



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년01월21일  
(11) 등록번호 10-0879702  
(24) 등록일자 2009년01월13일

(51) Int. Cl.<sup>9</sup>

C07K 7/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7007515(분할)  
(22) 출원일자 2008년03월28일  
    심사청구일자 2008년03월28일  
    번역문제출일자 2008년03월28일  
(65) 공개번호 10-2008-0036662  
(43) 공개일자 2008년04월28일  
(62) 원출원 특허 10-2002-7013674  
    원출원일자 2002년10월11일  
    심사청구일자 2006년04월06일  
(86) 국제출원번호 PCT/N02001/000146  
    국제출원일자 2001년04월06일  
(87) 국제공개번호 WO 2001/77145  
    국제공개일자 2001년10월18일

(30) 우선권주장  
    0009042.3 2000년04월12일 영국(GB)  
    0025070.4 2000년10월12일 영국(GB)

(56) 선행기술조사문헌

국제특허공보 제98-47541호 (1998.10.29. 공고)\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

지이 헬스케어 에이에스

노르웨이 오슬로 니코비엔 2(우편번호 0485)

(72) 발명자

쿠트베르트손, 알란

노르웨이 엔-0401 오슬로 피.오. 박스 4220 토르  
    쇼브 니코베이엔1-2니코메드 이메이징 에이에스

인드레볼, 바르트

노르웨이 엔-0401 오슬로 피.오. 박스 4220 토르  
    쇼브 니코베이엔1-2니코메드 이메이징 에이에스

(74) 대리인

김영, 주성민

전체 청구항 수 : 총 1 항

심사관 : 정의준

(54) 펩티드 기재 화합물

### (57) 요 약

본 발명은 인테그린 수용체와 관련된 수용체에 결합하는 표적화 백터를 포함하는 영상 진단제로서 또는 치료제로서 사용하기 위한 신규 펩티드 기재 화합물에 관한 것이다.

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 케냐, 키르키즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크맨, 터키, 트리니아드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구와바부다, 코스타리카, 도미니카, 알제리, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 벨리즈, 모잠비크, 그라나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 짐바브웨, 세르비아 앤 몬테네그로, 시에라리온

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 모잠비크, 탄자니아

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크맨

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스, 터키

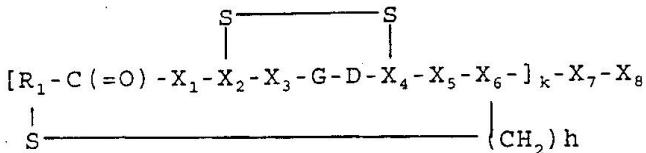
OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우

## 특허청구의 범위

## 청구항 1

임의로 링커 (L)을 통해 벡터 V를 전단용 촬영 절차에서 검출가능한, 인테그린 수용체에 대해 친화력을 갖는 하기 화학식 I의 화합물에 접합시키거나, 또는 퀄레이트화제에 접합시키고 필요시에는 형성된 접합체 내의 퀄런트 기를 전단용 촬영 절차에서 검출가능한 금속 이온으로 금속화하는 것을 포함하는, 벡터 (V), 링커 (L) 및 리포터 (R) 부분을 포함하는 조영제의 제조 방법.

## <화학식 I>



상기 식에서,

G는 글리신을 나타내고,

D는 아스파르트산을 나타내고,

$R_1$ 은  $-(CH_2)_n-$  또는  $-(CH_2)_n-C_6H_4-$  (여기서  $n$ 은 1 내지 10의 정수를 나타냄)를 나타내고,

$h$ 는 정수 1 또는 2를 나타내고,

$X_1$ 은 결합 또는 리신, 아스파르트산, 티로신 중 선택되는 1 또는 2개의 아미노산 잔기를 나타내고, 이때 각 아미노산 잔기는 독립적으로 제제의 약동학 또는 혈액 청소율을 변화시키기에 적합한 관능성 측쇄를 갖도록 유도체화될 수 있고, 여기서 각 아미노산 잔기는 독립적으로 i) 링커 (L) 부분 또는 ii) 칼레이트화제 또는 iii) 칼레이트화제에 부착된 링커 (L) 부분을 통해 생체내 활영에 적합한 리포터 (R) 부분에 결합될 수 있는 것이며,

$X_2$  및  $X_4$ 는 독립적으로 이황화 결합을 형성할 수 있는 아미노산 잔기를 나타내고,

$X_3$ 은 아르기닌, N-메틸아르기닌 또는 아르기닌 의사체를 나타내고,

$X_5$ 는 소수성 아미노산 또는 그의 유도체를 나타내고,

$X_6$ 은 티올 함유 아미노산 잔기를 나타내고,

$k$ 는 정수 1 내지 10을 나타내고,

$X_7$ 은 디아민을 포함하는 링커 (L)이거나, 또는  $X_7$ 은 부재하며,

$X_8$ 은 리포터 (R) 부분을 나타내거나, 또는  $-NH_2$ 이거나, 또는 부재한다.

## 명세서

## 발명의 상세한 설명

## 기술분야

<1>

본 발명은 새로운 펩티드 기재 화합물 및 진단용 콜링 기술 및 치료학적으로 유효한 처치에서의 그의 용도에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 본 발명은 혈관신생과 관련된 수용체, 특히 인테그린 수용체, 예를 들면  $\alpha_v \beta_3$  인테그린 수용체에 결합하는 효적화 백터로서 사용되는 그러한 펩티드 기재 화합물의 용도에 관한 것이다. 따라서, 그러한 조영제는, 예를 들면 악성 질환, 심장 질환, 염증 관련 질환, 류머티스성 관절염 및 카포시 육종의 진단에 사용될 수 있다. 또한, 그러한 조영제는 이를 질환의 치료학적 처치에 사용될 수 있다.

## 배경기술

- <2> 새로운 혈관은 두가지 다른 기전: 혈관형성 또는 혈관신생에 의해 형성될 수 있다. 혈관신생은 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 분기되어 형성되는 것이다. 이러한 과정에 대한 일차적 자극은 조직 내 세포로의 영양분 및 산소의 부적절한 공급 (저산소증)일 수 있다. 이들 세포는 혈관 내피세포 성장 인자 (VEGF)로서 불리우는 것이 한 예인 여러가지 혈관신생 인자를 분비함으로써 반응할 수 있다. 이들 인자는 기저막의 단백질을 분해하는 단백질분해 효소 뿐만 아니라 잠재적으로 유해한 이러한 효소의 작용을 제한하는 억제제의 분비를 개시한다. 혈관신생 인자의 다른 두드러진 효과는 내피 세포의 이동 및 분열을 일으키는 것이다. 관강 반대쪽에서 혈관들레에 연속 시트를 형성하는 기저막에 부착된 내피 세포는 유사분열을 겪지 않는다. 혈관신생 인자에 대한 수용체로부터의 시그널과 부착력 소실이 합쳐진 효과는 내피 세포의 이동, 증식 및 자체 재배열을 일으키고, 최종적으로 새로운 혈관 주위에 기저막을 합성하는 것이다.
- <3> 혈관신생은 상처 치유 및 염증 과정을 비롯한 조직의 성장 및 리모델링에서 두드러진다. 종양은 성장 속도를 유지하기 위해서는 밀리미터 크기에 도달하면 혈관신생을 개시해야 한다. 혈관신생은 내피 세포 및 그 주변의 특징적인 변화를 수반한다. 이들 세포의 표면은 이동에 대비하여 리모델링되며, 단백질분해를 실시하고 조절하는 것에 관련된 각종 단백질 이외에 기저막이 분해되는 곳인 잠재 구조가 노출된다. 종양의 경우에, 결과적으로 혈관 네트워크는 일반적으로 예리한 킹크 (kink) 및 동정맥 선트 (shunt)가 형성되며 무질서해진다. 혈관신생의 억제는 항종양 요법에서 유망한 전략으로 여겨진다. 혈관신생에 수반하는 형질전환은 악성 질환 등의 진단을 위해 매우 유망한 것이지만 그 개념은 염증, 및 초기 아테롬성동맥경화증 병변의 대식세포가 혈관신생 인자의 잠재적인 생산원이므로 아테롬성동맥경화증을 비롯한 각종 염증 관련 질환에서도 장래성을 보인다. 이 인자는 또한 단시간 내에 협착이 해제될 때 일어나는, 심근 경색 부분의 재혈관화에 관련된다.
- <4> 새로운 혈관의 발생 또는 증식인 신혈관신생 또는 혈관신생과 관련된 바람직하지 못한 상태의 다른 예는 아래에 나타나 있다. WO98/47541 참조.
- <5> 혈관신생과 관련된 질환 및 정후는, 예를 들면 다른 형태의 암 및 전이, 예를 들면 유방암, 피부암, 결장직장암, 췌장암, 전립선암, 폐암 또는 난소암이다.
- <6> 다른 질환 및 정후는 염증 (예를 들면, 만성), 아테롬성동맥경화증, 류머티스성 관절염 및 치은염이다.
- <7> 혈관신생과 관련된 또다른 질환 및 정후는 동정맥 알포메이션, 신경교성상세포종, 융모막암, 신경교아세포종, 신경교종, 혈관종 (소아기, 모세관), 간암, 과형성성 자궁내막, 허혈성 심근, 카포시 육종, 황반 변성, 흑색종, 신경아세포종, 폐쇄성 말초 동맥 질환, 골관절염, 건선, 망막증 (당뇨병, 증식성), 공피증, 정상피종 및 케양성 대장염이다.
- <8> 혈관신생은 내피 세포 및 주위 조직에 특이적인 수용체와 관련있다. 이 마커는 성장 인자 수용체, 예를 들면 VEGF 및 인테그린 족의 수용체를 포함한다. 면역조직화학적 연구는 각종 인테그린, 아마도 가장 중요하게는  $\alpha_v$ 류가 혈관의 근첨 (根尖) 표면 상에 발현되며 [Conforti, G., et al. (1992) Blood 80: 37-446] 리간드를 순환시켜 표적화하는데 이용가능함을 입증하였다 [Pasqualini, R., et al. (1997) Nature Biotechnology 15: 542-546].  $\alpha_5\beta_1$ 도 또한 피브로네틴 매트릭스의 집합을 촉진시키고 피브로네틴에 대한 세포 부착을 개시하는데 있어서 중요한 인테그린이다. 그것은 또한 종양 침윤 및 전이 [Gehlsen, K. R., (1988) J. Cell Biol. 106: 925-930] 뿐만 아니라 세포 이동에서 중요한 역할을 한다 [Bauer, J. S., (1992) J. Cell Biol. 116: 477-487].
- <9> 인테그린  $\alpha_v\beta_3$ 은 혈관신생과 관련된 것으로 알려진 수용체 중의 하나이다. 자극된 내피 세포가 혈관신생 과정의 결정적인 주기 동안에 생존을 위해 이 수용체에 의존하는 것으로 보이므로  $\alpha_v\beta_3$  인테그린 수용체/리간드 상호작용의 길항질은 아폽토시스를 유도하고 혈관 성장을 억제한다.
- <10> 인테그린은  $\alpha$ - 및  $\beta$ -서브유닛이 세포막 지질 이중층에 투과한 헤테로다이머 분자이다.  $\alpha$ - 서브유닛은 그의 세포외 사슬 상에 4개의  $\text{Ca}^{2+}$  결합 도메인을 가지며,  $\beta$ -서브유닛은 다수의 세포외 시스테인 풍부 도메인을 갖는다.
- <11> 세포 부착에 관련된 많은 리간드 (예를 들면, 피브로네틴)는 트리펩티드 서열 아르기닌-글리신-아스파르트산 (RGD)을 함유한다. RGD 서열은 이 서열이 나타내는 리간드와 세포 표면 상의 수용체 사이의 1차 인식 부위로서 작용하는 것으로 보인다. 일반적으로, 리간드와 수용체 사이의 2차 상호작용은 상호작용의 특이성을 향상시키는 것으로 생각된다. 이들 2차 상호작용은 RGD 서열에 바로 인접한 또는 RGD 서열과 구분되는 부위에 있는 리간드와 수용체의 부분 사이에서 일어난다.

<12> RGD 펩티드는 광범위한 인테그린 수용체에 결합하는 것으로 알려져 있으며 임상적 상황에서 중요하게 이용되는 다수의 세포성 경과를 조절하는 능력을 갖는다 (Ruoslahti, J. Clin. Invest., 87: 1-5 (1991)). 아마도, RGD 펩티드 및 그의 의사체의 가장 광범위하게 연구된 효과는 혈소판 인테그린 GpIIbIIIa를 표적화하는 항혈전제로서의 그의 용도에 관한 것이다.

<13>  $\alpha v \beta 3$  또는  $\alpha v \beta 5$  길항질의 투여에 의한 조직에서의 혈관신생의 억제는 항체 또는 RGD 함유 펩티드를 이용하는 W097/06791 및 W095/25543에 기재되어 있다. EP578083은 일련의 단환식 RGD 함유 펩티드를 기재하며 W090/14103은 RGD-항체를 청구한다. 하우브너 (Haubner) 등의 문헌 (J. Nucl. Med. (1999); 40: 1061-1071)은 단환식 RGD 함유 펩티드를 기재로 한 종양 표적화를 위한 새로운 부류의 트레이서를 개시한다. 그러나, 전신 자동방사선사진 촬영을 이용한 생체분포 연구는  $^{125}\text{I}$ -표지된 펩티드가 매우 신속한 혈액 청소율 및 주로 간담도 배출 경로를 가져서 고도의 배경이 형성되게 함을 밝혀냈다.

<14> 다중 가교를 함유하는 환식 RGD 펩티드는 또한 W098/54347 및 W095/14714에 개시되어 있다. 생체내 바이오패닝 (biopanning) (W097/10507)으로부터 유도된 펩티드는 각종 표적화 용도에 사용되어 왔다. 가교 위치가 미확인된 서열 CDRRGDCFC (RGD-4C)는 약물, 예를 들면 독시루비신 (W098/10795), 핵산 및 아데노바이러스를 세포에 대해 표적화하는데 사용되어 왔다 (W099/40214, W099/39734, W098/54347, W098/54346, US 5846782 참조). 그러나, 다중 시스테인 잔기를 함유하는 펩티드는 다중 이황화 이성질체가 발생될 수 있는 단점을 갖고 있다. RGD-4C와 같은 4개의 시스테인 잔기를 가진 펩티드는 3개의 다른 이황화 폴딩된 형태를 형성할 가능성이 있다. 그 이성질체는 인테그린 수용체에 대해 가변적인 친화력을 가질 것이므로 RGD 파마코포어는 3가지 다른 형태로 형성될 것이다.

## 발명의 내용

### 해결 하고자하는 과제

<15> 그러므로, 생체내 혈관신생과 관련된 인테그린 수용체의 효율적인 표적화 및 촬영에는 화학적으로 강하고 안정한 선택적인 고친화력 RGD 기재 벡터가 필요하다. 또한 배경에 의한 문제점을 줄이기 위해 조영제를 설계할 때 배출 경로는 중요한 요소이다. 이들 엄격한 조건은 본 발명에 설명된 이환식 구조물에 의해 충족된다.

### 과제 해결수단

<16> 한 면에서 보면, 본 발명은 화학식 1에 의해 정의된 바와 같은 새로운 펩티드 기재 화합물을 제공한다. 이들 화합물은 인테그린 수용체에 대해 친화력, 예를 들면 인테그린  $\alpha v \beta 3$ 에 대해 친화력을 갖는 벡터로서 유용성을 갖는다.

<17> 화학식 1의 화합물은 2개 이상의 가교를 포함하며, 그 중 한 가교는 이황화 결합을 형성하고 제2 가교는 티오에테르 (황화) 결합을 포함하며 가교들은 벡터 부분을 "포개어진" 형태로 접는다.

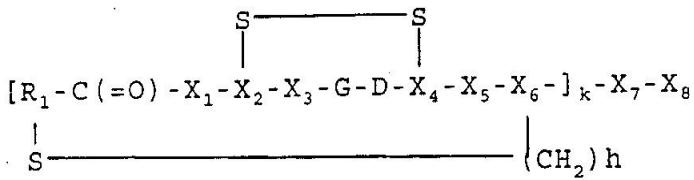
<18> 따라서, 본 발명의 화합물은 벡터 부분 당 최대 하나의 이황화 가교를 갖는다. 본 발명에 의해 정의된 화합물은 놀랍게도 생체내에서, 또한 표지화시에, 예를 들면 테크네튬에 의한 표지화시에 이용되는 조건 하에서 안정하다.

<19> 이러한 신규 화합물은 촬영 목적뿐만 아니라 치료학적으로 효과적인 처치에 사용될 수 있다.

<20>  $R_1$  및  $X_{1-8}$ 의 정의에 따라 화학식 1은 인간 또는 혈관 분포된 비인간 동물 신체 (예를 들면, 포유류, 조류 또는 과충류 신체)의 생체내 촬영에서 ( $V$ )<sub>k</sub>LR 구조물로 조영제로서 사용되거나 치료제로서 사용되는, 임의로 부분 L 및(또는) R과 함께 부분 ( $V$ )<sub>k</sub>를 포함하는 화합물 (여기서, V는 이환식 벡터이고, L은 링커 부분이고, R은 검출 가능한, 예를 들면 촬영 절차에서 검출가능한 부분 (리포터)임)을 포함한다.

<21> 본 발명에 의해 제공된 새로운 펩티드 기재 화합물 및 그의 임의의 제약학상 허용되는 염은 화학식 1로 정의된다:

## 화학식 1



&lt;22&gt;

상기 식에서,

&lt;23&gt;

G는 글리신을 나타내고,

&lt;24&gt;

D는 아스파르트산을 나타내고,

&lt;25&gt;

$R_1$ 은  $-(CH_2)_n-$  또는  $-(CH_2)_n-C_6H_4-$ 를 나타내고, 바람직하게는  $R_1$ 은  $-(CH_2)-$ 를 나타내고, 여기서 n은 정수 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10을 나타내고,

&lt;26&gt;

$h$ 는 정수 1 또는 2를 나타내고,

&lt;27&gt;

$X_1$ 은 결합 또는 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 잔기, 바람직하게는 1 또는 2개의 아미노산 잔기를 나타내고, 이때 각 아미노산 잔기는 독립적으로 임의로 제제의 약동학 또는 혈액 청소율을 변화시키기에 적합한 관능성 측쇄, 예를 들면 탄수화물 부분을 갖도록 유도체화되고, 상기 측쇄는 바람직하게는  $C_{1-22}$ -알킬 또는  $C_{1-22}$ -페플루오로알킬 사슬, 폴리에틸렌글리콜 중합체 및(또는) 혈청 알부민에 대해 친화력을 갖는 소수성 부분을 포함하고,

&lt;28&gt;

각 아미노산 잔기는 독립적으로 임의로 i) 링커 (L) 부분 또는 ii) 킬레이트화제 또는 iii) 킬레이트화제에 부착된 링커 (L) 부분을 통해 생체내 촬영에 적합한 리포터 (R) 부분을 결합시키며,

&lt;29&gt;

$X_1$ 은 바람직하게는 아스파르트산, 티로신, 티로신-아스파르트산, 리신, 글루탐산, 아세틸-리신, 아스파라긴, 세린, 트레오닌 또는 글루타민 또는 그의 유도체를 나타내고,

&lt;30&gt;

$X_2$  및  $X_4$ 는 독립적으로 이황화 결합을 형성할 수 있는 아미노산 잔기, 바람직하게는 시스테인 또는 호모시스테인 잔기를 나타내고,

&lt;31&gt;

$X_3$ 은 아르기닌, N-메틸아르기닌 또는 아르기닌 의사체, 바람직하게는 아르기닌 또는 N-메틸아르기닌 잔기를 나타내고,

&lt;32&gt;

$X_5$ 는 소수성 아미노산 또는 그의 유도체, 바람직하게는 티로신, 페닐알라닌, 3-요오도-티로신 또는 나프틸알라닌 잔기, 더욱 바람직하게는 페닐알라닌 또는 3-요오도-티로신 잔기를 나타내고,

&lt;33&gt;

$X_6$ 은 티올 함유 아미노산 잔기, 바람직하게는 시스테인 또는 호모시스테인 잔기를 나타내고,

&lt;34&gt;

$k$ 는 정수 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10, 바람직하게는 정수 1, 2, 3 또는 4를 나타내고, 더욱 바람직하게는  $k$ 는 정수 1을 나타내고,

&lt;35&gt;

$X_7$ 은 링커 (L) 부분 또는 임의로 링커 (L) 부분의 일부로서의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 잔기를 나타내고, 바람직하게는  $X_7$ 은 하나의 아미노산 잔기를 나타내고,

&lt;36&gt;

각 아미노산은 독립적으로 임의로 제제의 약동학 또는 혈액 청소율을 변화시키기에 적합한 관능성 측쇄, 예를 들면 탄수화물 부분을 갖도록 유도체화되고, 상기 측쇄는 바람직하게는  $C_{1-22}$ -알킬 또는  $C_{1-22}$ -페플루오로알킬 사슬, 폴리에틸렌글리콜 중합체 및(또는) 혈청 알부민에 대해 친화력을 갖는 소수성 부분을 포함하고,

&lt;37&gt;

여기서 각 아미노산 잔기는 독립적으로 임의로 i) 링커 (L) 부분 또는 ii) 킬레이트화제 또는 iii) 킬레이트화제에 부착된 링커 (L) 부분을 통해 생체내 촬영에 적합한 리포터 (R) 부분을 결합시키거나, 또는

&lt;38&gt;

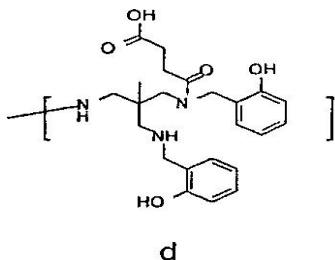
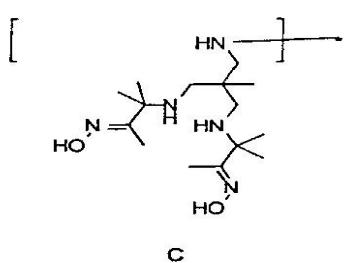
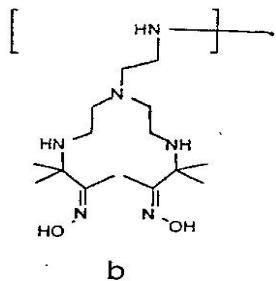
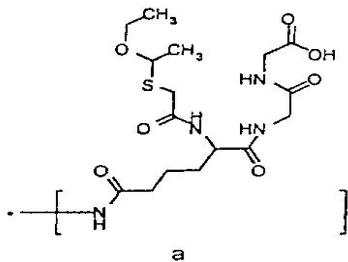
$X_7$ 은 부재하며,

&lt;39&gt;

바람직하게는 하나 이상의 개개의 링커 (L) 부분이 하나 이상의 에틸렌 글리콜 단위를 포함하고, 또한(또는) 바람직하게는  $X_7$ 은 글리신 잔기를 포함하거나 또는 바람직한 대안은  $X_7$ 이 부재하는 것이고,

<41> X<sub>8</sub>은 리포터 (R) 부분을 나타내거나, 또는 -NH<sub>2</sub>이거나 또는 부재한다.

<42> 칼레이트화제의 특히 바람직한 정의는 하기 화학식 a, b, c 및 d이다. 그러나, 화학식 1에 정의된 화합물은 표 I에 정의된 바와 같은 칼레이트화제를 포함할 수도 있다.

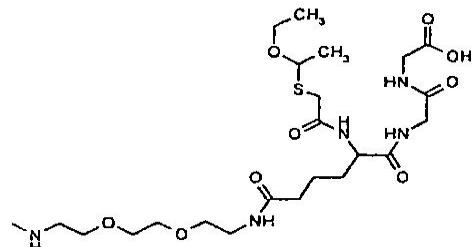


<43>

<44> 칼레이트화제 및 링커 단위의 바람직한 예는 화학식 e 및 f로서 표시된다.

<45>

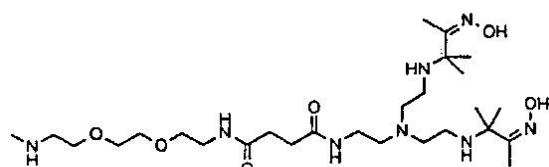
e)



<46>

<47>

f)



<48>

<49>

본 발명의 일부 면에서, 칼레이트는 방사성 핵종에 결합하거나 또는 결합할 수 있는 관능성 부분이다. <sup>99m</sup>테크네튬이 바람직한 것인, 뉴클레오티드의 촉화를 위한 칼레이트화제의 바람직한 정의는 아래 표 I에 기록되어 있다.

표 1

리간드 종류	구조	정의
아민옥심		$Y_{1-6}$ 은 H, 알킬, 아릴 또는 그의 혼합일 수 있고, $Y_4$ 또는 $Y_5$ 는 펩티드 벡터에 접합될 수 있도록 하는 적합한 작용기를 함유한다 - 예를 들면, 바람직하게는 알킬아민, 알킬су페드, 알콕시, 알킬 카르복실레이트, 아릴아민, 아릴 술퍼드 또는 $\alpha$ -할로아세틸 등... $m=n=1$ 일 때 $X=C$ 또는 $N$ 이고, $m=n=2$ 일 때 $X=N$ 이다.
MAG3 타입		$P$ = 보호기 (바람직하게는, 벤조일, 아세틸, EOE); $Y_1, Y_2$ 는 펩티드 벡터에 접합될 수 있도록 하는 적합한 작용기를 함유한다 - 바람직하게는 H (MAG3), 또는 L 또는 D 형태인 임의의 아미노산의 측쇄.
G4 타입 리간드		$Y_1, Y_2, Y_3$ 은 펩티드 벡터에 접합될 수 있도록 하는 적합한 작용기를 함유한다 - 바람직하게는 H, 또는 L 또는 D 형태인 임의의 아미노산의 측쇄.
테트라아민 리간드		$Y_{1-6}$ 은 H, 알킬, 아릴 또는 그의 혼합일 수 있고, 여기서 $Y_{1-6}$ 기는 퀼레이트가 벡터에 접합될 수 있도록 하는 하나 이상의 작용기 부분을 함유한다 - 예를 들면, 바람직하게는 알킬아민, 알킬су페드, 알콕시, 알킬 카르복실레이트, 아릴아민, 아릴 술퍼드 또는 $\alpha$ -할로아세틸.
사이람 (Cylam) 타입 리간드		$Y_{1-5}$ 은 H, 알킬, 아릴 또는 그의 혼합일 수 있고, 여기서 $Y_{1-5}$ 기는 퀼레이트가 벡터에 접합될 수 있도록 하는 하나 이상의 작용기 부분을 함유한다 - 예를 들면, 바람직하게는 알킬아민, 알킬су페드, 알콕시, 알킬 카르복실레이트, 아릴아민, 아릴 술퍼드 또는 $\alpha$ -할로아세틸.

표 1a

디아민디페놀		$Y_1, Y_2$ 는 H, 알킬, 아릴이고, 여기서 $Y_1$ 또는 $Y_2$ 기는 칼레이트가 벡터에 접합될 수 있도록 하는 작용기 부분을 함유한다 - 예를 들면, 바람직하게는 알킬아민, 알킬슬피드, 알콕시, 알킬 카르복실레이트, 아릴아민, 아릴 슬피드 또는 $\alpha$ -할로아세틸. $W = C, N$ 이고, $m=n=1$ 또는 2이다.
HYNIC		$V$ = 벡터에 대한 링커 또는 벡터 그 자체.
아미드 티올		$P$ = 보호기 (바람직하게는, 벤조일, 아세틸, EOE); $Y_{1-5}$ = H, 알킬, 아릴이거나; 또는 $Y_3$ 은 L 또는 D 아미노산 측쇄 또는 글리신이고 그 카르복실레이트는 아미드 결합을 통한 벡터로의 접합에 사용될 수 있다. 별법으로, $Y_{1-5}$ 기는 칼레이트가 벡터에 접합될 수 있도록 추가의 작용기를 함유할 수 있다 - 예를 들면, 알킬아민, 알킬슬피드, 알콕시, 알킬 카르복실레이트, 아릴아민, 아릴 슬피드 또는 $\alpha$ -할로아세틸.

&lt;51&gt;

&lt;52&gt;

본 발명의 일부 면에서, 칼레이트는 친핵성 치환, 친전자성 부가 반응에 의해 또는 칼레이트화제의 사용에 의해  $^{18}F$  동위원소 또는 Cu의 동위원소에 결합하는 또는 결합할 수 있는 관능성 부분이다. 결과 화합물은 양전자 방출 단층촬영 (PET)에 사용될 수 있다.

&lt;53&gt;

본원에 기재된 벡터 접합체의 벡터 성분은 바람직하게는 유리 아미노- 또는 카르복시-말단을 갖지 않는다. 이는 이들 화합물에 효소적 분해에 대한 상당한 저항성 증가를 유도하며 결과적으로 알려진 많은 유리 펩티드에 비해 증가된 생체내 안정성을 갖는다.

&lt;54&gt;

리포터, R은  $X_1$  및(또는)  $X_7$ 을 통해 V에 (L을 통해) 부착될 수 있다. 바람직하게는, 부착 지점은 V의 생물학적 활성 또는 V의 그의 표적에 대한 결합 친화력이 실질적으로 감소되지 않거나 또는 상당히 감소되지 않도록 (R 없는 V의 생물학적 활성 또는 V의 결합 친화력에 비교됨) 선택된다. 가장 바람직하게는 R이 V에 부착된다.

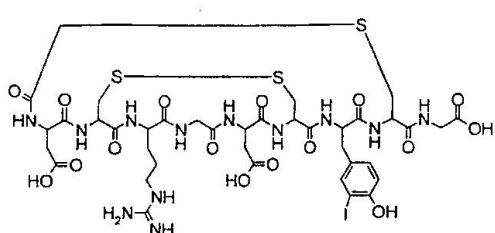
&lt;55&gt;

본원에 사용된 용어 '아미노산'은 그의 가장 광범위한 의미로는 단백질형성 L-아미노산, D-아미노산, 화학적으로 개질된 아미노산, N-메틸, C $\alpha$ -메틸 및 아미노산 측쇄 의사체 및 비천연 아미노산, 예를 들면 나프ти알라닌을 의미하며, 바람직하게는 임의의 천연 아미노산 또는 그러한 천연 아미노산의 의사체이다.

&lt;56&gt;

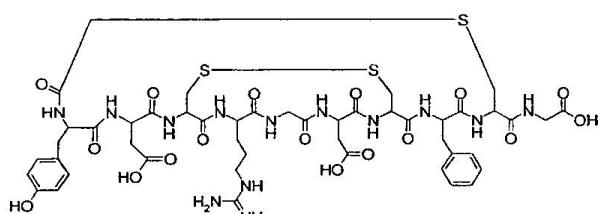
화학식 1의 화합물의 일부 바람직한 실시양태는 아래 화학식 2-IX의 화합물로 예시되어 있다:

## 화학식 2



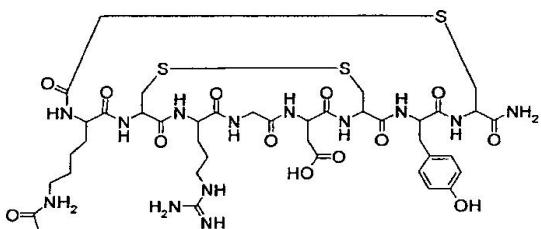
&lt;57&gt;

## 화학식 3



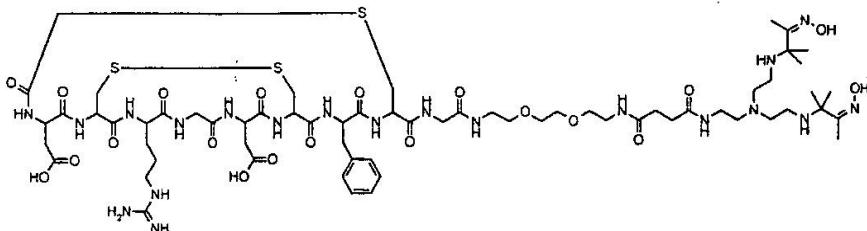
&lt;58&gt;

## 화학식 4



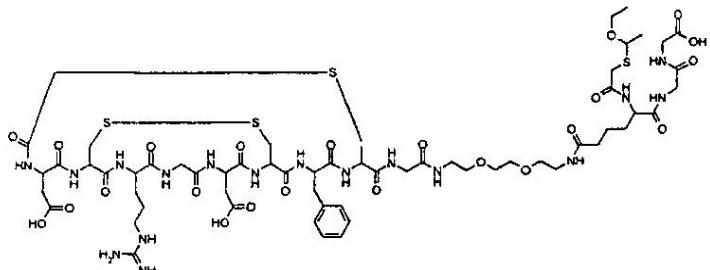
&lt;59&gt;

## 화학식 5



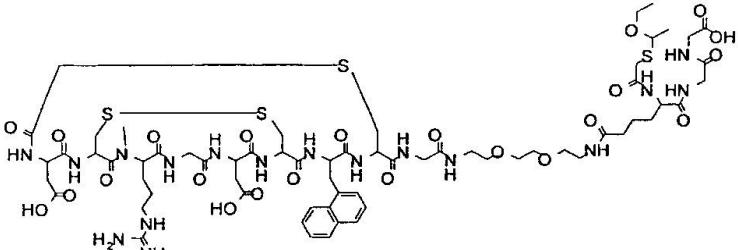
&lt;60&gt;

## 화학식 6



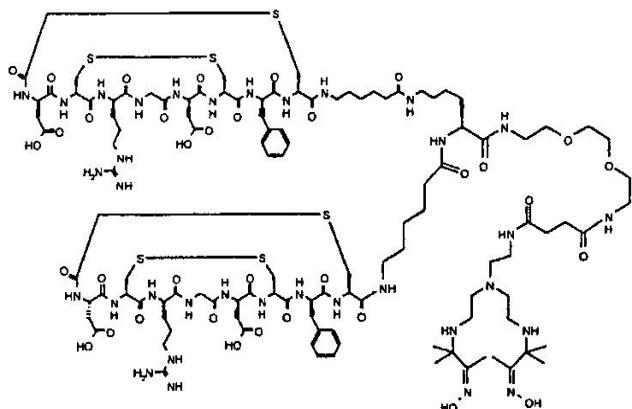
&lt;61&gt;

## 화학식 7



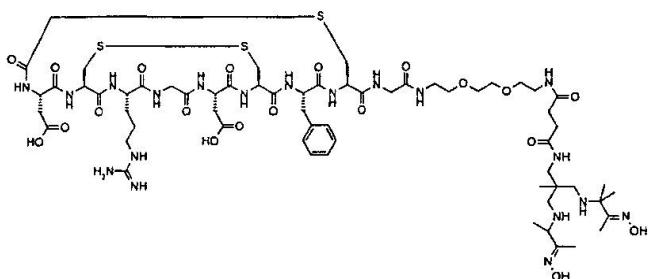
&lt;62&gt;

## 화학식 8



&lt;63&gt;

## 화학식 9



&lt;64&gt;

<65> 여기서, 화합물 V 및 화합물 VI은 테크네튬 표지화에 적합하며, 화합물 II는 요오드의 방사성동위원소로 표지될 수 있고 화합물 III은 요오드의 방사성동위원소에 의한 표지화에 적합한 티로신 잔기를 갖는다. 화합물 VII은 아르기닌 및 페닐알라닌 잔기가 각각 벡터 성분의 효소적 안정성을 증가시키는 N-메틸아르기닌 및 나프틸알라닌으로 대체된 벡터-킬레이트 접합체를 포함한다. 화합물 IV는 요오드에 의한 방사표지화를 위해 페닐알라닌 대신 티로신을 포함하며, 그 C-말단 글리신은 제거되었고 산 관능기는 아미드 결합에 의해 대체되어 카르복시펩티다제에 의한 벡터 분해를 감소시킨다.

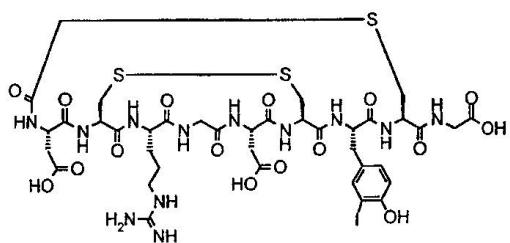
<66>  $X_1$ 이 결합 또는 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 잔기를 나타내고, 여기서 각 아미노산 잔기는 독립적으로 임의로 제제의 약동학 또는 혈액 청소율을 변화시키기에 적합한 관능성 측쇄를 갖도록 유도체화되고,  $X_{2-6}$ 이 화학식 1에 정의된 바와 같고,  $X_7$ 이 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 잔기를 나타내거나 또는 부재하며,  $X_8$ 이 부재하는 화학식 1은 하나 이상의 다중 벡터 (V)를 포함한다.

<67> 대부분의 경우에, 벡터 V 내의 아미노산은 L-형태인 것이 바람직하다. 그러나, 본 발명의 일부 실시양태에서, 벡터 V 내의 아미노산 중 1, 2, 3개 또는 그 이상은 바람직하게는 D-형태이다. 그러한 D-형태 아미노산의 포함은 벡터의 혈청 안정성에 상당한 효과를 나타낼 수 있다. 이에 관해서는 특히 위치  $X_1$ 에서 D-티로신을 갖는 벡터를 참고로 한다.

<68> 본 발명에 따라서, 화학식 1에 정의된 임의의 아미노산 잔기는 바람직하게는 독립적으로 D 또는 L 형태인 천연 아미노산을 나타낼 수 있다.

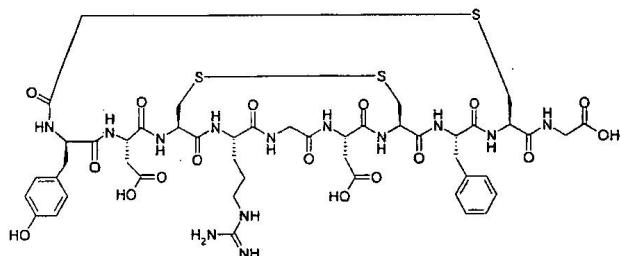
<69> 화합물 II-VII은 바람직하게는 아래에 나타낸 입체-특이적 형태를 갖는다:

화학식 2a



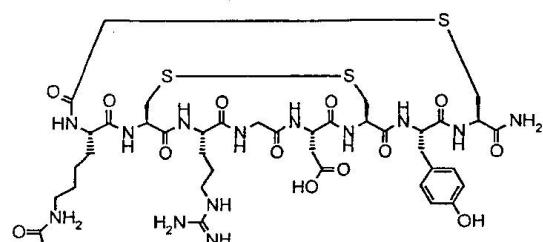
&lt;70&gt;

화학식 3a



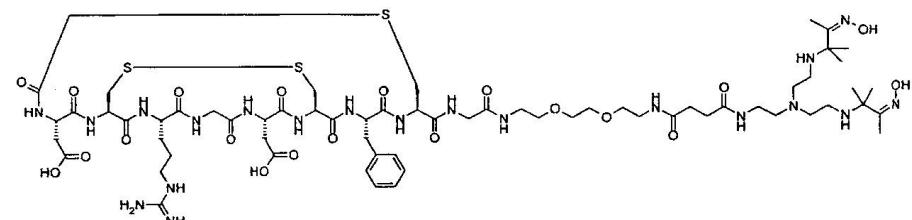
&lt;71&gt;

화학식 4a



&lt;72&gt;

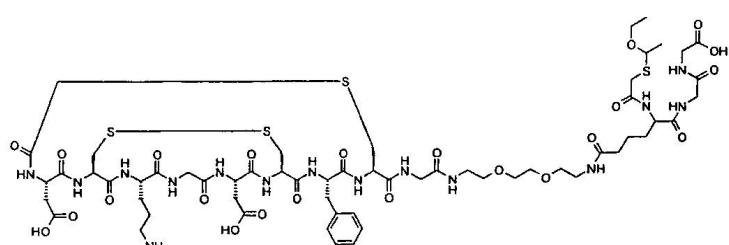
화학식 5a



&lt;73&gt;

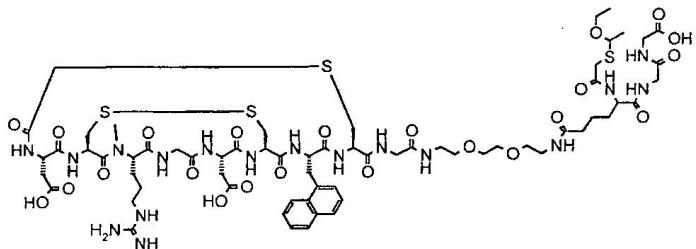
&lt;74&gt; 분자량: 1569.856; 실제 질량: 1568.690; 분자식: C64H104N20020S3

화학식 6a



&lt;75&gt;

## 화학식 7a



&lt;76&gt;

본 발명의 화합물의 일부는 고친화력 RGD 기재 벡터이다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 '고친화력 RGD 기재 벡터'는  $\alpha$  v  $\beta$  3 인테그린에 대한 경쟁 결합 분석에서 <100 nM, 바람직하게는 <10 nM, 가장 바람직하게는 <5 nM의 Ki를 갖는 화합물을 의미하며, 여기서 Ki 값은 공지된 고친화력 리간드 에키스타틴과의 경쟁에 의해 확인된다. 그러한 경쟁적 분석을 수행하는 방법은 당 업계에 잘 알려져 있다.

&lt;77&gt;

본 발명은 또한 유효량 (예컨대, 생체내 활영에서 영상 콘트라스트를 향상시키는데 효과적인 양)의 화학식 1의 화합물 또는 그의 염을, 하나 이상의 제약학상 허용되는 보조제, 부형제 또는 희석제와 함께 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

&lt;78&gt;

본 발명은 또한 유효량의 화학식 1의 화합물 또는 그의 산 부가염을, 하나 이상의 제약학상 허용되는 보조제, 부형제 또는 희석제와 함께 포함하는 질환 치료용 제약 조성물을 제공한다.

&lt;79&gt;

상기한 바와 같이, 화학식 1의 화합물은 벡터, 링커 및 리포터 부분을 포함할 수 있다. 링커 부분은 한 벡터를 한 리포터에 결합시키는 작용을 할 수 있고; 또한 그것은 하나를 넘는 벡터 및(또는) 하나를 넘는 수용체를 함께 결합시킬 수 있다. 마찬가지로, 리포터 또는 벡터는 둘 이상의 링커에 결합될 수 있다. 다수의 리포터의 이런 식의 사용 (한 벡터에 부착된 수개의 링커-리포터 부분 또는 한 벡터에 부착된 하나의 링커에 부착된 수개의 리포터)은 조영제의 검출능력이 증가되도록 할 수 있거나 (예를 들면, 그것의 방사선비투파, 에코발생도 또는 이완성을 증가시킴으로써) 또는 그것을 두 가지 이상의 활영 기법으로 검출되도록 할 수 있다. 다수의 벡터의 이런 식의 사용은 예를 들면, 조영제의 표적화 효율을 증가시킬 수 있거나 또는 조영제/치료제가 수용체 다양성을 갖는 체계에 대해 하나를 넘는 부위, 예를 들면 다른 수용체를 표적화하도록 할 수 있다.

&lt;80&gt;

생분해성 링커 및 생중합체를 비롯한 광범위한 링커가 사용될 수 있다.

&lt;81&gt;

조영제의 링커 성분은 가장 간단하게는 벡터와 리포터 부분 사이의 결합이다. 그러나, 더욱 일반적으로 링커는 하나 이상의 벡터를 하나 이상의 수용체에 공유적으로 또는 비공유적으로 결합시키는 단- 또는 다-분자 골격, 예를 들면 선형, 환형, 분지 또는 망상 분자 골격, 또는 벡터 및 리포터 부분과 공유적으로 또는 비공유적으로, 예를 들면 배위적으로 결합하거나 또는 그러한 부분을 피포하거나, 포획하거나 또는 정착시키는 인-빌트 또는 웨던트 기와의 분자 집합체를 제공할 것이다. 본 발명의 바람직한 한 실시양태는 하나 또는 다중 아미노산이 개개의 링커 성분의 일부인 화학식 1의 화합물을 제공한다.

&lt;82&gt;

리포터 단위를 목적하는 벡터에 결합시키는 것은 일반적으로 리포터 및(또는) 벡터 상에 위치된 하나 이상의 관능기와의 상호작용을 포함한, 공유 또는 비공유 수단에 의해 이루어질 수 있다. 이러한 목적에 이용될 수 있는 화학적으로 반응성인 관능기의 예는 아미노, 히드록실, 슬프히드릴, 카르복실 및 카르보닐 기, 및 탄수화물 기, 인근 디올, 티오에테르, 2-아미노알코올, 2-아미노티올, 구아니디닐, 이미다졸릴 및 폐놀기를 포함한다.

&lt;83&gt;

그러므로, 리포터 및 벡터의 공유 커플링은 그러한 관능기와 반응할 수 있는 반응성 부분을 함유하는 결합체를 사용하여 실시될 수 있다.

&lt;84&gt;

리포터 및(또는) 벡터 내의 관능기는 필요시에, 예를 들면 추가의 반응성 또는 선택성을 부여하기 위해 반응 전에 다른 관능기로 전환될 수 있다.

&lt;85&gt;

막 삽입을 매개할 수 있는 요소를 함유하는 웨티드, 리포-올리고사카라이드 또는 리포펩티드 링커에 커플링된 벡터가 또한 유용할 수도 있다.

&lt;86&gt;

비공유 리포터-벡터 결합을 유도하는 바이오틴/아비딘 시스템과 같은 제제 및 정전기적 상호작용을 유도하는 제제가 그러한 것처럼, 추가의 결합 물질을 도입하지 않고 (예를 들면, 카르보디이미드를 이용하거나 또는 효소적으로 유도된 아미드 결합 형성에서와 같이) 두 반응성 화학기의 직접적인 공유 결합을 유도하는 소위 제로 길

이 결합제가 필요시에 본 발명에 따라서 이용될 수 있다.

<88> 그러나, 대부분 결합제는 예를 들면 상기한 바와 같이 스페이서 요소에 의해 연결된 2개 이상의 반응성 부분을 포함할 것이다. 그러한 스페이서의 존재는 이관능성 링커가 분자내의 또는 2개의 다른 분자 사이의 특정 관능기와 반응하도록 하여, 이들 2개 성분 사이에 결합을 형성하고 외성 링커 유도된 물질을 리포터-벡터 접합체로 도입하게 된다. 결합제 내의 반응성 부분은 동일하거나 (호모이관능성 제제) 또는 상이할 수 있으므로 (헤테로이관능성 제제 또는 수개의 다른 반응성 부분이 존재하는 경우에는 헤테로다관능성 제제) 임의의 화학종 사이에 분자내의 또는 분자간의 공유 결합을 일으킬 수 있는 다양한 포텐셜 제제를 제공하게 된다.

<89> 결합제에 의해 도입되는 외성 재료의 특성은 최종 생성물의 표적화 능력 및 일반적인 안정성에 대해 결정적인 관련이 있을 수 있다. 따라서, 예를 들면 생분해성이거나 또는 화학적으로 민감하거나 또는 효소적 분해 부위를 포함하는 스페이서 아암을 함유하는 치환성 결합을 도입하는 것이 바람직할 수 있다. 별법으로, 스페이서는 예를 들면, 계면활성제로서 작용하고 제제의 안정성을 향상시키기 위해 중합체 성분을 포함할 수 있다. 스페이서는 또한 표면 가교를 향상시키기 위하여 예를 들면 상기한 바와 같은 반응성 부분을 함유할 수 있다. 스페이서 요소는 또한 텍스트란 및 바람직하게는 일반적으로 PEG로서 불리우는 폴리(에틸렌글리콜)과 같은 고분자 구조를 포함할 수도 있다. 스페이서 요소 이외에, PEG는 벡터의 생체내 특성을 개질시키는데 이용될 수 있다.

<90> 다른 대표적인 스페이서 요소는 효소 분해 부위를 함유할 수 있거나 또는 함유하지 않을 수 있는, 구조형 폴리사카라이드, 저장형 폴리사카라이드, 폴리아미노산 및 그의 메틸 및 에틸 에스테르, 및 폴리펩티드, 올리고사카라이드 및 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

<91> 바람직한 연결기는 제한되는 것은 아니지만, 다음 기로부터 선택된 벡터 반응성기로부터 유도된다:

<92> 벡터 상에서 카르복시, 알데히드, 아민 (NHR), 알코올, 술프히드릴기, 활성화 메틸렌 등과 직접 반응할 기, 예를 들면 활성 할로겐 함유 기,

<93> 벡터 반응성 기를 함유하는 개질된 벡터 분자, 즉 예를 들면 벡터의 알데히드 또는 카르복실산으로의 산화에 의해 반응성 기를 함유하도록 개질된 반응성 기를 함유하는 벡터와 쉽게 반응할 수 있는 기 및

<94> 가교제의 사용에 의해 반응성 기를 함유하는 벡터에 또는 상기한 바와 같은 개질된 벡터에 결합될 수 있는 기.

<95> 바람직한 유용한 연결기는 문헌 [Pierce Chemical Company Immunotechnology Catalog - Protein Modification Section (1995 and 1996)]에 기록된 것과 같은 각종 헤테로이관능성 가교 시약에서 유래된다.

<96> 상기 설명 이외에, 연결기는 전체적으로 또는 부분적으로, 천연적이거나 수식된 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 잔기의 상보적 서열, 바람직하게는 비자기 결합성 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하고 그로부터 유래될 수도 있다.

<97> 본 발명에 따라서 사용되는 결합제는 일반적으로 어느 정도의 특이성을 갖고 벡터의 리포터로의 결합 또는 리포터의 리포터로의 결합을 일으킬 것이며, 또한 하나 이상의 치료학적 활성제를 부착시키는데 사용될 수도 있다.

<98> 본 출원에 사용될 수 있는 링커의 또다른 예는 본원에 그의 전문이 참고로 인용된 WO98/47541의 32-54 페이지에 제공되어 있다.

<99> 상기 페이지에 개시된 각각의 또한 모든 링커 또는 그의 일부는 이 출원에 포함된 본 발명의 설명의 일부인 것으로 간주되어야 한다.

<100> 본 발명의 조영제의 리포터 부분은 생체내 진단 촬영 절차에서 직접적으로 또는 간접적으로 검출할 수 있는 임의의 부분일 수 있다. 바람직하게는, 조영제는 하나의 리포터를 포함한다. 바람직한 부분은 검출가능한 방사선을 방출하거나 또는 방출을 야기시킬 수 있는 부분 (예를 들면, 방사성붕괴, 형광 여기, 스핀 공명 여기 등에 의해), 국소 전자기장에 영향을 미치는 부분 (예를 들면, 상자성, 초상자성, 준강자성 또는 강자성 종), 방사선 에너지를 흡수하거나 또는 산란시키는 부분 (예를 들면, 발색단 및 형광발색단), 입자 (액체 함유 소포를 포함함), 중원소 및 그의 화합물, 및 검출가능한 물질을 발생시키는 부분 등일 수 있다.

<101> 진단용 촬영 기법에 의해 검출가능한 아주 광범위한 재료가 당업계에 공지되어 있으며 리포터는 사용될 촬영 기법에 따라서 선택될 것이다. 따라서, 예를 들면 초음파 촬영의 경우 에코발생 물질 또는 에코발생 물질을 발생시킬 수 있는 재료가 선택될 것이다. 벡터는 가스 충전된 미세기포로의 혼입을 위해 링커를 통해 적합한 지질

리포터/캐리어에 커플링될 수 있다. 그러한 미세기포는 표적화 초음파 촬영에 사용될 수 있다. X-선 촬영의 경우, 리포터는 일반적으로 중원자 (예를 들면, 원자량 38 이상)이거나 또는 중원자를 함유할 것이고; MR 촬영의 경우, 리포터는 비-제로 핵 스픈 동위원소 (예를 들면,  $^{19}\text{F}$ ) 또는 홀전자 스픈을 가져서 상자성, 초상자성, 준강자성 또는 강자성 특성을 갖는 물질일 것이며; 광 촬영의 경우, 리포터는 광 산란체 (예를 들면, 착색된 또는 비착색된 입자), 흡광체 또는 광 병출제일 것이며; 자기력 촬영의 경우, 리포터는 검출가능한 자기 특성을 가질 것이며; 전기 임피던스 촬영의 경우, 리포터는 전기 임피던스에 영향을 미칠 것이며; 신티그램, SPECT, PET 등의 경우 리포터는 방사성핵종일 것이다.

<102> 자기 철 산화물 입자, X-선 조영제 함유 소포, 킬레이트화된 상자성 금속 (예를 들면, Gd, Dy, Mn, Fe 등)과 같은 적합한 리포터의 예는 진단용 촬영 관련 문헌에 널리 알려져 있다.

<103> 일반적으로 말하면, 리포터는 (1) 킬레이트화 가능한 금속 또는 다원자 금속 함유 이온 (즉,  $\text{TcO}$  등) (여기서, 금속은 높은 원자 번호 금속 (예컨대 원자 번호가 37을 넘음), 상자성 종 (예컨대 전이 금속 또는 란탄족) 또는 방사성 동위원소임, (2) 홀전자 부위인 공유 결합된 비금속종 (예컨대, 안정된 자유 라디칼의 산소 또는 탄소), 높은 원자 번호 비금속 또는 방사성동위원소, (3) 협력적인 자기 거동 (예컨대 초상자성, 준강자성 또는 강자성)을 나타내거나 또는 방사성핵종을 함유하는, 원자 번호가 높은 원자를 함유하는 다원자 집단 또는 결정, (4) 발색단 (형광 또는 인광인 종이 포함됨), 예를 들면, 무기 또는 유기 구조, 특히 광범위한 비편재화된 전자계를 가진 유기기 또는 착화된 금속 이온 또는 (5) 광범위한 비편재화된 전자계 등에 의해 전기 임피던스 기변 특성을 갖는 구조 또는 기일 수 있다.

<104> 특히 바람직한 리포터 기의 예는 아래에 더욱 상세히 기재되어 있다.

<105> 킬레이트화된 금속 리포터는 바람직하게는 금속 방사성핵종, 상자성 금속 이온, 형광 금속 이온, 중금속 이온 및 집단 이온의 군으로부터 선택된다.

<106> 바람직한 금속 방사성핵종은  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{177\text{m}}\text{Sn}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{167}\text{Tm}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{203}\text{Pb}$  및  $^{141}\text{Ce}$ 를 포함한다.

<107> 바람직한 상자성 금속 이온은 전이 및 란타니드 금속 (예를 들면, 6 내지 9, 21-29, 42, 43, 44 또는 57-71의 원자 번호를 갖는 금속)의 이온, 특히 Cr, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb 및 Lu, 특히 Mn, Cr, Fe, Gd 및 Dy, 더욱 특히 Gd의 이온을 포함한다.

<108> 금속 이온은 바람직하게는 링커 부분 위의 또는 입자 (예를 들면, 소포 또는 다공성 또는 비다공성 무기 또는 유기 고체) 내 또는 위의 킬런트 기, 특히 선형, 거대환식, 터퍼리딘 및  $\text{N}_2\text{S}_2$  킬런트, 예를 들면 DTPA, DTPA-BMA, EDTA, D03A 및 TMT에 의해 킬레이트화된다. 적합한 킬런트 기의 또다른 예는 US-A-4647447, W089/00557, US-A-5367080, US-A-5364613 등에 개시되어 있다.

<109> 링커 부분 또는 입자는 (예를 들면, 다른 촬영 기법에서 검출가능한 리포터를 제공하기 위해) 필요시에 하나를 넘는 금속 종에 의해 금속화된 그러한 킬런트 기를 하나 이상 함유할 수 있다.

<110> 존재하는 킬레이트화제의 금속화 방법은 업계의 기술 수준 내에 든다. 금속은 다음 3가지의 일반적인 방법: 직접 혼입, 주형 합성 및(또는) 금속 교환 반응 중 어느 하나에 의해 킬런트 부분으로 혼입될 수 있다. 직접 혼입이 바람직하다.

<111> 따라서, 금속 이온은, 예를 들면 킬레이트화제 함유 부분의 수용액을 바람직하게는 약 4 내지 약 11의 pH를 가진 수용액의 금속 염과 혼합시키거나 또는 단순히 노출시킴으로써 킬레이트화제로 쉽게 착화되는 것이 바람직하다. 그 염은 임의의 염일 수 있지만, 바람직하게는 그 염은 할로겐 염과 같은 금속의 수용성 염이며, 더욱 바람직하게는 그러한 염은 금속 이온과 킬레이트화제와의 결합을 방해하지 않도록 선택된다. 킬레이트화제 함유 부분은 바람직하게는 약 5 내지 약 9의 pH, 더욱 바람직하게는 약 6 내지 약 8의 pH에서 수용액 상태이다. 킬레이트화제 함유 부분은 최적의 pH를 형성하도록 시트레이트, 아세테이트, 포스페이트 및 보레이트와 같은 완충 염과 혼합될 수 있다. 바람직하게는, 완충염은 이후의 금속 이온의 킬레이트화제로의 결합을 방해하지 않도록 선택된다.

<112> 진단용 촬영에서, 벡터-링커-리포터 (V)<sub>k</sub>LR 구조물은 바람직하게는 그러한 진단용 촬영 용도에 효과적인 금속 방사성핵종 이온 대 킬레이트화제의 비를 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 킬레이트화제 당 금속 이온의 몰비는

약 1:1,000 내지 약 1:1이다.

<113> 방사선치료 용도에서, (V)<sub>k</sub>LR은 바람직하게는 그러한 치료 용도에서 효과적인 금속 방사성핵종 이온 대 킬레이트 화제의 비를 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 킬레이트화제 당 금속 이온의 몰비는 약 1:100 내지 약 1:1이다. 방사성핵종은, 예를 들면 Sc, Fe, Pb, Ga, Y, Bi, Mn, Cu, Cr, Zn, Ge, Mo, Ru, Sn, Sr, Sm, Lu, Sb, W, Re, Po, Ta 및 Tl의 방사성동위원소로부터 선택될 수 있다.

<114> 바람직한 방사성핵종은 <sup>44</sup>Sc, <sup>64</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>212</sup>Pb, <sup>68</sup>Ga, <sup>90</sup>Y, <sup>163</sup>Sm, <sup>212</sup>Bi, <sup>186</sup>Re 및 <sup>188</sup>Re를 포함한다. 이중에서, 특히 바람직한 것은 <sup>90</sup>Y이다. 이 방사성동위원소는 원자이거나 또는 바람직하게는 이온이다.

<115> 다음 동위원소 또는 동위원소쌍은 방사표지 방법 또는 킬레이터를 변화시키지 않고 촬영 및 치료에 사용될 수 있다: <sup>47</sup>Sc<sub>21</sub>; <sup>141</sup>Ce<sub>58</sub>; <sup>166</sup>Re<sub>75</sub>; <sup>177</sup>Lu<sub>71</sub>; <sup>199</sup>Au<sub>79</sub>; <sup>47</sup>Sc<sub>21</sub>; <sup>131</sup>I<sub>53</sub>; <sup>67</sup>Cu<sub>29</sub>; <sup>131</sup>I<sub>53</sub> 및 <sup>123</sup>I<sub>53</sub>; <sup>166</sup>Re<sub>75</sub> 및 <sup>99m</sup>Tc<sub>43</sub>; <sup>90</sup>Y<sub>39</sub> 및 <sup>87</sup>Y<sub>39</sub>; <sup>47</sup>Sc<sub>21</sub> 및 <sup>44</sup>Sc<sub>21</sub>; <sup>90</sup>Y<sub>39</sub> 및 <sup>123</sup>I<sub>53</sub>; <sup>146</sup>Sm<sub>62</sub> 및 <sup>153</sup>Sm<sub>62</sub>; 및 <sup>90</sup>Y<sub>39</sub> 및 <sup>111</sup>In<sub>49</sub>.

<116> 킬런트 부분은 킬런트의 골격 관능기화를 통해 또는 킬런트의 하나 이상의 금속 배위기의 이용에 의해, 또는 예를 들면 폴리리신-폴리DTPA, 폴리리신-폴리DOTA에서와 같이 또한 소위 매그니파이어 폴리킬런트 (PCT/EP96/00565)에서와 같이, 산 킬런트와 아민 또는 히드록실 함유 링커 골격 사이의 아미드 또는 에테르 결합 형성에 의해 부착될 수 있다. 그러한 부분은 직접 (예를 들면, 폴리킬런트 링커 내의 아민, 산 또는 히드록실기를 이용하여) 또는 모노킬런트 링커에 대해 위에 논의된 바와 같이 이관능성 링커 화합물을 통해 하나 이상의 벡터 기에 접합될 수 있다.

<117> 킬레이트화 종이 입상 (또는 분자 접합체, 예를 들면 소포성) 링커에 의해 담지될 때, 킬레이트는 입자에 내포된 비부착된 모노 또는 폴리킬레이트 (예를 들면, Gd DTPA-BMA 또는 Gd HP-D03A)일 수 있거나 또는 그것은 공유 결합에 의해 또는 모노/폴리킬레이트 상의 정착 기 (예를 들면, 친지성 기)와 소포의 막의 상호작용에 의해 입자에 접합된 모노 또는 폴리킬레이트일 수 있다 (예를 들면 PCT/GB95/02378 참조).

<118> 바람직한 비금속 원자 리포터는 <sup>123</sup>I, <sup>131</sup>I 및 <sup>18</sup>F와 같은 방사성동위원소 뿐만 아니라 <sup>19</sup>F와 같은 비제로 핵 스핀 원자 및 I와 같은 중원자를 포함한다.

<119> 바람직하게는 다수의, 예를 들면 2 내지 200의 그러한 리포터는 통상의 화학 합성 기술을 이용하여 직접 또는 지지 기, 예를 들면 트리요오도페닐기를 통해 링커 골격에 공유 결합될 수 있다.

<120> 본 발명의 실시양태에서, 요오드 또는 플루오르의 방사성동위원소의 사용이 특히 예상된다. 예를 들면, 벡터 또는 링커가 공유 결합 형성 반응에서 요오드 또는 플루오르에 의해 화학적으로 치환될 수 있는 치환체, 예를 들면 히드록시페닐 또는 p-니트로벤조일 관능기를 함유하는 치환체를 포함한다면, 그러한 치환체는 당 업계에 공지된 방법에 의해 각각 요오드 또는 플루오르의 방사성동위원소로 표지될 수 있다. 이들 종은 치료용 및 진단용 촬영술 용도에 사용될 수 있다. 동일한 벡터-링커 상의 킬레이트화제에 부착된 금속이 동시에 치료용 및 진단용 촬영술 용도에 사용될 수도 있다. 상기 논의된 금속 킬런트와 같이 그러한 금속 원자 리포터는 링커에 결합되거나 또는 입상 링커, 예를 들면 소포 내에 또는 위에 담지될 수 있다 (예를 들면, W095/26205 및 GB 9624918.0 참조).

<121> 금속 리포터와 관련된 상기 유형의 링커는 비금속 원자 리포터에 대해 사용될 수 있으며, 이때 비금속 원자 리포터 또는 그러한 리포터를 갖는 기는 킬런트 기의 일부 또는 전부를 대신한다.

<122> 바람직하게는, 본 발명의 (V)<sub>k</sub>LR 제제는 입상 리포터 또는 링커-리포터, 예를 들면 초상자성 결정 (예를 들면, PCT/GB97/00067에서와 같이 임의로 코팅됨) 또는 소포, 예를 들면 요오드화된 조영제를 함유하는 미셀 또는 리포솜에 직접 또는 유기 링커 기를 통해 부착되거나 또는 커플링된 금속 킬레이트에 의해서나, 예를 들면 공유 결합된 요오드 방사성동위원소를 통해, 리포터에 직접 또는 간접적으로 커플링된 수용체 표적화 벡터를 가질 것이다.

<123> 본 발명의 바람직한 실시양태는 특히 종양 촬영술에 사용하기 위한, 화학식 1의 방사표지 제제에 관한 것이다.

<124> 본 발명의 진단 제제는 특정 촬영술로 원하는 콘트라스트를 나타내기에 충분한 양으로 촬영을 위해 환자에게 투여될 수 있다. 리포터가 금속인 경우, 일반적으로 환자 체중 kg 당 킬레이트화된 조영제 금속 이온 0.001 내지

5.0 mmol의 투여량이 적절하게 콘트라스트를 향상시키는데 효과적이다. 리포터가 방사성핵종인 경우, 체중 70 kg 당 0.01 내지 100 mCi, 바람직하게는 0.1 내지 50 mCi의 투여량이 충분할 것이다.

<125> 치료 용도를 위한 본 발명의 화합물의 투여량은 치료될 상태에 좌우될 것이지만, 일반적으로 1 pmol/체중 kg 내지 1 mmol/체중 kg 정도일 것이다.

<126> 본 발명에 따른 화합물은 당 업계의 기술 범위 내의 방법으로 생리학적으로 적합한 담체 또는 부형제를 이용하여 투여용으로 제제화될 수 있다. 예를 들면, 임의로 제약학상 허용되는 부형제를 첨가한 화합물은 수성 매질에 혼탁되거나 또는 용해될 수 있으며, 그후에 결과 용액 또는 혼탁액은 멸균된다.

<127> 화학식 1의 화합물은 생체내 촬영에서 검출가능할 뿐만 아니라 질환의 치료에서 치료학적으로 효과적일 수 있다. 따라서, 예를 들면 리포터 부분 위의 벡터는 예를 들면 방사성핵종 리포터의 방사선치료 효과, 발색단 (또는 형광물질) 리포터의 광역학 치료에서의 효능 또는 벡터 부분의 화학치료 효과에 의해 치료 효능을 가질 수 있다.

<128> 치료 조성물 (의약)의 제조 및 치료 또는 예방적 처치, 바람직하게는 인간 또는 비인간 동물 신체의 암의 치료 방법에서의 화학식 1의 화합물의 용도는 본 발명의 또다른 면을 나타내는 것으로 고려된다.

<129> 본 출원에 사용될 수 있는 리포터의 또다른 예는 본원에 그의 전문이 참고로 인용된 WO98/47541의 63-66 및 70-86 페이지에 제공되어 있다. 상기 페이지에 개시된 각각의 또한 모든 리포터 또는 그의 일부는 이 출원에 포함된 본 발명의 설명의 일부인 것으로 간주되어야 한다.

<130> 다른 면에서, 본 발명은 조영 매질을 생물 대상에게 투여하고 상기 대상의 적어도 일부의 영상을 얻는 것을 포함하는 진단 방법에 사용하기 위한 조영 매질의 제조를 위한 화학식 1의 화합물의 용도를 제공한다.

<131> 또다른 면에서, 본 발명은 조영제를 살아있는 인간 또는 비인간 (바람직하게는 포유류 또는 조류) 동물 대상에게 혈관계 등으로 투여하고 조영제가 분포된 상기 대상의 적어도 일부의 영상을 X-선, MR, 초음파, 신티그레피, PET, SPECT, 전기 임피던스, 광 또는 자기력 촬영 기법 등에 의해 얻는 것을 포함하는 상기 대상의 영상을 얻는 방법을 제공하며, 여기서 조영제로서는 화학식 1의 제제가 사용된다.

<132> 또다른 면에서, 본 발명은 화학식 1에 의해 정의된 화합물을 포함하는 조영제 조성물을 미리 투여한 인간 또는 비인간 동물 대상의 적어도 일부의 영상을 얻는 것을 포함하는 상기 대상의 향상된 영상을 얻는 방법을 제공한다. 또다른 면에서, 본 발명은 화학식 1의 제제를 인간 또는 비인간 동물 대상에게 투여하고 세포 수용체, 바람직하게는 내피세포 수용체, 특히  $\alpha$  v  $\beta$  3 수용체에 의한 상기 제제의 흡수를 검출하는 것을 포함하며, 상기 투여 및 검출이 암과 관련된 상태를 극복하는 약물에 의한 처치 전에, 도중에 또한 후에 선택적이지만 반복적으로 실시하는 것이 바람직한, 인간 또는 비인간 동물 대상을 상기 약물로 처치한 효과를 모니터하는 방법을 제공한다.

<133> 또다른 면에서, 본 발명은 벡터 V를 진단용 촬영 절차에서 검출가능한 화합물에 또는 킬런트 화합물에 접합시키고 필요시에 형성된 접합체 내의 킬런트 기를 진단용 촬영 절차에서 검출가능한 금속 이온으로 금속화하는 것을 포함하는, 화학식 1의 제제의 제조 방법을 제공한다.

<134> 본 발명의 화합물은 모든 공지된 화학 합성 방법을 이용하여 합성될 수 있지만 특히 유용한 것은 자동 웨티드 합성기를 이용하는 메리필드의 고체상 방법이다 (J. Am. Chem. Soc., 85: 2149 (1964)). 다중 가교를 함유하는 벡터는 구별되는 시스테인 보호기를 이용하여 합성되므로 벡터의 최종 폴딩된 형태에 관해 불명료한 것은 없다. 웨티드 및 웨티드 킬레이트는 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)를 사용하여 정제될 수 있으며 시험판내 스크린에서 시험하기 전에 질량 분석법 및 분석용 HPLC에 의해 특징화된다.

## 효과

<135> 본 발명에 의해 정의된 화합물은 놀랍게도 생체내에서, 또한 표지화시에, 예를 들면 테크네튬에 의한 표지화시에 이용되는 조건 하에서 안정하다.

<136> 이러한 신규 화합물은 촬영 목적뿐만 아니라 치료학적으로 효과적인 처치에 사용될 수 있다.

## 발명의 실시를 위한 구체적인 내용

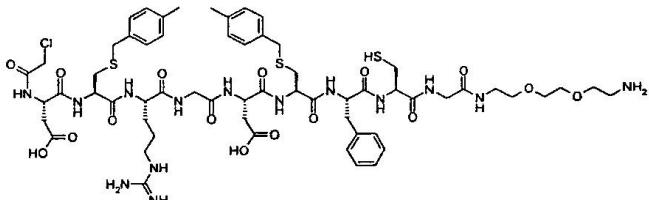
<137> 본 발명은 이제 다음 비제한적 실시예에 의해 더 예시될 것이다.

## 실시예

&lt;138&gt;

실시예 1: 화합물 V1a의 합성

&lt;139&gt;

1a)  $\text{C1CH}_2\text{CONH-Asp-Cys(MBz1)-Arg-Gly-Asp-Cys(MBz1)-Phe-Cys-Gly-NH-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 의 합성

&lt;140&gt;

실제 질량: 1388; 분자식: C<sub>60</sub>H<sub>85</sub>ClN<sub>14</sub>O<sub>16</sub>S<sub>3</sub>

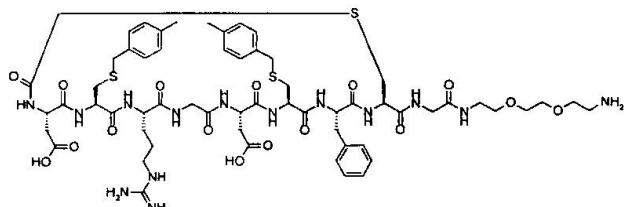
&lt;142&gt;

1 mmol 아미노산 및 클로로아세트산 카트리지를 사용하여 0.25 mmol 스케일로 O-Bis-(아미노에틸)에틸렌 글리콜 트리틸 수지로 개시하여 ABI 433A 자동 펩티드 합성기 상에서 펩티드를 합성하였다. 아미노산 및 클로로아세트산을 커플링 전에 HBTU를 사용하여 예비 활성화시켰다. TIS (5%), H<sub>2</sub>O (5%) 및 페놀 (2.5%)을 함유하는 TFA에서 2시간 20분 동안 수지로부터의 펩티드 및 측쇄 보호기 (MBz1는 제외)의 동시 제거를 수행하였다.

&lt;143&gt;

후처리 후에, 조 펩티드 250 mg을 얻었다 (분석용 HPLC: 구배, 20분에 걸쳐 5-50% B (A = H<sub>2</sub>O/0.1% TFA 및 B = CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA; 컬럼, VYDAC C18 218TP54; 검출, UV 214 nm; 생성물 체류 시간, 20.55분). MALDI 질량 분석법을 이용하여 추가의 생성물 특징화를 수행하였다: 예상치, 1389에서 M+H, 실측치, 1392에서).

&lt;144&gt;

1b) 시클로[-CH<sub>2</sub>CONH-Asp-Cys(MBz1)-Arg-Gly-Asp-Cys(MBz1)-Phe-Cys]-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>의 합성

&lt;145&gt;

실제 질량: 1352; 분자식: C<sub>60</sub>H<sub>84</sub>N<sub>14</sub>O<sub>16</sub>S<sub>3</sub>

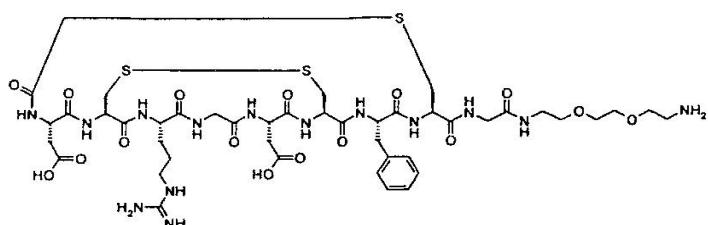
&lt;147&gt;

1CH<sub>2</sub>CONH-Asp-Cys(MBz1)-Arg-Gly-Asp-Cys(MBz1)-Phe-Cys-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> 250 mg을 물/아세토니트릴에 용해시켰다. 혼합물을 암모니아 용액으로 pH 8로 조정하고 20분 동안 교반시켰다.

&lt;148&gt;

동결건조 후에, 조 펩티드 240 mg을 얻었다 (분석용 HPLC: 구배, 20분에 걸쳐 5-50% B (A = H<sub>2</sub>O/0.1% TFA 및 B = CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA; 컬럼, VYDAC C18 218TP54; 검출, UV 214 nm; 생성물 체류 시간, 19.45분). MALDI 질량 분석법을 이용하여 추가의 생성물 특징화를 수행하였다: 예상치, 1353에서 M+H, 실측치, 1358에서).

&lt;149&gt;

1c) [Cys<sup>2-6</sup>] 시클로[-CH<sub>2</sub>CONH-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>의 합성

&lt;150&gt;

분자량: 1143.29; 실제 질량: 1142; 분자식: C<sub>44</sub>H<sub>66</sub>N<sub>14</sub>O<sub>16</sub>S<sub>3</sub>

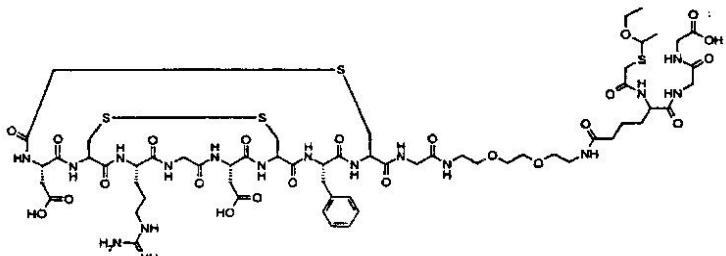
&lt;152&gt;

시클로[CH<sub>2</sub>CONH-Asp-Cys(MBz1)-Arg-Gly-Asp-Cys(MBz1)-Phe-Cys]-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> 100 mg을 TFA (10

ml)에 용해시키고 그후에 아니솔 (200  $\mu\ell$ ), DMSO (5 ml) 및 TFA (90 ml)의 예비가열된 용액에 첨가하였다. 혼합물을 60 °C에서 60분 동안 교반시키고, 이후에 TFA를 진공 중에서 제거하고 디에틸 에테르를 첨가하여 웹티드를 침전시켰다.

<153> 조 재료의 제조용 HPLC (Vydac C18 218TP1022 컬럼)에 의한 정제를 9 mL/분의 유속으로 40분에 걸쳐 0-30% B (A = H<sub>2</sub>O/0.1% TFA 및 B = CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA)를 이용하여 수행하였다. 동결건조 후에, 조 재료 26 mg을 얻었다 (분석용 HPLC: 구배, 0-35% B (A = H<sub>2</sub>O/0.1% TFA 및 B = CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA; 컬럼, VYDAC C18 218TP54; 검출, UV 214 nm; 생성물 체류 시간, 14.33분). MALDI 질량 분석법을 이용하여 추가의 생성물 특징화를 수행하였다: 예상치, 1143에서 M+H, 실측치, 1148에서).

<154> 1d) [Cys<sup>2-6</sup>]시클로[CH<sub>2</sub>CONH-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>와 N<sub>3</sub>S-아디페이트 킬레이트와의 접합 - 화합물 V1a:



&lt;155&gt;

<156> 분자량: 1546.75; 실제 질량: 1545; 분자식: C<sub>60</sub>H<sub>91</sub>N<sub>17</sub>O<sub>23</sub>S<sub>4</sub>

<157> 아세토니트릴 (5 ml) 중에 용해된 N<sub>3</sub>S-아디페이트 킬레이트 활성 에스테르 6.5 mg을 DPBS (5 ml, pH 7.4)에 용해된 [Cys<sup>2-6</sup>]시클로[CH<sub>2</sub>CONH-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> 5.1 mg에 첨가하였다. 혼합물을 3일 동안 교반시켰다.

<158> 반응 혼합물의 제조용 HPLC (Vydac C18 218TP1022 컬럼)에 의한 정제를 9 mL/분의 유속으로 40분에 걸쳐 5-30% B (A = H<sub>2</sub>O/0.1% TFA 및 B = CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA)를 이용하여 수행하였다. 동결건조 후에, 조 재료 4.3 mg을 얻었다 (분석용 HPLC: 구배, 10분에 걸쳐 5-50% B (A = H<sub>2</sub>O/0.1% TFA 및 B = CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA; 컬럼, Phenomenex Luna 3  $\mu$  C18 (2) 50 x 4.6 mm; 검출, UV 214 nm; 생성물 체류 시간, 6.55분). MALDI 질량 분석법을 이용하여 추가의 생성물 특징화를 수행하였다: 예상치, 1150에서 M+H, 실측치, 1546에서).

<159> 1e) 화합물 V1a의 테크네튬 표지화

<160> 질소 충전된 바이알에서, 물 (50  $\mu\ell$ )에 용해된 화합물 V1a (50  $\mu\text{g}$ ), 글루콘산 나트륨 용액 (6 ml H<sub>2</sub>O 중의 25 mg) 150  $\mu\ell$ , 아세트산 암모늄 (pH 4.0, 50 mM) 100  $\mu\ell$ , TcO<sub>4</sub> 용액 (500 MBq) 1 ml 및 SnCl<sub>2</sub> 용액 (100 ml H<sub>2</sub>O 중의 20 mg) 50  $\mu\ell$ 를 첨가하였다. 혼합물을 ITLC 및 HPLC에 의한 분석 전에 75 °C에서 20분 동안 가열하였다.

<161> 실시예 2: [Cys<sup>2-6</sup>]시클로[CH<sub>2</sub>CONH-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>와 Pn216 킬레이트와의 접합 (화합물 Va)

<162> 2a) Pn216 킬레이트의 합성

<163> 클로로-나트로소 중간체 (3-클로로-3-메틸-2-나트로소부탄)

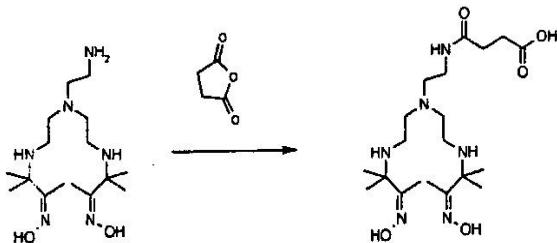
<164> 2-메틸부트-2-엔 (18.5 ml) 및 이소아밀 니트레이트 (19.5 ml)의 혼합물을 교반시키고, -10 °C로 냉각시키고 전한 염산 (17.5 ml)을 조심스럽게 첨가하여 0 °C 미만의 온도를 유지하였다. 반응을 이 온도에서 30분 동안 교반시켰다. 형성된 침전물을 여과시켜 모으고, 에탄올 (-20 °C) 5 ml로 4회 세척하고 진공 중에서 건조시켜 3-클로로-3-메틸-2-나트로소부탄을 백색 고상물로서 제공하였다.

<165> 2b) Pn216 - (3,3,11,11-테트라메틸-7-아미노에틸-4,7,10-트리아자트리데칸-2,12-디온디옥심)

<166> 아세토니트릴 (20 ml) 중의 트리스-(2-아미노에틸) 아민의 용액에 중탄산 나트륨 (2.2 g, 26 mmol)을 첨가하였

다. 건조 아세토니트릴 중의 3-클로로-3-메틸-2-나트로소부탄 (1.8 g, 13 mmol)의 용액을 0 °C에서 서서히 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반시켜 둔 후 여과시켰다. 여과물을 아세토니트릴로 세척하고 여액을 증발시켰다. 조 생성물을 아세토니트릴에 용해시키고 HPLC에 의해 정제하여 Pn216을 얻었다. 수율 0.88 g, 19%.

<167> 2c) Pn216 - 속신산 중간체의 합성:



<168>

<169> 속신산 무수물 (100)

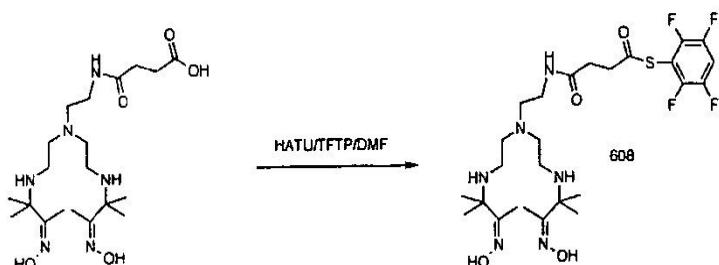
<170> Pn216 (358)

<171> 테트라플루오로티오페놀 (182)

<172> DCCI (206)

<173> Pn216 (0.5 g, 1.4 mmol)을 DMF (5 mL)에 용해시키고 DMF (10 mL) 중의 속신산 무수물 (0.015 g, 1.5 mmol)을 교반시키며 적가하였다. 반응물을 16시간 동안 교반시켜 두어 목적 생성물로의 완전한 전환을 실시하였다. HPLC 크로마토그래피 이후에 순수한 산을 양호한 수율로 얻었다.

<174> 2d) Pn216-속신산의 테트라플루오로티오페놀 에스테르 유도체의 합성

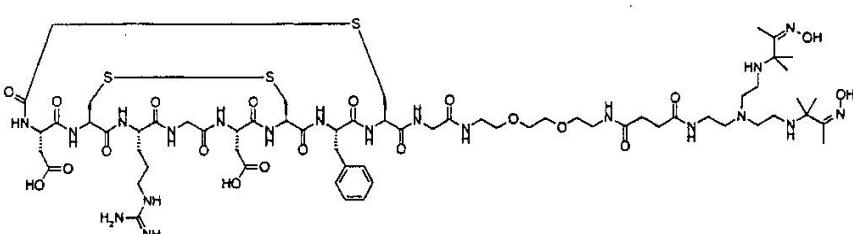


<175>

<176> DMF (1.0 mL) 중의 Pn216 산 (10 mg, 0.022 mmol)에 HATU (8.3 mg, 0.022 mmol) 및 NMM (0.007 mL, 0.066 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 5분 동안 교반시킨 후, TFTP (0.022 mmol, 4 mg)를 첨가하였다. 그 용액을 30분 동안 교반시킨 후, 반응 혼합물을 20% 아세토니트릴/H<sub>2</sub>O (3 mL)로 희석하고, 생성물을 역상 크로마토그래피에 의해 정제하여 동결 건조 이후에 목적 생성물 6 mg을 얻었다.

<177> 2e) 웹티드의 합성에 대해서 실시예 1a) 내지 c) 참조

<178> 2f) 웹티드 및 Pn216 칼레이트의 접합



<179>

<180> 분자량: 1569.856; 실제 질량: 1568.690; 분자식: C64H104N20020S3

<181> Pn216 칼레이트 활성 에스테르 5 mg, N-메틸모르폴린 2  $\mu$ L 및 [Cys<sup>2-6</sup>]시클로[CH<sub>2</sub>CONH-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-

Phe-Cys]-Gly-NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> 6 mg을 N,N-디메틸포름아미드 (0.5 mL)에 용해시켰다. 혼합물을 24시간 동안 교반시켰다.

<182> 반응 혼합물을의 제조용 HPLC (Phenomenex Luna 5  $\mu$  C18 (2) 250 x 21.20 mm 컬럼)에 의한 정체를 10 mL/분의 유속으로 40분에 걸쳐 5-50% B (A = H<sub>2</sub>O/0.1% TFA 및 B = CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA)를 이용하여 수행하였다. 동결건조 후에, 조 재료 3.5 mg을 얻었다 (분석용 HPLC: 구배, 10분에 걸쳐 5-50% B (A = H<sub>2</sub>O/0.1% TFA 및 B = CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA; 컬럼, Phenomenex Luna 3  $\mu$  C18 (2) 50 x 4.6 mm; 검출, UV 214 nm; 생성물 체류 시간, 4.47분). 질량 분석법을 이용하여 추가의 생성물 특징화를 수행하였다: 예상치, 1569.7에서 M+H, 실측치, 1569.7에서).

<183> 2g) 화합물은 상기 실시예 1e)에 기재된 바와 유사하게 테크네튬 (<sup>99m</sup>Tc)으로 표지될 수 있다.

<184> 실시예 3: Pn216 칼레이트를 가진 지방산 개질된 벡터

<185> 3a) Dde-Lys-Cys(tBu)-Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-Cys(tBu)-Phe-Cys(Trt)-Gly-(O-Bis-(아미노에틸)에틸렌 글리콜 트리틸) 수지 (i)의 접합

<186> 보호된 웨티드를 1 mmol 아미노산 카트리지를 사용하여 0.3 mmol 스케일로 O-Bis-(아미노에틸)에틸렌 글리콜 트리틸 수지로 개시하여 ABI 433A 자동 웨티드 합성기 상에서 보호된 웨티드를 접합시켰다. 아미노산을 커플링 전에 HBTU를 사용하여 예비 활성화시켰다.

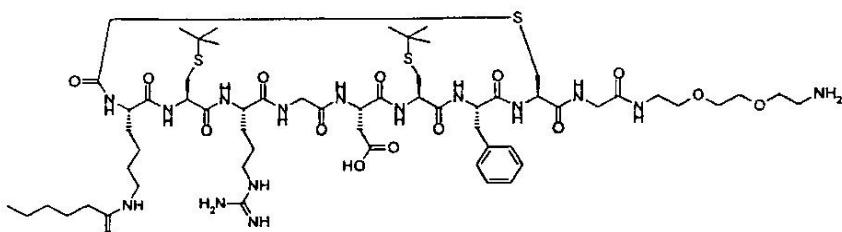
<187> 3b) C1CH<sub>2</sub>CO-Lys(헥사노일)-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (ii)의 합성

<188> 수지 (i) 0.1 mmol을 DMF 중의 헥산산 무수물의 용액으로 17시간 동안 처리하였다. DMF 중의 2% 히드라진 일수화물을 사용하여 4시간 30분 동안 수지로부터의 Dde 보호기의 제거를 수행하였다. 그후에, 수지를 DMF 중의 클로로아세트산 무수물의 용액으로 60분 동안 처리하였다.

<189> TIS (5%), H<sub>2</sub>O (5%) 및 폐놀 (2.5%)을 함유하는 TFA에서 2시간 동안 수지로부터의 웨티드 및 측쇄 보호기 (tBu는 제외)의 동시 제거를 수행하였다.

<190> 후처리 후에, 조 웨티드 100 mg을 얻었다 (분석용 HPLC: 구배, 10분에 걸쳐 5-50% B (A = H<sub>2</sub>O/0.1% TFA 및 B = CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA; 컬럼, Phenomenex Luna 3  $\mu$  C18 (2) 50 x 4.6 mm; 유량, 2 mL/분; 검출, UV 214 nm; 생성물 체류 시간, 7.81분). 질량 분석법을 이용하여 추가의 생성물 특징화를 수행하였다: 예상치, 1404.7에서 M+H, 실측치, 1404.6에서).

<191> 3c) 시클로[CH<sub>2</sub>CO-Lys(헥사노일)-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (iii)의 합성

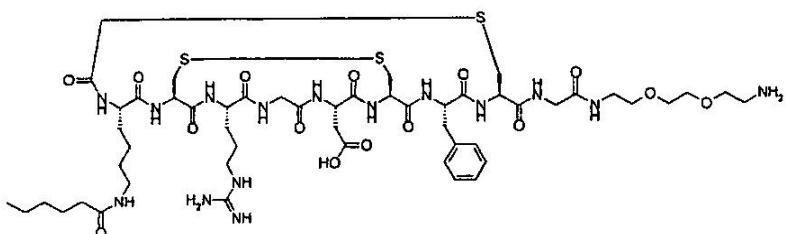


<192> <193> 분자량: 1368.757; 실제 질량: 1367.676; 분자식: C<sub>60</sub>H<sub>101</sub>N<sub>15</sub>O<sub>15</sub>S<sub>3</sub>

<194> 화합물 (ii) 100 mg을 물/아세토니트릴에 용해시켰다. 혼합물을 암모니아 용액으로 pH 8로 조정하고 20분 동안 교반시켰다.

<195> 후처리 후에, 조 웨티드 104 mg을 얻었다 (분석용 HPLC: 구배, 10분에 걸쳐 5-50% B (A = H<sub>2</sub>O/0.1% TFA 및 B = CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA; 컬럼, Phenomenex Luna 3  $\mu$  C18 (2) 50 x 4.6 mm; 유량, 2 mL/분; 검출, UV 214 nm; 생성물 체류 시간, 7.67분). 질량 분석법을 이용하여 추가의 생성물 특징화를 수행하였다: 예상치, 1368.7에서 M+H, 실측치, 1368.7에서).

<196> 3d)  $[\text{Cys}^{2-6}]$  시클로[CH<sub>2</sub>CO-Lys(헥사노일)-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (iv)의 합성



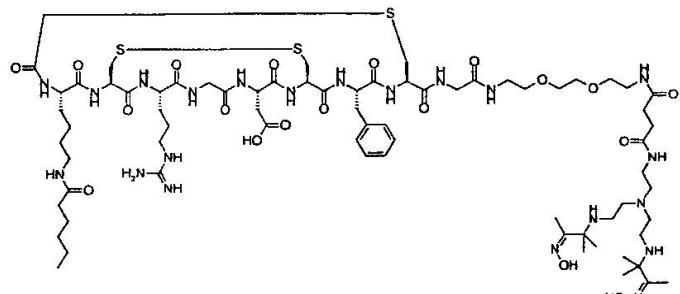
&lt;197&gt;

<198> 분자량: 1254.525; 실제 질량: 1253.536; 분자식: C52H83N15O15S3

<199> 화합물 (iii) 50 mg을 아리솔 (100  $\mu\ell$ ), DMSO (1  $\text{m}\ell$ ) 및 TFA (50  $\text{m}\ell$ )의 용액으로 실온에서 30분 동안 처리하고, 이후에 TFA를 진공 중에서 제거하고 디에틸 에테르를 첨가하여 펩티드를 침전시켰다.

<200> 조 재료의 제조용 HPLC (Phenomenex Luna 5  $\mu$  C18 (2) 250 x 21.20  $\text{mm}$  컬럼)에 의한 정제를 10 mL/분의 유속으로 40분에 걸쳐 5-50% B (A = H<sub>2</sub>O/0.1% TFA 및 B = CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA)를 이용하여 수행하였다. 동결건조 후에, 순수한 재료 9 mg을 얻었다 (분석용 HPLC: 구배, 10분에 걸쳐 5-50% B (A = H<sub>2</sub>O/0.1% TFA 및 B = CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA; 컬럼, Phenomenex Luna 3  $\mu$  C18 (2) 50 x 4.6  $\text{mm}$ ; 유량, 2  $\text{m}\ell$ /분; 검출, UV 214 nm; 생성물 체류 시간, 5.38분). 질량 분석법을 이용하여 추가의 생성물 특징화를 수행하였다: 예상치, 1254.5에서 M+H, 실측치, 1254.6에서).

<201> 3e)  $[\text{Cys}^{2-6}]$  시클로[CH<sub>2</sub>CO-Lys(헥사노일)-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-Pn216 (v)의 합성



&lt;202&gt;

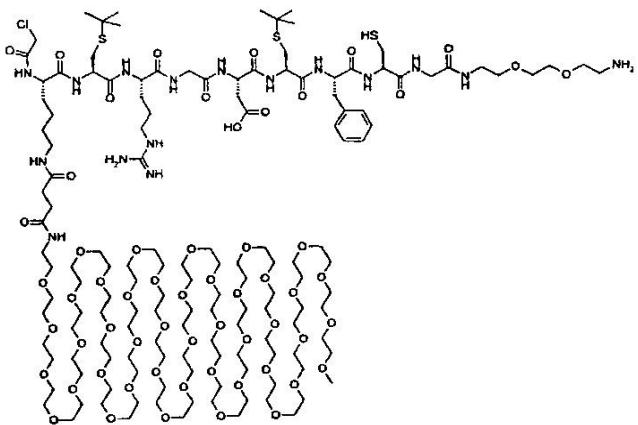
<203> 분자량: 1681.088; 실제 질량: 1679.831; 분자식: C72H121N21O19S3

<204> 화합물 (iv) 9 mg, Pn216 칼레이트 활성 에스테르 11 mg 및 N-메틸모르폴린 8  $\mu\ell$ 를 DMF (1  $\text{m}\ell$ )에 용해시켰다. 혼합물을 3.5시간 동안 교반시켰다. 반응 혼합물의 제조용 HPLC (Phenomenex Luna 5  $\mu$  C18 (2) 250 x 21.20  $\text{mm}$  컬럼)에 의한 정제를 10 mL/분의 유속으로 40분에 걸쳐 5-50% B (A = H<sub>2</sub>O/0.1% TFA 및 B = CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA)를 이용하여 수행하였다. 동결건조 후에, 순수한 재료 5.2 mg을 얻었다 (분석용 HPLC: 구배, 10분에 걸쳐 5-50% B (A = H<sub>2</sub>O/0.1% TFA 및 B = CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA; 컬럼, Phenomenex Luna 3  $\mu$  C18 (2) 50 x 4.6  $\text{mm}$ ; 유량, 2  $\text{m}\ell$ /분; 검출, UV 214 nm; 생성물 체류 시간, 5.83분). 질량 분석법을 이용하여 추가의 생성물 특징화를 수행하였다: 예상치, 1680.8에서 M+H, 실측치, 1680.7에서).

&lt;205&gt;

실시예 4: Pn216 칼레이트를 가진 PEG 개질된 벡터

<206> 4a)  $\text{ClCH}_2\text{CO-Lys(PEG2000)-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-Gly-NH-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$  (vi)의 합성



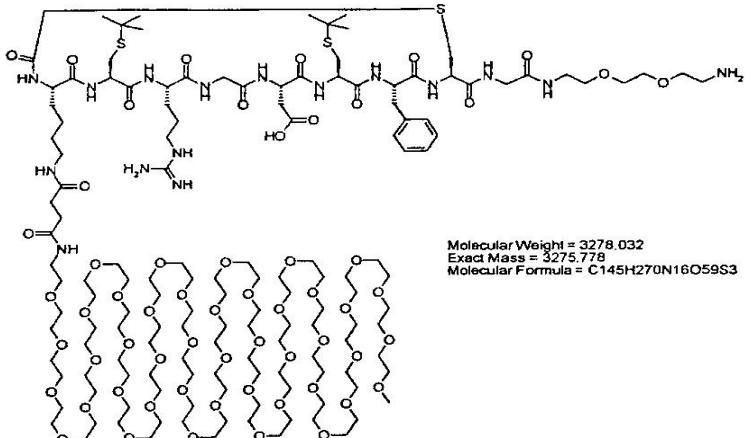
<207>

<208> 수지 (i) 0.1 mmol을  $\text{CH}_3\text{O-PEG-NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$  (HATU로 예비 활성화됨)로 16시간 동안 처리하였다. DMF 중의 2% 히드라진 일수화물을 사용하여 4시간 30분 동안 수지로부터의 Dde 보호기의 제거를 수행하였다. 그후에, 수지를 DMF 중의 클로로아세트산 무수물의 용액으로 60분 동안 처리하였다.

<209> TIS (5%),  $\text{H}_2\text{O}$  (5%) 및 페놀 (2.5%)을 함유하는 TFA에서 2시간 동안 수지로부터의 웨티드 및 측쇄 보호기 (tBu는 제외)의 동시 제거를 수행하였다.

<210> 후처리 후에, 조 웨티드 110 mg을 얻었다 (분석용 HPLC: 구배, 10분에 걸쳐 5-50% B (A =  $\text{H}_2\text{O}/0.1\%$  TFA 및 B =  $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$  TFA; 컬럼, Phenomenex Luna 3  $\mu$  C18 (2) 50 x 4.6 mm; 유량, 2 mL/분; 검출, UV 214 nm; 생성물 체류 시간, 5에서 9분까지의 다중 피크). MALDI 질량 분석법을 이용하여 추가의 생성물 특징화를 수행하였다: 예상치, 3313에서  $\text{M+H}$ , 실측치, 2785에서).

<211> 4b) 시클로[ $\text{CH}_2\text{CO-Lys(PEG2000)-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-Gly-NH-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$  (vii)의 합성



<212>

<213> 화합물 (vi) 110 mg을 물/아세토니트릴에 용해시켰다. 혼합물을 암모니아 용액으로 pH 8로 조정하고 20분 동안 교반시켰다.

<214> 후처리 후에, 조 웨티드 90 mg을 얻었다 (분석용 HPLC: 구배, 10분에 걸쳐 5-50% B (A =  $\text{H}_2\text{O}/0.1\%$  TFA 및 B =  $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$  TFA; 컬럼, Phenomenex Luna 3  $\mu$  C18 (2) 50 x 4.6 mm; 유량, 2 mL/분; 검출, UV 214 nm; 생성물 체류 시간, 5에서 9분까지의 다중 피크). MALDI 질량 분석법을 이용하여 추가의 생성물 특징화를 수행하였다: 예상치, 3277에서  $\text{M+H}$ , 실측치, 2627에서).

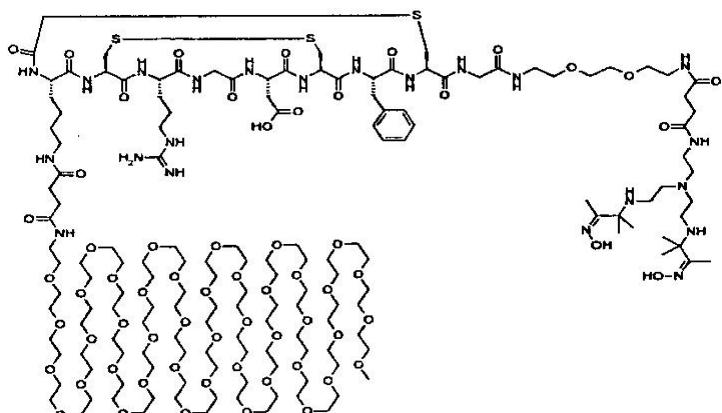
<215> 4c) [ $\text{Cys}^{2-6}$ ] 시클로[ $\text{CH}_2\text{CO-Lys(PEG2000)-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys-Gly-NH-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$  (viii)의 합

성

<216> 화합물 (vii) 60 mg을 아니솔 (200  $\mu\ell$ ), DMSO (2 mL) 및 TFA (100  $\mu\ell$ )의 용액으로 실온에서 30분 동안 처리하고, 이후에 TFA를 진공 중에서 제거하고 디에틸 에테르를 첨가하여 웹터드를 침전시켰다.

<217> 조 재료의 제조용 HPLC (Phenomenex Luna 5  $\mu$  C18 (2) 250 x 21.20 mm 컬럼)에 의한 정제를 10 mL/분의 유속으로 40분에 걸쳐 5-50% B (A =  $H_2O/0.1\%$  TFA 및 B =  $CH_3CN/0.1\%$  TFA)를 이용하여 수행하였다. 동결건조 후에, 순수한 재료 30 mg을 얻었다 (분석용 HPLC: 구배, 10분에 걸쳐 5-50% B (A =  $H_2O/0.1\%$  TFA 및 B =  $CH_3CN/0.1\%$  TFA; 컬럼, Phenomenex Luna 3  $\mu$  C18 (2) 50 x 4.6 mm; 유량, 2 mL/분; 검출, UV 214 nm; 생성물 체류 시간, 5분에서 넓은 피크).

<218> 4d)  $[Cys^{2-6}]$  시클로[ $CH_2CO-Lys(PEG2000)-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys-Gly-NH-(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_2NH_2$ ]와 Pn216 칼레이트의 접합 (ix)



&lt;219&gt;

<220> 분자량: 3590.363; 실제 질량: 3587.933; 분자식: C157H290N22063S3

<221> 화합물 (viii) 20 mg, Pn216 칼레이트 활성 에스테르 11 mg 및 NMM 8  $\mu\ell$ 를 DMF (1 mL)에 용해시켰다. 혼합물을 24시간 동안 교반시켰다.

<222> 반응 혼합물의 제조용 HPLC (Phenomenex Luna 5  $\mu$  C18 (2) 250 x 21.20 mm 컬럼)에 의한 정제를 10 mL/분의 유속으로 40분에 걸쳐 5-50% B (A =  $H_2O/0.1\%$  TFA 및 B =  $CH_3CN/0.1\%$  TFA)를 이용하여 수행하였다. 동결건조 후에, 순수한 재료 10.7 mg을 얻었다 (분석용 HPLC: 구배, 10분에 걸쳐 5-50% B (A =  $H_2O/0.1\%$  TFA 및 B =  $CH_3CN/0.1\%$  TFA; 컬럼, Phenomenex Luna 3  $\mu$  C18 (2) 50 x 4.6 mm; 유량, 2 mL/분; 검출, UV 214 nm; 생성물 체류 시간, 5에서 8분의 넓은 피크). 질량 분석법을 이용하여 추가의 생성물 특징화를 수행하였다: 예상치, 3589에서 M+H, 실측치, 3270에서).

&lt;223&gt;

실시예 5: Pn44 칼레이트를 가진 벡터

&lt;224&gt;

5a) 1,1,1-트리(페닐솔포닐옥시메틸)에탄의 제조

&lt;225&gt;

1,1,1-트리스 트리히드록시메틸 (120 g, 1.0 mol)을 디클로로메탄 (1000 mL) 및 피리딘 (237 g, 1 mol)에 용해시키고 온도가 10 °C 이상 상승되지 않도록 열음/메탄을 조상의 -5 °C에서 페닐솔포닐클로라이드 (528 g, 3 mol)로 적가 처리하였다. 그후에, 반응물을 밤새 실온으로 가온되도록 하였다. 그후에, 반응물을 5N 염산으로 진탕시키고 유기상을 분리하고, 수성상을 디클로로메탄으로 재추출하고 유기 추출물을 합하였다. 디클로로메탄 용액을 황산 나트륨 상에서 건조시키고 진공 중에서 농축시켜 1,1,1-트리(페닐솔포닐옥시메틸)에탄 (540 g, 1 mol)을 검으로서 제공하였다.

&lt;226&gt;

5b) 1,1,1-트리(아지도메틸)에탄의 제조

&lt;227&gt;

500 mL RB 플라스크에서 디메틸포름아미드 (300 mL) 중의 1,1,1-트리(페닐솔포닐옥시메틸)에탄 (25 g, 70 mmol)을 소듐 아지도 (41 g, 630 mmol, 9 eq)로 처리하고 혼합물을 120 °C에서 7시간 동안 교반시키며 가열하였다. 그후에, 반응물을 실온으로 냉각되도록 하고 50% 포화 염수 용액 (250 mL) 및 디에틸에테르 (250 mL)를 첨가하였다. 유기층을 50% 포화 염수 용액 (250 mL)으로 분리 세척하고  $Na_2SO_4$  상에서 건조시키고 농축시켜 1,1,1-트

리(아지도메틸)에탄 (5.51 g, 28.2 mmol, 40% 수율)을 황색 점성 액체로서 제공하였다.

<228> NMR H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>), 1.0 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 3.3 (6H, s, CH<sub>3</sub>)

<229> 5c) 1,1,1-트리(아미노메틸)에탄의 제조

<230> 에탄올 (140 mL) 중의 1,1,1-트리(아지도메틸)에탄 (5.51 g, 28.2 mmol)을 목탄 (2 g) 상의 10% 팔라듐으로 처리하고 수소 흐름 하에 대기압에서 15시간 동안 수소화하여 유리된 질소를 제거하였다. 반응물을 셀라이트 패드를 통해 여과시켜 촉매를 제거하고 진공 중에서 농축시켜 1,1,1-트리(아미노메틸)에탄 (2.53 g, 21.6 mmol, 76% 수율)을 황색 액체로서 얻었다.

<231> NMR H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>), 0.8 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.18 (6H, s, 3xNH<sub>2</sub>), 2.6 (6H, s, 3xCH<sub>2</sub>)

<232> NMR C<sup>13</sup> (CDCl<sub>3</sub>), 20.1 CH<sub>3</sub>, 31.7 C, 48.8 CH<sub>2</sub>.

<233> 5d) Pn44의 제조

<234> 0 °C, 질소 하에 건조 메탄올 (50 mL) 중의 3-클로로-3-메틸-2-니트로소부탄 (23.14 g, 1706 mmol, 2 eq)의 혼탁액에 건조 메탄올 (10 mL) 중의 1,1,1-트리(아미노메틸)에탄 (10 g, 85.3 mmol)의 용액을 서서히 첨가하였다. 혼합물을 0 °C에서 40분 동안 교반시키고, 실온으로 가온하고 그후에 60 °C에서 3시간 동안 가열하였다. 그후에, 반응 혼합물을 실온으로 냉각되도록 하고 5일 동안 교반시켰다. 마지막에, 혼합물을 환류 온도로 3시간 동안 가열하고, 그후에 용매를 진공 중에서 제거하였다. 잔류물을 2M HCl (150 mL)에 용해시키고 에테르 (3 x 100 mL)로 추출하였다. 수성층을 6M NaOH를 사용하여 pH 10으로 염기성화하고 디클로로메탄 (3 x 100 mL)으로 추출하였다. 합한 유기층을 실온에서 정치시키고 백색 고체를 침전시켰다. 이 고체를 여과시켜 NMR로 삼중 부가물임을 밝혀냈다. 여액을 ~1/3으로 농축시키고 냉장고에 정치시켰다. 다른 백색 고체를 용액으로부터 침전시켰다. 이것을 여과시켜 단리하여 <sup>1</sup>H-NMR로 Pn44임을 밝혀냈다. 여액을 다시 농축시키고 Pn44의 다른 부분을 용액으로부터 결정화하였다 (총 수율 6.981 g, 26%).

<235> NMR (H<sup>1</sup> CDCl<sub>3</sub>), 0.9 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.25 (6H, d, 4xCH<sub>3</sub>), 1.8 (6H, s, 2xCH<sub>3</sub>), 2.4 (2H, d, 2xCH), 2.54 (2H, d, 2xCH), 2.95 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 4.95 (6H, s, OH)

<236> MS C<sub>15</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> M+H=316 실측치 316

<237> 5e) PN44-숙신산 중간체의 합성

<238> 실시예 2c 참조.

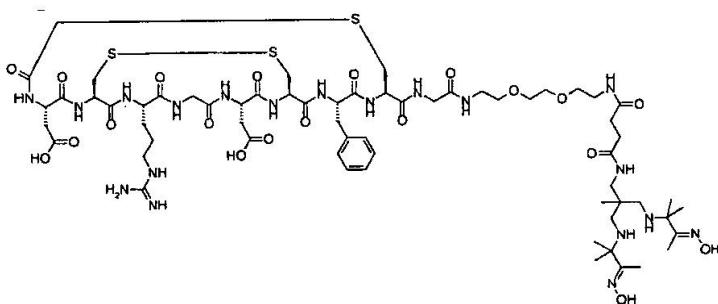
<239> 5f) PN44-숙신산의 테트라플루오로티오페놀 에스테르 유도체의 합성

<240> 실시예 2d 참조.

<241> 5g) [Cys<sup>2-6</sup>]시클로[CH<sub>2</sub>CONH-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>의 합성

<242> 실시예 1a-1c 참조.

<243> 5h) [Cys<sup>2-6</sup>]시클로[CH<sub>2</sub>CONH-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-Pn44의 합성



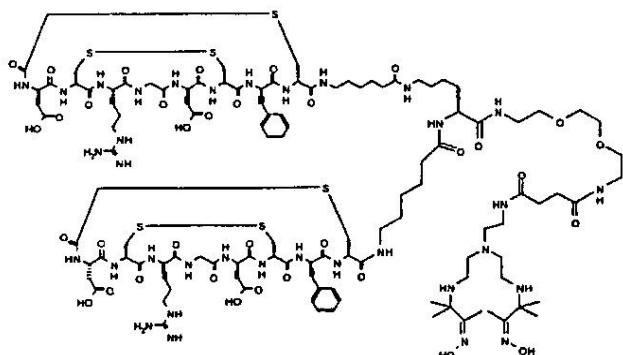
<244>

<245> 분자량: 1540.815; 실제 질량: 1539.663; 분자식: C63H101N19O20S3

<246> Pn44 킬레이트 활성 에스테르 7 mg, NMM 5  $\mu$ l 및 [Cys<sup>2-6</sup>]시클로[CH<sub>2</sub>CONH-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> 10 mg을 NMP (1 mL)에 용해시켰다. 혼합물을 3시간 동안 교반시켰다. 반응 혼합물의 제조용 HPLC (Phenomenex Luna 5  $\mu$  C18 (2) 250 x 21.20 mm 컬럼)에 의한 정제를 10 mL/분의 유속으로 40분에 걸쳐 5-50% B (A = H<sub>2</sub>O/0.1% TFA 및 B = CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA)를 이용하여 수행하였다.

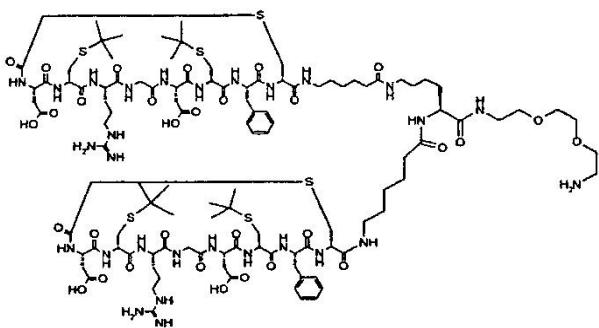
<247> 동결건조 후에, 순수한 재료 9.8 mg을 얻었다 (분석용 HPLC: 구배, 10분에 걸쳐 5-50% B (A = H<sub>2</sub>O/0.1% TFA 및 B = CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA; 컬럼, Phenomenex Luna 3  $\mu$  C18 (2) 50 x 4.6 mm; 유량, 2 mL/분; 검출, UV 214 nm; 생성물 체류 시간, 4.38분). 질량 분석법을 이용하여 추가의 생성물 특징화를 수행하였다: 예상치, 1540.7에서 M+H, 실측치, 1540.6에서).

<248> 실시예 6: 비스-[Cys<sup>2-6</sup>]시클로[-CH<sub>2</sub>CONH-Asp-Cys<sup>2</sup>-Arg-Gly-Asp-Cys<sup>6</sup>-Phe-Cys]-Ahx-Lys(시클로[-CH<sub>2</sub>CONH-Asp-Cys<sup>2</sup>-Arg-Gly-Asp-Cys<sup>6</sup>-Phe-Cys]Ahx)-NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-Pn216의 합성



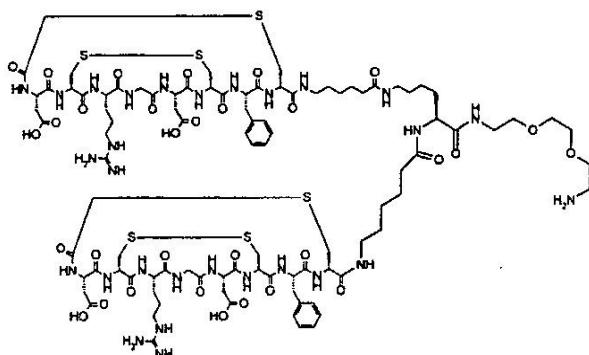
<249>

<250> 이량체 펩티드를 1 mmol 아미노산 카트리지를 사용하여 0.1 mmol 스케일로 O-Bis-(아미노에틸)에틸렌 글리콜 트리틸 수지로 개시하여 ABI 433A 자동 펩티드 합성기 상에서 이량체 펩티드를 집합시켰다. 아미노산을 Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, Fmoc-Ahx-OH (Ahx = 아미노헥산산), Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Cys(tBu)-OH, Fmoc-Asp(O-tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Cys(tBu)-OH, Fmoc-Asp(O-tBu)-OH, 클로로아세트산 무수물의 순서로 커플링 전에 HBTU를 사용하여 예비 활성화시켰다. 반보호된 펩티드를 5% TIS, 5% 페놀 및 5% 물을 함유하는 TFA에서 고상 지지체로부터 분해시켰다. 그후에, 조 쿠로로-펩티드를 20% 아세토나트릴/물 (pH 8)에서 환화시켜 Vydac C18 컬럼 상에서 HPLC 정제한 후에 단환식 t-부틸 보호된 중간체 (아래에 나타냄)를 생성시켰다.



<251>

<252> 순수한 중간체에 아니솔 0.1 mL를 함유하는 10% DMSO/TFA의 용액을 첨가하였다. 펩티드 혼합물을 1시간 동안 교반시키고 디에틸 에테르의 첨가에 의한 생성물 (아래에 나타냄)의 침전 전에 과량의 TFA를 증발시켰다.



&lt;253&gt;

&lt;254&gt;

그후에, 이 생성물 (5 mg)을 2% NMM을 함유하는 DMF 1 mL에 용해시키고 실시에 1로부터의 Pn216 활성 에스테르 5 mg을 첨가하였다. 접합 반응은 HPLC에 의해 이어졌으며 16시간 후에 완결된 것으로 밝혀졌다. 펩티드 용액을 물로 총 8 mL로 희석하고 5 mL/분의 유속으로 30분에 걸쳐 5-50% B (A = H<sub>2</sub>O/0.1% TFA 및 B = CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA)를 이용하여 Phenomenex Luna 5  $\mu$  C18 (2) 250 x 10 mm 컬럼에 넣었다. 동결건조 후에, 목적하는 최종 생성물 2 mg을 얻었다 (분석용 HPLC: 구배, 10분에 걸쳐 5-50% B (A = H<sub>2</sub>O/0.1% TFA 및 B = CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA; 컬럼, Phenomenex Luna 3  $\mu$  C18 (2) 50 x 4.6 mm; 유량, 2 mL/분; 검출, UV 214 nm; 생성물 체류 시간, 9.8 분). ES-MS를 이용하여 추가의 생성물 특징화를 수행하였다: 예상치, 1805에서 M+H, 실측치, 1805에서.