



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0054285
(43) 공개일자 2020년05월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/595 (2006.01) A61K 38/22 (2006.01)
A61K 51/08 (2006.01) A61K 51/12 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/595 (2013.01)
A61K 38/2207 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7010967
- (22) 출원일자(국제) 2018년08월27일
심사청구일자 2020년04월16일
- (85) 번역문제출일자 2020년04월16일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2018/073020
- (87) 국제공개번호 WO 2019/057445
국제공개일자 2019년03월28일
- (30) 우선권주장
17192428.5 2017년09월21일
유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인
폴 슈레 앙스퍼뛰
스위스 5232 빌리겐 피에스아이
- (72) 발명자
베에, 마르틴
스위스 4460 켈테르킨덴 라우라헤르베크 3
민트, 토마스
오스트리아 1180 비엔 슈만스가쎄 10/16
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 특허 CCK2 수용체 양성 종양 진단 및/또는 치료에 사용하기 위한, 미니가스트린 유도체

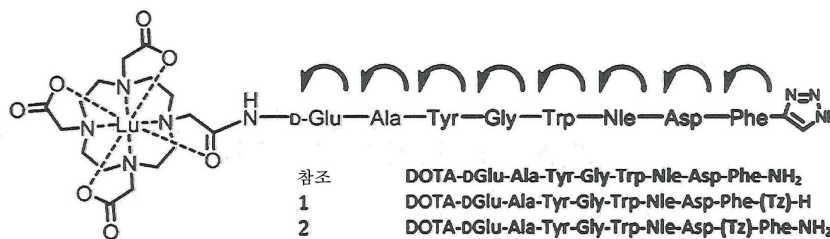
(57) 요약

따라서, 본 발명의 목적은 CCK-2 수용체 양성 종양에서의 축적은 더욱 개선하고 동시에 다른 기관, 예컨대 신장에서의 축적은 매우 낮은 미니가스트린 유도체를 제공하는 것이다. 이 목적은 하기 식을 갖는 미니가스트린 유도체에 의해 본 발명에 따라 달성된다:

(뒷면에 계속)

대표도

DOTA[NLE¹⁵]-MG11을 갖는 트리아졸-스캔



- | | |
|----|------------------------------------------------------------|
| 참조 | DOTA-DGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH ₂ |
| 1 | DOTA-DGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-(Tz)-H |
| 2 | DOTA-DGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-(Tz)-Phe-NH ₂ |
| 3 | DOTA-DGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-(Tz)-Asp-Phe-NH ₂ |
| 4 | DOTA-DGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-(Tz)-Nle-Asp-Phe-NH ₂ |
| 5 | DOTA-DGlu-Ala-Tyr-Gly-(Tz)-Trp-Nle-Asp-Phe-NH ₂ |
| 6 | DOTA-DGlu-Ala-Tyr-(Tz)-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH ₂ |
| 7 | DOTA-DGlu-Ala-(Tz)-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH ₂ |
| 8 | DOTA-DGlu-(Tz)-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH ₂ |
| 9 | DOTA-(Tz)-DGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH ₂ |

X-Z-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (Y), 상기 식에서 서열 Z, Ala, Tyr, Gly, Trp, Met, Asp, Phe의 아미노산 및 NH₂ 또는 Y (C-말단) 사이, 전 또는 후의 연결 또는 말단 아미드 결합 중 적어도 하나는 1,4-이치환된 또는 1,5-이치환된 1,2,3-트리아졸로 대체되고, X는 CCK-2 수용체 관련 질환의 진단 및/또는 치료 중재를 목적으로 펩티드에 부착된 화학적 기를 나타내고, Y는 선형 또는 분지형 알킬-, 알케닐-, 알키닐-, 방향족- 및 헤테로시클릭 알콜로부터 유도되는 아미드 및 에스테르를 포함하지만 이로 제한되지 않는 펩티드의 C-말단 변형, 예컨대 아미드, 1급 및 2급 아미드, 유리 카르복실산 및 카르복실산 에스테르 유도체를 나타내고, Z는 링커 또는 -DGlu-DGlu-DGlu-DGlu-DGlu-DGlu-)를 나타낸다. 이들 미니가스트린 유도체는 높은 특이적 내재화, 우수한 IC₅₀ 값 및 충분한 혈장 안정성을 갖는다.

(52) CPC특허분류

- A61K 51/08 (2013.01)
- A61K 51/1234 (2013.01)
- A61K 51/1244 (2013.01)
- G01N 33/57484 (2013.01)
- G01N 2333/726 (2013.01)

쉬블리, 로게르

스위스 5400 바덴 샤프텐라인스트라쎄 42

(72) 발명자

그룹, 나탈리

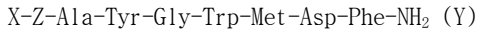
스위스 8057 취리히 이르헬스트라쎄 12

명세서

청구범위

청구항 1

하기 식을 갖는 미니가스트린 유도체:



상기 식에서, 서열 Z, Ala, Tyr, Gly, Trp, Met, Asp, Phe의 아미노산 및 NH₂ 또는 Y (C-말단) 사이, 전 또는 후의 연결 또는 말단 아미드 결합 중 적어도 하나는 1,4-이치환된 또는 1,5-이치환된 1,2,3-트리아졸로 대체되고, X는 CCK-2 수용체 관련 질환의 진단 및/또는 치료 중재를 목적으로 펩티드에 부착된 화학적 기를 나타내고, Y는 선형 또는 분지형 알킬-, 알케닐-, 알키닐-, 방향족- 및 헤테로시클릭 알콜로부터 유도되는 아미드 및 에스테르를 포함하지만 이로 제한되지 않는 펩티드의 C-말단 변형, 예컨대 아미드, 1급 및 2급 아미드, 유리 카르복실산 및 카르복실산 에스테르 유도체를 나타내고, Z는 링커 또는 DGlu*를 나타내고, 여기서 DGlu*는 1 내지 6개의 반복을 갖는 DGlu의 쇠 (-DGlu- 내지 -DGlu-DGlu-DGlu-DGlu-DGlu-DGlu-)를 나타낸다.

청구항 2

제1항에 있어서, 메티오닌이 바람직하게는 하나의 DGlu만을 갖는 미니가스트린 유도체 [Nle¹⁵]-MG11을 수득하고/하거나 미니가스트린 유도체 PP-F11N을 수득하기 위해 노르루이신으로 대체되는 것인 미니가스트린 유도체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, X가 방사성금속을 위한 킬레이터를 포함하는 방사성핵종을 나타내는 것인 미니가스트린 유도체.

청구항 4

제3항에 있어서, 방사성금속을 위한 킬레이터가 DOTA (1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산), NOTA, NOTAGA, CHX-A''-DTPA 및 TCMC로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 미니가스트린 유도체.

청구항 5

제3항에 있어서, 방사성핵종이 ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y, ¹¹¹In, Ga-68/67, Tc-99m, Cu-64/67, Ac-225, Bi-213, Pb-212 및 Th-227로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 미니가스트린 유도체.

청구항 6

제2항에 있어서, PP-F11N 및 [Nle¹⁵]-MG11이 각각 DOTA-DGlu-DGlu-DGlu-DGlu-DGlu-DGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH₂ 및 DOTA-DGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH₂로 정의되는 것인 미니가스트린 유도체.

청구항 7

제6항에 있어서, DOTA-DGlu-DGlu-DGlu-DGlu-DGlu-DGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH₂가 ¹⁷⁷Lu로 표지되거나 DOTA-DGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH₂가 ¹⁷⁷Lu로 표지되는 것인 미니가스트린 유도체.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, X가 광학적으로 활성인 화학적 화합물을 나타내는 것인 미니가스트린 유도체.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, X가 화학요법 활성 화합물 또는 티로신 키나제 억제제와 같은 임의의 다른 치료 활

성 화합물 또는 면역원성 활성 화합물을 나타내는 것인 미니가스트린 유도체.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, X가 진단 기능을 갖거나 (예컨대, 광학 활성 또는 MRI 조영제) 그 자체가 치료 기능을 갖거나 활성 화합물을 탑재한 나노입자 또는 리포솜을 나타내는 것인 미니가스트린 유도체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미니가스트린 유도체 및 CCK2 수용체 양성 종양 진단 및/또는 치료에서 그들의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] G 단백질-커플링된 수용체 (GPCR)는 90년대 초반부터 방사성표지된 펩티드의 표적 단백질로 사용된다. 소마토스타틴 수용체는 방사성-핵종 영상화 및 펩티드 (Lit)로의 요법에 대한 프로토타입으로서 옥트레오티드 (Lit)의 Y-90 및 Lu-177 표지된 유도체를 사용하는 신경내분비 종양에 대한 임상적 제1선 요법이 되었다. 가스트린 방출 펩티드 유사체 (GRP), 글루카곤-유사 펩티드 1 유사체 (GLP-1), 뉴로텐신 유사체 (NT) 또는 뉴로펩티드 Y 유사체 (NPY)를 포함하는 몇몇 방사성표지된 펩티드가 종양 상의 과다발현된 GPCR를 표적하는 가능성에 대해 시험되었다 (Macke, Reubi J Nucl Med 2008; 49:1735-1738). 추가의 매우 흥미로운 표적은 콜레시스토키닌-2 수용체 (CCK-2R)이다. 이 수용체는 주로 수질성 갑상선 암종 (MTC), 소세포폐암 (SCLC) 및 기질성 난소 종양에서 발현된다 (Reubi, Int J Cancer. 1996 and Reubi, Cancer Res. 1997). 방사성표지된 가스트린 유사체는 영상화 및 요법을 목적으로 삼기에 적합한 후보이다. In-111 표지된 가스트린 유사체는 옥트레오스캔 (OctreoScan)-111과 비교하여 MTC를 검출하는데 우수하며 특히 소마토스타틴 수용체 신티그래피에서 음성인 경우 신경내분비 종양에 대한 추가의 정보를 제공하는 것으로 나타났다 (Endocr Relat Cancer. 2006 Dec;13(4):1203-11.; Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2006 Nov;33(11):1273-9).

[0003] 그러나, 방사성표지된 펩티드는 높은 신장 흡수로 인해 요법에 사용될 수 없었다. 높은 신장 흡수는 6개의 음으로 하전된 글루탐산과 관련된다. 12개의 가스트린 관련 화합물이 111In 표지된 화합물로서 설계되고, 합성되고, 비교되었다. 높은 종양 대 신장 비율과 관련하여 가장 좋은 화합물은 6개의 D-글루탐산 또는 6개의 글루타민을 갖는 미니가스트린이다. 이들 화합물은 여전히 쉽게 산화될 수 있는 메티오닌을 보유한다. 이는 메티오닌의 산화 후 수용체 친화성이 현저히 감소되고 GMP 하에서의 생성이 현저히 방해될 수 있기 때문에 임상 적용에 불리하다.

[0004] 전이된 수질성 갑상선 암종 (MTC), 소세포폐암 (SCLC) 및 또한 CCK-2 수용체 양성 종양을 갖는 환자에서 요법 및 영상 생성의 상당한 개선을 위한 높은 잠재력은 방사성-표지된 가스트린 유사체로의 종양 세포의 특이적 표지화를 갖는다. 이러한 발견의 근거는 조사된 MTC의 92%에서 각각의 CCK-2 표적 수용체의 과다-발현의 증거이며, 상기 증거는 시험관내 연구에 의해 얻어졌다 [Reubi 1997]. 또한, 동일한 작업 그룹은 소세포폐암의 57%, 별아교세포종의 65% 및 기질성 난소 종양의 100%에서 CCK-2 표적 수용체의 동일한 과다-발현을 확인하였다.

[0005] 첫 번째 요법 연구 (0상 연구)는 진행되고 전이된 수질성 갑상선 암종을 갖는 8명의 환자에서 수행되었다. 2명의 환자에 대해, 부분적인 완화가 달성되었으며, 4명의 환자는 ⁹⁰Y-표지된 미니가스트린 유사체로의 요법 후 암 질환 MTC의 이전에 강하게 진행되던 과정이 안정화를 나타내었다. 이 연구는 신장에서 상기 검정에 사용된 물질의 강한 축적 측면에서 요법의 신독성으로 인해 중단되어야 했다.

[0006] 유럽 COST 이니셔티브 (과학 및 기술에 대한 유럽 협력)의 지원을 받아, 그 동안 다수의 상당히 개선된 방사성-표지된 가스트린-유사체가 다양한 작업 그룹들에 의해 합성되었으며 그들의 특성에 대해 조사되었다. 오래된 가스트린 유사체와 비교하여, 이들 덜 오래된 물질은 인간 조직에서의 흡수와 관련하여 상당히 더 높은 종양-대-신장 비율을 보유한다 [Laverman 2011, Polenc-Peittl 2011, Ocak 2011, Fani 2012]. 현재, 이들 덜 오래된 가스트린 유사체들 중, ¹⁷⁷Lu-PP-F11 (6개의 D-Glu 잔기를 갖는 선형 미니가스트린 유사체, 이하 PP-F11로 불림)은 신장에서의 낮은 축적을 동반하면서 종양에서 그의 높은 유리한 축적으로 인해 미래의 방사성핵종 요법에 가장 적합한 특성을 나타내었다.

[0007] 이 PP-F11 미니가스트린 유사체는 또한 국제 특허 출원 WO 2015/067473 A1에 따라 더욱 개선되었으며, 여기서

미니가스트린 유사체 PP-F11은 식: X-DGlu-DGlu-DGlu-DGlu-DGlu-DGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Y-Asp-Phe-NH₂을 갖고, 여기서 Y는 메티오닌을 대체하는 아미노산을 나타내고 X는 CCK-2 수용체 관련 질환에서 진단 및/또는 치료 중재를 목적으로 펩티드에 부착되는 화학적 기를 나타낸다. 특히, 높은 종양 대 신장 비율과 관련하여 매우 적합한 화합물은 6개의 D-글루탐산 또는 6개의 글루타민을 갖는 미니가스트린 유도체이다. 이들 화합물은 여전히 쉽게 산화될 수 있는 메티오닌을 보유하며 이는 발생할 수 있는 형태로 인해 GMP 하에서 임상 적용에 불리하다. 따라서, 메티오닌을 생물학적 활성은 보유하면서 비산화성 이소스테릭 아미노산으로 대체하면 산화 잠재력이 없는 화합물을 초래한다. 이는 저장 및 생성 동안 더 낮은 친화성 화합물을 초래하여 종양 대 신장 비율을 낮출 수 있는 산화를 피한다. WO 2015/067473 A1에 따른 바람직한 실시양태에서, 메티오닌은 노르루이신으로 대체된다. 이러한 소위 PP-F11N 미니가스트린은 우수한 종양-신장 비율을 나타내므로 임상 적용에 매우 유망한 후보 중의 하나이다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 CCK-2 수용체 양성 종양에서 펩티드의 대사 안정화 또는 그의 수용체 친화성 및 특이성의 개선에 의해 축적을 더욱 개선하고 동시에 다른 기관, 예컨대 신장에서는 축적이 매우 낮은 미니가스트린 유도체를 제공하는 것이다.

발명의 내용

[0009] 이 목적은 하기 식을 갖는 미니가스트린 유도체에 의해 본 발명에 따라 달성된다:

[0010] X-Z-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (Y)

[0011] 상기 식에서, 서열 Z, Ala, Tyr, Gly, Trp, Met, Asp, Phe의 아미노산 및 NH₂ 또는 Y (C-말단) 사이, 전 또는 후의 연결 또는 말단 아미드 결합 중 적어도 하나는 1,4-이치환된 또는 1,5-이치환된 1,2,3-트리아졸로 대체되고, X는 CCK-2 수용체 관련 질환의 진단 및/또는 치료 중재를 목적으로 펩티드에 부착된 화학적 기를 나타내고, Y는 선형 또는 분지형 알킬-, 알케닐-, 알키닐-, 방향족- 및 헤테로시클릭 알콜로부터 유도되는 아미드 및 에스테르를 포함하지만 이로 제한되지 않는 펩티드의 C-말단 변형, 예컨대 아미드, 1급 및 2급 아미드, 유리 카르복실산 및 카르복실산 에스테르 유도체를 나타내고, Z는 링커 또는 DGlu*를 나타내고, 여기서 DGlu*는 1 내지 6개의 반복을 갖는 DGlu의 쇠 (-DGlu- 내지 -DGlu-DGlu-DGlu-DGlu-DGlu-DGlu-)를 나타낸다.

[0012] 이들 미니가스트린 유도체는 높은 수용체 특이적 세포 내재화, CCK2에 대한 우수한 IC₅₀ 값 및 충분한 혈장 안정성을 갖는다.

[0013] 바람직하게는, 메티오닌은 노르루이신 또는 수용체에 대한 친화성을 보존하는 또 다른 아미노산으로 대체되며, 바람직하게는 하나의 DGlu만을 갖는 미니가스트린 유도체 [Nle¹⁵]-MG11을 제공한다.

[0014] 방사성 암 치료와 관련하여, X는 ¹⁷⁷Lu 또는 ⁹⁰Y 또는 ¹¹¹In과 같은 방사성금속을 위한 킬레이터와 같은 부착기, 또는 ¹⁸F, ¹¹C 또는 방사성아이오딘과 같은 비-금속을 위한 보결원자단을 포함하는 방사성핵종 또는 사전-표적화 접근법에 적합한 관능기를 나타낼 수 있다. 의학적 영상화를 개선하기 위해, X는 광학적으로 활성인 화학적 화합물, 예컨대 알렉사 플루오르(Alexa Fluor)® 647, IRDye 680RD, DY-700 또는 임의의 다른 광활성 물질을 나타낼 수 있으며, 광학적 치료 적용을 위해 포토프린 (Photofrin), 포르스캠 (Forscam) 또는 포토클로르 (Photochlor)와 같은 감광제일 수 있다. 두 적용 모두를 위해, 활성 화학적 화합물은 광학 활성 나노입자일 수 있다. 화학요법 중재를 지지하기 위해, X는 화학요법 활성 화합물, 예컨대 겐시타빈, 독소루비신 또는 시클로포스파미드를 나타낼 수 있다. X는 또한 영상화제 (염료, 방사성핵종)와 치료 실체 (세포독성 화합물, 방사성핵종)의 조합을 나타낼 수 있다. 기재된 작용제의 전달은 X로서 나노입자 또는 리포솜에 의해 수행될 수 있지만, 그들은 화학요법제를 탑재한다.

[0015] Z는 또한 펩티드의 생물학적 특성과의 잠재적인 간섭을 피하기 위해 거리를 유지하면서 펩티드를 영상화 프로브 또는 치료제와 공유적으로 연결하는 링커 또는 스페이서 유닛을 나타낼 수 있다. 링커 모이어티는 1-10개의 헤테로 원자 (O, S, N, P를 포함), 모든 탄소 또는 헤테로시클릭 방향족 모이어티, 예컨대 페닐, 나프탈렌, 트리아졸, 티오펜, 푸란 등, 및 주요 링커 쇠에 또는 하나 또는 몇몇 측쇄에 불포화된 C-C 또는 C-헤테로원자 (O, N, S, P) 결합을 함유하나 이로 제한되지 않는 1-20개 탄소 길이의 선형 또는 분지형 알킬 쇠를 포함하나 이로 제한되지 않을 수 있다.

[0016] 바람직하게는, X는 킬레이터를 나타내고, 여기서 방사성금속을 위한 하나의 킬레이터는 DOTA (1,4,7,10-테트라

아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산)일 수 있고/있거나 방사성핵종은 ¹⁷⁷Lu, Ga-68/67, ⁹⁰Y 및 ¹¹¹In으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 방사성핵종 (Tc-99m, Cu-64/67, Ac-225, Bi-213, Pb-212, Th-227) 및 다른 적합한 킬레이터는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있으며, 예컨대 MAG3, HYNIC, NOTA, NODAGA, DOTAGA, CHX-A''-DTPA, DFO, TCMC, HEHA, 사르코파진, 시클람의 교차-브릿징된 버전 및 실센 (cyclen) 킬레이터이다.

- [0017] 적합한 미니가스트린 유도체는 하기와 같이 정의되는 PP-F11N 및 [Nle¹⁵]-MG11이다:
- [0018] DOTA-DGlu-DGlu-DGlu-DGlu-DGlu-DGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH₂ (PP-F11N) 및
- [0019] DOTA-DGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH₂ ([Nle¹⁵]-MG11).
- [0020] 바람직하게는, X는 진단 기능을 갖거나 (예컨대, 광학 활성 또는 MRI 조영제) 그 자체로서 치료 기능을 갖거나 활성 화합물을 탑재한 나노입자 또는 리포솜을 나타낸다.
- [0021] 본 발명의 미니가스트린 유도체의 사용과 관련하여, CCK-2 수용체 관련 질환에서 진단 중재 및/또는 CCK-2 수용체 관련 질환에서 치료 중재가 예상된다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 이하, 본 발명의 바람직한 실시양태가 첨부된 도면과 관련하여 더욱 상세히 설명된다:
- 도 1은 명명된 트리아졸-스캔에 따른 유도체화된 형태의 [Nle¹⁵]-MG11의 특이적 내재화를 도시하고;
- 도 2는 명명된 트리아졸-스캔에 따른 유도체화된 형태의 [Nle¹⁵]-MG11의 반-최고 억제 농도 IC₅₀을 도시하고;
- 도 3은 명명된 트리아졸-스캔에 따른 유도체화된 형태의 [Nle¹⁵]-MG11의 혈장 안정성을 도시하고;
- 도 4는 도 1 내지 3에 나타난 결과의 요약을 도시하고;
- 도 5는 PP-F11N 및 [Nle¹⁵]-MG11 유도체 DOTA[Nle¹⁵, Tyr¹²-(Tz)-Gly¹³]-MG11의 비교를 도시하고;
- 도 6은 주로 DOTA[Nle¹⁵]-MG11을 갖는 트리아졸 스캔을 도시하고;
- 도 7은 표 2로부터의 Bis-TZMG의 총 내재화를 도시하고;
- 도 8은 표 2로부터의 Bis-TZMG의 반-최고 억제 농도 IC₅₀을 도시하고;
- 도 9는 표 2로부터의 Bis-TZMG의 혈장 안정성을 도시하고;
- 도 10은 2개의 일-치환된 트리아졸로미니가스트린 대 추가의 개선을 나타내는 돌연변이 둘 다를 갖는 유사체의 시험관내 특징을 도시하고;
- 도 11은 표 3에 따른 PPF11N 및 이의 유도체화된 형태의 총 내재화를 도시하고;
- 도 12는 표 3에 따른 유도체화된 형태의 PPF11N의 반-최대 억제 농도 IC₅₀을 도시하고;
- 도 13은 표 3에 따른 유도체화된 형태의 PPF11N의 혈장 안정성을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] [Nle¹⁵]-MG11은 다양한 유형의 암에서 과다발현되는 콜레스이스토키닌 2 수용체 (CCK2R)에 대해 높은 친화성 및 특이성을 갖는 조절 펩티드인 미니가스트린의 절두된 유사체이다. 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산 (DOTA)의 N-말단 컨주게이션은 금속성 방사성핵종 (예컨대, ¹⁷⁷Lu)으로 펩티드의 방사성표지화 및 생체내 종양 영상화 및 펩티드 수용체 방사성핵종 요법에 대한 후속 사용을 가능하게 한다.
- [0024] MG11을 종양-표적화 벡터로서 이용하는데 있어서의 결함은 불과 몇 분의 생물학적 반감기를 초래하는 빠른 효소적 분해로 인한 이의 낮은 종양 흡수이다. 트리아졸-스캔으로 불리는, 안정한 1,4-이치환된 또는 1,5-이치환된

1,2,3-트리아졸에 의한 펩티드 서열에서 단일 아마이드 결합의 체계적인 대체는 개선된 단백질 분해 안정성 및 중앙 표적화 특성을 초래한다. 이 새로운 방법론의 일반적 유용성을 입증하기 위해, 도 6에 체계적으로 도시되는 바와 같이 SPPS와 구리(I)-촉매된 아지드-알킨 고리화첨가 (1,4-이치환된 1,2,3-트리아졸에 대해 CuAAC)의 조합을 이용하여 고체상 접근법에 의해 DOTA[Ni¹⁵]-MG11로 트리아졸-스캐폴드를 수행하였다. 1,5-이치환된 1,2,3-트리아졸의 도입은 유사하지만 루테튬-촉매된 아지드-알킨 고리화첨가 (RuAAC)를 이용한다.

[0025] 하기 예는 방사성표지된 트리아졸로펩티드모방체의 합성 및 그들의 물리화학적 특성의 평가를 논의한다. 펩티드 컨주게이트의 수용체 친화성 (IC₅₀), 중앙 세포 내재화 비율 및 혈장 안정성을 시험관내에서 조사하였다. 이 종이식된 마우스로의 생체내 연구의 첫 번째 결과가 달성되었다. 이 프로젝트의 궁극적 목표는 유지 또는 개선된 생물학적 활성 또는 효소적 분해에 대한 우수한 내성을 갖는 DOTA[Ni¹⁵]-MG11 또는 PPF11N의 유사체를 식별하여 중앙에서 흡수를 개선시키는 것이다.

[0026] CuAAC 및 트리아졸로펩티드를 위한 빌딩 블록은 발데레 (Valdere) 등 및 마스카린 (Mascarin) 등에 의한 문헌에 보고된 적합한 절차에 의해 제조되었다.

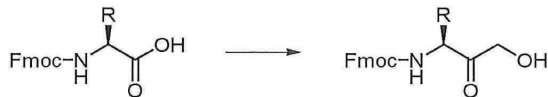
[0027] 일반적 절차 A: 바인랩 (Weinreb) 아마이드의 합성



R¹ = 아미노산 특이적 측쇄
R² = Boc/Fmoc

[0028] 상응하는 Fmoc- 또는 Boc- 보호된 아미노산 (1 당량)을 CH₂Cl₂ (0.1 M) 중에 용해시키고, DIPEA (2.5 당량) 및 BOP (1 당량)를 첨가하였다. 용액을 15분 동안 교반시키고, N,O-디메틸히드록실아민 (1.2 당량)을 첨가하고, 반응물을 12-14 h 동안 rt에서 교반시켰다. 용액을 CH₂Cl₂로 희석하고, 0.1 M HCl (3x), 포화된 aq. NaHCO₃ (3x) 및 물 (3x)로 세척하였다. 유기상을 MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 용매를 감압 하에 제거하였다. 원하는 바인랩 아마이드를 실리카 겔 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 분리하였다.

[0030] 일반적 절차 B: α-아미노 알코올의 합성

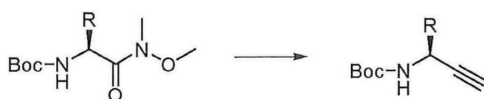


R = 아미노산 특이적 측쇄

[0031] 측쇄에 보호된 카르복실산을 갖는 아미노산에 대해, 상응하는 Fmoc-보호된 아미노산 (1 당량)을 아르곤 하에 무수 THF (0.2 M) 중에 용해시키고, 0°C (얼음 조)로 냉각시켰다. N-메틸모르폴린 (1.1 당량) 및 이소부틸 클로로포르메이트 (1.05 당량)를 첨가하고, 반응물을 15분 동안 0°C에서 교반시켰다. 반응의 완료를 TLC에 의해 모니터링하였다. 백색 현탁물을 -78°C (드라이 아이스, 아세톤)에서 THF/MeOH (3:1, 또는 순수 THF) 중의 NaBH₄ (2 당량)의 미리냉각된 현탁액에 적가하고, 20분 동안 교반시켰다. 환원 완료 시, 잔류 수소화물을 aq. 10% 아세트산으로 퀀칭시키고, 용액을 감압 하에 농축시켰다. 잔사를 에틸아세테이트 (3x)로 추출하고, 유기층을 aq. sat. NaHCO₃ (2x) 및 물 (1x)로 세척하였다. 유기층을 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 용매를 감압 하에 제거하였다. 원하는 α-아미노 알코올을 실리카 겔 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 분리하였다.

[0033] 일반적 절차 C: α-아미노 알킨5의 합성

[0034] C.1 Boc-보호된 바인랩 아마이드로부터 α-아미노 알킨의 합성

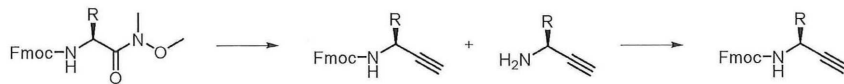


R = 아미노산 특이적 측쇄

[0036] 상응하는 바인랩 아마이드 (1 당량)를 아르곤 하에 회염 건조된 플라스크에 넣고, 무수 CH₂Cl₂ (0.1 M) 중에 용해

시켰다. 용액을 -78°C (드라이 아이스/아세톤 조)로 냉각시키고, 톨루엔 중의 1 M DIBAL-H를 적가하였다 (3 당량). 1 h 동안 교반시킨 후, 반응을 TLC에 의해 완료에 대해 점검하였다. 반응이 완료되지 않은 경우, 톨루엔 중의 1 M DIBAL-H (1 당량)을 첨가하고, 반응물을 1 h 동안 -78°C 에서 다시 교반시켰다. 출발 물질의 소모 후, 과량의 수소화물을 무수 MeOH를 서서히 첨가하여 퀴칭시키고, 반응물을 0°C (얼음/물 조)로 가온시켰다. K_2CO_3 (3 당량), 디메틸-(1-디아조-2-옥소프로필)포스포네이트 (2 당량) 및 무수 MeOH를 첨가하고, 반응 혼합물을 12-14 h 동안 rt에서 교반시켰다. 로셸 (Rochelle) 염의 포화된 용액을 첨가하고, 혼합물을 30분 동안 교반시켰다. 용액을 물 및 CH_2Cl_2 로 희석하고, 수상을 CH_2Cl_2 (3x)로 추출하였다. 합한 유기상을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 용매를 감압 하에 제거하였다. 원하는 알킨을 실리카 겔 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 분리하였다.

[0037] C.2 Fmoc-보호된 바이넵 아마이드로부터 α -아미노 알킨의 합성



R = 아미노산 특이적 측쇄

[0038]

[0039]

상응하는 바이넵 아마이드 (1 당량)를 아르곤 하에서 화염 건조된 플라스크에 넣고, 무수 CH_2Cl_2 (0.1 M) 중에 용해시켰다. 용액을 -78°C (드라이 아이스/아세톤 조)로 냉각시키고, 톨루엔 중의 1 M DIBAL-H를 적가하였다 (3 당량). 1 h 동안 교반시킨 후, 반응을 TLC에 의해 완료에 대해 점검하였다. 반응이 완료되지 않은 경우, 톨루엔 중의 1 M DIBAL-H (1 당량)을 첨가하고, 반응물을 1 h 동안 -78°C 에서 다시 교반시켰다. 출발 물질의 소모 후, 과량의 수소화물을 무수 MeOH를 서서히 첨가하여 퀴칭시키고, 반응물을 0°C (얼음/물 조)로 가온시켰다. K_2CO_3 (3 당량), 디메틸-(1-디아조-2-옥소프로필)포스포네이트 (2 당량) 및 무수 MeOH를 첨가하고, 반응 혼합물을 12-14 h 동안 RT에서 교반시켰다. 로셸 염의 포화된 용액을 첨가하고, 혼합물을 30분 동안 교반시켰다. 용액을 물 및 CH_2Cl_2 로 희석하고, 수상을 CH_2Cl_2 (3x)로 추출하였다. 합한 유기상을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 용매를 감압 하에 제거하였다. Fmoc 보호기의 절단이 TLC에 의해 검출되는 경우, 조 혼합물을 CH_2Cl_2 (초기 규모에 따라 0.1 M) 중에 용해시켰다. DIPEA (2.5 당량) 및 Fmoc-OSu (2 당량)를 첨가하고, 반응물을 12-14 h 동안 rt에서 교반시켰다. 이어서, 반응 혼합물을 CH_2Cl_2 및 물로 희석하였다. 수상을 CH_2Cl_2 로 3회 추출하였다. 합한 유기상을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 용매를 감압 하에 제거하였다. 원하는 알킨을 실리카 겔 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 분리하였다.

[0040] C.3 Fmoc-보호된 α -아미노 알콜로부터 α -아미노 알킨의 합성



R = 아미노산 특이적 측쇄

[0041]

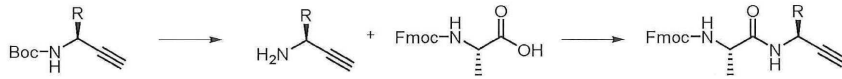
[0042]

DMSO (2.2 당량)를 무수 CH_2Cl_2 (1 M) 중에 용해시키고, 아르곤 하에 -45°C (드라이 아이스/MeCN 조)로 냉각시켰다. 옥살릴 디클로라이드 (1.2 당량)를 가스 발생 하에 -45°C 에서 적가하였다. 용액을 5분 동안 교반시키고, 상응하는 Fmoc-보호된 α -아미노 알콜 (1 당량, CH_2Cl_2 중 0.13 M)을 -45°C 에서 적가한 후, 30분 동안 교반시켰다. DIPEA (3 당량)를 첨가하고, 반응물을 -20°C (NaCl/얼음 조)로 가온시키고, 완료될 때까지 TLC에 의해 모니터링하였다. 이어서, 용액을 CH_2Cl_2 로 희석하고, 유기층을 물, 1 M NaHSO_4 및 물로 추출하였다. 합한 유기상을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 용매를 감압 하에 제거하였다. 조 반응 워크업 (workup)을 후속적으로 무수 MeOH (초기 수율에 따라 0.1 M)에 용해시키고, K_2CO_3 (3 당량) 및 디메틸-(1-디아조-2-옥소프로필)포스포네이트 (2 당량)를 첨가하고, 반응 혼합물을 12-14 h 동안 RT에서 교반시켰다. 반응 혼합물을 물로 희석하고, 수상을 CH_2Cl_2 로 3회 추출하였다. 합한 유기상을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 용매를 감압 하에 제거하였다. Fmoc 보호기의 절단이 TLC에 의해 검출되는 경우, 조 혼합물을 CH_2Cl_2 (초기 규모에 따라 0.1 M) 중에 용해시켰다. DIPEA (2.5 당량) 및 Fmoc-OSu (2 당량)를 첨가하고, 반응물을 12-14 h 동안 rt에서 교반시켰다. 이어서, 반응 혼합물을 CH_2Cl_2 및 물로 희석하였다. 수상을 CH_2Cl_2 로 3회 추출하였다. 합한 유기상

을 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 용매를 감압 하에 제거하였다. 원하는 알킨을 실리카 겔 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 분리하였다.

[0043] α-아미노 알킨 빌딩 블록의 광학적 순도 결정을 위한 일반적 절차 D: α-아미노 알킨으로부터 디펩티드의 합성

[0044] D.1 Boc-보호된 α-아미노 알킨으로부터 디펩티드의 합성

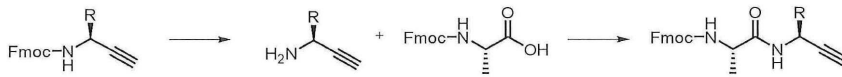


R = 아미노산 특이적 측쇄

[0045]

[0046] 상응하는 α-아미노 알킨 (1 당량)을 CH₂Cl₂/TFA/H₂O (75:20:5) (0.05M)의 용액 중에 용해시키고, 반응물을 15-30분 동안 교반시켰다. 반응이 완료된 후, 용매를 감압 하에 제거하였다. 물 및 TFA의 잔류량을 톨루엔과의 공동-증발에 의해 제거하였다. 잔사를 CH₂Cl₂ (0.1 M) 및 PG-Ala-OH (2 당량, PG = Boc 또는 Fmoc) 중에 용해시키고, (벤조트리아졸-1-일옥시)트리(디메틸아미노)포스포늄 헥사플루오로포스페이트 (BOP, 2 당량) 및 DIPEA (5 당량)를 첨가하였다. 반응물을 rt에서 교반시키고, 완료될 때까지 TLC에 의해 모니터링하였다. 용매를 감압 하에 조 혼합물로부터 제거하고, 원하는 디펩티드를 실리카 겔 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 분리하였다.

[0047] D.2 Fmoc-보호된 α-아미노 알킨으로부터 디펩티드의 합성



R = 아미노산 특이적 측쇄

[0048]

[0049] 상응하는 α-아미노 알킨 (1 당량)을 DMF (0.05 M) 중의 25% 피페리딘 중에 용해시키고, 반응물을 15-30분 동안 rt에서 교반시켰다. 얼음-냉각된 H₂O를 반응 혼합물에 첨가하고, 이를 EtOAc (3x)로 추출하였다. 합한 유기 분획물을 MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 용매를 감압 하에 제거하였다. 잔사를 CH₂Cl₂ (0.1 M) 및 Fmoc-Ala-OH (2 당량) 중에 용해시키고, BOP (2 당량) 및 DIPEA (5 당량)를 첨가하였다. 반응물을 rt에서 교반시키고, 완료될 때까지 TLC에 의해 모니터링하였다. 용매를 감압 하에 조 혼합물로부터 제거하고, 원하는 디펩티드를 실리카 겔 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 분리하였다.

[0050] 일반적 절차 E: 수동 고체상 펩티드 합성

[0051] 링크 아마이드 MBHA LL 수지 (ca. 100 mg, 0.03 - 0.04 mmol)를 폴리에틸렌 프리트 및 테플론 탭을 갖는 폴리프로필렌 주사기에 넣고, CH₂Cl₂ 및 DMF 중에서 반복적으로 팽창시켰다. DMF 중의 20% 피페리딘을 사용하여 Fmoc 보호기를 절단하였다 (3 x 3분, rt). 서열 연장을 위해, DMF (총 3 mL) 중의 Fmoc-보호된 아미노산 또는 DOTA-트리스(3차-부틸 에스테르) (2 당량, 0.06 mmol), HATU (1.9 당량, 0.057 mmol) 및 DIPEA (5 당량, 0.15 mmol)를 수지에 첨가하였다. 현탁액을 1 h 동안 rt에서 진탕시켰다. 용매를 여과에 의해 제거하고, 수지를 DMF 및 CH₂Cl₂로 반복적으로 세척하였다. 반응의 완료를 카이저 (Kaiser) 시험으로 모니터링하고, 필요한 경우 커플링을 반복하였다.

[0052] 일반적 절차 F: 고체 지지체 상의 펩티드의 N-말단에 아지도 관능기의 도입

[0053] Fmoc 보호기의 절단 후, 유리 N-말단 아민을 DMF (총 2 mL) 중의 이미다졸-1-술포닐 아지드 히드로클로라이드 (3 당량, 0.09 mmol), DIPEA (9 당량, 0.27 mmol) 및 촉매량의 CuSO₄ (0.01 당량, 0.03 μmol)로 처리하였다. 현탁액을 1 h 동안 rt에서 진탕시켰다. 용매를 여과에 의해 제거하고, 수지를 DMF 중의 소듐 디에틸디티오카르바메이트의 0.5% 용액, DMF 및 CH₂Cl₂로 반복적으로 세척하였다. 반응의 완료를 카이저 시험으로 모니터링하고, 필요한 경우 반복하였다.

[0054] 일반적 절차 G: 고체상 구리(I)-촉매된 고리화첨가 (CuAAC)

[0055] DMF (2 mL) 중의 Fmoc-보호된 α-아미노 알킨 (2 당량, 0.06 mmol), DIPEA (1 당량, 0.03 mmol), 테트라키스(아세토니트릴)구리(I) 헥사플루오로포스페이트 (0.5 당량, 0.015 mmol) 및 트리스[(1-벤질-1H-1,2,3-트리아졸-4-일)메틸]아민 (TBTA, 0.5 당량, 0.015 mmol)을 N-말단 아지드 관능기에 첨가하고, 현탁액을 12-14 h 동안 rt

에서 진탕시켰다. 용매를 여과에 의해 제거하고, 수지를 DMF 중의 소듐 디에틸디티오카르바메이트의 0.5% 용액, DMF 및 CH₂Cl₂로 반복적으로 세척하였다. 반응의 완료를 지방족 아지드에 대해 비색 시험으로 모니터링하였다.

[0056] 일반적 절차 H: 고체상 루테늄-축매된 고리화첨가 (RuAAC)

[0057] DMF (2 mL) 중의 Fmoc-보호된 α-아미노 알킨 (2 당량, 0.06 mmol) 및 (클로로(펜타메틸시클로펜타디에닐)(시클로옥타디엔)루테늄 (CpRu(COD)Cl, 0.5 당량)을 아르곤 분위기 하에 N-말단 아지드 관능기에 첨가하고, 현탁액을 12-14 h 동안 rt에서 진탕시켰다. 용매를 여과에 의해 제거하고, 수지를 DMF 중의 소듐 디에틸디티오카르바메이트의 0.5% 용액, DMF 및 CH₂Cl₂로 반복적으로 세척하였다. 반응의 완료를 지방족 아지드에 대해 비색 시험으로 모니터링하였다.

[0058] 일반적 절차 I: 펩티드 컨주게이트의 절단 및 정제

[0059] N-말단 킬레이터 DOTA-트리스(3차-부틸 에스테르)의 최종 커플링 후, 컨주게이트를 탈보호시키고, 5 h 동안 rt에서 휘저어 섞으면서 TFA/TIS/H₂O/페놀 (92.5/2.5/2.5/2.5, 6 mL)을 사용하여 수지로부터 절단시켰다. 절단 혼합물을 여과에 의해 수지로부터 분리시키고, 휘발성 성분의 증발을 위해 질소 스트림을 적용하였다. 이어서, 조 펩티드를 얼음-냉각된 디에틸 에테르 (15 mL)를 첨가하여 침전시켰다. 원심분리 (1800 rpm, 5분) 및 얼음-냉각된 디에틸 에테르로의 2회의 세척 단계 후, 조 펩티드 컨주게이트를 물 중의 20% CH₃CN (1 mg/mL) 중에 용해시키고, 역상 반제조용 HPLC로 정제하였다. 후속적인 동결건조로 최종 생성물을 백색 분말로서 수득하였다.

[0060] 합성 결과가 표 1에 나타나 있다.

[0061] <표 1>

신규 트리아졸로미니가스트린의 합성 규모, 수율 및 순도의 요약

	Mwt (g/mol)	규모 (mmol)	수율 (%)	순도 (%)
DOTA[Nle15]-MG11	1384.6	0.058	67.4	> 99
DOTA[Nle15, Phe17-ψ[Tz]-H]-MG11	1409.5	0.0511	35.7	> 99
DOTA[Nle15, Asp16-ψ[Tz]-Phe17]-MG11	1409.5	0.0379	10.1	98.5
DOTA[Nle15, Nle15-ψ[Tz]-Asp16]-MG11	1409.5	0.0399	76.3	> 99
DOTA[Nle15, Trp14-ψ[Tz]-Nle15]-MG11	1409.5	0.041	61.8	97
DOTA[Nle15, Gly13-ψ[Tz]-Trp14]-MG11	1409.5	0.0324	12.5	98.6
DOTA[Nle15, Tyr12-ψ[Tz]-Gly13]-MG11	1409.5	0.04101	13.9	> 99
DOTA[Nle15, Ala11-ψ[Tz]-Tyr12]-MG11	1409.5	0.0394	23.7	> 99
DOTA[Nle15, DGIu10-ψ[Tz]-Ala11]-MG11	1409.5	0.0403	12.5	> 99

[0062]

[0063] <표 2>

아미드의 트리아졸로의 변형을 갖는 신규 트리아졸로미니가스트린 (bis-TZMG)의 합성 규모, 수율 및 순도의 요약

	Mwt (g/mol)	규모 (mmol)	수율 (%)	순도 (%)
DOTA[Nle ¹⁵ , Tyr ¹² -ψ[Tz]-Gly ¹³ -Trp ¹⁴ -ψ[Tz]-Nle ¹⁵]-MG11 (64)	1433.6	0.0466	11.6	97.0
DOTA[Nle ¹⁵ , Tyr ¹² -ψ[Tz]-Gly ¹³ -ψ[Tz]-Trp ¹⁴]-MG11 (65)	1433.6	0.0506	10.8	98.2
DOTA[Nle ¹⁵ , Ala ¹¹ -ψ[Tz]-Tyr ¹² , Trp ¹⁴ -ψ[Tz]-Nle ¹⁵]-MG11 (74)	1433.6	0.0507	25.0	> 99
DOTA[Nle ¹⁵ , Ala ¹¹ -ψ[Tz]-Tyr ¹² -ψ[Tz]-Gly ¹³]-MG11 (76)	1433.6	0.0495	5.9	97.3
DOTA[Nle ¹⁵ , DGIu ¹⁰ -ψ[Tz]-Ala ¹¹ -Tyr ¹² -ψ[Tz]-Gly ¹³]-MG11 (86)	1433.6	0.0528	10.1	97.9
DOTA[Nle ¹⁵ , DGIu ¹⁰ -ψ[Tz]-Ala ¹¹ -ψ[Tz]-Tyr ¹²]-MG11 (87)	1433.6	0.0506	10.6	97.8

[0064]

[0065] <표 3>

PPF11N (DOTA-(DGLu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH₂)의 신규 트리아졸-유도체의 합성 규모, 수율 및 순도의 요약

	Mwt (g/몰)	규모 (mmol)	수율 (%)	순도 (%)
[Tyr-ψ[Tz]-Gly]-PPF11N	2055.1	0.0325	19.6	98.1
[Trp-ψ[Tz]-Nle]-PPF11N	2055.1	0.0334	20.9	>99

[0066]

(방사성)금속 표지화

[0067]

[0068]

암모늄 아세테이트 완충액 (50 μL, 0.5 M, pH 5.5) 중에 참조 물질 (DOTA-[Nle¹⁵]-MG11 및 DOTA-PP-F11-N) 또는 트리아졸로미니가스트린 (1 mg, 750 nmol)을 용해시키고, 물을 250 μM (대략 0.3 mg/mL)의 최종 펩티드 농도로 첨가함으로써 스톡 용액을 제조하였다. 시험관내 실험을 위해, DOTA-관능화된 화합물 (1 nmol, 4 μL의 250 μM 스톡 용액)을 aq. HCl (22.5 μL, 0.05 M, pH 1.3), 암모늄 아세테이트 완충액 (10 μL, 0.5 M, pH 5.5) 및 aq. 소듐 아스코르베이트 (5 μL, 0.5 M)의 혼합물에 첨가하였다. 20-25 MBq의 ¹⁷⁷LuCl₃ (ca. 2.5 μL, 0.04 M HCl 중, 20-25 MBq/nmol)을 첨가하고, 혼합물을 가열 블록에서 20분 동안 95°C로 가열하였다. 표지화 후, 1 μL 분취량의 표지화 혼합물을 γ-HPLC에 의한 품질 관리를 위해 aq. DTPA (200 μL, 25 μM)에 첨가하였다.

[0069]

비-방사성 ¹⁷⁵Lu로 표지화를 위해, 시험 화합물 (25 nmol, 100 μL, 250 μM)을 5-몰 (molar) 과량의 aq. ¹⁷⁵LuCl₃ (125 nmol, 12.5 μL, 10 mM), 암모늄 아세테이트 (5 μL, 0.5 M, pH 5.5)와 혼합하고, 열 블록에서 20분 동안 95°C로 가열하였다.

[0070]

생체내 실험을 위해, DOTA-관능화된 화합물을 다량의 ¹⁷⁷LuCl₃로 표지하여 45-55 MBq/nmol의 특이 활성을 획득하고, - 품질 관리 후 - PBS로 희석하여 100 pmol/mL의 농도에 도달하였다.

[0071]

세포 배양

[0072]

CCK2R을 발현하는 인간 수질성 갑상선암 세포 (MZ-CRC1)를 5% CO₂ 및 37°C에서 가습 공기 중에서 눈클론 (Nunc)™ 델타 처리된 세포 배양 플라스크에서 단층으로 성장시켰다. 세포를 20 mM L-글루타민 (L-Glu) 및 10% FCS로 보충된 배양 배지 DMEM (높은 글루코스 (4.5 g/L))에서 유지시켰다. 배양물을 0.25% 트립신 0.38% EDTA 용액을 사용하여 80 내지 90% 합류로 정규적으로 계대하였다. 0.1% BSA를 함유하는 검정 배지 DMEM (높은 글루코스)에서 검정을 수행하였다.

[0073]

세포 내재화 실험

[0074]

실험 전일에, MZ-CRC1 세포를 세포 배양 배지 중의 6-웰 플레이트 (0.85 · 106 세포/웰)에 위치시키고, 부착을 위해 밤새 인큐베이션하였다. 실험 당일에, 배지를 제거하고, 세포를 1 mL PBS로 2회 세척하였다. 플레이트를 준비를 위해 얼음 상에 두었다. 0.9 mL의 검정 배지를 비특이적 결합을 위한 것 이외의 모든 웰에 분배하였다. 0.2 pmol의 ¹⁷⁷Lu-표지된 컨주게이트 (100 μL, 검정 배지 중 2 nM, ca. 4.2 kBq)를 모든 웰에 분배하였다. 비특이적 결합의 결정을 위해, 5000배 과량의 미니가스트린 (1 nmol, 100 μL, 검정 배지 중 10 μM)을 ¹⁷⁷Lu 표지된 컨주게이트를 함유하는 0.8 mL의 검정 배지에 첨가하였다. 결합 및 내재화를 위해 플레이트를 5% CO₂에서 37°C에서 인큐베이션하였다. 상청액 수집에 의해 30, 60, 120 및 240분 후 공정을 중단하였다. 세포를 PBS (각각 0.6 mL)로 2회 세척하였다. 합한 상청액은 방사능의 유리된 결합되지 않은 분획을 나타낸다. 세포를 rt에서 5분 동안 차가운 식염수 글리신 완충액 (0.6 mL, 0.05 M, pH 2.8)과 2회 인큐베이션함으로써 막-결합된 활성을 결정하였다. NaOH (각각 0.6 mL, 1 M, 10분, rt)로의 세포 용해의 2회 사이클에 의해 내재화된 분획을 분리하였다. 분획의 방사능을 COBRA-II 감마 카운터로 측정하고, 총 적용된 방사능 용량에 대한 퍼센트로 나타낸다 (n=3-5, 삼중).

[0075]

수용체 친화성 - IC50 검정

[0076]

실험 전일에, MZ-CRC1 세포를 세포 배양 배지 중의 6-웰 플레이트 (0.85 · 106 세포/웰)에 위치시키고, 부착을 위해 밤새 인큐베이션하였다. 실험 당일에, 배지를 제거하고, 세포를 1 mL PBS로 2회 세척하였다. 얼음 상에

서, 0.8 mL의 검정 배지 및 방사성표지된 참조 화합물 ^{177}Lu -DOTA-PP-F11N (0.2 pmol, 검정 배지 중 2 nM, 100 μL , ca. 4.2 kBq)을 각각의 웰에 분배하였다 (웰 중 최종 농도 = 0.2 nM). ^{175}Lu -표지된 시험 화합물을 10^{-11} 내지 $5 \cdot 10^{-6}$ M (검정 배지에서 10^{-10} 에서 $5 \cdot 10^{-5}$ M까지의 100 μL 희석 시리즈)의 최종 웰 농도에 도달하도록 첨가하였다. ^{177}Lu -DOTA-PP-F11N의 총 결합을 시험 화합물의 첨가 없이 세포를 인큐베이션하여 확인하였다. 플레이트를 4°C에서 1 h 동안 인큐베이션한 후, 상청액을 제거하고, 세포를 1 mL의 차가운 PBS로 2회 세척하였다. NaOH를 세포 용해를 위해 모든 웰에 2회 첨가하였다 (0.6 mL, 1 M, 10분, rt). 용해된 세포와 연관된 방사능을 COBRA-II 감마 카운터로 결정하였다. 50% 억제 농도 (IC50)를 정규화된 비선형 회귀에 의해 그래프패드 프리즘 (GraphPad Prism)으로 계산하였다 (n=3, 3중).

[0077] 혈장 안정성

[0078] ^{177}Lu -표지된 화합물을 0.9% NaCl로 3.75 μM 의 농도로 희석하고, 37°C에서 질소-플러싱된 신선한 인간 혈장 (1.5 mL) 중에서 인큐베이션하였다 (375 pmol, 100 μL , 7.5-12 MBq). 상이한 시점에 (0.5, 1, 2, 4, 6 및 24 h), 분취량 (75 μL)을 취하고, 단백질을 CH_3CN (100 μL)에서 침전시키고, 원심분리하였다 (2분, 14680 rpm, rt). 상청액 (75 μL)을 물 (75 μL)로 희석하고, γ -HPLC로 분석하였다. 1상 붕괴 비선형 회귀 ($A = A_0 * e^{-kt}$)를 이용하여 펩티드 컨주게이트의 반감기 ($t_{1/2}$)를 그래프패드 프리즘으로 계산하였다 (n=2-3).

[0079] LogD 결정

[0080] 방사성표지된 트리아졸로펩티드의 친유성 (logD)을 "셰이크 플라스크 방법 (shake flask method)"으로 결정하였다. 방사성표지된 컨주게이트 (10 pmol, 10 μL , PBS 중 1 μM , ca. 0.25 MBq)를 n-옥탄올/PBS의 포화된 1:1 혼합물 (1 mL, pH 7.4)에 첨가하고, 1분 동안 와동에 의해 격렬하게 진탕시켰다. 원심분리 (3000 rpm, 10분) 후, 두 상의 100 μL 분취량을 취하고, 방사능을 감마 카운터에서 측정하였다 (n=2, 4중).

[0081] 이종이식된 마우스에서 생체분포 연구

[0082] 모든 절차는 지역 동물위원회에 의해 승인되었으며, 동물의 윤리적 사용에 대한 국제 지침에 따랐다. 6주령의 암컷 CD1 nu/nu 마우스 (찰스 리버 라보라토리 (Charles River Laboratory), 독일)에 5 Mio MZCRC 세포를 접종하였다. 그들은 50-200 mm²의 크기에 도달할 때까지 2주 동안 성장시켰다.

[0083] 실험 당일에, 그들에게 꼬리 정맥을 통해 100 μL PBS 중의 10 pmol의 각각의 ^{177}Lu -표지된 화합물 (ca. 0.5 MBq)을 주사하였다. 마우스를 4시간 p.i.의 CO₂ 질식으로 희생시키고, 기관 (혈액, 심장, 폐, 비장, 신장, 췌장, 위, 소장, 간, 근육, 뼈, 종양)을 해부하여 수거하고, 중량을 재고, 감마 카운터에서 측정하였다 (n=4).

[0084] 차단 실험을 위해, 마우스에게 방사성표지된 화합물을 주사하기 전에 100 μL PBS 중의 100 mg의 미니가스트린 (ca. 60'000 pmol, 6000배 과다)을 주사하였다 (n=4). 조직 분포 데이터를 조직 그램당 주사된 활성 퍼센트 (% ID/g)로서 계산하고, 통계 분석을 그래프패드 프리즘으로 수행하였다.

[0085] 도 1은 참조로서 미니가스트린 유도체 DOTA[N1e15]-MG11 및 마지막 6개 아미노산의 쇠의 상이한 위치에 편입된 Tz (1,4-이치환된 1,2,3-트리아졸)를 갖는 유도체화된 미니가스트린에 대한 특이적 내재화를 예시한다. DOTA[N1e15, Tyr¹²-(Tz)-Gly¹³]-MG11은 120분 후 특이적 내재화의 50% 초과를 나타낸다.

[0086] 도 2는 참조 미니가스트린 유도체 DOTA[N1e15]-MG11과 비교하여 명명된 트리아졸-스캔에 따른 유도체화된 형태의 [N1e¹⁵]-MG11의 반-최대 억제 농도 IC₅₀을 예시한다. 따라서, DOTA[N1e15, Tyr¹²-(Tz)-Gly¹³]-MG11은 방사성 표지된 참조 화합물 PP-F11-N을 대체하는데 가장 높은 유효성을 갖는 미니가스트린 유도체이다.

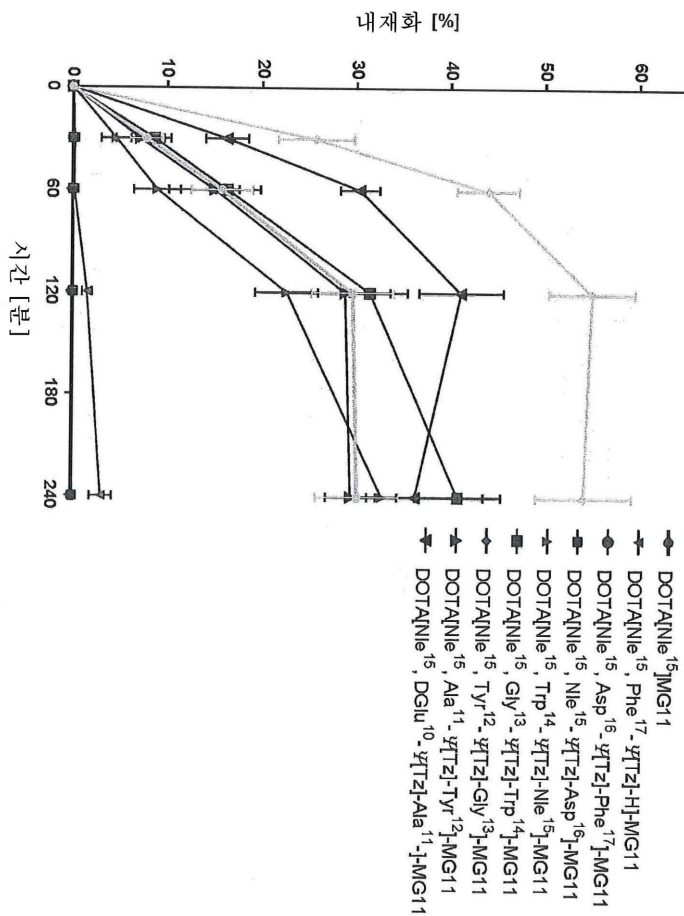
[0087] 도 3은 참조 미니가스트린 유도체 DOTA[N1e15]-MG11과 비교하여 명명된 트리아졸-스캔에 따른 유도체화된 형태의 [N1e¹⁵]-MG11의 혈장 안정성을 예시한다. 대부분의 유도체는 참조 유도체와 유사하게 작용한다. DOTA[N1e15, Tyr¹²-(Tz)-Gly¹³]-MG11은 이와 관련하여 낮은 안정성을 갖지만 그럼에도 불구하고 펩티드의 60% 초과가 적어도 2시간 초과 동안 안정하여 광범위한 범위의 진단 및 치료 적용을 가능하게 한다. 따라서, 도 1 내지 3에 나타난 결과의 요약에서 도 4에 또한 예시되는 바와 같이, DOTA[N1e15, Tyr¹²-(Tz)-Gly¹³]-MG11은 가

장 높은 측정된 특이적 내재화 및 가장 낮은 IC₅₀ 값이 약간 낮은 혈장 반감기를 보상하므로 미래의 진단 및 치료 적용을 위한 가장 적합한 후보인 것으로 보인다.

[0088] WO 2015/067473 A1로부터의 미니가스트린 유도체 PPF11N과 비교하여, 미니가스트린 유도체 DOTA[Nle¹⁵, Tyr¹²-(Tz)-Gly¹³]-MG11은 120분 이하의 범위의 시간 범위에서 더 높은 특이적 내재화 및 따라서 관심 수용체 (예컨대, GPCR)를 "차단"하는 더 높은 유효성을 보유한다.

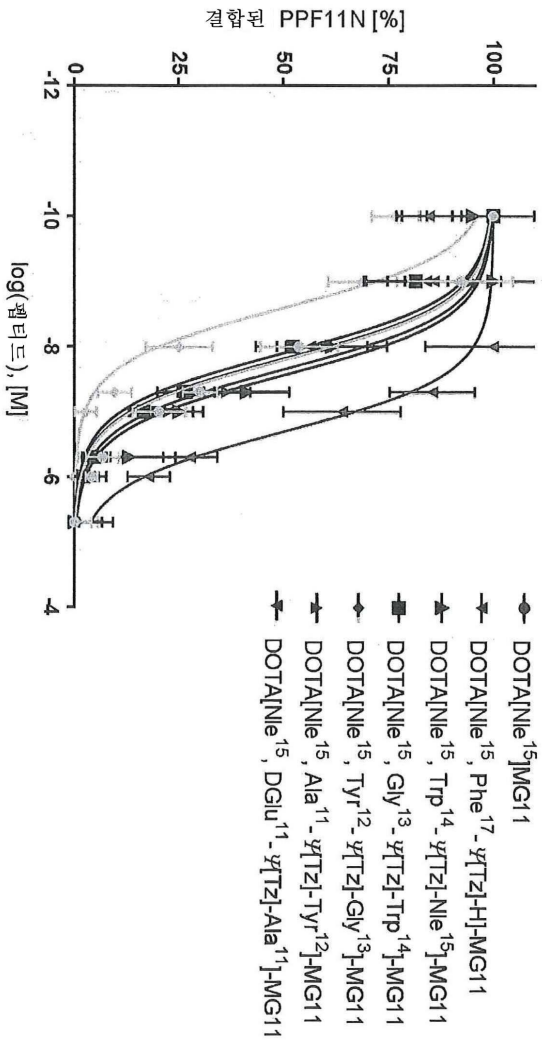
도면

도면1

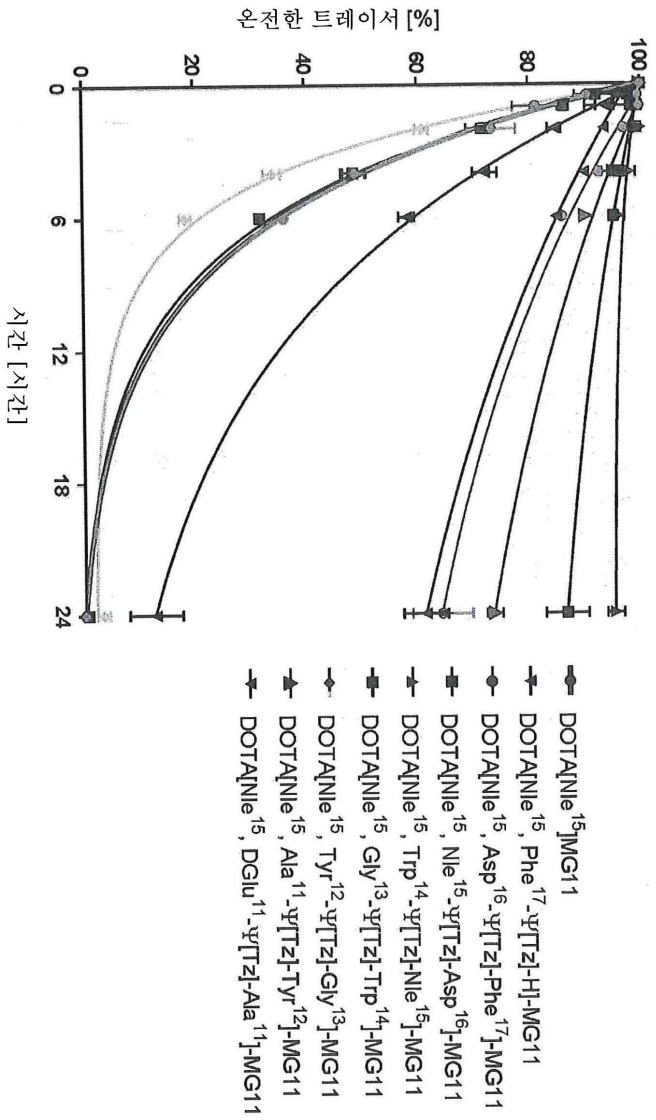


IC₅₀

도면2



혈장 안정성



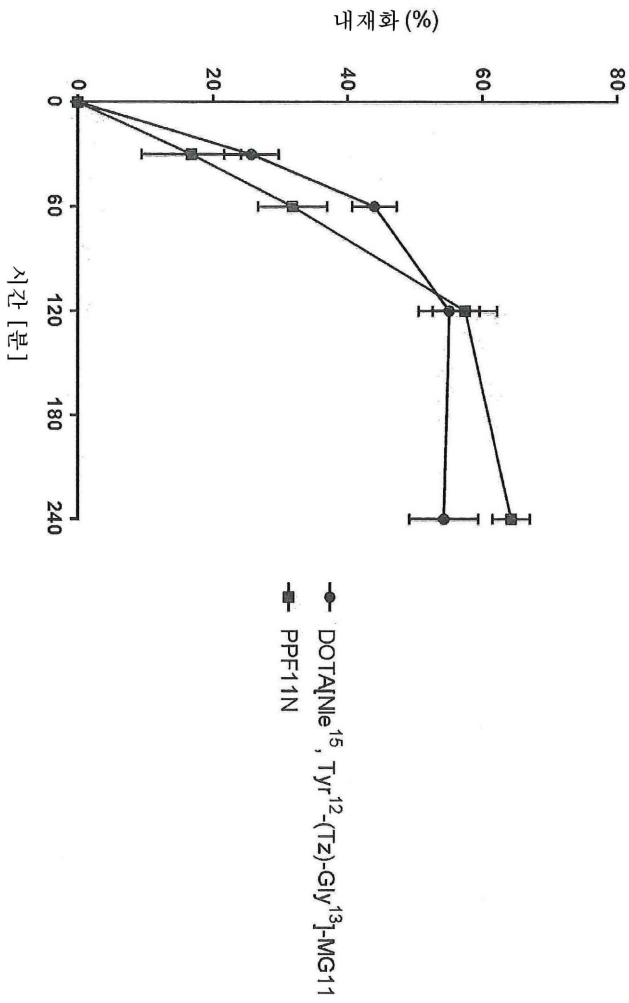
도면3

도면4

화합물	4h 특이적 내재화 (%)	IC50 (nM)	혈장 반감기 (h)	logD (pH 7.4)
DOTA[Ne15]-MG11	30.3	16.1	4.2	-3.86
DOTA[Ne15, Phe17-(Tz)-H]-MG11	3.2	204.1	17.2	-3.68
DOTA[Ne15, Asp16-(Tz)-Phe17]-MG11	0.1	검출되지 않음	14.0	-3.95
DOTA[Ne15, Ne15-(Tz)-Asp16]-MG11	0.1	검출되지 않음	18.5	-3.76
DOTA[Ne15, Trp14-(Tz)-Ne15]-MG11	32.9	27.7	>24	-3.98
DOTA[Ne15, Gly13-(Tz)-Trp14]-MG11	41.0	12.7	4.3	-4.00
DOTA[Ne15, Tyr12-(Tz)-Gly13]-MG11	54.3	2.5	2.5	-4.06
DOTA[Ne15, Ala11-(Tz)-Tyr12]-MG11	29.6	22.6	16.7	-3.81
DOTA[Ne15, DGlul0-(Tz)-Ala11]-MG11	36.4	15.5	7.7	-4.00

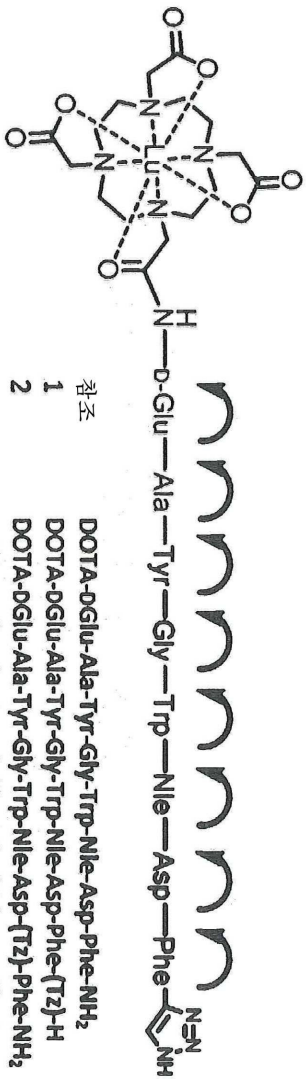
 상영한 개신
 상영한 결함

PPF11N 과의 비교



도면5

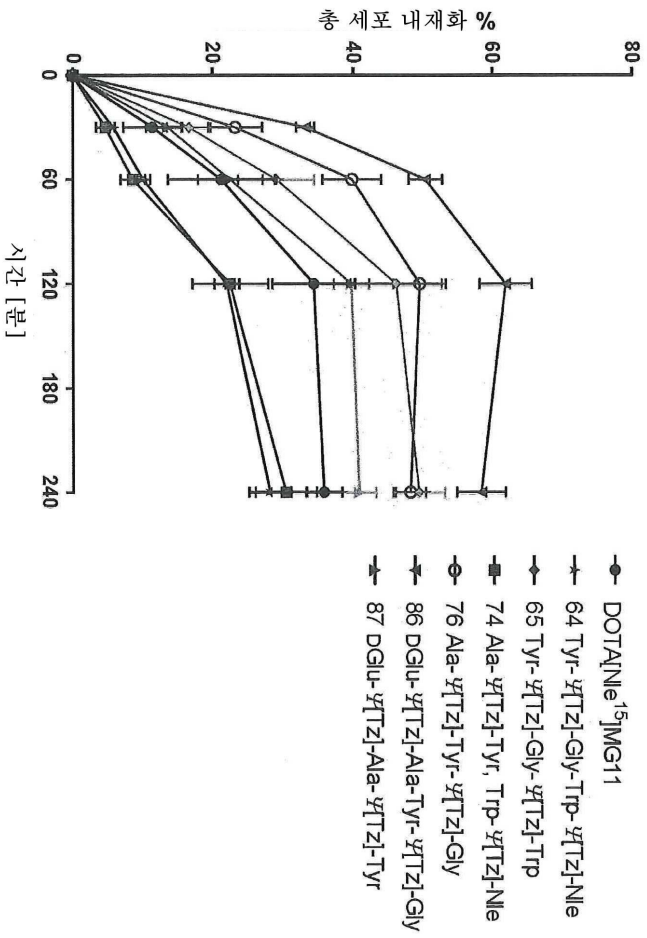
DOTA[¹⁵NLE]-MG11을 갖는 트리이졸-스캔



- 참조
- 1 DOTA-DGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH₂
 - 2 DOTA-DGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-(Tz)-H
 - 3 DOTA-DGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-(Tz)-Phe-NH₂
 - 4 DOTA-DGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-(Tz)-Nle-Asp-Phe-NH₂
 - 5 DOTA-DGlu-Ala-Tyr-Gly-(Tz)-Trp-Nle-Asp-Phe-NH₂
 - 6 DOTA-DGlu-Ala-Tyr-(Tz)-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH₂
 - 7 DOTA-DGlu-Ala-(Tz)-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH₂
 - 8 DOTA-DGlu-(Tz)-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH₂
 - 9 DOTA-(Tz)-DGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH₂

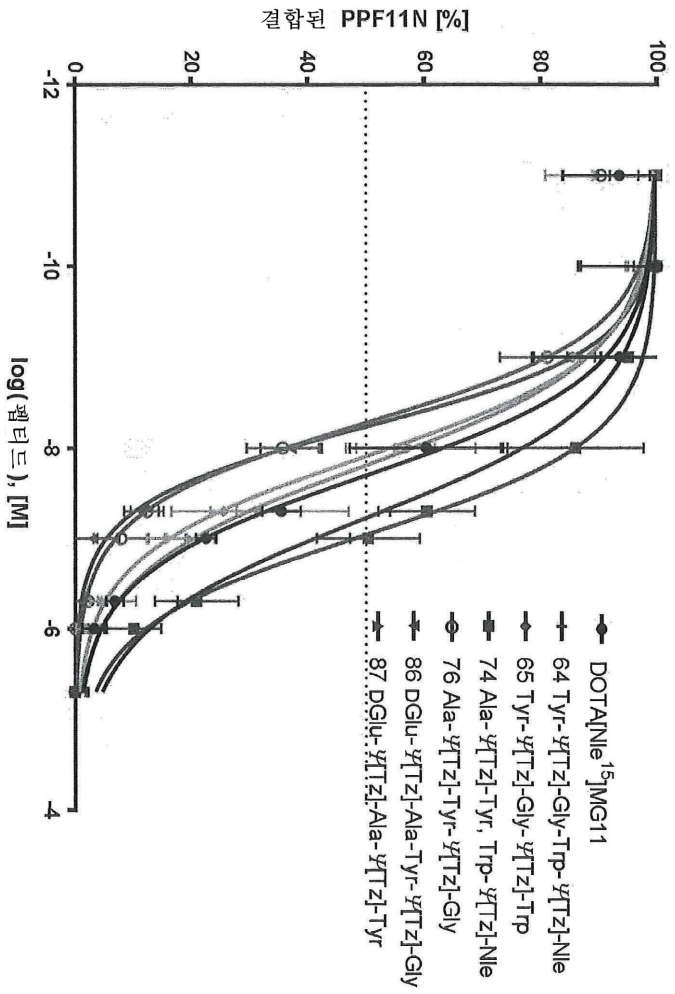
도면6

총 내재화 BIS-TZMG



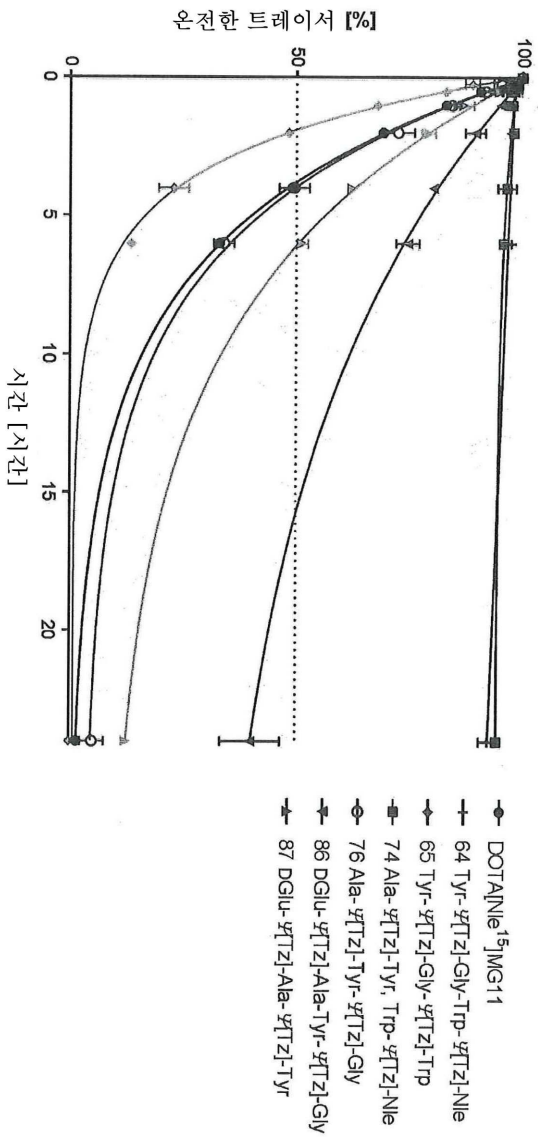
도면7

IC₅₀ BIS-TZMG



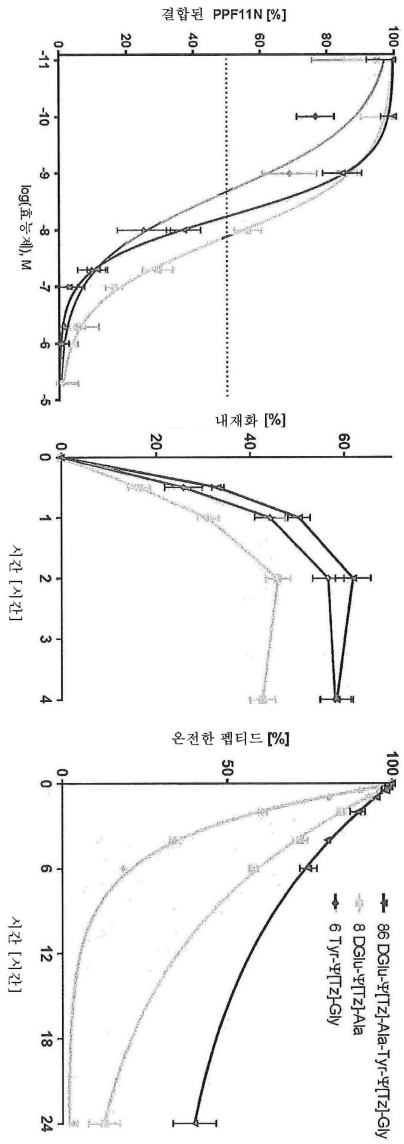
도면8

혈장 안정성 BIS-TZMG



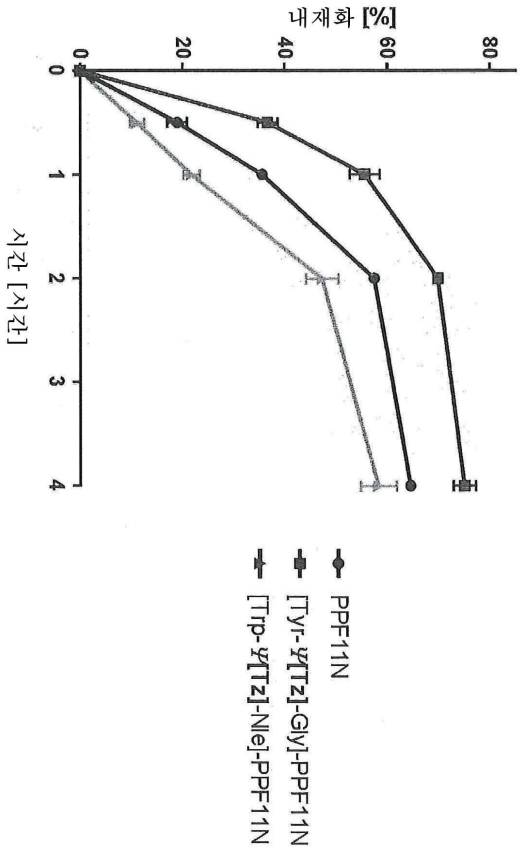
도면9

도면10



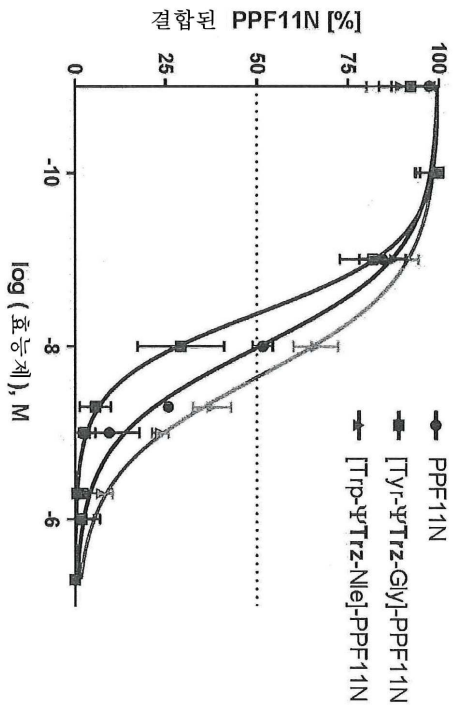
일-치환된 TZMG 대 BIS-TZMG

총 내재화 TZ-PPF11N



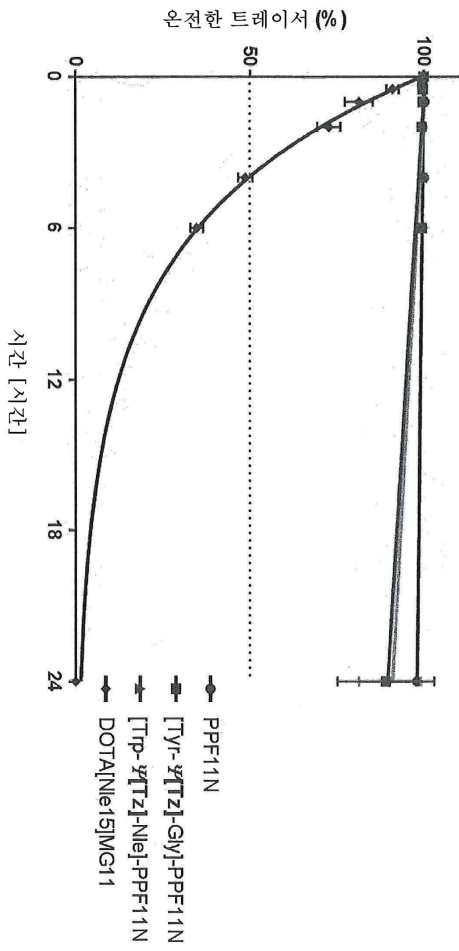
도면11

도면12



IC₅₀ TZ-PPF11N

혈장 안정성 TZ-PPF11N



도면13