선험계수법을 이용하여 아포토시스 조직의 생체내 영상화에 유용할 수 있다고 기술하고 있다.

[0006] 문헌 [Haber Korn et al. Nucl. Med. Biol., 28, 793-798 (2001)]은 잠재적인 아포토시스 조영제로서 방사성 동위원소 ^{131}I 로 표지된 pan-카스파제 억제제인 Z-VAD-fmk, 즉 벤질옥시카보닐-Val-Ala-DL-Asp(O-메틸)-플루오로메

틸케톤을 조사하였다. 이들은 상기 제제의 절대적 세포 흡수가 낮으며, 이것이 활성화된 카스파제 당 단지 하나의 억제제 분자의 포획에 기인한다는 것을 밝혔다. 이들은 표지된 카스파제 기질은 이러한 문제를 겪지 않으며 조영제에 대한 보다 만족할 만한 접근이라고 결론지었다.

- [0007] 아포토시스 영상화를 위한 방사성약물은 문헌 [Lahorte et al., Eur. J. Nucl. Med., 31, 887-919 (2004)]에서 검토되어 있다
- [0008] 신속한 영상화 (예를 들어, 주입한 지 1 시간 내)를 가능하게 하고 혈액 및 배경 기관으로부터 충분한 정화를 갖는 아포토시스 조영제가 여전히 필요하다.
- [0009] 본 발명
- [0010] 본 발명에 이르러, 영상화 잔기로 표지된 합성 카스파제-3 억제제가 비정상적 아포토시스, 특히 과도한 아포토시스가 수반되는 포유동물 신체의 질환을 생체내 영상화하는데 유용한 진단 조영제라는 것이 밝혀졌다.
- [0011] 영상화 잔기는 방사성 (예를 들어, 방사성 금속 이온, 감마선-방출 방사성 할로젠 또는 양전자-방출 방사성 비금속) 또는 비-방사성 (예를 들어, 상자성 금속 이온, 과분극화된 NMR-활성 핵 또는 생체내 영상화에 적합한 광학 염료)일 수 있다.
- [0012] 과도한 아포토시스는 다양한 인간 질환과 관련이 있으며, 많은 이들 장애의 진행에서 카스파제의 중요성이 입증되었다. 따라서, 본 발명의 조영제는 다음을 포함한 일련의 질환 상태에서 생체내 진단 영상화 및(또는) 치료 모니터링에 유용하다:
- [0013] (a) 급성 장애, 예를 들어 심장 및 뇌 허혈/재관류 손상 (예를 들어, 각각 심근 경색 또는 발작), 척수 손상, 외상성 뇌 손상, 이식시의 기관 거부, 간 변성 (예: 간염), 폐혈증 및 세균성 수막염;
- [0014] (b) 만성 장애, 예를 들어 신경퇴행성 질환 (예: 알츠하이머 질환, 헌팅톤 질환, 다운 증후군, 척추성 근 위축증, 다발성 경화증, 파킨슨 질환), 면역결핍 질환 (예: HIV), 관절염, 동맥경화증 및 당뇨병;
- [0015] (c) 방광암, 유방암, 결장암, 자궁내막암, 두경부암, 백혈병, 폐암, 흑색종, 비-호지킨 림프종, 난소암, 전립선암 및 직장암과 같은 암에서 아포토시스를 유발하는데 사용되는 제제의 효율을 모니터링.

발명의 상세한 설명

- [0016] 하나의 양태로서, 본 발명은 영상화 잔기로 표지되고 카스파제-3에 대한 K_i 가 2000 nM 미만인 합성 카스파제-3 억제제를 포함하고, 상기 영상화 잔기는 상기 표지된 카스파제-3 억제제를 포유동물 신체에 생체내 투여한 후에 외부에서 비-침습(non-invasive) 방식으로 검출할 수 있는 것이거나 생체내 사용하도록 고안된 검출기, 예를 들어 혈관 내 방사 또는 광학 검출기 (예: 내시경), 또는 수술시 사용하도록 고안된 방사선 검출기를 사용하여 검출할 수 있는 것인 조영제를 제공한다.
- [0017] 현재까지, 카스파제-1, 카스파제-2 등이라고 지칭되는 14가지 이상의 상이한 카스파제가 인간에서 확인되었다. 카스파제는 3개의 주요 작용 범주로 분류되었다:
- [0018] 그룹 I 카스파제 (예: 카스파제-1, -4, -5 및 -13): 주로 염증 반응 경로에 관여함;
- [0019] 그룹 II 카스파제 (예: 카스파제-3, -6 및 -7): 이펙터(effector) 또는 "실행자(executioner)" 카스파제;
- [0020] 그룹 III 카스파제 (예: 카스파제-8, -9 및 -2): 개시자 카스파제.
- [0021] 본 발명은 CPP32로도 공지되고 29 kDa 시스테인 프로테아제인 카스파제-3의 억제제에 관한 것이다.
- [0022] 본 발명에 적합한 조영제는 우수한 세포막 투과성을 나타내므로, 세포내 효소인 카스파제-3을 표적할 수 있다. 세포막 전달을 용이하게 하기 위해서, 본 발명의 조영제는 임의로 하기 정의되는 바와 같은 "리더 펩티드"를 포함할 수 있다. 바람직한 조영제는 생체내에서 용이한 대사를 겪지 않으며, 따라서 가장 바람직하게는 인간에서 60 내지 240 분의 생체내 반감기를 나타낸다. 조영제는 바람직하게는 신장을 통해 배출된다 (즉, 뇨가 배출됨). 조영제는 바람직하게는 아포토시스 병소에서 적어도 1.5, 가장 바람직하게는 적어도 5, 특히 바람직하게는 적어도 10의 시그널-대-백그라운드 비율을 나타낸다. 조영제가 방사성인 경우, 비특이적으로 결합되거나 생체내 유리된 조영제의 1/2 피크 수준에 대한 정화는 바람직하게는 방사성 동위원소의 방사능 붕괴 반감기 미만이거나 동일한 시간 동안 일어난다.
- [0023] 조영제의 분자량은 적합하게는 5000 Da 이하이다. 보다 바람직하게는, 150 내지 3000 Da이고, 가장 바람직하게

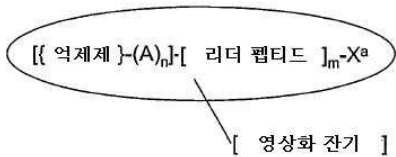
는 200 내지 1500 Da이며, 특히 바람직하게는 300 내지 800 Da이다.

- [0024] 본 발명에 적합한 합성 카스파제-3 억제제는 카스파제-3에 대한 K_i 가 2000 nM 미만이다. 카스파제-3은 거의 대부분의 조직에서 다른 카스파제에 비해 고수준으로 발현될 수 있으며, 다른 그룹 II 카스파제에 비해 높은 촉매 활성을 나타낸다. 그러나, 카스파제-3은 단지 아포토시스 동안 활성 형태로 발현된다. 이는 우수한 시그널-대-노이즈를 갖는 실행 가능한 조영제인 본 발명의 표지된 억제제에 대한 기초를 형성한다. 억제 상수 K_i 는 효소-억제제 배합물에 대한 해리 상수이다 [Lehninger, A. L., Nelson, D. L. and Cox, M. M. (1993) Principles of Biochemistry (2nd edn.) Worth, New York Stryer, L. (1995) Biochemistry (4th edn.) Freeman, New York]. 바람직하게는, 상기 억제제는 카스파제-3에 대한 K_i 가 500 nM 미만, 가장 바람직하게는 100 nM 미만이다. 또한, 본 발명의 합성 카스파제-3 억제제는 바람직하게는 다른 카스파제에 비해 카스파제-3에 대해 선택적이다. 이러한 선택적 억제제는 적합하게는 카스파제-1에 비해 카스파제-3에 대해 50배 이상, 바람직하게는 100배 이상, 가장 바람직하게는 500배 이상 우수한 효능 (K_i 로 정의됨)을 나타낸다.
- [0025] 본 발명이 바람직한 합성 카스파제-3 억제제는 비가역적, 즉 효소에 공유적으로 결합한다. 카스파제-3은 세포 내 효소이기 때문에, 바람직한 카스파제-3 억제제는 우수한 세포막 투과성을 나타내며, 즉 생체내에서 포유동물 세포막을 통해 효과적으로 전달된다. 이와 관련하여, 비-펩티드 억제제가 바람직하다.
- [0026] 용어 "표지된"은 카스파제-3 억제제 자체가 영상화 잔기를 포함하거나, 영상화 잔기가, 하기 화학식 I에 대해 기술된 바와 같이, 추가의 종으로서, 임의로 링커기(linker group)를 통해 부착된다. 카스파제-3 억제제 자체가 영상화 잔기를 포함하는 경우, 이는 '영상화 잔기'가 억제제에 대한 화학적 구조물의 일부를 형성하고, 천연의 풍부한 수준 보다 상당히 높은 수준으로 존재하는 방사성 또는 비방사성 동위원소라는 것을 의미한다. 동위원소의 이러한 상승되거나 높은 수준은 적합하게는 적어도 5배, 바람직하게는 적어도 10배, 가장 바람직하게는 20배이며, 이상적으로는 문제의 동위원소의 천연의 풍부한 수준의 적어도 50배이거나, 문제의 동위원소의 농축 수준이 90 내지 100%인 수준으로 존재한다. '영상화 잔기'를 포함하는 카스파제-3 억제제의 예가 하기에 기술되며, 영상화 잔기가 카스파제-3 억제제의 화학적 구조물 내에 있는 동위원소적으로 표지된 ^{13}C , ^{11}C 또는 ^{18}F 를 갖도록, 증가된 수준의 ^{13}C 또는 ^{11}C 를 갖는 CH_3 기 및 증가된 수준의 ^{18}F 를 갖는 플루오로알킬을 포함한다. 방사성 동위원소 ^3H 및 ^{14}C 는 적합한 영상화 잔기가 아니다.
- [0027] "영상화 잔기"는 포유동물 신체의 외부에서 사용하거나 또는 생체내에서 사용하도록 고안된 검출기, 예를 들어 혈관 내 방사, 광학 검출기, 예를 들어 내시경, 또는 수술시의 사용을 위해 고안된 방사선 검출기의 사용을 통해 검출될 수 있다. 바람직한 영상화 잔기는 생체내 투여 후 비-침습적 방식으로 외부에서 측정될 수 있는 것이다. "영상화 잔기"는 바람직하게는 하기 중에서 선택된다:
- [0028] (i) 방사성 금속 이온;
- [0029] (ii) 상자성 금속 이온;
- [0030] (iii) 감마선-방출 방사성 할로젠;
- [0031] (iv) 양전자-방출 방사성 비금속; 또는
- [0032] (v) 과분극화된 NMR-활성 핵;
- [0033] (vi) 생체내 영상화에 적합한 광학 염료를 포함하는 조영제.
- [0034] 가장 바람직한 영상화 잔기는 방사성, 특히 방사성 금속 이온, 감마선-방출 방사성 할로젠 및 양전자-방출 방사성 비금속, 특히 SPECT 또는 PET를 사용하여 영상화하는데 적합한 것이다.
- [0035] 영상화 잔기는 방사성 금속 이온, 즉 방사금속이다. 용어 "방사금속"은 방사성 전이 원소 + 란타늄 원소 및 액티나이드 계열 원소, 및 금속 주요군 원소를 포함한다. 반고체의 비소, 셀레늄 및 텔루르가 상기 범위에서 제외된다. 적합한 방사금속은 양전자 방사체, 예를 들어 ^{64}Cu , ^{43}V , ^{52}Fe , ^{55}Co , $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 또는 ^{68}Ga ; 또는 γ -방사체, 예를 들어 $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{67}Cu or ^{67}Ga 일 수 있다. 바람직한 방사금속은 $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{64}Cu , ^{68}Ga 및 ^{111}In 이다. 가장 바람직한 방사금속은 γ -방사체, 특히 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 이다.
- [0036] 영상화 잔기가 상자성 금속 이온인 경우, 적합한 금속 이온은 Gd(III), Mn(II), Cu(II), Cr(III), Fe(III),

Co(II), Er(II), Ni(II), Eu(III) 또는 Dy(III)을 포함한다. 바람직한 상자성 금속 이온은 Gd(III), Mn(II) 및 Fe(III)이고 Gd(III)가 특히 바람직하다.

- [0037] 영상화 잔기가 감마선-방출 방사성 할로겐인 경우, 방사성 할로겐은 적합하게는 ^{123}I , ^{131}I 또는 ^{77}Br 로부터 선택된다. 바람직한 감마선-방출 방사성 할로겐은 ^{123}I 이다.
- [0038] 영상화 잔기가 양전자-방출 비금속인 경우, 적합한 양전자 방사체는 ^{11}C , ^{13}N , ^{17}F , ^{18}F , ^{75}Br , ^{76}Br 또는 ^{124}I 를 포함한다. 바람직한 양전자-방출 비금속은 ^{11}C , ^{13}N , ^{124}I 및 ^{18}F 이고, 특히 바람직하게는 ^{11}C 및 ^{18}F 이며, 가장 특히 바람직하게는 ^{18}F 이다.
- [0039] 영상화 잔기가 과분극화된 NMR-활성 핵인 경우, 이러한 NMR-활성 핵은 제로가 아닌 핵 스핀을 갖지 않으며, ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{29}Si 및 ^{31}P 를 포함한다. 물론, ^{13}C 이 바람직하다. 용어 "과분극화된"은 이의 평형 분극화 이상으로 NMR-활성 핵의 분극화도가 증가된 것을 의미한다. 천연 양의 ^{13}C (^{12}C 에 비교)는 약 1%이고, 적합한 ^{13}C -표지된 화합물은 과분극화되기 전에 적어도 5%, 바람직하게는 적어도 50%, 가장 바람직하게는 적어도 90%의 다량으로 농축된다. 본 발명의 카스파제-3 억제제의 탄소-함유 치환체 중 적어도 하나의 탄소 원자가 ^{13}C 로 적합하게 농축된 후 과분극화된다.
- [0040] 영상화 잔기가 생체내 광학 영상화에 적합한 리포터인 경우, 리포터는 광학 영상화 절차에서 직접적으로나 간접적으로 검출될 수 있는 잔기이다. 리포터는 광 산란체 (예: 착색되거나 비착색된 입자), 광 흡수체 또는 광 방사체일 수 있다. 보다 바람직하게는, 리포터는 발색단 또는 형광 화합물과 같은 염료이다. 염료는 자외선 내지 근적외선의 파장을 갖는 전자기 스펙트럼에서 광과 상호작용하는 염료일 수 있다. 가장 바람직하게는, 리포터는 형광 특성을 갖는다.
- [0041] 바람직한 유기 발색단 및 형광단 리포터는 광범위한 비편재된 전자 시스템을 갖는 군, 예를 들어 시아닌, 메로시아닌, 인도시아닌, 프탈로시아닌, 나프탈로시아닌, 트리페닐메틴, 포르피린, 피릴륨 염료, 티아피릴륨 염료, 스쿠아릴륨 염료, 크로코늄 염료, 아줄레늄 염료, 인도아닐린, 벤조펜옥사지늄 염료, 벤조티아페노티아지늄 염료, 안트라퀴논, 나프토퀴논, 인다트렌, 프탈로일아크리돈, 트리페노퀴논, 아조 염료, 분자 간 및 분자 내 전자-전달 염료 및 염료 콤플렉스, 트로폰, 테트라진, 비스(디티올렌) 콤플렉스, 비스(벤젠-디티올레이트) 콤플렉스, 요오도아닐린 염료, 비스(S,O-디티올렌) 콤플렉스를 포함한다. 형광 단백질, 예를 들어 녹색 형광 단백질 (GFP) 및 상이한 흡수/방사 특성을 갖는 GFP의 변형물도 유용할 수 있다. 특정한 희토금속 (예: 유로퓸, 사마륨, 테르븀 또는 디스프로슘)의 콤플렉스도 형광 나노크리스탈 (양자 도트)이기 때문에 특정한 상황에서 사용된다.
- [0042] 사용될 수 있는 발색단의 특정 예는 플루오레세인, 술포르호다민 101 (Texas Red), 로다민 B, 로다민 6G, 로다민 19, 인도시아닌 그린, Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, Marina Blue, Pacific Blue, Oregon Green 88, Oregon Green 514, 테트라메틸로다민 및 Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700 및 Alexa Fluor 750를 포함한다.
- [0043] 가시 영역 또는 근적외선 영역인 400 nm 내지 3 μm , 특히 600 내지 1300 nm에서 최대 흡수를 갖는 염료가 특히 바람직하다.
- [0044] 광학 영상화 방법 및 측정 기술은, 이로 제한됨이 없이, 발광 영상화; 내시경; 형광 내시경; 광학 응집 단층촬영; 투과 영상화; TRTI (time resolved transmittance imaging); 공초점 영상화; 비선형 현미경; 광음향 영상화; 음향-광학 영상화; 분광계; 반사 분광계; 간섭계; 결맞음 간섭계 (coherence interferometry); 확산 광학 단층촬영 및 형광 매개된 확산 광학 다단층촬영 (연속 웨이브, 시간 도메인 및 주파수 도메인 시스템), 및 광 산란, 흡수, 편광, 발광, 형광 수명, 양자수율, 및 퀴칭의 측정을 포함한다.
- [0045] 본 발명의 조영제는 바람직하게는 화학식 I의 갖는다:

화학식 I



[0046]

[0047]

[0048]

[0049]

[0050]

[0051]

[0052]

[0053]

[0054]

[0055]

[0056]

[0057]

상기 식에서,

{역제제}는 본 발명의 카스파제-3 억제제이고;

[리더 펩티드]는 4 내지 20-mer의 펩티드 세포막 전달자 펩티드이며, 이것의 아민 또는 카르복실 말단에 의해 결합되어 있고;

-(A)_n-는 링커기이고, 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 시클로헥테로알킬렌기, C₄₋₈ 시클로알킬렌기, C₅₋₁₂ 아릴렌기, C₃₋₁₂ 헤테로아릴렌기, 아미노산 또는 단분산형 폴리에틸렌글리콜 (PEG) 빌딩 블록(building block)이고;

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

n은 0 내지 10의 값을 갖는 정수이고;

m은 0 또는 1이며;

X^a는 H, OH, Hal, NH₂, C₁₋₄ 알킬, C₁₋₄ 알콕시, C₁₋₄ 알콕시알킬 또는 C₁₋₄ 히드록시알킬이거나, X^a는 영상화 잔기이다.

화학식 I에 나타난 바와 같이, 본 발명의 화합물은 영상화 잔기로 "표지"된다. 상기 정의된 바와 같이, 이는 하나 이상의 {역제제}, 링커기 -(A)_n 또는 리더 펩티드가 이에 결합된 적어도 하나의 "영상화 잔기"를 포함하거나 갖는다는 것을 의미한다. 바람직하게는, 카스파제-3 억제제 또는 링커기가 영상화 잔기에 부착되거나 이를 포함한다.

본 발명의 "리더 펩티드"는 세포막 전달을 용이하게 하는 4-mer 내지 20-mer 펩티드이다. 이는 카스파제-3이 세포내 효소이기 때문에 중요한 사항이며, 따라서 조영제는 세포막을 통과할 수 있어야 한다. 그러나, "리더 펩티드"가 생체내에서 생물학적 표적화를 제공하지는 않는다. 적합한 리더 펩티드는 당 분야에 공지되어 있으며, Tat 펩티드, 타킬플레신(tachypleisin) 유도체 및 프로테그린(protegrin) 유도체를 포함한다. 특정한 "리더 펩티드" 서열 및 이에 대한 참조가 하기 표 1에 나타나 있다:

표 1

리더 펩티드

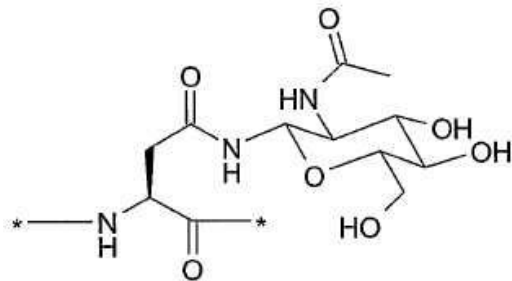
	리더 펩티드	설명	참고문헌
1	CNSRLHLR 및 CENWWGDV	파아지 펩티드 라이브리리로 혈관 표적화	Pasqualini R Q, J. Nucl. Med., 43(2):159-62 (1999)
2	KWSFRVSYRGISYRRSR	타킬플레신 유도체	WO 00/32236; Nakamura et al., J Biol Chem. 15; 263(32): 16709-13 (1988).; Tamura H. et al., Chem. Pharm. Bull. Tokyo 41, 978-980 (1993)
3	AWSFRVSYRGISYRRSR	타킬플레신 유도체	WO 99/07728
4	RKKRRQRRR	TAT	Mie M et al., Biochem Biophys Res Commun. 24; 310(3):730-4 (2003); Potocky TB et al., Biol Chem. 2003 Sep. 29 [Epub ahead of print]
5	RRLSYSRRRF	프로테그린 유도체	WO 99/07728

6	RGGRLSYSRRRFVSVSVGR	프로테그린	WO 00/32236; Kokryakov et al., FEBS Lett.; 327(2):231-6 (1993)
7	RGGRLSYSRRRFSTSTGR	트로픽(tropic) 프로테그린 (SynB1)	WO 99/07728; WO 00/32236
8	PRPRPLPFPRPGPPGPRPIPR	In (Bac7)	
9	RQIKIWFQNRRMKWKK	-페넨트라틴	
10	RGGGLSYSRRRFSTSTGR	트로픽 프로테그린	
11	ILPWKWPWWPWR	Ip (인돌리신)	
12	FKCRRWQWRMKKLG	Ip (L페린 B)	
13	RLSRIVVIRVSR	Ip (도데카펩티드)	

[0058] 바람직한 "리더 펩티드"는 Tat 펩티드, 타킬플레신 유도체 및 프로테그린 유도체이다. 타킬플레신 유도체 및 프로테그린 유도체가 가장 바람직하다.

[0059] 용어 "아미노산"은 L- 또는 D-아미노산, 아미노산 동족체 (예: 나프틸알라닌) 또는 천연 발생 또는 순수하게 합성 기원일 수 있는 아미노산 모사체를 의미하며, 광학적으로 순수한, 즉 단일 거울상이성체 및 따라서 키랄 분자, 또는 거울상이성체의 혼합물일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 아미노산은 광학적으로 순수하다.

[0060] 용어 "당"은 단당류, 이당류 또는 삼당류를 의미한다. 적합한 당은 글루코즈, 갈락토즈, 말토즈, 만노즈 및 락토즈를 포함한다. 임의로, 당은 아미노산에의 커플링이 용이하도록 관능화될 수 있다. 따라서, 예를 들어 아미노산의 글루코사민 유도체가 펩티드 결합을 통해 다른 아미노산에 결합될 수 있다. 아스파라긴의 글루코사민 유도체 (Novabiochem으로부터 시판됨)가 이러한 물질에 대한 하나의 예이다:



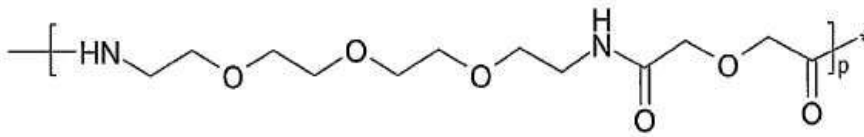
[0061]

[0062] 화학식 I에서, X^a는 바람직하게는 영상화 잔기이다. 이는 화학식 I의 링커기 -(A)_n-가 메탈로프로테이나제 억제제의 활성 부위로부터 영상화 잔기를 떼어놓는 이점을 갖는다. 이는, 영상화 잔기가 비교적 부피가 클 때 (예를 들어, 금속 착물 또는 방사성 요오드 원자) 특히 중요하며, 억제제가 카스파제 효소에 결합해도 손상되지 않는다. 이는 유연성과 함께 달성될 수 있으며 (예: 단순 알킬쇄), 부피가 큰 기가 활성 부위 및(또는) 경직부 (rigidity)로부터 떨어져서 자리를 잡는 것을 자유롭게 한다 (예: 금속 착물을 활성 부위로부터 떨어뜨리는 시클로알킬 또는 아릴 스페이서).

[0063] 또한, 링커기의 특성은 조영제의 생체분포를 변형시키는데 사용될 수 있다. 따라서, 예를 들어 링커에 에테르기를 도입하면 혈장 단백질 결합을 최소화시키는 것을 도울 수 있다. -(A)_n-가 폴리에틸렌글리콜 (PEG) 빌딩블럭 또는 1 내지 10개의 아미노산 잔기의 펩티드쇄를 포함하는 경우, 링커기는 약력학 및 조영제의 생체내 혈중 정화 속도를 변화시키는 작용을 할 수 있다. 이러한 "생물변형제" 링커기는 배경 조직, 예를 들어 근육 또는 간, 및(또는) 혈액으로부터 조영제의 정화를 가속화시킬 수 있어, 낮은 백그라운드 간섭에 의해 보다 우수한 진단 영상을 얻을 수 있다. 또한, 생물변형제 링커기는, 예를 들어 간을 통하는 것과 반대로 신장을 통해 특정한 경로의 배출을 유리하게 하는데 사용될 수도 있다.

[0064] -(A)_n-가 1 내지 10개의 아미노산 잔기의 펩티드쇄를 포함하는 경우, 아미노산 잔기는 바람직하게는 글리신, 리신, 아스파르트산, 글루탐산 또는 세린으로부터 선택된다. -(A)_n-가 PEG 잔기를 포함하는 경우, 이는 바람직하게는 화학식 IIA 또는 IIB의 단일분산 PEG-유사 구조물의 올리고머화로부터 유도된 단위를 포함한다:

화학식 IIA



[0065]

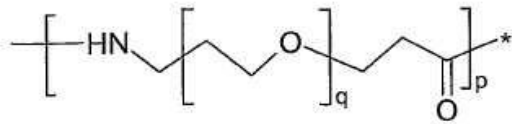
[0066]

<17-아미노-5-옥소-6-아자-3,9,12,15-테트라옥사헵타데칸산>

[0067]

상기 식에서, p는 1 내지 10의 정수이고, C-말단 단위 (*)가 영상 잔기에 연결된다. 다르게는, 화학식 IIB의 프로피온산 유도체에 기초된 PEG-유사 구조물이 사용될 수 있다:

화학식 IIB



[0068]

[0069]

상기 식에서, p는 화학식 IIA에 대해 정의된 바와 같고, q는 3 내지 15의 정수이다.

[0070]

화학식 IIB에서, p는 바람직하게는 1 또는 2이고, q는 바람직하게는 5 내지 12이다.

[0071]

링커기가 PEG 또는 펩티드쇄를 포함하지 않는 경우, 바람직한 -(A)_n-기는 2 내지 10개 원자, 가장 바람직하게는 2 내지 5개 원자, 특히 바람직하게는 2 또는 3개 원자의 -(A)_n- 잔기를 형성하는 연결된 원자의 골격쇄를 갖는다. 2개 원자의 최소 링커기 골격쇄는 상호작용이 최소화되도록 영상화 잔기를 카스파제-3 억제제로부터 잘 분리시키는 이점을 부여한다.

[0072]

비-펩티드 링커기, 예를 들어 알킬렌기 또는 아릴렌기는 결합된 카스파제-3 억제제와 유의한 수소 결합 상호작용이 없는 이점이 있으며, 링커가 억제제를 덮어 가리지 않는다. 바람직한 알킬렌 스페이서기는 -(CH₂)_q- (q = 2 내지 5)이다. 바람직한 아릴렌 스페이서는 하기 화학식의 화합물이다:



[0073]

[0074]

상기 식에서, a 및 b는 독립적으로 0, 1 또는 2이다.

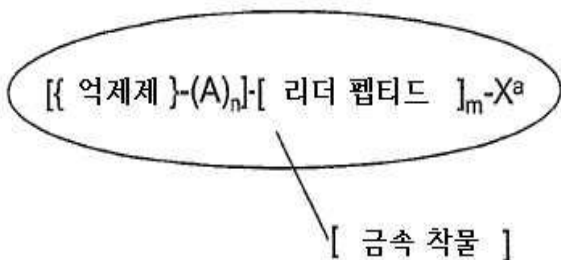
[0075]

링커기 -(A)_n-는 바람직하게는 디글리콜산 잔기, 말레이미드 잔기, 글루타르산, 숙신산, 폴리에틸렌글리콜계 단위 또는 화학식 IIA의 PEG-유사 단위를 포함한다.

[0076]

영상화 잔기가 금속 이온을 포함하는 경우, 금속 이온은 금속 착물로서 존재한다. 따라서, 금속 이온을 갖는 이러한 카스파제-3 억제제 결합체는 적합하게는 화학식 Ia의 화합물이다:

화학식 Ia



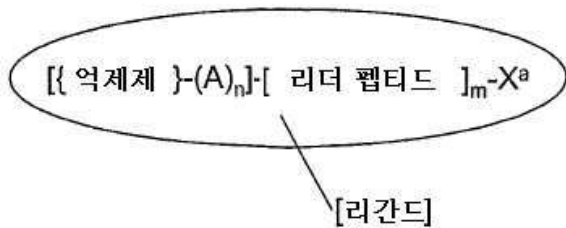
[0077]

[0078] 상기 식에서, A, n, m 및 X^a 는 상기 화학식 I에서 정의된 바와 같다.

[0079] 용어 "금속 착물"은 금속 이온과 하나 이상의 리간드와의 배위 착물을 의미한다. 금속 착물은 "트랜스킬레이팅 화에 내성", 즉 금속 배위 부위에 대해 다른 잠정적으로 경쟁하는 리간드와 쉽게 리간드 교환을 하지 않는 것이 특히 바람직하다. 잠정적으로 경쟁하는 리간드는 카스파제-3 억제제 자체와 시험관내 제제 중의 다른 부형제 (예를 들어, 제제에 사용되는 방사선 보호제 또는 항미생물 보존제) 또는 생체내 내인성 화합물 (예: 글루타티온, 트랜스페린 또는 혈장 단백질)을 포함한다. 금속 착물은 바람직하게는 링커기 $-(A)_n-$ 또는 리더 펩티드의 아미노산 잔기 중 하나의 잔기에 부착된다. 금속 착물은 가장 바람직하게는 억제제로부터 가장 멀리 떨어진 A 잔기 중 하나의 잔기에 부착되며, 링커기의 말단 A 잔기에 부착하거나 비-말단 A 잔기로부터 분지함으로써 리더 펩티드가 존재할 수 있다.

[0080] 화학식 Ia의 금속 착물은 화학식 Ib의 리간드의 결합체로부터 유도된다:

화학식 Ib



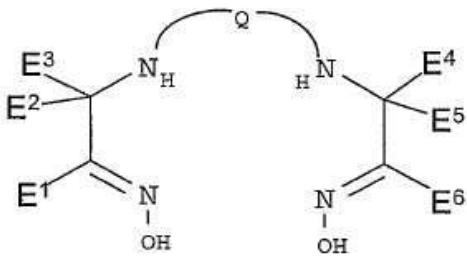
[0081] 상기 식에서, A, n, m 및 X^a 는 상기 화학식 I에서 정의된 바와 같다.

[0082] 상기 식에서, A, n, m 및 X^a 는 상기 화학식 I에서 정의된 바와 같다.

[0083] 트랜스킬레이팅화에 내성인 금속 착물을 형성하는 본 발명에 사용하기에 적합한 리간드는 킬레이팅제 [(금속 공여체 원자를 연결하는 비-배위 헤테로원자 또는 탄소 원자의 비-배위 골격을 지님으로써) 5원 또는 6원 킬레이트 환이 생기도록 2 내지 6개, 바람직하게는 2 내지 4개의 금속 공여체 원자가 배열된다]; 또는 금속 이온에 강하게 결합하는 공여체 원자를 포함하는 한자리 리간드, 예를 들어 이소니트릴, 포스핀 또는 디아제니드를 포함한다. 킬레이팅제의 일부로서 금속에 잘 결합하는 공여체 원자 유형의 예는 아민, 티올, 아마이드, 옥심 및 포스핀을 포함한다. 포스핀은 강한 금속 착물을 형성하므로 한자리 또는 두자리 포스핀이어도 적합한 금속 착물을 형성한다. 이소니트릴 및 디아제니드의 선형 기하학은 이들을 킬레이팅제로 쉽게 삽입시키지 않아 통상적으로 한자리 리간드로 사용된다. 적합한 이소니트릴의 예는 단순 알킬 이소니트릴, 예를 들어 3급-부틸이소니트릴 및 에테르-치환된 이소니트릴, 예를 들어 mibi (즉, 1-이소시아노-2-메톡시-2-메틸프로판)을 포함한다. 적합한 포스핀의 예는 테트로포스민 및 한자리 포스핀, 예를 들어 트리스(3-메톡시프로필)포스핀을 포함한다. 적합한 디아제니드의 예는 HYNIC 시리즈의 리간드, 즉 히드라진-치환된 피리딘 또는 니코틴아미드를 포함한다.

[0084] 트랜스킬레이팅화에 내성인 금속 착물을 형성하는 테크네티움에 적합한 킬레이팅제의 예는, 이로 제한됨이 없이, (i) 내지 (v)를 포함한다:

[0085] (i) 하기 화학식의 디아민디옥심:



[0086] 상기 식에서, E^1 내지 E^6 은 각각 독립적으로 R' 기이고;

[0087] 각각의 R'은 H 또는 C₁₋₁₀ 알킬, C₃₋₁₀ 알킬아릴, C₂₋₁₀ 알콕시알킬, C₁₋₁₀ 히드록시알킬, C₁₋₁₀ 플루오로알킬, C₂₋₁₀ 카르복시알킬 또는 C₁₋₁₀ 아미노알킬이거나, 2개 이상의 R'기는 이들이 부착된 원자와 함께 카르보시클릭, 헤테로

시클릭, 포화 또는 불포화 환을 형성하며, 하나 이상의 R'기는 카스파제-3 억제제에 결합되며;

[0089] Q는 화학식 $-(J)_f-$ 의 브릿지 [여기서, f는 3, 4 또는 5이고, 각각의 J는 독립적으로 -O-, -NR'- 또는 $-C(R')_2-$ 이며, 단 $-(J)_f-$ 는 -O- 또는 -NR'-인 최대 하나의 J기를 포함함]이다.

[0090] 바람직한 Q기는 하기와 같다:

[0091] $Q = -(CH_2)(CHR')(CH_2)-$, 즉 프로필렌아민 옥심 또는 PnAO 유도체;

[0092] $Q = -(CH_2)_2(CHR')(CH_2)_2-$, 즉 펜틸렌아민 옥심 또는 PentAO 유도체;

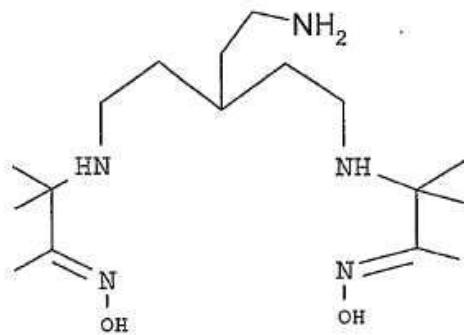
[0093] $Q = -(CH_2)_2NR'(CH_2)_2-$.

[0094] E^1 내지 E^6 은 바람직하게는 C_{1-3} 알킬, 알킬아릴, 알콕시알킬, 히드록시알킬, 플루오로알킬, 카르복시알킬 또는 아미노알킬로부터 선택된다. 가장 바람직하게는, 각각의 E^1 내지 E^6 기는 CH_3 이다.

[0095] 카스파제-3 억제제는 바람직하게는 E^1 또는 E^6 R'기, 또는 Q 잔기의 R'기에 결합된다. 가장 바람직하게는, 카스파제-3 억제제는 Q 잔기의 R'기에 결합된다. 카스파제-3 억제제가 Q 잔기의 R'기에 결합되는 경우, R'기는 바람직하게는 교두보 위치에 존재한다. 이러한 경우, Q는 바람직하게는 $-(CH_2)(CHR')(CH_2)-$, $-(CH_2)_2(CHR')(CH_2)_2-$ 또는 $-(CH_2)_2NR'(CH_2)_2-$, 가장 바람직하게는 $-(CH_2)_2(CHR')(CH_2)_2-$ 이다.

[0096] 특히 바람직한 이관능성 디아민디옥심 킬레이터는 카스파제-3 억제제가 교두보 $-CH_2CH_2NH_2$ 기를 통해 결합되는 킬레이터 1이다:

[0097] <킬레이터 1>



[0098]

[0099] (ii) 티올트리아미드 공여체 세트, 예를 들어 MAG₃ (머캅토아세틸트리아글리신) 및 관련 리간드를 갖거나, 디아미드피리딘티올 공여체 세트, 예를 들어 Pica를 갖는 N₃S 리간드.

[0100] (iii) 디아민디티올 공여체 세트, 예를 들어 BAT 또는 ECD (즉, 에틸시스테이네이트 이량체), 또는 아미드아민디티올 공여체 세트, 예를 들어 MAMA를 갖는 N₂S₂ 리간드.

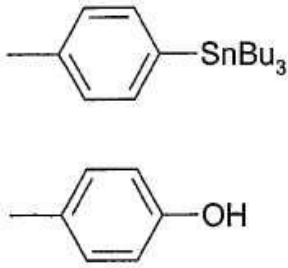
[0101] (iv) 개방쇄인 N₄ 리간드 또는 테트라아민, 아미드트리아민 또는 디아미드디아민 공여체 세트, 예를 들어 사이클람, 모노옥소사이클람 또는 디옥소사이클람을 갖는 마크로시클릭 리간드.

[0102] (v) 디아민디페놀 공여체 세트를 갖는 N₂O₂ 리간드.

[0103] 상술된 리간드는 특히 테크네튬, 예를 들어 ^{94m}Tc 또는 ^{99m}Tc를 착화하는데 특히 적합하며, 문헌 [Jurisson et al., Chem. Rev., 99, 2205-2218 (1999)]에 보다 충분히 기술되어 있다. 또한, 리간드는 기타 금속, 예를 들어 구리 (⁶⁴Cu 또는 ⁶⁷Cu), 바나듐 (예: ⁴⁸V), 철 (예: ⁵²Fe) 또는 코발트 (예: ⁵⁵Co)에 유용하다. 기타 적합한 리간드는 문헌 [Sandoz, WO 91/01144]에 기술되어 있으며, 인듐, 이트륨 및 가돌리늄에 특히 적합한 리간드, 특히 마크로시클릭 아미노카르복실레이트 및 아미노포스폰산 리간드를 포함한다. 가돌리늄의 비-이온성 (즉, 중성) 금속 착물을 형성하는 리간드가 US 특허 4885363에 기술되어 있다. 방사금속 이온이 테크네튬인 경우, 리

간드는 바람직하게는 네자리인 킬레이팅제이다. 테크네튬에 바람직한 킬레이팅제는 디아민디옥심 또는 상술한 바와 같이 N₂S₂ 또는 N₃S 공여체 세트를 갖는 것이다.

[0104] 영상화 잔기가 방사성 할로젠, 예를 들어 요오드인 경우, 카스파제-3 억제제는 적합하게는 비-방사성 전구체 할로젠 원자, 예를 들어 아릴 요오다이드 또는 브로마이드 (방사성 요오드 교체를 가능하게 하기 위함); 활성화된 전구체 아릴 환 (예: 페놀기); 유기금속성 전구체 화합물 (예: 트리알킬스탄난 또는 트리알킬실릴); 또는 유기 전구체, 예를 들어 트리아젠 또는 친핵성 치환을 위한 적합한 이탈기, 예를 들어 요오도늄 염을 포함하도록 선택된다. 방사성 할로젠 (¹²³I 및 ¹⁸F를 포함)의 도입 방법은 문헌 [Bolton, J. Lab. Comp. Radiopharm., 45, 485-528 (2002)]에 기술되어 있다. 방사성 할로젠, 특히 요오드가 부착될 수 있는 적합한 전구체 아릴기의 예는 다음과 같다:



[0105] [0106] 2개의 화합물 모두 방향족 환으로 용이한 방사성 요오드 치환을 가능하게 하는 치환체를 포함한다. 방사성 요오드를 포함하는 다른 치환체는 하기에 예시한 바와 같이 방사성 할로젠 교환을 통한 직접적 요오드화에 의해 합성될 수 있다:

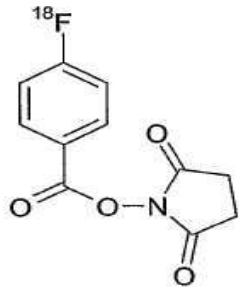


[0107] [0108] 영상화 잔기가 요오드의 방사성 동위원소인 경우, 방사성 요오드 원자는 바람직하게는 직접적 공유 결합을 통해 방향족 환, 예를 들어 벤젠 환, 또는 포화된 지방족 시스템에 결합된 요오드 원자가 생체내 대사되어 방사성 요오드를 상실하기 쉬운 것으로 공지되어 있으므로 비닐기에 부착된다.

[0109] 영상화 잔기가 불소의 방사성 동위원소 (예: ¹⁸F)를 포함하는 경우, 방사성 할로젠화는 ¹⁸F-플루오라이드를 적당한 이탈기를 갖는 적합한 전구체, 예를 들어 알킬 브로마이드, 알킬 메실레이트 또는 알킬 토실레이트와 반응시키는 직접적 표지화에 의해 수행될 수 있다. 또한, ¹⁸F는 아민 전구체를 알킬화제, 예를 들어 ¹⁸F(CH₂)₃OMs (Ms = 메실레이트)로 N-알킬화시켜 N-(CH₂)₃¹⁸F를 획득하거나, 히드록실기를 ¹⁸F(CH₂)₃OMs 또는 ¹⁸F(CH₂)₃Br로 O-알킬화시켜 도입시킬 수 있다. 또한, ¹⁸F는 N-할로아세틸기를 ¹⁸F(CH₂)₃OH 반응물로 알킬화시켜 ¹⁸F(CH₂)₃OH 유도체를 획득하도록도 도입시킬 수 있다. 아릴 시스템에 대해서, 아릴 디아조늄 염, 아릴 니트로 화합물 또는 아릴 4급 암모늄 염으로부터의 ¹⁸F-플루오라이드 친핵성 치환이 아릴-¹⁸F 유도체에 적합한 경로이다.

[0110] 또한, 1급 아민-함유 카스파제-3 억제제는, 문헌 [Kahn et al., J. Lab. Comp. Radiopharm. 45, 1045-1053 (2002); 및 Borch et al., J. Am. Chem. Soc. 93, 2897 (1971)]에서 교시되는 바와 같이, ¹⁸F-C₆H₄-CHO를 사용하여 환원적 아미노화시켜 ¹⁸F로 표지될 수 있다. 또한, 이러한 접근은 통상적으로 아릴 1급 아민, 예를 들어 페닐-NH₂ 또는 페닐-CH₂NH₂기를 포함하는 화합물에 적용될 수 있다. 할로알킬케톤 관능기를 포함하지 않는 펩티드계 억제제에 있어서, 이러한 접근은 문헌 [Poethko et al., J. Nuc. Med., 45, 892-902 (2004)]에서 교시되는 바와 같이 펩티드의 아미노옥시 유도체에 적용될 수 있다.

[0111] 또한, 아민-함유 카스파제-3 억제제는 아마이드 결합 연결된 생성물을 획득하기 위해 하기 에스테르와 같은 ¹⁸F-표지된 활성 에스테르와 반응시켜 ¹⁸F로 표지될 수 있다:



[0112]

[0113] N-히드록시숙신이מיד 에스테르 및 펩티드를 표지하기 위한 이의 사용이 문헌 [Vaidyanathan et al., Nucl. Med. Biol., 19(3), 275-281 (1992); 및 Johnstrom et al., Clin. Sci., 103 (Suppl. 48), 45-85 (2002)]에서 교시된다. ¹⁸F-표지된 유도체의 합성 경로에 대한 추가의 설명이 문헌 [Bolton, J. Lab. Comp. Radiopharm., 45, 485-528 (2002)]에 기술되어 있다.

[0114] 최대의 생체내 민감성을 위해, 영상화 잔기는 방사성 원소를 포함하는 것이 가장 바람직하다. 영상화 잔기는 바람직하게는 양전자-방출 또는 감마선-방출 방사성 동위원소를 포함한다.

[0115] 본 발명의 합성 카스파제-3 억제제는 바람직하게는 하기로부터 선택된다:

[0116] (i) 화학식 III의 테트라펩티드 유도체:

화학식 III

[0117] Z^1 -Asp-Xaa1-Xaa2-Asp- X^1

[0118] (상기 식에서,

[0119] Z^1 은 테트라펩티드의 N-말단에 부착된 대사 억제기이고;

[0120] Xaa1 및 Xaa2는 독립적으로 임의의 아미노산이고;

[0121] Asp는 아스파르트산에 대한 통상의 3문자 약어이고;

[0122] X^1 은 테트라펩티드의 카르복시 말단에 부착된 $-R^1$ 기 또는 $-CH_2OR^2$ 기이고;

[0123] R^1 은 H, $-CH_2F$, $-CH_2Cl$, C_{1-5} 알킬, C_{1-5} 알콕시 또는 $-(CH_2)_qAr^1$ [여기서, q는 1 내지 6의 정수이고, Ar^1 은 C_{6-12} 아릴, C_{5-12} 알킬-아릴, C_{5-12} 플루오로-치환된 아릴 또는 C_{3-12} 헤테로아릴임]이고;

[0124] R^2 는 C_{1-5} 알킬, C_{1-10} 아실 또는 Ar^1 임);

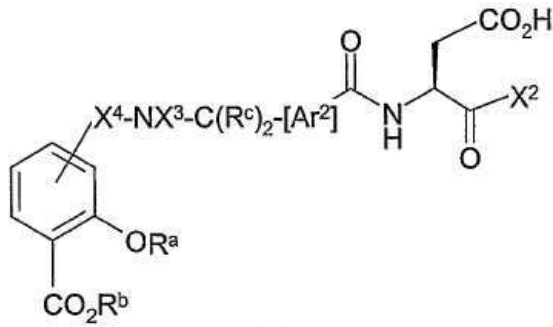
[0125] (ii) 퀴나졸린 또는 아닐리노퀴나졸린;

[0126] (iii) 2-옥신돌 술폰아미드;

[0127] (iv) 옥소아제피노인돌린;

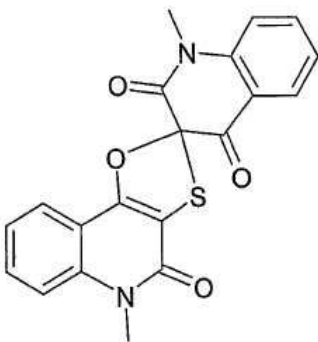
[0128] (v) 화학식 IV의 화합물:

화학식 IV



- [0129]
- [0130] (상기 식에서,
- [0131] X^2 는 H, C₁₋₅ 알킬 또는 $-(CH_2)_r-(S)_s-(CH_2)_tAr^3$ [여기서, r 및 t는 0 내지 6의 값을 갖는 정수이고, s는 0 또는 1이며, Ar³는 C₆₋₁₂ 아릴, C₅₋₁₂ 알킬-치환된 아릴, C₅₋₁₂ 할로-치환된 아릴 또는 C₃₋₁₂ 헤테로아릴임]이고;
- [0132] Ar²는 C₆₋₁₂ 아릴 또는 C₃₋₁₂ 헤테로아릴이고;
- [0133] X³는 R^b기이고;
- [0134] X⁴는 -SO₂- 또는 -CR₂-이고;
- [0135] R^a는 H, C₁₋₅ 알킬 또는 P^{GP}이며, 이때의 P^{GP}는 보호기이고;
- [0136] R^b는 R^a기 또는 C₁₋₅ 아실이며;
- [0137] R^c는 각각 독립적으로 H 또는 C₁₋₅ 알킬임);
- [0138] (vi) 화학식 V의 화합물:

화학식 V



- [0139]
- [0140] (vii) 피라지논;
- [0141] (viii) 화학식 VI의 디펩티드:

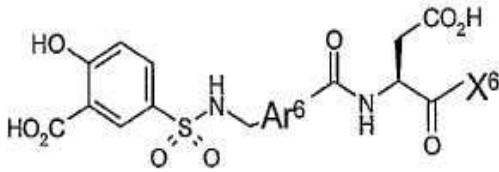
화학식 VI

- [0142] Z¹-Val-Asp-CH₂-S-R¹
- [0143] (상기 식에서, -CH₂-S-R¹기는 디펩티드의 카르복시 말단에 부착되고, Z¹ 및 R¹은 화학식 III에 대해 정의된 바와

같음);

[0144] (ix) 화학식 XI의 살리실산 술폰아미드:

화학식 XI



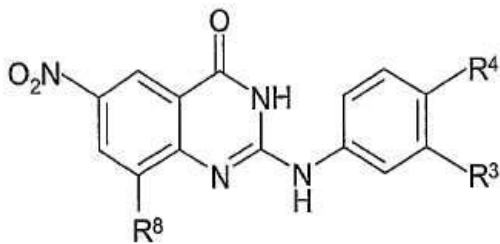
- [0145]
- [0146] (상기 식에서, Ar⁶은 5원 또는 6원의 C₄₋₆ 아릴 또는 헤테로아릴 환이고, X⁶은 H 또는 -CH₂SR²이며, 이때의 R²는 상기 정의된 바와 같음).
- [0147] 용어 "아미노산"은 상기 정의한 바와 같다.
- [0148] 화학식 III의 펩티드 알데히드 (X¹= R¹ = H), 케톤 [X¹ = R¹ = C₁₋₅ 알킬 또는 -(CH₂)₆Ar¹] 또는 펜옥시메틸케톤 (X¹= -CH₂OR² 및 R² = Ar¹ = 페닐) 억제제는 가역적 카스파제 억제제인 반면, 클로로메틸 및 플루오로메틸 유도체 (X¹= R¹ = -CH₂F 또는 -CH₂Cl) 및 아실옥시메틸케톤 (X¹= -CH₂OR² 및 R² = C₁₋₁₀ 아실)은 비가역적 억제제이다. 할로메틸케톤 펩티드는 카스파제-3의 시스템인 티올에 결합하여 티오메틸 케톤을 형성하고 효소를 비가역적으로 불활성화시키는 것으로 믿어진다. 상기된 바와 같이, 이러한 비가역적 억제제가 바람직하다. 따라서, 화학식 III의 X¹은 바람직하게는 -CH₂F 또는 -CH₂OR²(R² = C₁₋₁₀ 아실)이다. R²가 C₁₋₁₀ 아실인 경우, 바람직한 아실기는 2,6-이치환된 벤조일, 예를 들어 (2,6-디메틸페닐)(C=O)- 또는 [2,6-비스(트리플루오로메틸)페닐](C=O)이다.
- [0149] 용어 "대사 억제기" (Z¹)는 펩티드 또는 아미노 말단에 있는 아미노산의 생체내 대사를 억제 또는 저지하는 생체 적합성 기를 의미한다. 이러한 기는 당업자에게 널리 공지되어 있으며, 펩티드 아민 말단을 위해 아세틸, Boc (Boc = 3급-부틸옥시카보닐), Fmoc (Fmoc = 플루오레닐메톡시카보닐), 벤질옥시카보닐, 트리플루오로아세틸, 알릴옥시카보닐, Dde [즉, 1-(4,4-디메틸-2,6-디옥소시클로헥실리덴) 에틸] 또는 Npys (즉, 3-니트로-2-피리딘 술페닐) 중에서 적합하게 선택된다. 펩티드 N-말단을 위한 바람직한 대사 억제기는 아세틸이다.
- [0150] 화학식 III에서, Xaa1 및 Xaa2는 가장 바람직하게는 모든 L-아미노산이다. Xaa1-Xaa2는 바람직하게는 Glu-Val 또는 Gln-Met이어서, 화학식 III의 바람직한 화합물은 Z¹-Asp-Glu-Val-Asp-X¹ 또는 Z¹-Asp-Gln-Met-Asp-X¹ (즉, Z¹-DEVD-X¹ 또는 Z¹-DQMD-X¹)이다.
- [0151] 화학식 III에서, 아스파틸 및 글루타밀 측쇄의 카르복시기는 바람직하게는 카스파제-3 억제제가 강력하도록 유리 카르복실레이트로 존재한다. 그러나, 카르복시기는 또한 세포 투과성을 증진시키도록 에스테르, 예를 들어 메틸 에스테르로서 존재할 수도 있다. 이어서, 에스테르는 비-괴사성 세포에 존재하는 에스테라제에 의해 탈보호된다. 화학식 III에 대해, 영상화 잔기는 바람직하게는 Z¹ 또는 X¹ 위치에 부착된다. 영상화 잔기가 금속을 포함하는 경우, 화학식 III의 펩티드의 펩티드 아민 또는 카르복실 말단의 대사 억제는 바람직하게는 한쪽 말단 또는 양쪽 말단을 금속의 금속 착물에 부착시킴으로써 달성된다.
- [0152] 용어 "보호기" (P^{RP})는 바람직하지 않은 화학 반응은 억제 또는 저지하나 분자의 나머지를 변형시키지 않는 적당한 조건 하에서 문제의 관능기로부터 절단될 수 있게 충분히 반응적으로 고안된 기를 의미한다. 탈보호 후, 목적하는 생성물이 얻어진다. 보호기는 당업자에게 널리 공지되어 있으며, 아민기에 대해서는 Boc (Boc = 3급-부틸옥시카보닐), Fmoc (Fmoc = 플루오로메톡시카보닐), 트리플루오로아세틸, 알릴옥시카보닐, Dde [즉, 1-(4,4-디메틸-2,6-디옥소시클로헥실리덴) 에틸] 또는 Npys (즉, 3-니트로-2-피리딘 술페닐), 카르복실기에 대해서는 메틸 에스테르, 3급-부틸 에스테르 또는 벤질 에스테르 중에서 적합하게 선택된다. 히드록실기에 대해 적합한 보호기는 벤질, 아세틸, 벤조일, 트리틸 (Trt) 또는 트리알킬실릴, 예를 들어 테트라부틸디메틸실릴이다. 티올기에 대해서 적합한 보호기는 트리틸 및 4-메톡시벤질이다. 추가의 보호기의 사용이 문헌 [Protective

Groups in Organic Synthesis', Theodorora W. Greene and Peter G. M. Wuts, (Third Edition, John Wiley & Sons, 1999)]에 기술되어 있다.

[0153] 화학식 III의 카스파제-3 억제제 중 일부가 시판되며, 예를 들어 Ac-DEVD CHO, Ac-AAVALLPAVLLALLAP-DEVD-CHO, Z-DEVD-FMK, 및 Ac-DEVD CMK는 Calbiochem으로부터 VWR INTERNATIONAL LTD (Hunter Boulevard, Magna Park, Luttermouth LE17 4XN UNITED KINGDOM)을 통해 구입할 수 있다. 기타의 것들은 문헌 [Thornberry et al., J. Biol. Chem., 272 (29), 17907-17911 (1997); ibid, 273 (49), 32608-32613 (1998)]에 기술된 바와 같이 제조될 수 있다. 또한, 본 발명의 펩티드-함유 카스파제-3 억제제 및 리더 펩티드는 문헌 [P. Lloyd-Williams, F. Albericio and E. Girald; Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, CRC Press, 1997]에 기술된 바와 같이 통상의 고체상 합성법으로 수득될 수 있다.

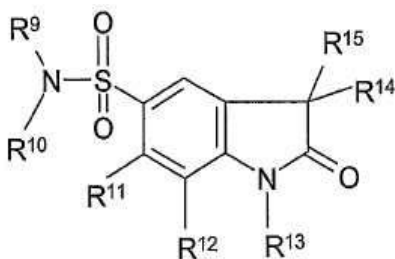
[0154] 퀴나졸린 또는 아닐리노퀴나졸린 카스파제-3 억제제는 문헌 [Scott et al., J. Pharmacol. Exper. Ther., 304(1), 433-440 (2003)]에 기술되어 있다. 바람직한 화합물은 화학식 VII의 화합물이다:

화학식 VII



[0155] 상기 식에서,
 [0156] R³는 H 또는 Cl이고;
 [0157] R⁴는 Cl 또는 F이며;
 [0158] R⁸은 -CONH-X⁵ 또는 -CH=CH-Ar⁴ [여기서, X⁵는 C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐 또는 -(CH₂)_sAr⁴이고, s는 0 또는 1이며, Ar⁴는 -C₆H₅X⁶이며, X⁶은 Hal, CF₃ 또는 -SO₂NR⁶R⁷이고, R⁶ 및 R⁷은 독립적으로 C₁₋₃ 알킬이거나 함께 C₅₋₇ 시클로알킬 환을 형성할 수 있음]이다.
 [0159] R⁸은 바람직하게는 -CONH-X⁵ [여기서, X⁵는 -(CH₂)_sAr⁴임]이다. X⁶은 바람직하게는 F, CF₃ 또는 -SO₂NC₆H₁₀이다.
 [0160] 본 발명의 바람직한 2-옥신돌 술폰아미드 유도체는 화학식 VIII의 화합물이다:

화학식 VIII



[0162] 상기 식에서,
 [0163] R⁹은 H 또는 C₁₋₄ 알킬이고;
 [0164] R¹⁰은 C₁₋₁₀ 알킬, 아릴 C₁₋₄ 알킬, 헤테로아릴 C₁₋₄ 알킬, C₃₋₇ 시클로알킬이거나, R⁹ 및 R¹⁰은 이들이 부착된 질소 원자와 함께 O, N 또는 S로부터 선택되는 추가의 헤테로원자를 임의로 포함할 수 있는 3원 내지 10원 환을 형성

하며;

[0166] R¹¹ 및 R¹²는 독립적으로 H, C₁₋₆ 알킬, NO₂ 또는 Hal 이고;

[0167] R¹³은 H, C₁₋₆ 알킬, C₆₋₁₂ 아릴알킬 또는 C₃₋₁₂ 헤테로아릴알킬이며;

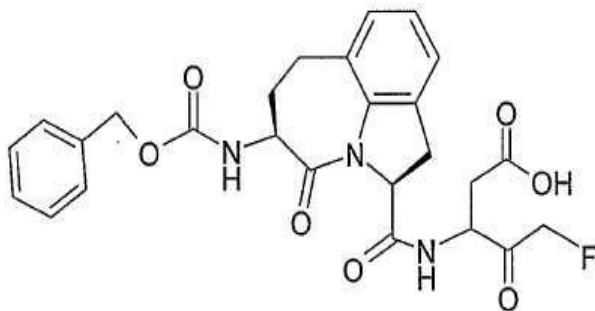
[0168] R¹⁴ 및 R¹⁵은 Cl이거나 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 C=O 카보닐기를 형성한다.

[0169] 화학식 VIII에서, R¹⁴ 및 R¹⁵은 바람직하게는 함께 C=O인, 이사틴 유도체이다. R¹³은 바람직하게는 H 또는 CH₃이다. R⁹ 및 R¹⁰은 바람직하게는 C₄₋₆ 시클로알킬, 가장 바람직하게는 C₅ 시클로알킬이다. R⁹ 및 R¹⁰이 C₄₋₆ 시클로알킬인 경우, 시클로알킬 환은 바람직하게는 X⁷기로 치환되며, X⁷은 -CH₂OR¹⁶ 또는 -CH₂NHR¹⁶이고, R¹⁶은 C₁₋₃ 알킬 또는 C₄₋₇ 아릴이다. 화학식 VIII의 2-옥신돌 술폰아미드 유도체는 문헌 [Lee et al., J. Biol. Chem., 275, 16007-16014 (2000)]에 기술된 바와 같이 제조될 수 있다.

[0170] 영상화 잔기는 바람직하게는 화학식 VIII의 억제제의 R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹² 또는 R¹³ 치환체에 부착되며, 가장 바람직하게는 R⁹, R¹⁰ 또는 R¹³ 치환체에 부착된다. ¹⁸F 표지화를 위해, R¹³은 4-¹⁸F-벤즈알데히드 이민 경로 (상술됨)를 위해 -CH₂ONH₂이거나 ¹⁸F-(CH₂)₃Br 또는 ¹⁸F-(CH₂)₃OTs 타입 O-알킬화제로 표지하기 위해 -CH₂OH이도록 선택된다. 달리, R¹³은 H이도록 선택되어 직접적 N-알킬화로 목적하는 ¹⁸F 유도체를 생성한다.

[0171] 본 발명의 바람직한 옥소아제피노인돌린은 화학식 IX의 IDN5370이다:

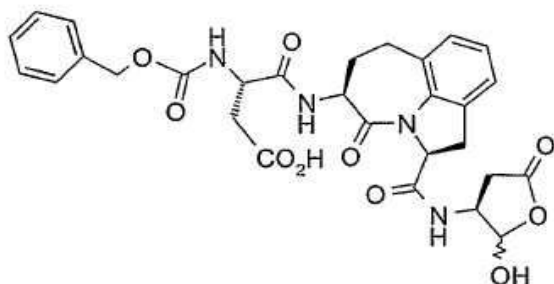
화학식 IX



[0172]

[0173] 가장 바람직한 옥소아제피노인돌린은 인둔 A (Indun A)이다:

[0174] <인둔 A>

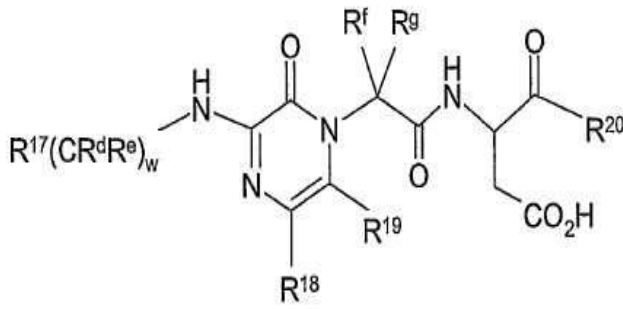


[0175]

[0176] 본 발명의 옥소아제피노인돌린은 문헌 [Deckwerth et al., Drug Devel. Res., 52, 579-586 (2001)] 및 WO 98/11109에 기술되어 있다.

[0177] 본 발명의 피라지논은 적합하게는 화학식 X의 화합물이다:

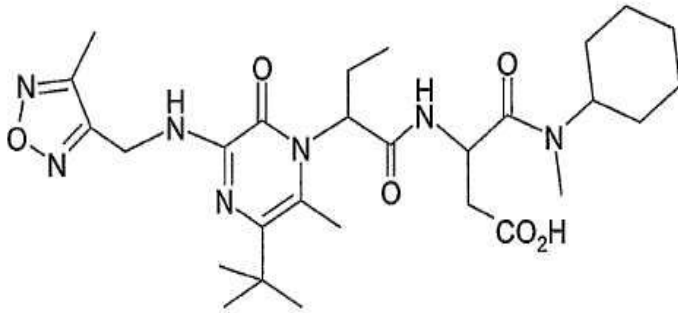
화학식 X



- [0178]
- [0179] 상기 식에서,
- [0180] R^{17} 은 OH, NH_2 , NHR^i , $N(R^i)_2$, R^i , C_{1-6} 알콕시, Ar^5 , Het^1 , $X^8(CO)-$, X^8SO- 또는 X^8SO_2- 이고, 여기에서
- [0181] R^i 는 각각 독립적으로, OH, Hal, CO_2H , CF_3 , NH_2 , $NHCH_3$, $N(CH_3)_2$, Ar^5 및 C_{1-4} 아실로부터 선택되는 1 내지 3개의 치환체에 의해 임의로 치환될 수 있는, C_{1-6} 알킬이며,
- [0182] Ar^5 는, 1 내지 3개의 OH, Hal, CO_2H , CF_3 , NH_2 , $NHCH_3$, $N(CH_3)_2$, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, Het^1 또는 C_{1-4} 아실 치환체로 임의로 치환될 수 있는, C_{6-14} 방향족 환이고,
- [0183] X^8 은 R^i , Ar^5 또는 Het^1 이며,
- [0184] Het^1 은, 1 또는 2개의 옥소기 및 C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, C_{1-4} 아실 및 CF_3 으로부터 선택되는 1 내지 3개의 기로 임의로 치환될 수 있는, O, S 및 N으로부터 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5원 내지 15원의 헤테로시클릭 또는 헤테로아릴 환이고;
- [0185] R^{18} 은 H, C_{1-20} 알킬, Ar^5 또는 Het^1 이고;
- [0186] R^{19} 은 H, Hal 또는 C_{1-6} 알킬이고;
- [0187] R^{20} 는 H, C_{1-6} 알킬, Ar^5 , Het^1 , $-(CH_2)_zSR^i$, $-(CH_2)_zOR^i$, $-(CH_2)_zOC(O)R^j$ 또는 $-(CH_2)_zNR^{21}R^{22}$ 이며, 여기에서
- [0188] z는 1, 2 또는 3이고,
- [0189] R^j 는 C_{1-8} 알킬, Ar^5 또는 Het^1 이며,
- [0190] R^{21} 및 R^{22} 는 독립적으로 H, R^i , Ar^5 또는 Het^1 이거나 R^{21} 및 R^{22} 는 이들이 부착된 질소 원자와 함께, 1 또는 2개의 옥소기 및 C_{1-4} 알킬, Het^1 , C_{1-4} 카르복시, C_{1-4} 아실 및 C_{1-6} 카르복사미드로부터 선택되는 1 내지 3개의 기로 임의로 치환될 수 있는, O, S 및 N으로부터 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 3원 내지 10원의 환 시스템을 형성하고;
- [0191] R^d 및 R^e 는 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬 또는 Ar^5 이거나, 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 O, S 및 NR^{23} 으로부터 선택되는 하나의 헤테로원자를 임의로 포함하는 3원 내지 7원의 비방향족 치환체 또는 헤테로시클릭 환을 형성하며, 여기에서 R^{23} 은 H, C_{1-4} 알킬 또는 C_{1-4} 아실이고;
- [0192] R^f 및 R^g 는 독립적으로 H, Ar^5 , C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시알킬 또는 C_{5-7} 시클로알킬이며;
- [0193] w는 0 내지 6의 정수이다.

[0194] 카스파제-3에 대해 선택적인 바람직한 피라지논은 L-826,791 또는 M-826이다 [Hotchkiss et al., Nature Immunol., 1(6), 496-501 (2000)]:

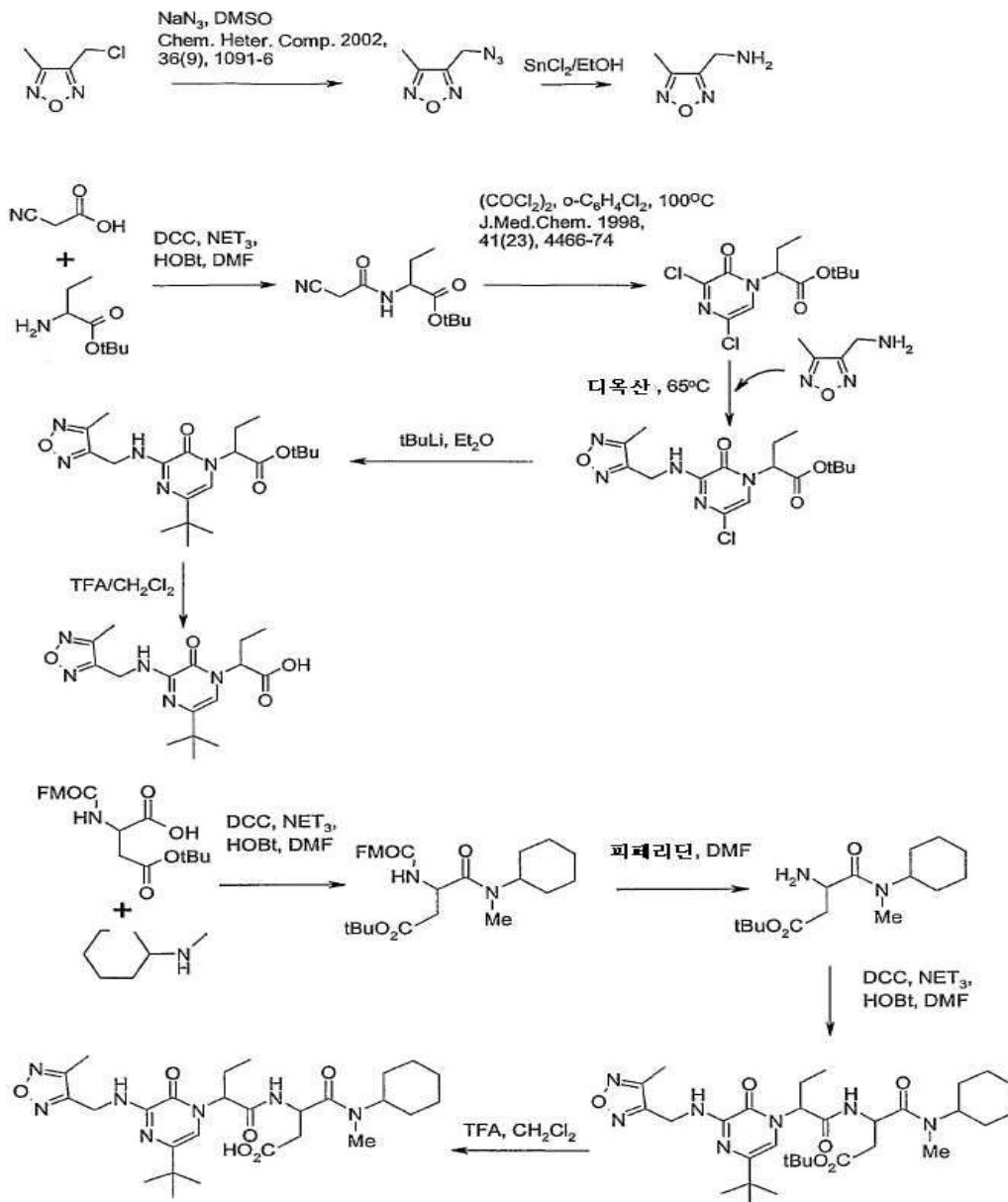
[0195] <MF-826>



[0196]

[0197] 본 발명의 피라지논은 카스파제-3 억제제의 합성법은 미국 특허 6,444,811에 기술되어 있으며, 반응식 1에 나타나 있다. 출발 물질은 시판되는 디메틸글리옥심이다.

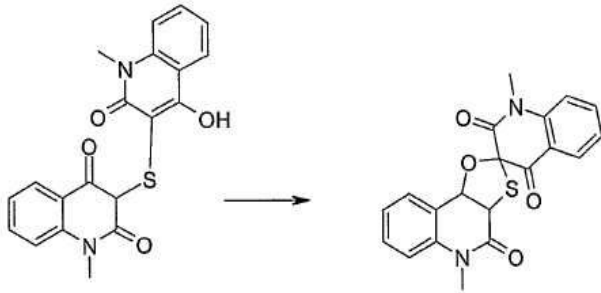
반응식 1



[0198]

[0199] 화학식 V의 화합물은 WO 03/024955에 기술된 바와 같이 제조될 수 있다. 화학식 VI의 화합물은 반응식 2에 나타난 바와 같이 제조될 수 있다:

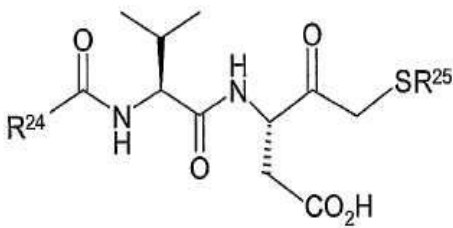
반응식 2



[0200]

[0201] 화학식 VI의 디펩티드 억제제는 아스파틸 케톤이며, 문헌 [Han et al, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004, 14, 805-808]에 기술되어 있다. 이들 억제제는 강력하며 선택적인 카스파제-3 억제제이다. 화학식 VI에 대해, 영상화 잔기는 바람직하게는 Z¹ 또는 X¹ 위치에 부착된다. 화학식 VI의 바람직한 카스파제-3 억제제는 화학식 VIa의 화합물이다:

화학식 VIa



[0202]

[0203] 상기 식에서,

[0204] R²⁴는 C₆₋₁₂ 아릴 또는 C₆₋₁₂ 헤테로아릴이고;

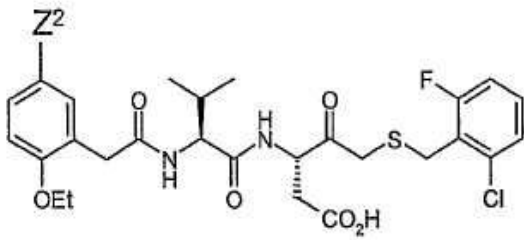
[0205] R²⁵는 C₁₋₄ 알킬 또는 벤질이며, 이때의 벤질기의 페닐 환은 1 또는 2개의 할로젠 원자로 임의로 치환된다.

[0206] R²⁴는 바람직하게는 벤질기의 페닐 환이 할로젠, C₁₋₃ 알콕시; C₁₋₃ 카르복실 또는 C₂₋₄ 카르복시에스테르기로 치환된 C₁₋₃ 알콕시; C₁₋₃ 아실; C₂₋₄ 알케닐 또는 C₁₋₃ 알킬술폰닐로부터 선택되는 1 또는 2개의 기로 임의로 치환되는 벤질기이다.

[0207] R²⁵는 바람직하게는 벤질기 또는 2-클로로-5-플루오로-벤질기이다.

[0208] 화학식 VI의 특히 바람직한 억제제는 R¹에 치환된 2-클로로-6-플루오로벤질기 및 Z¹에 2,5-이치환된 벤질카보닐을 포함한다. 이러한 억제제는 화학식 VIb의 화합물이다:

화학식 VIb



억제제	Z^2
6A	OCH ₂ CO ₂ Me
6A'	OCH ₂ CO ₂ H
6B	OCH ₂ CO ₂ iPr
6C	SO ₂ Me

[0209]

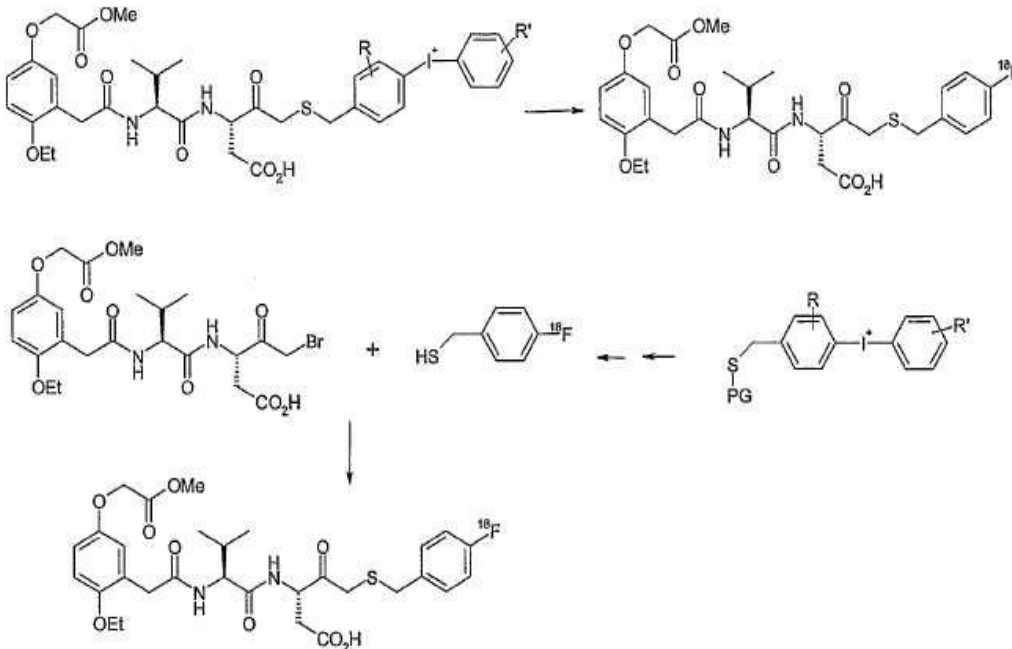
[0210]

억제제 6A, 6A', 6B 및 6C의 카스파제-3에 대한 IC₅₀은 낮은 나노몰 범위이다 [Han et al Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004, 14, 805-808]]. 에스테르 유도체 6A 및 6B는 보다 강력한 산 6A'로 세포내에서 가수분해된다.

[0211]

화학식 VI의 화합물 및 이에 기초된 가장 바람직한 강력한 카스파제-3 억제제의 합성은 문헌 [Han et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 14(3), 805-808 (2004)]에 기술되어 있다. 영상화 잔기는 바람직하게는 화학식 VIb의 페닐 환 중 어느 한 쪽에 부착되며, 가장 바람직하게는 Z² 위치에 부착된다. ¹⁸F 표지가 반응식 3에 나타낸 바와 같이 도입될 수 있는 것으로 예상된다:

반응식 3

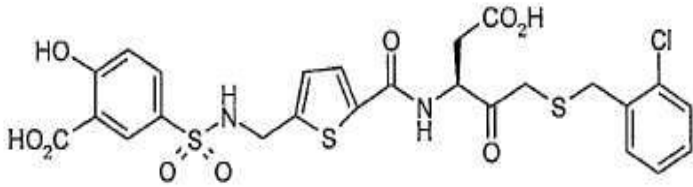


[0212]

[0213]

화학식 XI의 억제제는 문헌 [Choong et al., J. Med. Chem. 45, 5005-5022 (2002); Erlanson et al., Nature Biotech., 21, 308-314 (2003); 및 WO 03/024955]의 방법으로 제조될 수 있다. 화학식 XI의 바람직한 억제제는 페닐, 티오펜 또는 피리딘, 특히 티오펜으로부터 선택되는 Ar⁶를 갖는다. 화학식 XI에서, X⁶은 바람직하게는 -CH₂SAr⁷이고, Ar⁷은 할로젠-치환된 페닐 환이다. 화학식 XI의 바람직한 억제제는 화학식 XIa의 화합물이다:

화학식 XIa



- [0214]
- [0215] 본 발명의 바람직한 카스파제-3 억제제는 화학식 III의 테트라펩티드, 화학식 VI의 디펩티드 또는 화학식 VIII의 2-옥신돌 술폰아미드이다. 가장 바람직한 억제제는 화학식 III의 테트라펩티드 및 화학식 VI의 디펩티드이다.
- [0216] 본 발명의 조영제가 방사성 또는 상자성 금속 이온을 포함하는 경우, 금속 이온은 적합하게는 금속 착물로서 존재한다. 이러한 금속 착물은 적합하게는 화학식 Ia의 결합체를 적합한 금속 이온과 반응시켜 제조된다. 화학식 Ia의 카스파제-3 억제제의 리간드-결합체 또는 킬레이터-결합체는 이관능성 킬레이트 접근법을 통해 제조될 수 있다. 따라서, 관능기를 이에 부착시킨 리간드 또는 킬레이팅제 (각각 "이관능성 링커" 또는 "이관능성 킬레이트")를 제조하는 것이 널리 공지되어 있다. 부착된 관능기는 아민, 티오시아네이트, 말레이미드 및 활성 에스테르, 예를 들어 N-히드록시숙시이미드 또는 펜타플루오로페놀을 포함한다. 본 발명의 킬레이터 1은 아민-관능화된 이관능성 킬레이트의 예이다. 이러한 이관능성 킬레이트는 카스파제-3 억제제 상의 적합한 관능기와 반응하여 목적하는 결합체를 형성할 수 있다. 카스파제-3 억제제 상의 이러한 적합한 관능기는 카르복실 (아민-관능화된 이관능성 킬레이터와 아마이드 결합 형성을 위함); 아민 (카르복실- 또는 활성 에스테르-관능화된 이관능성 킬레이터와 아마이드 결합을 형성하기 위함); 할로젠, 메실레이트 및 토실레이트 (아민-관능화된 이관능성 킬레이터의 N-알킬화를 위함) 및 티올 (말레이미드-관능화된 이관능성 킬레이터와 반응하기 위함)을 포함한다.
- [0217] 본 발명의 방사성 금속 착물은 적합한 산화 상태의 방사성 금속의 용액을 적합한 pH에서 화학식 Ia의 리간드 결합체와 반응시켜 제조될 수 있다. 상기 용액은 바람직하게는 금속에 약하게 착화되는 리간드 (예: 글루코네이트 또는 시트레이트)를 포함할 수 있으며, 방사성 금속 착물은 리간드 교환 또는 트랜스킬레이팅화에 의해 제조된다. 이러한 조건은 바람직하지 않은 부작용, 예를 들어 금속 이온의 가수분해를 억제하는데 유용하다. 방사성 금속 이온이 ^{99m}Tc인 경우, 통상의 출발 물질은 ⁹⁹Mo 생성자로부터의 나트륨 퍼테크네이트이다. 테크네튬은 비교적 비반응성인 Tc(VII) 산화 상태로 ^{99m}Tc-퍼테크네이트에 존재한다. 따라서, 낮은 산화 상태 Tc(I) 내지 Tc(V)의 테크네튬 착물의 제조는 통상적으로 착화를 용이하게 하기 위해 적합한 제약학적으로 허용되는 환원제, 예를 들어 나트륨 디티오나이트, 중아황산나트륨, 아스코르브산, 포름아미딘 술폰산, 주석 이온, Fe(II) 또는 Cu(I)를 첨가하는 것을 필요로 한다. 제약학적으로 허용되는 환원제는 바람직하게는 주석 염, 가장 바람직하게는 염화주석, 불화주석 또는 주석 타르트레이트이다.
- [0218] 영상화 잔기가 과분극화된 NMR-활성 핵, 예를 들어 과분극화된 ¹³C 원자인 경우, 목적하는 과분극화된 화합물은 과분극화된 기체 (예: ¹²⁹Xe 또는 ³He)로부터 적합한 ¹³C-농축된 카스파제-3 억제제로의 분극화 교환에 의해 제조될 수 있다.
- [0219] 제2 측면에서, 본 발명은 생체적합성 담체와 함께 상기 기술된 바와 같은 조영제를 포함하는 포유동물 투여에 적합한 형태의 제약 조성물을 제공한다. "생체적합성 담체"는 조영제가 현탁되거나 용해될 수 있는 유체, 특히 액체이며, 조성물은 생리학적으로 허용되고, 독성 또는 지나친 고통 없이 포유동물 신체에 투여될 수 있다. 생체적합성 담체는 적합하게는 주사가 가능한 담체 액체, 예를 들어 멸균된 발열물-비함유 주사용수; 수용액, 예를 들어 염수 (주사를 위한 최종 제품이 등장성이거나 저장성이 아니도록 유리하게 균형을 맞춤); 하나 이상의 삼투-조절 물질의 수용액 (예: 혈장 양이온과 생체적합성 카운터이온과의 염), 당 (예: 글루코즈 또는 수크로즈), 당 알콜 (예: 소르비톨 또는 만니톨), 글리콜 (예: 글리세롤) 또는 기타 비-이온성 폴리올 물질 (예: 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌 글리콜 등)이다.
- [0220] 제3 측면에서, 본 발명은 생체적합성 담체와 함께 영상화 잔기가 방사성인 상기 기술된 바와 같은 조영제를 포함하는 포유동물 투여에 적합한 형태의 방사성약물(radiopharmaceutical) 조성물을 제공한다. 이러한 방사성약물은 적합하게는 멸균 상태를 유지하면서 피하 주사 바늘로 1회 또는 수회 찌르기에 적합한 시일 (예: 크립드-온 (crimped-on) 격막 시일 폐쇄)이 제공된 용기에 제공된다. 이러한 용기는 단일 또는 다수 환자 용량을 포함

할 수 있다. 바람직한 다수 용량 용기는 다수 환자 용량을 포함하는 단일 벌크 바이알 (예: 10 내지 30 cm³ 용적)을 포함하므로, 제제가 사용 가능한 동안 임상 상태에 맞도록 다양한 시간 간격으로 단일 환자 용량을 임상 등급 주사기로 빼낼 수 있다. 예비-충전된 주사기는 단일 인간 용량을 포함하도록 고안되어, 바람직하게는 임상 사용에 적합한 일회용 또는 다른 주사기이다. 예비-충전된 주사기에는 임의로 방사성 용량으로부터 작업자를 보호하기 위한 주사기 방어물이 제공될 수 있다. 적합한 방사성약물 주사기 방어물은 당 분야에 공지되어 있으며, 바람직하게는 납 또는 텅스텐을 포함한다.

[0221] 영상화 잔기가 ^{99m}Tc를 포함하는 경우, 진단 영상 방사성약물에 적합한 방사능 함량은 생체내 영상화되는 부위, 흡수 및 표적물 대 백그라운드 비율에 따라 180 내지 1500 MBq 범위의 ^{99m}Tc이다.

[0222] 본 발명의 방사성약물은 하기 기술되는 제 5 및 제 6 양태에 기술되는 바와 같이 키트로부터 제조될 수 있다. 달리, 방사성약물은 목적하는 멸균 제품을 수득하도록 무균 제작 조건 하에서 제조될 수 있다. 또한, 방사성약물은 비-멸균 조건하에 제조된 후, 예를 들어 감마선-조사, 오토클레이빙, 건식 가열 또는 화학적 처리 (예: 에틸렌 옥사이드 사용)을 이용하여 최종 멸균 처리될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 방사성약물은 키트로부터 제조된다.

[0223] 제4 측면에서, 본 발명은 본 발명의 합성 카스파제-3 억제제와 리간드와의 결합체를 제공한다. 상기 결합체는 방사성 금속 이온 또는 방사성 금속 이온으로 표지된 합성 카스파제-3 억제제의 제조에 유용하다. 바람직하게는, 리간드 결합체는 상기된 바와 같은 화학식 Ia의 화합물이다. 본 발명의 제 4 양태의 결합체에 대한 리간드는 바람직하게는 킬레이팅제이다. 바람직하게는, 킬레이팅제는 디아민디옥심, N₂S₂ 디아민티올 또는 N₃S 디아미드피리디네티올 공여체 세트를 갖는다. 가장 바람직하게는, 킬레이팅제는 디아민디옥심이다.

[0224] 제5 측면에서, 본 발명은 영상화 잔기가 방사성금속을 포함하는 상술된 방사성약물 조성물의 제조를 위한 비-방사성 키트를 제공한다. 상기 키트는 리간드와 화학식 I의 카스파제-3 억제제와의 결합체를 포함한다. 방사성금속이 ^{99m}Tc인 경우, 키트는 적합하게는 생체적합성 환원제를 추가로 포함한다. 리간드 결합체 및 이의 바람직한 측면이 상기 제 4 양태에 기술되어 있다.

[0225] 이러한 키트는 인간 투여에 적합한 멸균 방사성약물을, 예를 들어 직접 주사를 통해 혈류에 제공하도록 고안된다. ^{99m}Tc에 대해서, 키트는 바람직하게는 동결건조되고, ^{99m}Tc 방사성 동위원소 발생기로부터 멸균 ^{99m}Tc-퍼테크네이트 (TcO₄⁻)로 재구성되어 추가의 조작 없이 인간 투여에 적합한 용액을 생성하도록 고안된다. 적합한 키트는 "생체적합성 환원제", 예를 들어 나트륨 디티오나이트, 중아황산나트륨, 아스코르브산, 포름아미딘 술폰산, 주석 이온, Fe(II) 또는 Cu(I)과 함께 유리 염기 또는 산 염 형태의 리간드 또는 킬레이터 결합체를 포함하는 용기를 포함한다. 생체적합성 환원제는 바람직하게는 주석 염, 예를 들어 염화주석 또는 주석 타르트리이트이다. 달리, 키트는 임의로 방사성금속의 첨가 시 트랜스금속화 (즉, 금속 교환) 하여 목적하는 생성물을 생성하는 금속 착물을 포함할 수 있다.

[0226] 적합한 키트 용기는 멸균 보전 및 방사능 안전을 유지하게 하는 밀폐된 용기 및 임의의 불활성 헤드스페이스 (headspace) 기체 (예: 질소 또는 아르곤)를 포함하며, 주사기로 용액을 첨가하거나 빼내는 것이 가능하다. 바람직한 용기는 격막-밀봉된 바이알이며 기체-차단 밀폐물이 (통상적으로 알루미늄의) 오버시일로 클립핑된다. 이러한 용기는 밀폐물이, 필요한 경우, 예를 들어 헤드스페이스 기체 또는 탈기 용액을 교체하도록 진공을 견딜 수 있는 추가의 이점을 갖는다.

[0227] 비-방사성 키트는 임의로 추가의 성분, 예를 들어 트랜스킬레이터, 방사능보호제, 항미생물성 보존제, pH-조절제 또는 충전제를 추가로 포함할 수 있다. "트랜스킬레이터"는 방사성금속과 약한 착물을 형성하도록 신속히 반응한 후 리간드에 의해 대체되는 화합물이다. 테트네튬에 있어, 이는 테크네튬 착화와 경쟁하는 퍼테크네이트의 신속한 환원에 의해 환원된 가수분해 테트네튬 (RHT)의 형성 위험을 최소화시킨다. 적합한 트랜스킬레이터는 약한 유기산, 즉 3 내지 7 범위의 pKa를 갖는 유기산과 생체적합성 양이온과의 염이다. 적합한 약한 유기산은 아세트산, 시트르산, 타르타르산, 글루콘산, 글루코헵톤산, 벤조산, 페놀 또는 포스포산이다. 따라서, 적합한 염은 아세테이트, 시트레이트, 타르트리이트, 글루코네이트, 글루코헵토네이트, 벤조에이트, 페놀레이트 또는 포스포네이트이다. 바람직한 염은 타르트리이트, 글루코네이트, 글루코헵토네이트, 벤조에이트 또는 포스포네이트, 가장 바람직하게는 포스포네이트, 가장 특히 바람직하게는 디포스포네이트이다. 용어 "생체적합성 양이온"은 이온화되어 음으로 하전된 기와 함께 염을 형성하는 양으로 하전된 카운터이온을 의미하며, 양으로 하

전된 카운터이온은 무독성이어서 포유동물 신체, 특히 인체에 투여하기에 적합하다. 적합한 생체적합성 양이온의 예는 알칼리 금속 나트륨 또는 칼륨; 알칼리 토금속 칼슘 및 마그네슘; 및 암모늄 이온을 포함한다. 바람직한 생체적합성 양이온은 나트륨 및 칼륨, 가장 바람직하게는 나트륨이다. 바람직한 트랜스킬레이터는 MDP, 즉 메틸렌디포스포산과 생체적합성 양이온과의 염이다.

[0228] 용어 "방사능 보호물"은 고도로 반응성인 유리 라디칼, 예를 들어 물의 방사선 분해로부터 발생하는 산소-함유 유리 라디칼을 포획함으로써 분해 반응, 예를 들어 산화환원 과정을 억제하는 화합물을 의미한다. 본 발명의 방사능 보호물은 적합하게는 아스코르브산, 파라-아미노벤조산 (즉, 4-아미노벤조산), 겐티스산 (예: 2,5-디히드록시벤조산) 및 상술된 바와 같은 생체적합성 양이온과의 염의 염으로부터 선택된다.

[0229] 용어 "항미생물성 보존제"는 잠재적으로 유해한 미생물, 예를 들어 세균, 효모 또는 사상균의 성장을 억제하는 작용제를 의미한다. 또한, 항미생물성 보존제는 용량에 따라 다소간의 살균 특성을 나타낼 수도 있다. 본 발명의 항미생물성 보존제(들)의 주된 역할은 방사성약물 조성물의 재구성 후에, 즉 방사성 진단 제품 자체에서 모든 미생물의 성장을 억제시키는 것이다. 그러나, 항미생물성 보존제는 임의로 재구성 전의 본 발명의 비-방사성 키트의 하나 이상의 성분 중에 있는 잠재적으로 유해한 미생물의 성장을 억제하는데도 사용될 수 있다. 적합한 항미생물성 보존제(들)은 파라벤, 즉 메틸, 에틸, 프로필 또는 부틸 파라벤 또는 이의 혼합물; 벤질 알콜; 페놀; 크레졸; 세트리미드 및 티오메르살을 포함한다. 바람직한 항미생물성 보존제(들)은 파라벤이다.

[0230] 용어 "pH-조절제"는 재구성된 키트의 pH가 인간 또는 포유동물 투여를 위해 허용되는 한계 (약 pH 4.0 내지 10.5) 내에 있도록 하는데 유용한 화합물 또는 화합물의 혼합물을 의미한다. 적합한 pH-조절제는 제약학적으로 허용되는 완충제, 예를 들어 트리신, 포스페이트 또는 TRIS [즉, 트리스(히드록시메틸)아미노메탄] 및 제약학적으로 허용되는 염기, 예를 들어 탄산나트륨, 중탄산나트륨 또는 이의 혼합물을 포함한다. 결합체가 산 염 형태로 사용되는 경우, pH 조절제는 임의로 분리된 바이알 또는 용기에 제공될 수 있으며, 키트의 사용자가 다수-단계 절차의 일부로서 pH를 조절할 수 있다.

[0231] 용어 "충진제"는 생산 및 동결건조 동안 물질의 취급을 용이하게 할 수 있는 제약학적으로 허용되는 벌크화제를 의미한다. 적합한 충진제는 무기산 염, 예를 들어 염화나트륨, 및 수용성 당 또는 당 알콜, 예를 들어 수크로즈, 말토즈, 만니톨 또는 트레할로즈를 포함한다.

[0232] 제6 측면에서, 본 발명은 영상화 잔기가 비금속성 방사성 동위원소, 즉 감마선-방출 방사성 할로겐 또는 양전자-방출 방사성 비금속을 포함하는 방사성약물 제제의 제조를 위한 키트를 제공한다. 이러한 키트는 바람직하게는 멸균된 비발열성 형태의 "전구체"를 포함하여, 방사성 동위원소의 멸균 공급원과의 반응으로 최소의 조작으로 목적하는 방사성약물을 생성한다. 이러한 고려는 방사성 동위원소가 비교적 짧은 반감기를 갖는 방사성약물 및 취급의 용이함 및 그 결과 방사선제약사에 대해 감소된 방사선을 제공하는데 특히 중요하다. 따라서, 이러한 키트의 재구성을 위한 반응 매질은 바람직하게는 상기 정의된 바와 같이 "생체적합성 담체"이며, 가장 바람직하게는 수성이다.

[0233] "전구체"는 적합하게는 카스파제-3 억제제 물질의 비-방사성 유도체를 멸균된 비발열성 형태로 포함하며, 이는 목적하는 비금속성 방사성 동위원소의 통상의 화학적 형태를 사용한 화학 반응이 최소한의 단계 (이상적으로는 단독 단계)로 목적하는 방사성 생성물을 수득하기 위해 결정적인 정제를 할 필요 없이 (이상적으로는 추가의 정제 없이) 수행될 수 있도록 고안된다. 이러한 전구체는 편리하게는 충분한 화학적 순도로 수득될 수 있다. "전구체"는 임의로 카스파제-3 억제제의 특정한 관능기를 위한, 상술된 바와 같은, 보호기 (P^{GF})를 포함할 수 있다. 적합한 전구체가 문헌 [Bolton, J. Lab. Comp. Radiopharm., 45, 485-528 (2002)]에 기술되어 있다.

[0234] 이러한 양태에 대한 바람직한 전구체는 친전자성 또는 친핵성 할로겐화하거나 알킬 또는 플루오로알킬 할라이드, 토실레이트, 트리플레이트 (즉, 트리플루오로메탄술포네이트) 또는 메실레이트 중에서 선택되는 알킬 화제로 용이하게 알킬화하거나; 티올 잔기를 알킬화하여 티오에테르 결합을 형성하는 유도체를 포함한다. 제 1 범주의 예는 다음과 같다:

[0235] (a) 유기금속 유도체, 예를 들어 트리알킬스타닐 (예: 트리메틸스타닐 또는 트리부틸스타닐), 또는 트리알킬실란 (예: 트리메틸실릴);

[0236] (b) 할로겐 교체를 위한 비-방사성 알킬 요오다이드 또는 알킬 브로마이드 및 친핵성 할로겐화를 위한 알킬 토실레이트, 메실레이트 또는 트리플레이트;

[0237] (c) 친전자성 할로겐화가 일어나도록 활성화되는 방향족 환 (예: 페놀) 및 친핵성 할로겐화가 일어나도록 활성

화되는 방향족 환 (예: 아릴 요오도늄, 아릴 디아조늄, 니트로아릴).

- [0238] 용이하게 알킬화되는 바람직한 유도체는 알콜, 페놀 또는 아민기, 특히 페놀 및 입체적으로 방해되지 않은 1급 또는 2급 아민이다. 티올-함유 방사성 동위원소 반응물을 알킬화시키는 바람직한 유도체는 N-할로아세틸기, 특히 N-클로로아세틸 및 N-브로모아세틸 유도체이다.
- [0239] 전구체는 무균 제작 조건 하에서 사용되어 목적하는 멸균된 비-발열성 물질을 제공할 수 있다. 또한, 전구체는 비멸균 상태 하에서 사용된 후, 예를 들어 감마선-조사, 오토클레이빙, 건조 가열 또는 화학 처리 (예를 들어 에틸렌 옥사이드 사용)를 이용해 최종 멸균 처리될 수 있다. 바람직하게는, 전구체는 멸균된 비발열성 형태로 사용된다. 가장 바람직하게는, 멸균된 비-발열성 전구체가 상술된 바와 같이 밀봉된 용기에 사용된다.
- [0240] 키트의 "전구체"는 바람직하게는 고체 지지체 매트릭스에 공유적으로 부착되게 공급된다. 이러한 경우, 목적하는 방사성약물은 용액으로 형성되며, 출발 물질 및 불순물은 고체상에 결합된 상태로 잔류한다. ¹⁸F-플루오라이드를 사용하여 고체상 친전자성 플루오르화를 위한 전구체가 WO 03/002489에 기술되어 있다. ¹⁸F-플루오라이드를 사용하여 고체상 친핵성플루오르화를 위한 전구체가 WO 03/002157에 기술되어 있다. 따라서, 키트는 적합하게 변형시킨 자동화된 합성기에 연결될 수 있는 카트리지를 포함할 수 있다. 카트리는 고체 지지체-결합된 전구체와 떨어져 목적하지 않는 플루오라이드 이온을 제거하기 위한 걸림, 및 반응 혼합물을 증발시키고 필요한 경우 생성물을 제형화하기 위해 연결되는 적합한 용기를 포함할 수 있다. 또한, 합성기가 방사능 농도, 용적, 수송 시간 등에 대한 소비자 요구에 부합하는 방식으로 작동되도록 하는 소프트웨어를 갖는 컴팩트 디스크와 함께 시약 및 용매 및 합성에 필요한 기타 소모품이 포함될 수도 있다. 편리하게는, 키트의 모든 성분은 수행 사이에 오염의 가능성을 최소화하도록 일회용이며, 멸균되고 질이 보증될 것이다.
- [0241] 제7 측면에서, 본 발명은 카스파제-3이 연류된 포유동물 신체의 질환 상태에 대한 생체내 진단 영상화를 위한 제 1 양태의 조영제의 사용을 기술한다. 이러한 비-침습적 영상화는 비정상적 아포토시스에 있는 카스파제-3과 관련되며, 많은 질환에서 세포 사멸을 모니터링하는데 유용할 것이다. 세포 증식 및 아포토시스가 높은 병리, 예를 들어 심근경색, 공격적 종양 및 이식 거부에서, 아포토시스 영상화가 유용한 것으로 믿어진다. 또한, 이러한 영상화는 이들 상태에 대한 화학치료 약물을 모니터링하는데도 가치가 있을 것이다.
- [0242] 아포토시스가 중요하게 여겨지나 많은 아포토시스가 비교적 드문 기타 질환, 예를 들어 알츠하이머에서는, 이용 가능한 세포 푸울이 적으므로 가시화하기가 매우 어렵다. 따라서, 본 발명의 아포토시스 조영제는 아포토시스가 비교적 심한 병리, 예를 들어 심근경색, 공격적인 종양 및 이식 거부에서 보여지는 바와 같은 병리에 가장 잘 적용될 것으로 믿어진다. 아포토시스가 보다 만성인 질환, 예를 들어 신경병리 및 덜 공격적인 종양에서는, 백그라운드 이상으로 기록할 아포토시스 세포가 불충분할 수 있다.
- [0243] 본질적으로, 방사선요법, 화학요법 또는 면역요법을 포함한 암에 대한 모든 치료는 이들의 종양 세포 표적물에서 아포토시스를 유발하는 경향이 있다. 아포토시스의 영상화는 암 환자를 다루는 방식을 근본적으로 변화시킬 수 있는 종양 치료의 신속하고 직접적인 평가 및 효과의 모니터링을 제공하는 능력을 가질 수 있다. 종양이 치료에 반응하는 환자는 종양에서의 상승된 아포토시스 반응 때문에 조영제가 상당히 증가되는 흡수를 보일 것이라 예상된다. 종양이 추가의 치료에 반응하지 않을 환자는 이들 환자의 종양이 조영제 처리 후 흡수를 증가시키지 못하는 것으로써 확인될 수 있다.
- [0244] 측정가능한 질환을 앓는 암 환자에서 치료적 중재에 대한 평가는 수개의 적용을 갖는다:
- [0245] · 신규한 항암제의 항신생물적 활성의 평가;
- [0246] · 효율적인 치료법의 결정;
- [0247] · 신규한 항암 약물에 대한 최적 용량 및 투여 스케줄의 확인;
- [0248] · 기존의 항암 약물 및 약물 배합물의 최적 용량 및 투여 스케줄의 확인;
- [0249] · 임상 시험되는 암 환자의 치료법에 대한 반응자 및 비-반응자로의 보다 효과적인 구분;
- [0250] · 확립된 치료적 항암요법에 대한 개개 환자의 반응에 대한 효율 및 적시의 평가.
- [0251] 본 발명은 하기에 상술되는 비-제한적 실시예로 설명된다. 실시예 1은 화합물 1,1,1-트리스(2-아미노에틸)메탄의 합성을 기술한다. 실시예 2는 잠정적으로 위험한 아지드 중간체의 사용을 피하는 1,1,1-트리스(2-아미노에틸)메탄의 다른 합성법을 제공한다. 실시예 3은 클로로니트로소알칸 전구체의 합성을 기술한다. 실시예 4는

본 발명의 바람직한 아민 치환된 이관능성 디아민디옥심 (킬레이터 1)의 합성을 기술한다. 실시예 5는 본 발명의 펩티드 억제제의 합성을 제공한다. 실시예 6은 본 발명의 2개의 방사성 할로젠화 전구체의 합성을 제공한다. 실시예 7은 본 발명의 비-펩티드 카스파제-3 억제제의 합성을 제공한다. 실시예 9는 카스파제-3 억제제 검정을 기술하며, 실시예 10은 세포-기초한 카스파제-3 검정을 기술한다. 실시예 11 및 12는 카스파제-3 억제제의 ¹⁸F 방사선 표지화에 적합한 ¹⁸F-표지된 화합물의 합성을 제공한다. 실시예 13은 본 발명의 억제제의 방사성 요오드화를 기술한다.

실시예

실시예 1: 1,1,1-트리스(2-아미노에틸)메탄의 합성

(단계 a): 3-(메톡시카보닐메틸렌)글루타르산 디메틸에스테르

톨루엔 (600 ml) 중의 카르복시메톡시메틸렌트리페닐포스포란 (167 g, 0.5 mol)을 디메틸 3-옥소글루타레이트 (87 g, 0.5 mol)으로 처리하고, 반응물을 36 시간 동안 질소 대기 하에 120°C의 오일조에서 100°C로 가열하였다. 이어서, 반응물을 진공 하에 농축시키고, 오일성 잔사를 40/60 가솔린 에테르/디에틸에테르 1:1 (600 ml)로 분쇄하였다. 트리페닐포스핀 옥사이드를 침전시키고, 상등액을 버리고/여과시켰다. 진공 하에 증발시킨 잔사를 고진공 Bpt (오븐 온도 180-200°C, 0.2 torr) 하에 쿠겔로르(Kugelrohr) 증류시켜 3-(메톡시카보닐메틸렌)글루타르산 디메틸에스테르 (89.08 g, 53%)를 수득하였다.

NMR ¹H(CDC1₃): δ 3.31 (2H, s, CH₂), 3.7(9H, s, 3×OCH₃), 3.87 (2H, s, CH₂), 5.79 (1H, s, =CH,) ppm.

NMR ¹³C(CDC1₃), δ 36.56, CH₃, 48.7, 2×CH₃, 52.09 및 52.5 (2×CH₂); 122.3 및 146.16 C=CH; 165.9, 170.0 및 170.5 3×COO ppm.

(단계 b): 3-(메톡시카보닐메틸렌)글루타르산 디메틸에스테르의 수소화

메탄올 (200 ml) 중의 3-(메톡시카보닐메틸렌)글루타르산 디메틸에스테르 (89 g, 267 mmol)를 30 시간 동안 수소 가스 (3.5 bar)의 대기 하에 10% 팔라듐/목탄: 50% 물 (9 g)과 함께 흔들었다. 이 용액을 규조토를 통해 여과시키고, 진공 하에 농축시켜 3-(메톡시카보닐메틸)글루타르산 디메틸에스테르를 오일로서 수득하였다. 수율 (84.9 g, 94%).

NMR ¹H(CDC1₃), δ 2.48 (6H, d, J=8Hz, 3×CH₂), 2.78 (1H, 육중선, J=8Hz CH,) 3.7 (9H, s, 3×CH₃).

NMR ¹³C(CDC1₃), δ 28.6, CH; 37.50, 3×CH₃; 51.6, 3×CH₂; 172.28, 3×COO.

(단계 c): 트리메틸 에스테르의 트리아세테이트로의 환원 및 에스테르화

질소 대기 하에 3구 2 L 환저 플라스크에서 테트라히드로푸란 (400 ml) 중의 수소화리튬알루미늄 (20 g, 588 mmol)을 1 시간에 걸쳐 테트라히드로푸란 (200 ml) 중의 트리스(메틸옥시카보닐메틸)메탄 (40 g, 212 mmol)으로 조심스럽게 처리하였다. 강한 발열 반응이 발생하여 강하게 용매의 환류를 일으켰다. 반응물을 3일 동안 90°C의 오일조에서 환류 가열하였다. 반응물을 수소 발생이 멈출 때까지 아세트산 (100 ml)을 조심스럽게 적가하여 퀀칭시켰다. 교반된 반응 혼합물을 적당한 환류를 일으키는 속도로 아세트산 무수물 용액 (500 ml)로 조심스럽게 처리하였다. 플라스크에 증류 및 교반이 가능하도록 장치를 하고, 90°C (오일조 온도)에서 가열하여 테트라히드로푸란을 증류시켰다. 추가분의 아세트산 무수물 (300 ml)을 가하고, 반응물을 환류 구성으로 되돌리고, 교반한 후, 5 시간 동안 140°C의 오일조에서 가열하였다. 반응물을 냉각시키고 여과하였다. 산화알루미늄 침전물을 에틸 아세테이트로 세척하고, 배합한 여과물을 진공 (5 mmHg) 하에 50°C의 수조 온도로 회전 증발기에서 농축시켜 오일을 수득하였다. 오일을 에틸 아세테이트 (500 ml)에 취하고, 포화된 탄산칼륨 수용액으로 세척하였다. 에틸 아세테이트 용액을 분리시키고, 황산나트륨 상에서 건조시킨 후, 진공 하에 농축시켜 오일을 수득하였다. 오일을 고진공 하에 쿠겔로르 증류시켜 트리스(2-아세톡시에틸)메탄 (45.3 g, 96%)을 오일로서 수득하였다. Bp. 220°C (0.1 mmHg).

NMR ¹H(CDC1₃), δ 1.66(7H, m, 3×CH₂, CH), 2.08(1H, s, 3×CH₃); 4.1(6H, t, 3×CH₂O).

[0264] NMR ^{13}C (CDCl_3), δ 20.9, CH_3 ; 29.34, CH ; 32.17, CH_2 ; 62.15, CH_2O ; 171, CO .

[0265] (단계 d): 트리아세테이트로부터 아세테이트기의 제거

[0266] 메탄올 (200 ml) 및 880 암모니아 (100 ml) 중의 트리스(2-아세톡시에틸)메탄 (45.3 g, 165 mM)을 2일 동안 80 °C의 오일조에서 가열하였다. 반응물을 추가분의 880 암모니아 (50 ml)와 함께 가열하고, 24 시간 동안 오일조에서 80 °C로 가열하였다. 추가분의 880 암모니아 (50 ml)를 가하고, 반응물을 24 시간 동안 80 °C에서 가열하였다. 이어서, 반응물을 진공 하에 농축시켜 모든 용매를 제거시킴으로써 오일을 수득하였다. 이를 880 암모니아 (150 ml)에 취하고, 24 시간 동안 80 °C에서 가열하였다. 이어서, 반응물을 진공 하에 농축시켜 모든 용매를 제거하고 오일을 수득하였다. 쿠겔로르 증류하여 아세트아미드 (bp 170-180, 0.2 mm)를 수득하였다. 아세트아미드를 포함하는 벌브 (bulb)를 깨끗이 세척하고, 증류를 계속하여 bp 220 °C (0.2 mm)에서 증류된 트리스(2-히드록시에틸)메탄 (22.53 g, 92%)를 수득하였다.

[0267] NMR ^1H (CDCl_3), δ 1.45(6H, q, $3 \times \text{CH}_2$), 2.2(1H, 오중선, CH); 3.7(6H, t $3 \times \text{CH}_2\text{OH}$); 5.5(3H, brs, $3 \times \text{OH}$).

[0268] NMR ^{13}C (CDCl_3), δ 22.13, CH; 33.95, $3 \times \text{CH}_2$; 57.8, $3 \times \text{CH}_2\text{OH}$.

[0269] (단계 e): 트리올의 트리스(메탄술포네이트)로의 전환

[0270] 디클로로메탄 (50 ml) 중의 트리스(2-히드록시에틸)메탄 (10 g, 0.0676 mol)의 교반된 빙-냉각 용액에 온도가 15 °C 이상으로 상승하지 않는 속도로 질소 하에 디클로로메탄 (50 ml) 중의 메탄술포닐 클로라이드 (40 g, 0.349 mol)의 용액을 서서히 적가하였다. 이어서, 디클로로메탄 (50 ml) 중에 용해된 피리딘 (21.4 g, 0.27 mol, 4 eq)의 용액을 온도가 15 °C 이상으로 상승하지 않는 속도로 적가하였다 (발열 반응). 반응물을 24 시간 동안 실온에서 교반한 후, 5 N 염산 용액 (80 ml)으로 처리하고, 층을 분리시켰다. 수층을 추가의 디클로로메탄 (50 ml)으로 추출하고, 유기 추출물을 합한 후, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과 농축시켜 과량의 메탄술포닐클로라이드로 오염된 트리스[2-(메틸술포닐옥시)에틸]메탄을 수득하였다. 이론적 수율은 25.8 g이었다.

[0271] NMR ^1H (CDCl_3), δ 4.3(6H, t, $2 \times \text{CH}_2$), 3.0(9H, s, $3 \times \text{CH}_3$), 2(1H, 육중선, CH), 1.85(6H, q, $3 \times \text{CH}_2$).

[0272] (단계 f): 1,1,1-트리스(2-아지도에틸)메탄의 제조

[0273] 질소 하에 무수 DMF (250 ml) 중의 트리스[2-(메틸술포닐옥시)에틸] 메탄 [단계 1(e)로부터 수득, 과량의 메틸술포닐 클로라이드로 오염됨] (25.8 g, 67 mmol, 이론치)의 용액을 15 분에 걸쳐 아지드화나트륨 (30.7 g, 0.47 mol)을 적가하면서 처리하였다. 발열 반응이 관측되었으며, 반응물을 얼음조에서 냉각시켰다. 30 분 후, 반응 혼합물을 24 시간 동안 50 °C에서 오일조에서 가열하였다. 반응물이 갈색이 되었다. 반응물을 냉각시키고, 희석된 탄산칼륨 용액 (200 ml)으로 처리한 후, 40/60 가솔린 에테르/디에틸에테르 10:1 (3×150 ml)로 3회 추출하였다. 유기 추출물을 물 (2×150 ml)로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조시킨 후, 여과시켰다. 에탄올 (200 ml)을 가솔린/에테르 용액에 가하여 트리아지드를 용액으로 유지시키고, 용적을 진공 하에 200 ml로 감소시켰다. 에탄올 (200 ml)을 가하고, 진공 하에 재농축시켜 나머지 잔량의 가솔린을 제거하여 200 ml의 에탄올 용액을 남겼다. 트리아지드의 에탄올 용액을 단계 1(g)에서 직접적으로 사용하였다.

[0274] 주의: 아지드는 잠정적으로 폭발적이고 항상 희석 용액으로 보관하여야 하므로 모든 용매를 제거하지 말아야 한다.

[0275] 0.2 ml 미만의 용액을 진공 하에 증발시켜 에탄올을 제거시키고, 이러한 적은 샘플에 대해 NMR을 수행하였다:

[0276] NMR ^1H (CDCl_3), δ 3.35(6H, t, $3 \times \text{CH}_2$), 1.8(1H, 칠중선, CH), 1.6(6H, q, $3 \times \text{CH}_2$).

[0277] (단계 g): 1,1,1-트리스(2-아미노에틸)메탄의 제조

[0278] 에탄올 (200ml) 중의 트리스(2-아지도에틸)메탄 (15.06 g, 0.0676 mol) (이전 반응으로부터 100% 수율로 추정)을 목탄 상의 10% 팔라듐 (10% 팔라듐/목탄)으로 처리하고 12 시간 동안 수소화시켰다. 반응 용기를 매 2 시간 마다 비워 반응물로부터 방출되는 질소를 제거한 후, 수소로 재충전시켰다. 샘플을 NMR 분석하여 트리아지드의 트리아민으로 완전한 전환을 확인하였다.

[0279] 주의: 비환원된 아지드는 증류 시 폭발할 수 있다. 반응물을 셀라이트 (Celite) 패드를 통해 여과시켜 촉매를

제거하고, 진공 하에 농축시켜 트리스(2-아미노에틸)메탄을 오일로서 수득하였다. 이를 쿠겔로르 증류 (bp.180-200°C, 0.4 mm/Hg)시켜 무색 오일 (8.1 g, 트리올로부터의 총 수율: 82.7%)을 수득하였다.

[0280] NMR ¹H(CDC1₃), δ 2.72(6H, t, 3×CH₂N), 1.41(H, 칠중선, CH), 1.39(6H, q, 3×CH₂).

[0281] NMR ¹³C(CDC1₃), δ 39.8 (CH₂NH₂), 38.2 (CH₂), 31.0 (CH).

[0282] **실시예 2: 1,1,1-트리스(2-아미노에틸)메탄의 또 다른 제조**

[0283] (단계 a): *p*-메톡시-벤질아민으로 트리메틸에스테르의 아미드화

[0284] 트리스(메틸옥시카보닐메틸)메탄 [2 g, 8.4 mmol; 상기 단계 1(b)에서와 같이 제조]을 *p*-메톡시-벤질아민 (25 g, 178.6 mmol) 중에 용해시켰다. 증류를 위한 장치를 설치하고, 질소 흐름 하에 24 시간 동안 120°C로 가열하였다. 반응의 진행을 수집되는 메탄올 양으로 모니터링하였다. 반응 혼합물을 주위 온도로 냉각시키고, 에틸 아세테이트 30 ml를 첨가한 후, 침전된 트리아미드 생성물을 30 분 동안 교반하였다. 트리아미드를 여과시켜 분리하고, 여과 케이크를 충분한 양의 에틸 아세테이트로 수회 세척하여 과량의 *p*-메톡시-벤질아민을 제거하였다. 건조시킨 후, 백색 분말 (4.6 g, 100%)을 수득하였다. 고도로 불용성인 생성물을 추가의 정제 또는 특징 분석 없이 다음 단계에 직접적으로 사용하였다.

[0285] (단계 b): 1,1,1-트리스[2-(*p*-메톡시벤질아미노)에틸]메탄의 제조

[0286] 빙수조에서 냉각된 1000 ml 3구 환저 플라스크에, 단계 2(a)로부터의 트리아미드 (10 g 17.89 mmol)를 1 M 보란 용액 (3.5 g, 244.3 mmol) 250 ml에 조심스럽게 첨가하였다. 첨가가 완결된 후, 빙수조를 제거하고, 반응 혼합물을 서서히 60°C로 가열하였다. 반응 혼합물을 20 시간 동안 60°C에서 교반하였다. 반응 혼합물 (1 ml)의 샘플을 취하여 5 N HCl 0.5 ml과 혼합한 후, 30 분 동안 정치하였다. 샘플에 50 NaOH 0.5 ml을 첨가하고, 이어서 물 2 ml를 첨가한 후, 백색 침전물 모두가 용해될 때까지 용액을 교반하였다. 이 용액을 에테르 (5 ml)로 추출하고, 증발시켰다. 잔사를 1 mg/ml의 농도로 아세토니트릴 중에 용해시키고, MS로 분석하였다. 모노- 및 디-아미드 (M+H/z = 520 및 534)가 MS 스펙트럼에서 보여지는 경우, 반응은 완결된 것이 아니다. 반응을 완결시키기 위해, 추가로 100 ml의 1 M 보란 THF 용액을 첨가하고, 반응 혼합물을 60°C에서 6 시간 이상 동안 교반한 후, 전술한 샘플링 공정에 따라 새로운 샘플을 취하였다. 트리아민으로의 완전한 전환이 있을 때까지, THF 용액 중의 1 M 보란의 첨가를 계속하였다. 반응 혼합물을 주위 온도로 냉각시키고, 5 N HCl을 서서히 가하였다. [주위: 격렬한 기포 형성이 일어난다]. 더이상의 기체 발생이 관측되지 않을 때까지 HCl을 첨가하였다. 혼합물을 30 분 동안 교반시킨 후, 증발시켰다. 케이크를 NaOH 수용액 (20-40%; 1:2 w/v) 중에 현탁시키고, 30 분 동안 교반하였다. 이어서, 혼합물을 물 (3배 용적)으로 희석시켰다. 이어서, 혼합물을 디에틸에테르 (2×150 ml)로 추출하였다 [주위: 할로겐화된 용매를 사용하지 말아야 한다]. 이어서, 합한 유기상을 물 (1× 200 ml), 염수 (150 ml)로 세척하고, 황산마그네슘 상에서 건조시켰다. 증발 후 수율: 7.6 g, 84%, 오일.

[0287] NMR ¹H(CDC1₃), δ 1.45,(6H, m, 3×CH₂); 1.54,(1H, 칠중선, CH); 2.60(6H, t, 3×CH₂N); 3.68(OH, s, ArCH₂); 3.78(9H, s, 3×CH₃O); 6.94(6H, d, 6×Ar). 7.20(6H, d, 6×Ar).

[0288] NMR ¹³C(CDC1₃), δ 32.17, CH; 34.44, CH₂; 47.00, CH₂; 53.56, ArCH₂; 55.25, CH₃O; 113.78, Ar; 129.29, Ar; 132.61; Ar; 158.60, Ar

[0289] (단계 c): 1,1,1-트리스(2-아미노에틸)메탄의 제조

[0290] 1,1,1-트리스[2-(*p*-메톡시벤질아미노)에틸]메탄 (20.0 g, 0.036 mol)을 메탄올 (100 ml) 중에 용해시키고, Pd(OH)₂ (5.0 g)를 가하였다. 혼합물을 수소화시키고 (3 bar, 100°C, 오토클레이브 중), 5 시간 동안 교반하였다. 각각 10 시간 및 15 시간 후 Pd(OH)₂를 2회 이상의 부분 (2×5 g)으로 가하였다. 반응 혼합물을 여과시키고, 여과물을 메탄올로 세척하였다. 합한 유기상을 증발시키고, 잔사를 진공 하에 (1×10⁻², 110°C) 증류시켜 전술된 실시예 1과 동일한 1,1,1-트리스(2-아미노에틸)메탄 2.60 g (50%)을 수득하였다.

[0291] **실시예 3: 3-클로로-3-메틸-2-니트로부탄의 제조**

[0292] 2-메틸부트-2-엔 (147 ml, 1.4mol)과 이소아밀 니트라이트 (156 ml, 1.16 mol)의 혼합물을 카다이스 (cardice)

및 메탄올의 조에서 -30℃로 냉각시키고, 오버헤드 공기 교반기로 격렬히 교반시킨 후, 온도를 -20℃ 이하를 유지하는 속도로 진한 염산 (140 ml, 1.68 mol)으로 처리하였다. 상당히 발열 반응이므로, 약 1 시간이 필요하며, 과열을 방지하는데 주의해야 한다. 첨가의 말기에 형성되었던 슬러리의 점도를 감소시키기 위해 에탄올 (100ml)을 첨가하였으며, 반응물을 첨가의 2 시간 동안 -20 내지 -10℃에서 교반하여 반응을 완결하였다. 침전물을 진공 하에 여과로 수집하고, 냉각 (-20℃) 에탄올 (4×30 ml) 및 얼음 냉각수 100 ml로 세척한 후, 진공 하에 건조시켜 3-클로로-3-메틸-2-니트로부탄을 백색 고체로서 수득하였다. 에탄올 여과물 및 세척물을 합하고, 물 (200 ml)로 세척한 후, 냉각시키고, 3-클로로-3-메틸-2-니트로부탄이 결정화되는 10℃에서 1 시간 동안 정치시켰다. 침전물을 여과시켜 수집하고, 최소량의 물로 세척한 후, 진공 하에 건조시켜 3-클로로-3-메틸-2-니트로부탄 (115 g 0.85 mol, 73%) (NMR에 의한 순도: >98%)을 수득하였다.

[0293] NMR ¹H(CDC1₃), 이성체의 혼합물로서 (이성체1, 90%) 1.5 d,(2H, CH₃), 1.65 d,(4H, 2 CH₃), 5.85, q, 및 5.95, q, together 1H. (이성체2, 10%), 1.76 s,(6H, 2× CH₃), 2.07(3H, CH₃).

[0294] **실시예 4: 비스[N-(1,1-디메틸-2-N-히드록시이민프로필)-2-아미노에틸]-(2-아미노에틸)메탄 (킬레이터 1)의 합성**

[0295] 무수 에탄올 (30 ml) 중의 트리스(2-아미노에틸)메탄 (4.047 g, 27.9 mmol)의 용액에 탄산칼륨 무수물 (7.7 g, 55.8 mmol, 2 eq)을 질소 대기 하에 격렬히 교반하면서 실온에서 가하였다. 3-클로로-3-메틸-2-니트로부탄 (7.56 g, 55.8 mmol, 2 eq)의 용액을 무수 에탄올 (100 ml) 중에 용해시키고, 이 용액 75ml를 반응 혼합물에 서서히 첨가하였다. 반응 후 실리카 상에서의 TLC [디클로로메탄, 메탄올, 진한 (0.88 sg) 암모니아 (100/30/5)에서 플레이트를 전개시키고, 닐히드린을 분무하고 가열하여 발색시킴]를 수행하였다. 모노-, 디- 및 트리-알킬화된 생성물은 이러한 순서대로 RF가 증가하는 것으로 나타났다. 3% 수성 암모니아 중의 7.5-75% 아세토니트릴의 구배에서 RPR 역상 컬럼을 사용하여 분석용 HPLC를 수행하였다. 반응물을 진공 하에 농축시켜 에탄올을 제거하고 물 (110 ml) 중에 재현탁시켰다. 수성 슬러리를 에테르 (100 ml)로 추출하여 트리알킬화된 화합물 및 친유성 불순물의 일부를 제거하여 물 층에 모노 및 목적하는 디알킬화된 생성물을 남겼다. 수용액을 암모늄 아세테이트 (2 eq, 4.3 g, 55.8 mmol)로 완충시켜 우수한 크로마토그래피가 되게 하였다. 자동화된 정제용 (preparative) HPLC로 정제하기 전에 수용액을 밤새 4℃에서 저장하였다.

[0296] 수율 (2.2g, 6.4mmol, 23%).

[0297] 질량 스펙트럼; 양이온 10 V 콘 (corn) 전압. M+H= 실측치: 344; 계산치 344.

[0298] NMR ¹H(CDC1₃), δ 1.24(6H, s, 2×CH₃), 1.3(6H, s, 2×CH₃), 1.25-1.75(7H, m, 3×CH₂, CH), (3H, s, 2×CH₂), 2.58 (4H, m, CH₂N), 2.88(2H, t CH₂N₂), 5.0 (6H, s, NH₂, 2×NH, 2×OH).

[0299] NMR ¹H ((CD₃)₂SO), δ 1.14×CH; 1.29, 3×CH₂; 2.1(4H, t, 2×CH₂);

[0300] NMR ¹³C((CD₃)₂SO), δ 9.0 (4×CH₃), 25.8(2×CH₃), 31.0 2×CH₂, 34.6 CH₂, 56.8 2×CH₂N; 160.3, C=N.

[0301] HPLC 조건: 유속 8 ml/분, 25 mm PRP 컬럼 사용, A=3% 암모니아 용액 (sp.gr = 0.88)/물; B = 아세토니트릴

[0302] 시간 %B

[0303] 0 7.5

[0304] 15 75.0

[0305] 20 75.0

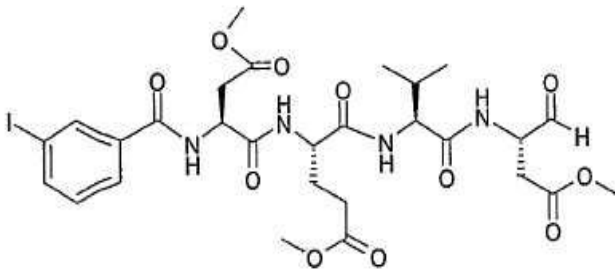
[0306] 22 7.5

[0307] 30 7.5

[0308] 작업 당 수용액 3 ml을 로딩하고, 12.5-13.5 분의 시간대에서 수집.

[0309] **실시예 5: 3-요오도-벤조일-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-H (화합물 3)의 합성**

[0310] <화합물 3>

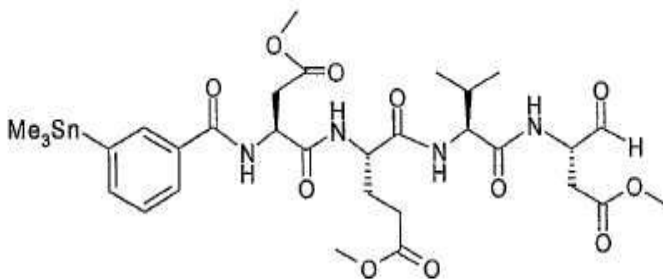


[0311]

[0312] 상기 서열에 상응하는 펩티드 수지를 표준 고체상 펩티드 화학 (Barany, G; Kneib-Cordonier, N.; Mullen, D.G. (1987) Int. J. Peptide Protein Research 30, 705-739)에 의해 H-Asp(tBu)-H NovaSyn TG 수지 (NovaBiochem) 상에서 합성하였다. 수동 질소 버블러 장치를 사용하였다 (Wellings, D. A., Atherton, E. (1997) in Methods in Enzymology (Fields, G. ed), 289, p. 53-54, Academic Press, New York). 합성된 펩티드 수지 3-요오도-벤조일-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Val-Asp(OtBu)-H NovaSyn TG 수지 (화합물 1)를 3급-부틸 보호기를 제거하기 위해 2.5% 물을 포함하는 트리플루오로아세트산 (TFA)으로 처리하였다. 아스파르트산 및 글루타르산 잔기의 측쇄를 메탄올 중의 티오닐 클로라이드 (20 eq)를 사용하여 메틸 에스테르로 전환시켜 펩티드 수지 (화합물 2)를 수득하였다. 펩티드 수지를 4 시간에 걸쳐 0.1% 트리플루오로아세트산 (TFA)을 포함하는 물 중의 60% 아세토니트릴 (ACN)로 처리하여 펩티드 생성물 (화합물 3)을 수지로부터 방출시켰다. 수지 잔사를 여과시키고, 여과물을 회전 증발로 농축시킨 후, 디에틸 에테르로 분쇄하고, 생성물을 원심분리시켜 분리시켰다. 생성물을 LC-MS로 특징 분석하였다. 분석용 RP-HPLC: $t_R = 8.2$ 분 (Phenomenex Luna 3 μ C18(2) 50 mm \times 2 mm, 0.1% 수성 TEA 중의 0-70% ACN, 10 분, 0.3 ml/분, UV 흡수 파장 $\lambda=214$ nm). 전기분무 MS: 산물의 $[M+H]^+$ 이론치 733.2 m/z, 실측치 733.2 m/z.

[0313] **실시예 6: 방사성합로제화를 위한 트리메틸스타닐 전구체 (화합물 4)의 합성**

[0314] <화합물 4>

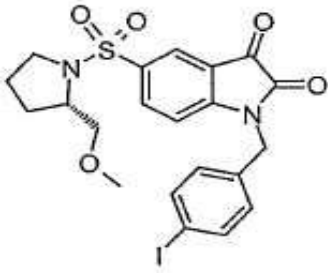


[0315]

[0316] 상기 실시예 5로부터의 펩티드 수지 3-요오도-벤조일-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-H NovaSyn TG 수지 (화합물 2)를 마이크로웨이브 기술을 이용해 스타닐화하였다. 3-요오도 관능화된 수지 (50 mg, 0.012 mmol)를 아르곤 하에 조사 튜브에 넣고, 무수 N 메틸피롤리돈 (NMP) (1 ml) 중의 테트라키스(트리페닐포스핀) 팔라듐 (7 mg, 0.006 mmol) 및 헥사메틸디틴 (7.86 mg, 5 μ l, 0.024 mmol)으로 처리하였다. 튜브를 밀봉하고, 캐버티 (cavity)에 위치시키고, 100 $^{\circ}$ C에서 5 분 동안 조사하였다. 냉각시킨 후, 검정 혼합물을 세척하고, 스타닐화된 펩티드 (화합물 4)를 수지로부터 절단시키고, 상기 실시예 5에 기술된 바와 같이 후처리하였다. 생성물을 LC-MS로 특징 분석하였다. 분석용 RP-HPLC: $t_R = 8.3$ 분 (Phenomenex Luna 3 μ C18(2) 50 mm \times 2 mm, 0.1% 수성 TEA 중의 10-80% ACN, 10 분, 0.3 ml/분, UV 흡수 파장 $\lambda=214$ nm). 전기분무 MS: 생성물의 $[M+H]^+$ 이론치 771.2 m/z, 실측치 771.1 m/z.

[0317] **실시예 7: 1-(4-요오도벤질)-5-(2-메톡시메틸-피롤리딘 술폰닐)-1H-인돌-2,3-디온 (화합물 5)의 합성**

[0318] <화합물 5>



[0319]

[0320]

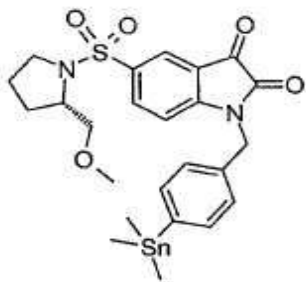
아르곤 하, 실온에서 60% 수소화나트륨을 무수 DMF (5 ml) 중의 5-(2-메톡시메틸-피롤리딘-1-술포닐)-1H-인돌-2,3-디온 (이사틴 유도체; Calbiochem으로부터 Cat #218826로 구입, 50 mg, 0.154 mmol)의 맑은 황색 용액에 첨가하였다. 혼합물은 바로 짙은 자주색으로 변하였다. 10 분 동안 교반시킨 후, DMF (200 μ l) 중의 4-요오도 벤질 브로마이드 (46.56 mg)를 가하고, 주위 온도에서 계속 교반하였다. 반응이 진행됨에 따라 자주색이 옅어지며, 24 시간 후 TLC (클로로포름:메탄올, 8:2) rf ca 2로 반응 완결을 확인하였다. 이어서, DMF를 감압 하에 증발시켜 제거하고, 잔사를 클로로포름: 메탄올 (8:2)을 사용하여 섬광 크로마토그래피하여 황색 반고체 61 mg (73%)을 수득하였다. 생성물을 정제용 RP HPLC로 추가 정제하였다. 컬럼 (Phenomenex Luna C18 10 μ , 22 \times 250 mm)을 60 분에 걸쳐 0.1% 수성 트리플루오로아세트산 (TFA) 중의 30-80% 아세토니트릴 (ACN) 구배를 사용하여 10 ml/분으로 용출하였다. 목적하는 피크 분획물을 모아 순수한 화합물 5를 수득하였다. 분석용 RP-HPLC: t_R = 5.39 분 (Phenomenex Luna 3 μ C18(2) 50 mm \times 2 mm, 0.1% 수성 TEA 중의 30% ACN, 10 분, 0.3 ml/분, λ =214 nm). 전기분무 MS: 생성물의 $[M+H]^+$ 이론치 541.0 m/z, 실측치 540.9 m/z.

[0321]

실시예 8: 5-(2-메톡시메틸-피롤리딘-1-술포닐)-1-(4-트리메틸스타닐벤질)-1H-인돌-2,3-디온 (화합물 6)

[0322]

<화합물 6>



[0323]

[0324]

톨루엔 (8 ml) 중의 화합물 5 (27 mg, 0.05 mmol; 상기 실시예 7로부터 수득), 테트라키스(트리페닐포스핀) 팔라듐 (5.78 mg, 0.005 mmol) 및 헥사메틸디틴 (21 μ l, 0.10 mmol)의 맑은 황색 용액을 5 분 동안 120 $^{\circ}$ C에서 마이크로웨이브 조사 하에 가열하였다. 생성된 검정 혼합물을 여과시켰다. 여과물을 증발 건조시키고, 잔사를 에틸 아세테이트: 헥산 (1:1)를 사용하면서 섬광 크로마토그래피로 정제하여 순수한 생성물을 황색 오일로서 수득하였다 (수율: 83%). 분석용 RP-HPLC: t_R = 7.92 분 (Phenomenex Luna 3 μ C18(2) 50 mm \times 2 mm, 0.1% 수성 TEA 중의 30-80% ACN, 10 분, 0.3 ml/분, λ =214 nm). 전기분무 MS: 생성물의 $[M+H]^+$ 이론치: 578.9 m/z, 실측치 578.9 m/z.

[0325]

실시예 9: 시험관내 카스파제-3 억제 검정

[0326]

카스파제-3 억제제의 시험관내 효능을 시판되는 검정 키트 (예: Biomol, BIOMOL International L.P. 5120 Butler Pike, Plymouth Meeting, PA 19462-1202)를 사용하여 평가하였다. 간단히 설명하면, 카스파제-3 검정 키트는 카스파제-3의 프로테아제 활성을 측정하도록 고안된 완전한 검정 시스템이다. 이는 열량측정 기질 (DEVD-pNA) 및 플루오로생성 기질 (DEVD-AMC) 모두를 포함한다. 열량측정 기질로부터 p-니트로아닐라이드 (pNA)의 분해는 405nm에서의 흡광도를 증가시킨다. 형광 검정은 펩티드 기질의 C-말단으로부터 7-아미노-4-메

틸코우마린 (AMC) 염료의 분해에 기초한다. 기질로부터 염료의 분해는 460 nm에서의 형광 강도를 증가시킨다. 검정은 편리한 96-웰 마이크로플레이트 포맷에서 수행하였다. 키트는 잠정적 치료 표적물인 카스파제-3의 억제제를 스크리닝하는데 유용하였다. 또한, 억제제 DEVD-CHO (알테히드)을 기본형 대조 억제제로서 포함하였다. DEVD 아미노산 서열은 PARP [poly(ADP-ribose) polymerase]에 있는 카스파제-3 분해 위치로부터 유도되었다.

실시예 10: 카스파제-3 세포 검정

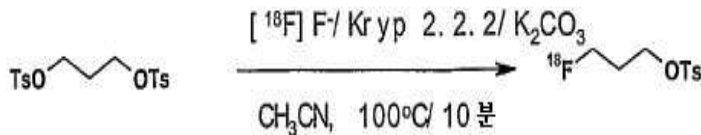
Jurkat 및 HL-60 세포를 세포-기준 모델에 사용하고, 문헌 [Wang et al., "A Role for Mitochondrial Bak in Apoptotic Response to Anticancer Drugs", J. Biol. Chem., Aug 2001; 276: 34307-34317]에 기술된 바와 같이 스타우로스포린으로 아포토시스를 유발하였다.

이관능성 세포 기준 검정은 카스파제-3 억제제가 세포로 들어간 후 카스파제-3 표적물에 결합하는 능력을 시험하는데 이용된다. 이 검정은 FLICA (Fluorochrome Inhibitors of Caspases)에 기초한다. 억제제는 세포를 투과할 수 있으며, 일단 세포로 들어가면 활성화 카스파제-3에 공유 결합하고, FLICA 형광이 검출될 수 있다. FLICA 프로브는 세포군에 첨가하였을 때 각각의 세포에 들어가며, 활성화 카스파제 헤테로이량체의 큰 서브유닛에 있는 반응성 시스테인 잔기에 공유적으로 결합하여 추가의 효소 활성을 억제한다. 결합된 표지된 시약은 세포에 보유되는 반면, 결합되지 않은 시약은 세포 밖으로 확산하여 세척된다. 녹색 형광 시그널 시그널은 시약 첨가 시 세포군에 존재하는 활성화 카스파제-3의 양에 대한 직접적 측정치이다. 결합된 표지된 시약을 포함하는 세포는 형광으로 96-웰 플레이트에서 분석될 수 있다.

또한, 검정 확인 시험 제품도 카스파제-3 표적된 억제제였으며, FLICA 처리 전에 이를 아포토시스 세포에 첨가하였다. 강력한 시험 화합물은 활성화 카스파제-3에 대한 FLICA의 결합을 차단하여 FLICA 관련된 형광의 감소로 효능을 모니터링할 수 있게 하였다.

실시예 11: N-알킬화를 위한 ¹⁸F-표지된 유도체의 합성

3-[¹⁸F] 플루오로프로필 토실레이트의 합성



2-방향 탭 (tap)을 통해 아세토니트릴 중의 Kryptofix 222 (10 mg) (300 μl) 및 물 중의 탄산칼륨 (4 mg) (300 μl) (유리 바이알에 준비됨)을 플라스틱 주사기 (1 ml)을 사용해 황동 히터에 위치한 탄소 유리 반응 용기에 옮겼다. 이어서, 표적수 (0.5-2 ml) 중의 ¹⁸F-플루오라이드 (185-370 MBq)을 2-방향 탭을 통해 첨가하였다. 히터를 125°C로 설정하고 타이머를 맞추었다. 15 분 후, 3개 분취물의 아세토니트릴 (0.5 ml)을 1 분 간격으로 첨가하였다. ¹⁸F-플루오라이드를 총 40 분 이하로 건조시켰다. 40 분 후, 히터를 압축 공기로 냉각시키고, 포트 뚜껑을 제거하고, 1,3-프로판디올-*d*-*p*-토실레이트 (5-12 mg) 및 아세토니트릴 (1 ml)을 첨가하였다. 포트 뚜껑을 교체하고, 라인을 마감로 씌웠다. 히터를 100°C로 설정하고, 100°C/5 분으로 표지하였다. 표지를 마친 후, 하기 조건을 이용해 Gilson RP HPLC로 3-[¹⁸F] 플루오로프로필 토실레이트를 분리하였다:

[0335]	컬럼	u-bondapak C18 7.8×300 mm
[0336]	용출제	물 (펌프 A): 아세토니트릴 (펌프 B)
[0337]	루프 크기	1 ml
[0338]	펌프 속도	4 ml/분
[0339]	파장	254 nm
[0340]	구배	20 분에 걸친 5-90% 용출제 B
[0341]	생성물 Rt	12 분

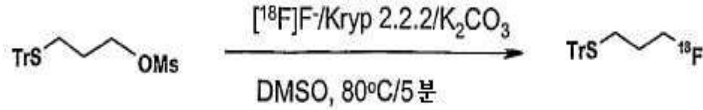
분리 후, 커트 샘플 (약 10 ml)을 물 (10 ml)로 희석하고, 조건-조절된 C18 셸 팩(sep pak)에 로딩하였다. 셸

팩을 15 분 동안 질소로 건조시키고, 유기 용매 피리딘 (2 ml), 아세토니트릴 (2 ml) 또는 DMF (2 ml)로 플러싱 하였다. 약 99%의 활성물을 플러싱하였다.

[0343] 3-[¹⁸F] 플루오로프로필 토실레이트를 피리딘에서의 환류에 의해 아민을 N-알킬화하는데 사용하였다.

[0344] 실시예 12: S-알킬화를 위한 [¹⁸F]-티올 유도체

[0345] 단계 (a): 3-[¹⁸F] 플루오로-트리틸술폰아닐-프로판의 제조



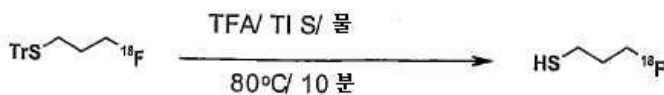
[0346]

[0347] 2-방향 탭을 통해 아세토니트릴 중의 Kryptofix 222 (10 mg) (800 μl) 및 물 중의 탄산칼륨 (1 mg) (50 μl) (유리 바이알에 준비됨)을 플라스틱 주사기 (1 ml)을 사용해 황동 히터에 위치된 탄소 유리 반응 용기에 옮겼다. 이어서, 표적수 (0.5-2 ml) 중의 ¹⁸F-플루오라이드 (185-370 MBq)을 2-방향 탭을 통해 첨가하였다. 히터를 125 °C로 설정하고 타이머를 맞추었다. 15 분 후, 3개 분취물의 아세토니트릴 (0.5 ml)을 1 분 간격으로 첨가하였다. ¹⁸F-플루오라이드를 총 40 분 이하로 건조시켰다. 40 분 후, 히터를 압축 공기로 냉각시키고, 포트 뚜껑을 제거하고, 트리메틸-(3-트리틸술폰아닐-프로폭시)실란 (1-2 mg) 및 DMSO (0.2 ml)를 첨가하였다. 포트 뚜껑을 교체하고, 라인을 마개로 씌웠다. 히터를 80°C로 설정하고, 80°C/5 분으로 표지하였다. 표지를 마친 후, 반응 혼합물을 하기 조건을 이용해 RP HPLC로 분석하였다:

[0348]	컬럼	u-bondapak C18 7.8×300 mm
[0349]	용출제	0.1% TFA/물 (펌프 A)
[0350]		: 0.1% TFA/아세토니트릴 (펌프 B)
[0351]	루프 크기	100 μl
[0352]	펌프 속도	4 ml/분
[0353]	파장	254 nm
[0354]	구배	1 분 40%B
[0355]		15 분 40-80%B
[0356]		5 분 80%B

[0357] 반응 혼합물을 DMSO/물 (1:1 v/v, 0.15 ml)로 희석하고, 조건-조절된 t-C18 셉-팩에 로딩하였다. 카트리지를 물 (10 ml)로 세척하고 질소를 사용해 건조시킨 후, 3-[¹⁸F] 플루오로-1-트리틸술폰아닐-프로판을 4 분취물의 아세토니트릴 (0.5 ml/분취물)로 용출하였다.

[0358] 단계 (b): 3-[¹⁸F] 플루오로-프로판-1-티올의 제조



[0359]

[0360] 아세토니트릴 (1-2 ml) 중의 3-[¹⁸F] 플루오로-1-트리틸술폰아닐-프로판의 용액을 질소 스트림을 사용하여 100°C/10 분으로 증발 건조시켰다. TEA (0.05 ml), 트리아이소프로필실란 (0.01 ml) 및 물 (0.01 ml)의 혼합물을 가하고, 80°C/10 분으로 가열하여 3-[¹⁸F] 플루오로-프로판-1-티올을 생성하였다.

[0361] 단계 (c): -N(CO)CH₂Cl 전구체와의 반응

[0362] 클로로아세틸 전구체를 표지하기 위한 일반적인 절차에 따라 단계 (b)로부터의 3-[¹⁸F] 플루오로-1-머캅토-프로

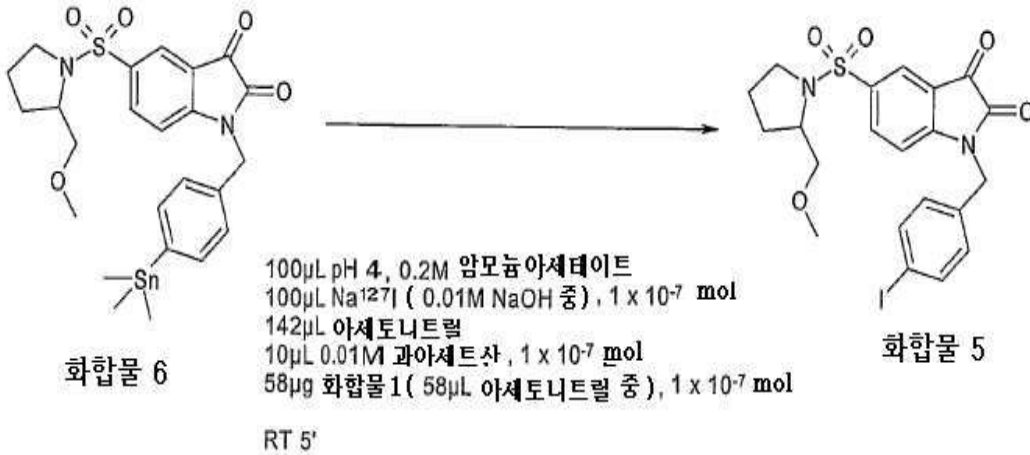
관을 포함하는 반응 용기를 압축 공기로 냉각시킨 후, 암모니아 (물 중 27%, 0.1 ml) 및 물 중 전구체 (1 mg) (0.05 ml)를 첨가하였다. 혼합물을 80°C/10 분으로 가열하였다.

[0363] **실시예 13: 카스파제-3 억제제의 [¹²³I]-방사성표지화**

[0364] 단계 (a): 화합물 5의 또 다른 합성

[0365] 화합물 5는 비-방사성 동족체이며, 요오드 동위원소가 ¹²⁷I인 경우, 하기 반응식 4에 따라 제조되었다.

반응식 4



[0366]

[0367] 질량 분광 분석으로 화합물 5의 실체를 확인하였다.

[0368] 단계 (b): 화합물 5A의 합성

[0369] ¹²³I-표지된 화합물 5 (화합물 5A)을 제조하기 위해서, 단계 (a)와 유사한 프로토콜을 수행하였다. 담체-비포함 나트륨 [¹²³I] 요오다이드 8-30 µl에, 0.2 M 암모늄 아세테이트 완충액 (pH 4) 100 µl, 나트륨 [¹²⁷I] 요오다이드 10 µl, 0.01 M 수산화나트륨 중의 15 mg/100 ml 요오드화나트륨 용액 (1×10⁻⁸ mol) 및 아세토니트릴 50 µl을 가하였다. 시약들을 혼합하고, 실란처리된 P15 바이알에 옮겼다. 마지막으로, 과아세트산 용액 10 µl (1×10⁻⁸ mol) 및 아세토니트릴 중의 화합물 6의 1 mg/ml 용액 58 µl (1×10⁻⁷ mol)를 첨가하였다. [¹²³I]-화합물 5 (화합물 5A)을 HPLC 정제하고, 10% 에탄올 (용해도를 돕기 위함)로 50 mM 인산나트륨 완충액 (pH 7.4) 중에 각각 14 MBq/nmol 및 41 MBq/nmol의 통상적인 비활성을 갖도록 20 MBq/ml 또는 100 MBq/ml로 희석하였다. 2개의 제제 모두 pH 7.5에서 안정한 것으로 밝혀졌다 (4 시간에 걸쳐 >95% RCP). 단계 (a)로 부터의 ¹²⁷I 표준물과 공동-용출이 관측되었으며 실체를 확인하였다.