



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0092700
(43) 공개일자 2015년08월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 51/04 (2006.01) A61K 51/10 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7034741
(22) 출원일자(국제) 2013년05월13일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2014년12월10일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2013/059839
(87) 국제공개번호 WO 2013/167754
국제공개일자 2013년11월14일
(30) 우선권주장
1208309.3 2012년05월11일 영국(GB)

(71) 출원인
바이엘 에이에스
노르웨이 오슬로 0277 드라멘스베이엔 147 비
(72) 발명자
본게-한센 한느 테레세
노르웨이 엔-0884 오슬로 켈사스베이엔 172에이
알게타 에이에스에이
리안 올라브 벤자민
노르웨이 엔-0884 오슬로 켈사스베이엔 172에이
알게타 에이에스에이
(74) 대리인
리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 방사성-약제 복합체

(57) 요약

조직 표적 모이어티, 4개의 HOPO 모이어티들을 포함하는 옥타덴테이트 히드록시피리딘-함유 리간드, 및 알파-방출 토륨 방사성 핵종의 이온을 포함하는 조직-표적 복합체가 개시되고, 여기서 상기 4개의 HOPO 모이어티들 중의 적어도 하나는 N-위치에서 히드록시알킬 가용화 기로 치환되며, 그리고 상기 조직 표적 모이어티는 상기 CD22 수용체에 결합 친화성을 갖는다. 그러한 복합체들을 이용한 치료 방법들 및 그러한 복합체들의 형성 방법들이 제공된다.

명세서

청구범위

청구항 1

조직 표적 모이어티, 4개의 HOPO 모이어티들을 포함하는 옥타덴테이트 히드록시피리디논-함유 리간드, 및 알파-방출 토륨 방사성 핵종의 이온을 포함하는 조직-표적 복합체(tissue-targeting moiety)로서, 상기 4개의 HOPO 모이어티들 중 하나 이상은 N-위치에서 히드록시알킬 가용화 기로 치환되며, 상기 조직 표적 모이어티는 CD22 수용체에 대한 결합 친화성을 갖는 것인 복합체.

청구항 2

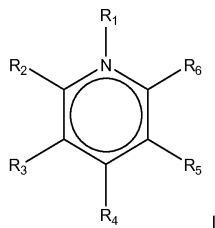
청구항 1에 있어서, 하나 이상의 3,2-HOPO 모이어티를 포함하는 것인 복합체.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 4개의 HOPO 모이어티들 모두는 N-위치에서 히드록시알킬 가용화 모이어티들을 포함하는 것인 복합체.

청구항 4

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 화학식 I의 4개의 킬레이트화 모이어티들을 포함하는 옥타덴테이트 리간드를 포함하는 것인 복합체:



상기 식에서, R₁은 화학식 I의 상기 4개의 모이어티들 중 하나 이상에 존재할 선택적(optional) N-치환기 가용화 기이고; R₂ 내지 R₆ 기들은 각각 독립적으로 H, OH, =O, 짧은 히드로카르빌기, R₂ 내지 R₆ 중 하나는 OH이고 R₂ 내지 R₆ 중 하나는 =O인 것인 링커 모이어티 및/또는 결합 모이어티로부터 선택된다.

청구항 5

청구항 4에 있어서, R₁ 내지 R₆ 중 하나 이상은 링커 모이어티인 것인 복합체.

청구항 6

청구항 4 내지 5 중 어느 한 항에 있어서, 4개의 3,2-히드록시피리디논 모이어티들을 포함하는 것인 복합체.

청구항 7

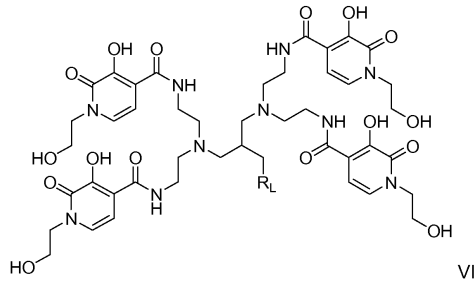
선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 4개의 HOPO 기 각각에 대한 상기 N-치환기는 각각 독립적으로 HO-, HOCH₂-, HOCH₂CH₂-, HO-CH₂CH₂CH₂-, HO-CH(CH₃)CH₂-, HO-CH₂CH₂CH₂CH₂-, HO-CH(CH₃)CH₂CH₂-, HO-CH(CH₂CH₃)CH₂-, HO-C(CH₃)₂CH₂-, HO-CH(CH₃)CH(CH₃)- 및 HOCH₂CH(CH₂CH₃)- 에서 선택되는 것인 복합체.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 알파-방출 토륨 방사성 핵종의 이온은 ²²⁷Th와 같은 알파-방출 토륨 방사성 핵종의 4+ 이온인 것인 복합체.

청구항 9

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 화학식 VI의 리간드 모이어티를 포함하는 것인 복합체:



상기 화학식에서, R_L은 적합한 링커 모이어티이다.

청구항 10

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조직 표적 모이어티는 모노클로날 또는 폴리클로날 항체, 항체 단편 (예컨대 Fab, F(ab')₂, Fab' 또는 scFv), 또는 그러한 항체들 및/또는 단편들의 작제물인 것인 복합체.

청구항 11

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조직 표적 모이어티는, 하기의 서열들 중 하나 이상과 90% 이상의 서열 유사성을 갖는, 하나 이상의 펩티드 사슬을 포함하는 것인 복합체:

경쇄 :

DIQLTQSPSSLAVSAGENVTMSCKSSQSVLYSANHKNYLAWYQOKPGQSPKLLIYWASTRE
SGVPDRFTGSGSGIDFTLTISRVQVEDLAIYYCHQYLSSWTFGGGTKLEIKR (서열ID1)

DIQLTQSPSSLASAAVEDRTMSCKSSQSVLYSANHKNYLAWYQOKPGQKAKLLIYWASTRE
SGVPSRFSGSGSGIDFTFTISSLPEDIATYYCHQYLSSWTFGGGTKLEIKR (서열ID2)

중쇄 :

QVQLQESGAELSKPGASVKMSCKASGYTFTSYWLHWIKQRPQGLEWIGYINPRNDYTEYN
QNFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARRDITTFYWGQGTTLTVSS
(서열ID3)

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWLHWVRQAPGQGLEWIGYINPRNDYTEYN
QNFKDKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAFYFCARRDITTFYWGQGTITVTVSS
(서열ID4)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWLHWVRQAPGQGLEWIGYINPRNDYTEYN
QNFKDKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAFYFCARRDITTFYWGQGTITVTVSS
(서열ID5)

청구항 12

증식성(hyperplastic) 또는 종양성(neoplastic) 질병의 치료를 위한 약제의 제조에서, 조직 표적 모이어티, 4개의 HOPO 모이어티들을 포함하는 옥타덴테이트 히드록시피리디논-함유 리간드, 및 알파-방출 토폴 방사성 핵종의 이온을 포함하는 조직-표적 복합체의 용도로서, 상기 4개의 HOPO 모이어티들 중 하나 이상은 N-위치에서 히드록시알킬 가용화 기로 치환되며, 상기 조직 표적 모이어티는 CD22 수용체에 대한 결합 친화성을 갖는 것인 용도.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 조직-표적 복합체는 청구항 1 내지 11 중 어느 한 항의 복합체인 것인 용도.

청구항 14

청구항 12 또는 청구항 13에 있어서, 상기 질병은 암종, 육종, 골수종, 백혈병, 림프종, 또는 비-호지킨(Non-Hodgkin's) 림프종 또는 B-세포 종양을 포함하는 혼합형 암인 것인 용도.

청구항 15

조직 표적 모이어티, 4개의 HOPO 모이어티들을 포함하는 옥타덴테이트 히드록시피리디논-함유 리간드, 및 알파-

방출 토폴 방사성 핵종의 이온을 포함하는, 하나 이상의 조직-표적 복합체를 투여하는 단계를 포함하는 인간 또는 비-인간 동물(특히 치료를 요하는 인간 또는 비-인간 동물)의 치료 방법으로서, 상기 4개의 HOPO 모이어티들 중 하나 이상은 N-위치에서 히드록시알킬 가용화 기로 치환되며, 상기 조직 표적 모이어티는 CD22 수용체에 대한 결합 친화성을 갖는 것인 방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 조직-표적 복합체는 청구항 1 내지 11 중 어느 한 항의 복합체인 것인 방법.

청구항 17

청구항 15 또는 청구항 16에 있어서, 암종, 육종, 골수종, 백혈병, 림프종, 또는 비-호지킨 림프종 또는 B-세포 증양을 포함하는 혼합형 암과 같은 증식성 또는 종양성 질병의 치료를 위한 것인 방법.

청구항 18

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, 요법(therapy)에 사용하기 위한 것인 조직 표적 복합체.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 암종, 육종, 골수종, 백혈병, 림프종, 또는 비-호지킨 림프종 또는 B-세포 증양을 포함하는 혼합형 암과 같은 증식성 및/또는 종양성 질병의 치료에 사용하기 위한 것인 조직 표적 복합체.

청구항 20

하나 이상의 약학적 담체 또는 부형제와 함께, 조직 표적 모이어티, 4개의 HOPO 모이어티들을 포함하는 옥타덴테이트 히드록시피리딘-함유 리간드, 및 알파-방출 토폴 방사성 핵종의 이온을 포함하는 조직-표적 복합체를 포함하는 약제학적 조성물로서, 상기 4개의 HOPO 모이어티들 중 하나 이상은 N-위치에서 히드록시알킬 가용화 기로 치환되며, 상기 조직 표적 모이어티는 CD22 수용체에 대한 결합 친화성을 갖는 것인 약학적 조성물.

청구항 21

청구항 20에 있어서, 조직-표적 복합체는 청구항 1 내지 11 중 어느 한 항의 복합체인 것인 약학적 조성물.

청구항 22

청구항 15 내지 17 중 어느 한 항에 따른 방법에 사용하기 위한 키트로서, 상기 키트는 4개의 HOPO 모이어티들을 포함하는 옥타덴테이트 히드록시피리딘-함유 리간드에 공액되거나 또는 공액될 수 있는 조직 표적 모이어티를 포함하고, 상기 4개의 HOPO 모이어티들 중 하나 이상은 N-위치에서 히드록시알킬 가용화 기로 치환되며, 상기 조직 표적 모이어티는 상기 CD22 수용체에 대한 결합 친화성을 갖고, 상기 키트는 선택적으로 및 바람직하게 ^{227}Th 과 같은 알파-방출 토폴 방사성 핵종을 포함하는 것인 키트.

청구항 23

조직-표적 복합체의 형성 방법으로서, 상기 방법은 조직 표적 모이어티를 수성 용액에서 옥타덴테이트 히드록시피리딘-함유 리간드에 결합(couple)시키는 단계를 포함하고, 상기 복합체는 4개의 HOPO 모이어티들 및 알파-방출 토폴 방사성 핵종의 이온을 포함하며, 상기 4개의 HOPO 모이어티들 중 하나 이상은 N-위치에서 히드록시알킬 가용화 기로 치환되며, 상기 조직 표적 모이어티는 CD22 수용체에 대한 결합 친화성을 갖는 것인 방법.

청구항 24

청구항 23에 있어서, 옥타덴테이트 히드록시피리딘-함유 리간드의 제1 수용액 및 상기 조직 표적 모이어티의 제2 수용액을 제조하는 단계, 및 상기 제1 수용액 및 상기 제2 수용액을 접촉시키는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 25

청구항 24에 있어서, 상기 접촉 단계는 40°C 미만에서 수행되는 것인 방법.

청구항 26

청구항 24 또는 청구항 25에 있어서, 상기 접착 단계는 유기 용매의 실질적인 부재 하에 수행되는 것인 방법.

청구항 27

청구항 23 내지 26 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단계는 상기 킬레이트와 상기 항체 사이에 아마이드, 에스테르, 에테르 또는 아민 결합을 생성하는 것인 방법.

청구항 28

청구항 27에 있어서, 상기 에스테르 또는 아마이드 결합은 하나 이상의 활성화된 에스테르기에 의해 형성되고, 예를 들면 N-히드록시 말레이미드, 카르보디이미드 또는 아조디카르복실레이트 결합제(coupling reagent) 중 하나 이상에 의해 형성되는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 토폴 동위 원소들의 복합체들, 그리고 특히 조직 표적 모이어티들에 공액된 특정 옥타덴테이트 리간드들이 있는 토폴-227의 복합체들에 관한 것이다. 본 발명은 또한 그러한 복합체들의 투여를 포함하는 질병, 특히 종양성 질병들의 치료에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

특정 세포 사멸은 포유동물 대상자들에서 각종 질병들의 성공적인 치료를 위해 필수적일 수 있다. 이것의 전형적인 예는 육종 및 암종과 같은 악성 질병의 치료하는 데 있다. 그러나, 특정 세포 유형들의 선택적 제거는 또한 다른 질병들, 특히 증식성 및 종양성 질병들의 치료에서 중요한 역할을 할 수 있다.

[0003]

선택적 치료의 가장 일반적인 방법은 현재 수술, 화학요법 및 외부 빔 조사이다. 그러나, 표적화된 방사성 핵종 요법은 원치않는 세포 유형들에 고도의 세포 독성 방사선을 전달할 가능성 있는 유망한 개발 중인 영역이다. 인간에 사용하도록 현재 승인된 방사성 약물의 가장 일반적인 형태는 베타-방출 및/또는 감마-방출 방사성 핵종들을 사용한다. 그러나, 더 특정한 세포를 사멸할 수 있는 이들의 가능성 때문에 알파-방출 방사성 핵종들을 치료하는 데 사용하는 것에 대하여 일부의 관심이 있어 왔다.

[0004]

생리적 환경에서 전형적인 알파 방출체들의 방사선 범위는 일반적으로 단지 소수의 세포 직경에 상응하는 100 μ m 미만이다. 이는 이들의 선원(source)로 하여금 종양 치료에 매우 적합하도록 할 수 있는데, 이는 그들이 종양 내에서 이웃하는 세포들에 도달하는 범위를 갖지만 그들이 높은 정도로 표적화 될 경우 방사된 에너지의 극히 일부만이 표적 세포들을 넘어 통과할 것이기 때문이다. 따라서, 모든 세포가 표적이 될 필요는 없고 주변의 건강한 조직에 대한 손상이 최소화될 수 있다(Feinendegen et al., Radiat Res 148:195-201(1997) 참조). 이와 대조적으로, 베타 입자는 수중에서 1 mm 이상의 범위를 갖는다(Wilbur, Antibody Immunocon Radiopharm 4: 85-96(1991) 참조).

[0005]

알파-입자 방사선의 에너지는 통상적으로 5-8 MeV인 베타 입자, 감마 선 및 X-선에 의해 시행된 것에 비해 높거나, 또는 베타 입자의 에너지의 5 내지 10 배 및 감마 선의 에너지의 20 배 이상이다. 따라서, 매우 짧은 거리에 걸쳐 다량의 에너지의 이러한 축적은 감마 및 베타 방사선에 비해 예외적으로 높은 선형 에너지 전달(LET), 높은 상대 생물학적 효능(RBE) 및 낮은 산소 증강율(OER)의 α -방사선을 제공한다(Hall, "Radiobiology for the radiologist", Fifth edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia PA, USA, 2000 참조). 이에 의하여 알파 방출 방사성 핵종들의 예외적인 세포 독성이 설명되고, 또한 그러한 동위 원소들의 생물학적 표적화에 대해서, 그리고 용인할 수 없는 부작용을 피하기 위해 필요한 알파 방출 방사성 핵종 분포의 조절과 연구 수준에 대하여 엄격한 요구 사항이 부과된다.

[0006]

다음 표 1은 가능한 치료 효능을 갖는 것으로서 문헌에서 지금까지 광범위하게 제안된 알파 방출체들의 물리적 붕괴 특성을 나타낸다.

[0007] 표 1

후보 핵종	$T_{1/2}$ *	다음을 위해 임상적으로 시험됨
^{225}Ac	10.0 일	백혈병
^{211}At	7.2 시간	아교 모세포종
^{213}Bi	46 분	백혈병
^{223}Ra	11.4 일	골격 전이
^{224}Ra	3.66 일	강직성 척추염

* 반감기

[0008]

[0009] 지금까지, 방사선 면역 요법에서 그 적용에 관한 주된 관심은 ^{211}At , ^{213}Bi 및 ^{225}Ac 에 집중되어 왔으며 이들 3개의 핵종은 임상 면역 요법 시험에서 탐구되어 왔다.

[0010] 제안된 여러 가지 방사성 핵종들은 수명이 짧고, 즉 12시간 미만의 반감기를 갖고 있다. 그러한 짧은 반감기는 이들 방사성 핵종들에 기초한 방사성 약물들을 상업적 방식으로 생산하고 유통하기 어렵게 한다. 짧은 수명의 핵종의 투여는 또한 표적 부위에 도달하기 전에 신체 내로 방출될 방사선량의 비율을 증가시킨다.

[0011] 알파-방출로부터 반동 에너지는 많은 경우에 부모 핵종(parent nuclide)의 붕괴 위치로부터 딸 핵종(daughter nuclide)의 방출을 일으킬 것이다. 이러한 반동 에너지는, 예를 들면 부모 핵종이 킬레이트제와 같은 리간드에 의해 복합체화가 된 경우 부모 핵종을 유지할 수 있는 화학적 환경에서 많은 딸 핵종을 파괴하기에 충분하다. 이는 딸 핵종이 화학적으로 용화될 수 있는, 즉 동일한 리간드에 의해 복합체화가 가능한 경우에도 발생할 것이다. 똑같이, 딸 핵종이 기체, 특히 비활성 기체, 예컨대 라돈인 경우, 또는 리간드와 화학적으로 용화되지 않는 경우, 이러한 방출 효과는 훨씬 더 커질 것이다. 딸 핵종들이 수 초 이상의 반감기를 가질 때, 이들은 부모 핵종을 유지하는 복합체에 의해 억제되지 않고, 혈관계 내로 멀리 확산될 수 있다. 그렇게 되면, 이들 유리 방사성 딸 핵종은 원하지 않는 전신 독성을 일으킬 수 있다.

[0012] ^{223}Ra 딸 동위 원소의 통제가 유지되는 조건 하에 토륨-227($T_{1/2} = 18.7$ 일)의 사용은 몇 년 전에 제안되었다(WO 01/60417 및 WO 02/05859 참조). 이러한 제안은 딸 핵종들이 폐쇄된 환경에 의해 계속 함유될 수 있게 하는 담체 시스템이 사용된 상황에서 있었다. 한 경우에, 방사성 핵종은 하나의 리포솜 내에 배치하고(반동 거리에 비교되는) 리포솜의 상당한 크기는 딸 핵종들을 상기 리포솜 내에서 계속 함유하는 데 도움이 된다. 제2의 경우에, 골 기질 내로 흡입하고 그에 따라 딸 핵종들의 방출을 제한하는 방사성 핵종의 골-친화성 복합체들이 사용된다. 이들은 잠재적으로 매우 유리한 방법들이지만, 리포솜의 투여는 일부 상황에서 바람직하지 않고, 방사성 핵종들이 딸 동위 원소들을 계속 함유하도록 광물화된 기질에 의해 둘러싸일 수 없는 많은 연조직 질환들이 있다.

[0013] 보다 최근에, ^{227}Th 의 붕괴에 따라 방출된 ^{223}Ra 딸 핵종의 독성은 유사한 핵종에 대한 이전 시험들로부터 예측될 수 있는 정도보다 훨씬 더 대단한 정도까지 포유동물의 신체 내에서 견딜 수 있다는 것이 밝혀졌다. 상기 고찰된 토륨-227의 라듐 딸 핵종들을 유지하는 특정 수단의 부재 하에, 라듐 독성에 관하여 공개적으로 입수할 수 있는 정보에 의하면 치료제로서 토륨-227을 사용하는 것이 가능하지 않다는 것이 분명하며, 그 이유는 토륨-227 붕괴에 기인하는 치료 효과를 달성하는 데 필요한 투여량이 라듐 딸들의 붕괴에 기인하는 방사선의 고도의 독성과 어쩌면 치사 투여량을 초래하기 때문이다, 즉, 어떠한 치료 기회의 창도 없기 때문이다.

[0014] WO 04/091668은 표적화된 토륨-227 방사성 핵종의 치료학적으로 유효한 양이 용인할 수 없는 골수 독성을 일으키기에 충분한 양의 라듐-223을 생성하지 않고 대상자(일반적으로 포유동물)에게 투여될 수 있는 치료 기회의 창이 존재한다는 예상치 못한 연구 결과를 기술하고 있다. 따라서, 이 치료법은 뼈 부위와 연조직 부위, 둘 모두에서 모든 유형의 질병들의 치료 및 예방을 위해 사용될 수 있다.

[0015] 상기 진전 사항에 비추어 보면, 현재 생성된 ^{223}Ra 에 기인한 치명적인 골수 독성 없이 내부 방사성 핵종 요법에서 알파-방출 토륨-227 핵종을 사용하는 것이 가능하다. 그럼에도 불구하고, 치료 기회의 창은 비교적 좁게 남아있고, 모든 경우에 절대적으로 필요한 것 이상의 알파-방출 방사선 동위 원소를 대상자에게 투여하지 않는 것이 바람직하다. 따라서, 이러한 새로운 치료 기회의 창이 유용한 이용은 알파-방출 토륨-227 핵종이 높은 신뢰도로 복합체화되고 표적이 될 수 있는 경우에 크게 증진될 수 있다.

[0016] 방사성 핵종들은 끊임없이 붕괴하고 있기 때문에, 단리와 대상자에게의 투여 사이에 그 물질을 취급하는 데 쓴

시간은 매우 중요하다. 그 시간은 또한, 알파-방출 토폴 핵종이 조제하기에 신속하고 편리한 형태로, 바람직하게는 표적화 실체의 특성에 불가역적으로 영향을 미치지 않는 극히 소수의 단계들, 짧은 배양 기간 및/또는 온도가 필요한 형태로 복합체화가 하고, 표적이 되고/되거나 투여될 수 있는 경우에도 상당한 가치가 있을 것이다. 더욱이, (본질적으로 수용액으로) 투여 전에 제거될 필요 없는 용매로 시행될 수 있는 공정들은 용매 증발 또는 투석 단계를 피하는 상당한 이점을 갖는다.

[0017] 치료하는 데 세포 독성제의 전달에 있어서 선택성이 필요하다는 견지에서, 알파-방사성 핵종 복합체들이 표적이 되는 것이 명백히 필요하다. 그러나, 작은 표적 펩티드나 작은 단백질과 적합한 킬레이터들의 공액체들은 작은 생체 분자가 용액 중의 불용성 킬레이터를 유지할 수 없기 때문에 수성 시스템에서 불량한 용해성을 나타내는 경향이 있다. 불량한 용해성은 응집 및 침전을 초래한다. 응집물들은 인간 피험자들에게 투여되는 약물 제제에서 용인할 수 없으며, 침전으로 인해 조성물은 전혀 사용할 수 없게 되는 것은 분명하다.

[0018] 더욱이, 또한 모노클로날 항체와 같은 더 큰 표적 펩티드/단백질과 함께, 상기 킬레이터는 소수성 '스팟(spot)'으로서 공액체의 표면 상에 노출될 것이다. 이렇게 되면 어떤 환경에서는 미세 응집의 문제를 초래할 수도 있을 것이다.

[0019] 생물학적 시스템에서, 예컨대 인간 환자에서, 소수성은 일반적으로 간에서의 바람직하지 못한 흡수와 연관이 있다. 분명히 이러한 문제는 일반적인 약물 화합물의 경우보다 알파-방출체들과 같은 고도의 세포 독성제의 경우에 훨씬 더 심각하다. 킬레이터의 소수성은 또한 면역 반응의 위험도 증가시키는 데, 이는 소수성은 숙주의 면역 시스템에 의해 생성된 항체들의 더 강한 결합을 촉진시키기 때문이다. 또다시, 이러한 현상은 알파-방출체의 이례적인 세포 독성 때문에 알파-방출체와 특히 관련이 있다. 따라서, 상기 고찰된 문제들 중의 하나 이상에 대한 해결책을 내놓기 위하여, 특히 리간드 부분의 친수성을 증가시킨 공액체들에 의해 알파-방출 토폴 방사성 핵종들을 선택적으로 전달하는 방법이 상당히 필요하다는 것은 분명하다.

[0020] 히드록시피리딘은 기를 함유하는 옥타덴테이트 킬레이터제는 표적 모이어티에의 후속 부착을 위해 알파 방출체 토폴-277을 조제하기에 적합한 것으로 이미 밝혀졌다(WO2011098611). 옥타덴테이트 킬레이터들은, 링커 기들에 의해 아민계 골격에 공액된 4개의 3,2-히드록시피리딘은 기들을 함유하고, 표적 분자에 공액하기 위해 사용된 별개의 반응성 기를 갖는 것으로 기술되어 있다. 이전의 발명에서 바람직한 구조는, 화합물 ALG-DD-NCS, ALG1005-38, Bb-1-HOPO-1-DEBN에 의해 나타난 바와 같이, 헤테로사이클릭 고리의 위치 1에 메틸 치환된 질소를 갖는 3,2-히드록시피리딘은 기들을 함유하고, 위치 4에 부착된 포름산을 포함하는 아민 결합에 의해 아민계 골격에 연결되어 있었다. 이들 히드록시피리딘은 함유 분자 중의 하나가 중앙 표적 항체에 공액된 실험에서, 상기 분자는 그것이 수성 완충체에 용해될 수 없었기 때문에 유기 용매 DMSO에 용해하였다.

[0021] CD22는 당 결합 막관통 수용체로서, 특정 포유동물 세포들에 발현되며, 특히 B 세포 수용체 신호를 위한 억제 수용체로서 작용하는 B세포들에서 발현된다. 이는 항체 기반 요법의 가능한 표적으로 고려되어 왔다.

[0022] 이제 본 발명자들은 적어도 하나가 적합한 가용화 모이어티에 의해 치환되는 4개의 HOPO 모이어티들을 포함하는 옥타덴테이트 히드록시피리딘(HOPO)-형 리간드에 의해 복합된 4+ 토폴-227 이온의 사용이 상기 복합체의 용해성 및 상용하는 특성을 획기적으로 증진시킬 수 있다는 것을 뜻밖에 규명하였다. 더욱이, 그러한 리간드와 CD22-결합 표적 모이어티의 결합은 유리한 특성을 갖는 공액체를 제공할 수 있다.

[0023] 발명의 요약

[0024] 따라서, 제1 측면에서 보면, 본 발명은 조직 표적 모이어티, 4개의 HOPO 모이어티들을 포함하는 옥타덴테이트 히드록시피리딘-함유 리간드, 및 알파-방출 토폴 방사성 핵종의 이온을 포함하는 조직-표적 복합체를 제공하고, 이 경우에 4개의 HOPO 모이어티들 중의 적어도 하나는 N-위치에서(위치 1) 히드록시알킬 가용화 기로 치환되며, 상기 조직 표적 모이어티는 상기 CD22 수용체에 결합 친화도를 갖는다. 일 구현예에서, 그러한 복합체는 순수한 물에 용해될 수 있다.

[0025] 바람직한 구현예에서, 상기 옥타덴테이트 리간드는 적어도 하나의 3,2-HOPO 모이어티, 바람직하게는 2, 3, 또는 4개의 3,2-HOPO 모이어티들을 포함한다. 추가의 바람직한 구현예에서, 적어도 2개, 바람직하게는 적어도 3개 및 가장 바람직하게는 4개의 HOPO 모이어티들 모두는 히드록시알킬 가용화 모이어티들을 N-위치에서 포함한다.

[0026] 바람직한 표적 모이어티들은 폴리클로날 및 특히 모노클로날 항체들 및 그의 단편들을 포함한다. 특이적 결합 단편들, 예컨대 Fab, Fab' Fab'2 및 단일쇄 특이적 결합 항체들이 전형적인 단편들이다.

[0027] 그러한 복합체들에서(그리고 바람직하게는 본 발명의 모든 측면에서) 토폴 이온은 일반적으로 옥타덴테이트 히

히드록시피리디논-함유 리간드에 의해 복합체화될 수 있고, 이는 다시 임의의 적합한 수단에 의해 조직 표적 모이어티에 부착될 것이다. 그러한 수단은 임의의 적합한 특이적 결합 쌍(예, 비오틴/아비딘 유형 결합 쌍들)에 의한 직접적인 공유 부착 또는 부착을 포함할 수 있다. 임의의 적합한 부착이 사용될 수 있지만, 직접적인 공유 결합 또는 공유 또는 결합-쌍 링커 모이어티의 사용이 통상적인 방법일 것이다. 공유 에스테르 또는 아마이드 결합들은 바람직한 방법들이다.

[0028] 더 심층적 측면에서 보면, 본 발명은 조직 표적 모이어티, 4개의 HOPO 모이어티들을 포함하는 옥타덴테이트 히드록시피리디논-함유 리간드, 및 알파-방출 토폴 방사성 핵종의 이온을 포함하는 조직 표적 복합체의 용도를 제공하고, 이 경우에 4개의 HOPO 모이어티들 중의 적어도 하나는 본원에 기술된 임의의 그러한 질병을 비롯한 증식성 또는 종양성 질병을 치료하는 약제의 제조에 있어서 N-위치에서 히드록시알킬 가용화 기로 치환되며, 상기 조직 표적 모이어티는 상기 CD22 수용체에 결합 친화도를 갖는다(본원에 기술된 임의의 그러한 복합체를 포함함).

[0029] 상응하는 측면에서, 본 발명은 조직 표적 모이어티, 4개의 HOPO 모이어티들을 포함하는 옥타덴테이트 히드록시피리디논-함유 리간드, 및 알파-방출 토폴 방사성 핵종의 이온을 포함하는 적어도 하나의 조직-표적 복합체의 투여를 포함하는 인간 또는 비인간 동물(특히 치료를 요하는 인간이나 동물)의 치료 방법을 제공하고, 이 경우에 상기 4개의 HOPO 모이어티들 중의 적어도 하나는 N-위치에서 히드록시알킬 가용화 기로 치환되며, 상기 조직 표적 모이어티는 상기 CD22 수용체에 결합 친화도를 갖는다(본원에 기술된 임의의 그러한 복합체를 포함함). 그러한 방법은 바람직하게는 본원에 기술된 임의의 그러한 질병을 비롯한 증식성 또는 종양성 질병의 치료를 위한 것이다. 그러한 방법은 통상적으로 인간 또는 비인간 포유동물 대상자에 대해, 예컨대 치료를 요하는 인간이나 동물에서 시행된다.

[0030] 더 심층적인 상응하는 구현예에서, 본 발명은 치료에 사용하기 위해, 특히 본원에 기술된 임의의 그러한 질병들 및 방법들을 비롯한 증식성 및/또는 종양성 질병에 사용하기 위해 조직 표적 모이어티, 4개의 HOPO 모이어티들을 포함하는 옥타덴테이트 히드록시피리디논-함유 리간드, 및 알파-방출 토폴 방사성 핵종의 이온을 포함하는 조직-표적 복합체를 제공하고, 이 경우에 4개의 HOPO 모이어티들 중의 적어도 하나는 N-위치에서 히드록시알킬 가용화 기로 치환되며, 상기 조직 표적 모이어티는 상기 CD22 수용체에 결합 친화도를 갖는다(본원에 개시된 바의 모든 그러한 복합체들을 포함함).

[0031] 더 심층적인 측면에서 보면, 본 발명은 조직 표적 모이어티, 4개의 HOPO 모이어티들을 포함하는 옥타덴테이트 히드록시피리디논-함유 리간드, 및 알파-방출 토폴 방사성 핵종의 이온을 포함하는 조직-표적 복합체를 적어도 하나의 약학적 담체 또는 부형제와 함께 포함하는 약학적 조성물을 제공하고, 이 경우에, 4개의 HOPO 모이어티들 중 적어도 하나는 N-위치에서 히드록시알킬 가용화 기로 치환되며, 상기 조직 표적 모이어티는 상기 CD22 수용체에 결합 친화도를 갖는다(본원에 기술된 임의의 그러한 복합체를 포함함).

[0032] 가장 풍부한, 자연적으로 발생하는 토폴 동위 원소의 토폴 복합체들, 즉, 토폴-232(반감기 10^{10} 년 및 효과적으로 비방사성)와 구별하기 위해, 본원에 특허 청구된 토폴 복합체 및 그의 조성물은 천연의 상대적 존재비보다 더 많이, 예, 적어도 20% 이상 알파-방출 토폴 방사성 동위 원소(즉, 10^3 년 미만의 반감기를 갖는 토폴의 적어도 하나의 동위 원소, 예, 토폴-227)를 포함한다는 것이 이해되어야 한다. 이러한 요구는, 방사성 토폴, 예컨대 토폴-227의 치료학적 유효량이 명시적으로 요구될 경우, 본 발명의 정의에 영향을 미치지 않지만, 모든 측면에서 바람직한 경우일 것이다.

[0033] 본 발명의 모든 측면들에서, 상기 알파-방출 토폴 이온이 토폴-227의 이온인 것이 바람직하다. 토폴의 4+ 이온은 본 발명의 복합체에서 사용하는 데 바람직한 이온이다. 상응하여, 토폴-227의 4+ 이온이 매우 바람직하다.

[0034] 또 다른 심층적 측면에서 보면, 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법에서 사용하기 위한 키트를 제공하고, 상기 키트는 4개의 HOPO 모이어티들을 포함하는 옥타덴테이트 히드록시피리디논-함유 리간드에 공액되거나 또는 공액될 수 있는 조직 표적 모이어티를 포함하고, 이 경우에 상기 4개의 HOPO 모이어티 중 적어도 하나는 N-위치(위치 1)에서 히드록시알킬 가용화 기로 치환되며, 상기 조직 표적 모이어티는 상기 CD22 수용체에 결합 친화도를 갖는다. 모든 결합 모이어티 및 리간드는 바람직하게는 본원에 기술된 것이다. 그러한 키트는 선택적으로 그리고 바람직하게는 알파-방출 토폴 방사성 핵종, 예컨대 ^{227}Th 를 포함할 것이다.

[0035] 더 심층적 측면에서, 본 발명은 또한 조직-표적 복합체의 형성을 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 조직 표적 모이어티를 수용액에서 옥타덴테이트 히드록시피리디논-함유 리간드에 결합시키는 단계를 포함하고, 상기 복합

체는 4개의 HOPO 모이어티들 및 알파-방출 토륨 방사성 핵종의 이온을 포함하고, 이 경우에 상기 4개의 HOPO 모이어티들 중 적어도 하나는 N-위치에서 히드록시알킬 가용화 기로 치환되며, 상기 조직 표적 모이어티는 상기 CD22 수용체에 결합 친화도를 갖는다. 그러한 방법은 임의의 유기 용매의 실질적인 부재 하에 시행될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 발명의 상세한 설명

본 발명의 맥락에서, "조직 표적"이 본원에서 사용되는 것은 논의하고 있는 물질이(특히 본원에 기술된 바의 조직-표적 복합체의 형태로 사용될 때) 그것의 존재가(예, 방사성 붕괴를 전달하기 위해) 바람직한 적어도 하나의 조직 부위에 우선적으로 그 자체를 국소화하는(그리고 특히 임의의 공액된 토륨 복합체를 국소화하는) 역할을 한다는 것을 나타내기 위한 것이다. 따라서, 조직 표적 기 또는 모이어티는 대상자에게 투여한 후 그 대상자의 신체 내에서 적어도 하나의 원하는 부위에 평균보다 더 높은 정도의 국소화를 제공하는 역할을 한다. 상기 표적 모이어티는, 이 경우, 특히 세포-표면 수용체 CD22에 결합하도록 선택될 것이다. 이는, 예를 들어 비-CD22 발현 세포들에 비해 CD22 발현 세포들에서 100배 이상 큰 결합 친화도를 갖는 것으로써 반영될 수 있다. CD22는 특정 병태들(여기 지시된 바와 같이)을 갖는 세포들에서 발현 및/또는 과발현되며, 그러므로 상기 CD22 특이적 바인더는 상기 복합체가 그러한 질병-영향받은 세포들을 표적화하는 역할을 할 수 있다. 유사하게, 조직 표적 모이어티는 질병-영향받은 세포들 근처의 세포들에 존재하는 세포-표면 표지자들(예, CD22 수용체들)에 결합할 수 있다. CD22 세포-표면 표지자들은 건강한 세포 표면보다 병든 세포 표면에서 더 심하게 발현되거나, 또는 휴면 단계 동안보다 성장 또는 복제 기간 동안 세포 표면에서 더 심하게 발현된다. 일 구현예에서, CD22 특이적 결합 리간드는 질병 특이적 세포-표면 표지자를 위한 또 다른 바인더와의 결합에 사용되어, 이로써 이중-결합 복합체를 산출할 수 있다.

상기 조직 표적 모이어티는 또한 원하는 조직(들)에 대한 토륨 복합체의 표적화 효과를 집합적으로 갖는 2개 이상의 성분을 포함할 수 있다. 이는, 예를 들면, 하나의 성분이 먼저 투여하고 특정 조직, 종양 또는 세포-형(조직-결합제)에 결합하고, 제2 및/또는 추가 성분(가교제)이 동시에, 또는 바람직하게는 순차적으로 투여되어, 조직-결합제에 생체 내 결합하는 경우이다. 상기 가교제는 복합된 알파-방출 토륨에 직접적으로 또는 간접적으로 공액될 것이고, 따라서 집합적으로 조직-결합제 및 가교제는 조직-표적 모이어티를 형성할 것이다. 상호 친화도를 갖는 조직 결합제 및 가교제를 제공하기에 적합한 특이적 결합 쌍들은 당업계에 잘 공지되어 있다(예, 아비딘 또는 스트렙타비딘을 갖는 비오틴).

본원에 기술된 바의 본 발명의 다양한 측면들은 질병의 치료, 특히 병든 조직의 선택적 표적화를 위한 치료에 관한 것이고, 뿐만 아니라 그러한 방법에서 유용한 복합체, 공액체, 약제, 제형, 키트 등에 관한 것이다. 모든 측면에서, 병든 조직은 신체 내의 단일 부위에(예를 들면, 국소화된 고형 종양의 경우에) 존재할 수 있거나, 또는 복수의 부위들에(예를 들면, 여러 개의 관절이 관절염에서 영향을 받거나 또는 분포된 또는 전이된 암성 질병의 경우에) 존재할 수 있다.

표적화되어야 하는 병든 조직은 연조직 부위에, 또는 석회화된 조직 부위에, 또는 연조직에 또는 석회화된 부위에 모두 있을 수 있는 복수 부위에 있을 수 있거나, 또는 적어도 하나의 연조직 부위 및/또는 적어도 하나의 석회화된 조직 부위를 포함할 수 있는 복수의 부위에 있을 수 있다. 일 구현예에서, 적어도 하나의 연조직 부위는 표적화된다. 표적화 부위와 질병의 기원 부위가 동일할 수도 있지만, 대안적으로 상이할 수도 있다(예컨대, 전이 부위가 특정적으로 표적화된 경우). 하나 이상의 부위가 포함되는 경우, 이에겐 기원 부위가 포함될 수 있거나 또는 복수의 제2 부위일 수 있다.

용어 "연조직(soft tissue)"은 본원에서 "경질(hard)" 광물화된 기질을 갖지 않는 조직들을 나타내는 데 사용된다. 특히, 본원에서 사용된 연조직은 골격 조직이 아닌 임의의 조직일 수 있다. 상응하여, 본원에 사용된 "연조직 질병"은 본원에서 사용된 "연조직"에서 발생하는 질병을 나타낸다. 본 발명은 특히 암의 치료에 적합하고, 따라서 "연조직 질병"은 임의의 "연질(soft)"(즉, 비광물화된) 조직에서 발생하는 암종, 육종, 골수종, 백혈병, 림프종 및 혼합형 암을 포함하며, 뿐만 아니라 그러한 조직의 다른 비-암성 질병들을 포함한다. 암성 "연조직 질병"은 전이성 및 미세 전이성 종양 뿐만 아니라 연조직들에서 발생하는 고형 종양도 포함한다. 사실상, 상기 연조직 질병은 동일한 환자에서 연조직의 일차 고형 종양 및 연조직의 적어도 하나의 전이성 종양을 포함할 수 있다. 대안적으로, 상기 "연조직 질병"은 유일한 일차 종양 또는 골격 질병인 일차 종양에 의한 유일한 전이로 구성될 수 있다. 본 발명의 모든 적합한 측면에서 치료 및/또는 표적화에 특히 적합한 것은, 혈액 종양, 및 특히 림프구성 세포들의 종양성 질병들이며, 예컨대 비-호지킨(non-Hodgkin's) 림프종, B-세포 림프종들의 B-세포 종양들을 포함한 림프종들 및 림프구성 백혈병들이다. 유사하게, 골수, 척추(특히 척수) 림프절 및/또는 혈구

세포들의 임의의 종양성 질병들은 본 발명의 모든 적합한 측면에서 치료 및/또는 표적화에 적합하다.

[0042]

본 발명의 모든 적합한 측면에서 치료 및/또는 표적화에 적합한 B-세포 종양들의 몇몇의 예들은 하기를 포함한다: 만성 림프구성 백혈병/소림프구성 림프종, B-세포 전림프구 백혈병, 림프구형질세포성 림프종(예컨대 발렌스트룀 거대글로불린혈증), 비장 변연부 림프종, 형질 세포 종양들(예를 들어, 형질 세포 골수종, 형질구종, 모노클로날 면역 글로불린 침적 질병들, 경쇄 질병들), 결절외변연부 B-세포림프종(MALT 림프종), 결절변연부 B-세포림프종(NMZL), 여포성 림프종, 외투세포 림프종, 미만성 큰 B-세포 림프종, 종격동(흉선) 큰 B-세포 림프종, 혈관내 큰 B-세포 림프종, 원발성 삼출액 림프종, 및 버킷(Burkitt) 림프종/백혈병.

[0043]

특정 알파-방사성 토륨 동위 원소들(예, ^{227}Th)이 모두 치료학적으로 효과적이고 견딜 수 없는 골수 독성을 생성하지 않는 양으로 투여될 수 있다는 것이 중요한 최근의 연구결과이다. 본원에 사용된 용어 "용인할 수 있는 정도의 비-골수 독성"은 가장 중요하게는, 투여된 토륨-227 방사선 동위 원소의 붕괴에 의해 생성된 라듐-223의 양이 일반적으로 대상자에게 직접적인 치사량이 되기에는 충분치 않다는 것을 나타내는 데 사용된다. 그러나, 그러한 치료의 용인할 수 있는 부작용인 골수 손상의 양(및 치사 반응의 확률)은 치료 중인 질병의 유형, 치료 처방의 목표, 그리고 대상자에 대한 예후에 따라 현저히 다를 것이라는 것은 당업자에게 분명할 것이다. 본 발명에 대한 바람직한 대상자들은 인간이지만, 다른 포유동물들, 특히 개에게 본 발명을 사용하면 유익할 것이고, 용인할 수 있는 골수 손상 수준은 또한 대상자의 종들을 반영할 수 있다. 용인할 수 있는 골수 손상의 수준은 일반적으로 비악성 질병보다는 악성 질병의 치료에 있어서 더 높을 것이다. 골수 독성의 수준의 하나의 잘 알려진 척도는 호중구 세포수이고, 본 발명에서, ^{223}Ra 의 용인할 수 있는 정도의 비-골수 독성 양은 통상적으로 그의 최저 지점(최하점)에서 호중구 분획이 치료 전의 수의 10% 만큼 되는 정도로 조절된 양이 될 것이다. 바람직하게는, ^{223}Ra 의 용인할 수 있는 정도의 비-골수 독성 양은 호중구 세포 분획이 최하점에서 적어도 20%이고 더욱 바람직하게는 적어도 30%가 되는 정도의 양이 될 것이다. 적어도 40%의 최하점 호중구 세포 분획이 가장 바람직하다.

[0044]

또한, 방사성 토륨(예, ^{227}Th) 함유 화합물은 줄기 세포 지지체 또는 비슷한 회수 방법이 포함될 때 생성된 라듐(예, ^{223}Ra)의 골수 독성이 정상적으로 견딜 수 없는 경우에 고투여량 요법에 사용될 수 있다. 그러한 경우에, 상기 호중구 세포수는 최하점에서 10% 미만으로 감소될 수 있고, 예외적으로 5%까지 또는 필요할 경우 5% 미만으로 감소될 수 있으나, 단, 적합한 주의를 기울여야 하고 그 후의 줄기 세포 지지체가 제공되어야 한다. 그러한 기법은 당업계에 잘 공지되어 있다.

[0045]

본 발명에서 특별한 관심을 두는 토륨 동위 원소는 토륨-227이고, 토륨-227은 본원에서 문맥에 따라 토륨을 지칭하는 모든 경우의 바람직한 동위 원소이다. 토륨-227은 생산하기에 비교적 용이하고, 중성자 조사된 ^{226}Ra 에서 간접적으로 조제될 수 있는 데, 이는 ^{227}Th , 즉, $^{227}\text{Ac}(T_{1/2} = 22 \text{ 년})$ 의 모 핵종을 함유할 것이다. 악티늄-227은 ^{226}Ra 표적에서 아주 용이하게 분리될 수 있고 ^{227}Th 를 생성하는 발생기로서 사용될 수 있다. 이러한 공정은 필요할 경우 산업 규모로 확장될 수 있고, 그에 따라서 분자 표적화된 방사선 요법의 후보 요법으로 고려된 대부분의 다른 알파-방출체에서 나타난 공급 문제가 방지될 수 있다.

[0046]

토륨-227은 라듐-223을 통해 붕괴된다. 이러한 경우에 일차 딸 핵종은 11.4 일의 반감기를 갖는다. 순수한 ^{227}Th 선원으로부터, 단지 적당한 양의 라듐이 최초 며칠 동안 생성된다. 그러나, ^{223}Ra 의 잠재적 독성은 ^{227}Th 의 잠재적 독성보다 더 높은데, 이는 알파 입자의 ^{223}Ra 에서 방출된 후 수명이 짧은 딸 핵종들에서 3개의 추가의 알파 입자들이 수분 내에 그 뒤를 따르기 때문이다.(토륨-227에 대한 붕괴 시리즈를 명시하는 아래 표 2 참조).

[0047] 표 2

핵종	붕괴 모드	평균 입자 에너지 (MeV)	반감기
²²⁷ Th	α	6.02	18.72 일
²²³ Ra	α	5.78	11.43 일
²¹⁹ Rn	α	6.88	3.96 초
²¹⁵ Po	α	7.53	1.78 ms
²¹¹ Pb	β	0.45	36.1 분
²¹¹ Bi	α	6.67	2.17 분
²⁰⁷ Tl	β	1.42	4.77 분
²⁰⁷ Pb			안정됨

[0048]

[0049] 부분적으로 토륨-227은 잠재적으로 유해한 붕괴 산물을 생성하기 때문에, 토륨-227($T_{1/2}$ = 18.7 일)은 알파 입자 요법용으로 널리 고려되지 않았다.

[0050]

토륨-227은 견딜 수 없는 골수 억제제를 일으킬 정도로 많은 라듐-223을 생성하지 않고 바람직한 치료 효과를 제공하기에 충분한 양으로 투여될 수 있다. 추가 치료 효과가 딸 동위원소의 붕괴로부터 유도될 수 있도록 표적화된 부위에서 딸 동위 원소들을 유지하는 것이 바람직하다. 그러나, 용인할 수 없는 골수 독성을 유발하지 않고 유용한 치료 효과를 갖기 위해 토륨 붕괴 산물의 조절을 유지하는 것은 필요하지 않다.

[0051]

중양 세포 사멸 효과가 주로 토륨-227에 기인하고 그의 딸 핵종에 기인하지 않는다고 가정하면, 이러한 동위 원소의 가능한 치료 투여량은 다른 알파 방출체들과 비교함으로써 규명될 수 있다. 예를 들면, 아스타틴-211의 경우, 동물에서의 치료 투여량은 통상적으로 2-10 MBq/kg이었다. 반감기 및 에너지에 대해 보정함으로써, 토륨-227에 상응하는 투여량은 적어도 체중 kg당 36-200 kBq이 될 것이다. 이에 의하여 치료 효과를 기대하여 유용하게 투여될 수 있는 ²²⁷Th의 양에 대한 하한치를 설정할 수 있다. 이러한 계산은 아스타틴과 토륨의 유사한 잔류를 가정한다. 그러나, 분명히 토륨의 18.7일의 반감기에 의해 이러한 동위 원소의 붕괴 전에 그 원소의 더 큰 소실이 필히 초래될 것이다. 따라서, 이렇게 계산된 투여량은 일반적으로 최소 유효량으로 간주되어야 한다. 완전히 잔류된 ²²⁷Th(즉, ²²⁷Th는 신체에서 배출되지 않음)의 면에서 발현된 치료 투여량은 일반적으로 적어도 18 또는 25 kBq/kg, 바람직하게는 적어도 36 kBq/kg, 더욱 바람직하게는 적어도 75 kBq/kg, 예를 들면 100 kBq/kg 또는 그 이상일 것이다. 더 많은 양의 토륨이 더 큰 치료 효과를 가질 것으로 기대될 수 있지만, 용인할 수 없는 부작용이 초래될 경우에는 투여될 수 없다. 마찬가지로, 상기 토륨이 짧은 생물학적 반감기(즉, 여전히 토륨을 운반하는 신체에서 배출되기 전의 반감기)를 갖는 형태로 투여되는 경우, 많은 토륨이 그것의 붕괴전에 소실될 것이 때문에 더 많은 양의 방사선 동위 원소가 치료 효과를 위해 필요할 것이다. 그러나, 생성된 라듐-223의 양은 그에 상응하여 감소될 것이다. 동위 원소가 완전히 잔류될 때 투여되어야 하는 상기 토륨-227의 양은 더 짧은 생물학적 반감기를 갖는 동등한 투여량과 용이하게 관련이 있을 수 있다. 그러한 계산은 당업계에 잘 공지되어 있고 WO 04/091668에(예, 실시예들 1 및 2의 내용에) 나와있다.

[0052]

방사선 동위원소로 표시된 화합물이 딸 핵종들을 방출하는 경우, 임의의 방사성 딸 핵종(들)의 운명을 아는 것은, 해당되는 경우에, 중요하다. ²²⁷Th의 경우, 주된 딸 산물은 ²²³Ra이고, 이는 그의 골 친화 속성 때문에 임상 평가를 받고 있다. 라듐-223은 혈액을 매우 신속히 청소하고, 골격 내에 농축되거나 또는 장 경로 및 신장 경로를 통해 배설된다(Larsen, J Nucl Med 43(5, Supplement): 160P(2002) 참조). 따라서, ²²⁷Th에서 생체 내로 방출된 라듐-223은 건강한 연조직에 영향을 크게 미치지 않을 것이다. 용해된 시트레이트 염으로서 ²²⁷Th의 분포에 관한 Int. J. Radiat. Biol. 20:233-243(1971)에서의 Müller에 의한 연구에서, 연조직 내의 ²²⁷Th에서 생성된 ²²³Ra는 빠르게 즉시 재분포되거나 또는 배설된 것으로 밝혀졌다. 그러므로, 특히 골수에 대한 알파 방출 라듐의 알려진 독성은 토륨 투여량과 관련된 문제이다.

[0053]

사실은, ²²³Ra의 최소한 200 kBq/kg의 투여량은 인간 피험자들에서 투여될 수 있고 견딜 수 있다는 것이 WO 04/091668에서 최초로 규명되었다. 이들 데이터는 그 공보물에 나타나 있다. 따라서, 아주 뜻밖에도, 치료 유효량의 ²²⁷Th(예컨대, 36 kBq/kg 이상)이 포유동물 대상자가 심각하거나 또는 심지어 치명적인 골수 독성의 용인할

수 없는 위험을 겪을 것이라고 예상하지 않고 포유동물 대상자에게 투여될 수 있는 치료 기회의 창이 존재한다는 것은 이제 알 수 있다. 그럼에도 불구하고, 이러한 치료 기회의 창을 가장 잘 사용하게 되는 것이 매우 중요하고, 따라서 방사성 토륨이 신속하고 효율적으로 복합체화되고, 매우 높은 친화도로 유지되어, 가능한 한 투여량의 최대 분량이 표적 부위에 전달되는 것이 극히 중요하다.

[0054]

^{227}Th 약제로부터 생성된 ^{223}Ra 의 양은 방사선 동위원소로 표식된 화합물의 생물학적 반감기에 좌우될 것이다. 이상적인 상황은 종양 세포 내로의 내재화, 강한 종양 유지 및 정상 조직에서의 짧은 생물학적 반감기를 포함하여 급속한 종양 흡수와 함께 복합체를 사용하는 것이 될 것이다. 그러나, 이상적인 생물학적 반감기 미만인 복합체는 ^{223}Ra 의 투여량이 견딜 수 있는 수준 내에서 유지되는 한 유용할 수 있다. 생체 내에서 생성된 라듐-223의 양은 투여된 토륨의 양 및 토륨 복합체의 생물학적 잔류 시간의 인자일 것이다. 임의의 특정한 경우에 생성된 라듐-223의 양은 당업자에 의해 용이하게 계산될 수 있다. ^{227}Th 의 최대 투여 가능한 양은 생체 내에서 생성된 라듐의 양에 의해 결정될 것이고, 견딜 수 없는 수준의 부작용, 특히 골수 독성을 생성시키는 양보다 적어야 한다. 이러한 양은 일반적으로 300kBq/kg 미만, 특히 200 kBq/kg 미만, 더욱 바람직하게는 170 kBq/kg 미만(예, 130 kBq/kg 미만)일 것이다. 최소 유효 투여량은 토륨의 세포 독성, 병든 조직의 생성된 알파 조사에 대한 민감성 및 상기 토륨이(이러한 경우에 리간드와 표적 모이어티의 조합인) 표적 복합체에 의해 효율적으로 결합하고, 유지하고 전달되는 정도에 의해 결정될 것이다.

[0055]

본 발명의 방법에서, 상기 토륨 복합체는 바람직하게는 18 내지 400 kBq/kg 체중, 바람직하게는 36 내지 200 kBq/kg, (예컨대 50 내지 200 kBq/kg), 더욱 바람직하게는 75 내지 170 kBq/kg, 특히 100 내지 130 kBq/kg의 토륨-227 투여량으로 투여된다. 상응하여, 단일 투여량은 적합한 체중을, 예컨대 30 내지 150 Kg, 바람직하게는 40 내지 100 Kg(예, 투여량당 540 kBq 내지 4000 kBq의 범위, 등)의 체중을 곱한 임의의 이들 범위 근처를 포함할 수 있다. 또한, 토륨 투여량, 복합체 및 투여 경로는 바람직하게는 생체 내에서 생성된 라듐-223 투여량이 300 kBq/kg 미만, 더욱 바람직하게는 200 kBq/kg 미만, 훨씬 더 바람직하게는 150 kBq/kg 미만, 특히 100 kBq/kg 미만이 되게 하는 정도가 될 것이다. 또한, 이렇게 됨으로써 이들 범위에 표시된 임의의 체중을 곱함으로써 나타난 ^{223}Ra 에 대한 노출이 구현될 것이다. 상기 투여량 수준은 바람직하게는 ^{227}Th 의 완전히 잔류된 투여량이지만, 일부 ^{227}Th 가 그것의 붕괴 전에 신체에서 배출될 것을 고려하여 투여된 투여량일 수 있다.

[0056]

^{227}Th 복합체의 생물학적 반감기가 물리적 반감기에 비해 짧은 경우(예, 7일 미만, 특히, 3일 미만), 상당히 더 많이 투여된 투여량은 동등한 잔류 투여량을 제공하기 위해 필요할 수 있다. 따라서, 예를 들면, 완전히 잔류된 투여량의 150 kBq/kg는 711 kBq/kg의 투여량으로 투여된 5일의 반감기를 갖는 복합체와 동등하다. 임의의 적절한 잔류 투여량과 동등한 투여량은 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 복합체의 생물학적 청소율로부터 계산될 수 있다.

[0057]

하나의 ^{227}Th 핵의 붕괴는 하나의 ^{223}Ra 원자를 제공하기 때문에, ^{227}Th 의 잔류 및 치료 활성은 환자가 겪는 ^{223}Ra 투여량에 직접적으로 관련될 것이다. 임의의 특정 상황에서 생성된 ^{223}Ra 의 양은 잘 알려진 방법을 사용하여 계산될 수 있다.

[0058]

따라서, 바람직한 구현예에서, 본 발명은(본원에 기술된 바와 같이) 포유동물 대상자에서 질병의 치료 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 대상자에게 조직 표적 모이어티, 옥타덴테이트 리간드(특히, 본원에 기술된 것들 중의 임의의 것) 및 방사성 토륨 동위 원소(예, 토륨-227)를 포함하는 공액체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.

[0059]

^{223}Ra 딸 동위 원소에 대한 대상자의 노출을 최소화하는 것은 이의 특성이 유용하게 사용되지 않는 한, 분명히 바람직하다. 특히, 생체 내에서 생성된 라듐-223의 양은 일반적으로 40 kBq/kg 초과, 예를 들면, 60 kBq/kg 초과일 것이다. 일부 경우에, 생체 내에서 생성된 ^{223}Ra 가 80 kBq/kg 초과, 예를 들면, 100 또는 115 kBq/kg 초과가 되는 것이 필요하다.

[0060]

적절한 담체 용액 내의 토륨-227로 표식된 공액체는 정맥내로, 강내(예, 복강내)로, 피하로, 경구로 또는 국소적으로 단일 적용 요법으로서, 또는 분획화된 적용 요법으로서 투여될 수 있다. 바람직하게는 표적 모이어티에 공액된 복합체는 용액으로서 비경구(예, 경피) 경로, 특히 정맥내 또는 강내 경로를 통해 투여될 것이다. 바람직하게는, 본 발명의 조성물은 비경구 투여를 위한 멸균 용액으로 제형될 것이다.

[0061] 본 발명의 방법 및 생성물에서 토폴-227은 단독으로 사용될 수 있거나, 수술, 외부 빔 방사선 요법, 화학 요법, 다른 방사성 핵종, 또는 조직 온도 조정 등을 포함하는 다른 치료 방법과 병용하여 사용될 수 있다. 이는 본 발명의 방법의 더 심층적인 바람직한 구현예를 형성하고, 제형/약제는 상응하여 적어도 하나의 추가의 치료학적 활성제, 예컨대 또 하나의 방사성제 또는 화학요법제를 포함할 수 있다.

[0062] 하나의 특히 바람직한 구현예에서, 상기 대상자는 또한 라듐-223 유래 골수 독성의 효과를 감소시키기 위해 줄기 세포 치료 및/또는 다른 지지 요법도 받을 수 있다.

[0063] 본 발명에 따라, ²²⁷Th은 표적 복합체에 의해 복합체화될 수 있다. 일반적으로 상기 표적 모이어티는 100 g/mol 내지 수백만 g/mol(특히 100 g/mol 내지 백만 g/mol)의 분자량을 가질 것이고, 바람직하게는 질병과 관련이 있는 수용체에 대한 친화도를 직접적으로 가질 것이고/이거나 ²²⁷Th를 투여하기 전에 질병에 대해 표적화된 분자에 결합된 사전-투여된 적합한 결합제(예, 비오틴 또는 아비딘)를 포함할 것이다. 적합한 표적 모이어티는 폴리-및 올리고-펩티드, 단백질, DNA 및 RNA 단편들, 앵타머(aptamer) 등을 포함하고, 바람직하게는 단백질, 예, 아비딘, 스트렙타비딘, 폴리클로날 또는 모노클로날 항체(IgG 및 IgM 유형 항체들을 포함함), 또는 단백질들의 혼합물 또는 단백질들의 단편들 또는 작제물을 포함한다. 항체, 항체 작제물, 항체의 단편(예, Fab 단편 또는 임의의 단편은 적어도 하나의 항원 결합 부위(들)을 포함함), 단편의 작제물(예, 단일 사슬 항체) 또는 이들의 혼합물이 특히 바람직하다. 적합한 단편은 특히 Fab, F(ab')₂, Fab' 및/또는 scFv를 포함한다. 항체 작제물은 본원에서 나타낸 임의의 항체 또는 단편을 가질 수 있다.

[0064] 일 측면에서, 상기 특이적 바인더(조직 표적 모이어티)는 아래 개시된 것 중 적어도 하나의 서열과 서열 유사성 또는 상동성을 갖는 펩티드일 수 있다.

경쇄 :

췌과 DIQLTQSPSSLAVSAGENVMTSC**KSSQSV**LYSANHKNYLAWYQQKPGQSP
인간화 -----SA-V-DR-----KA

췌과 KLLIYW**ASTRES**GVPDRFTGSGSGTDFTLTISRVOQEDLAIYY**CHQYLSS**
인간화 -----S--S-----F--SL-P--I-T-----

췌과 WT**FGGG**TKLEIKR (서열ID1)
인간화 ----- (서열ID2)

중쇄 :

췌과 QVQLQESGAELSKPGASVKMSCKASGYTFT**SYWLH**WIKORPGQGLEWIG
인간화1 ----Q---VK---S---V-----VR-A-----
인간화2 ----VQ---VK---S---V-----VR-A-----

췌과 **YINPRNDYTEYNQNF**KDKATLTADKSSSTAYMQLSLTSEDSAVYYCAR
인간화1 -----I---E-TN---E---R---T-F-F---
인간화2 -----I---E-TN---E---R---T-F-F---

췌과 **RDITTFY**WGQGTTTLTVSS (서열ID3)
인간화1 -----V----- (서열ID4)
인간화2 -----V----- (서열ID5)

[0065]

[0066] 상기 서열들에서, 인간화(Humanised, H'ised)된 서열들에서의 "-"는 상기 잔기가 췌과 서열과 변화가 없음을 지시한다.

[0067] 상기 서열들(서열 ID 1 내지 5)에서, 상기 볼드체의 영역들은 핵심 특이적-결합 영역들(CDRs)로 여겨지며, 밀줄 친 영역들은 결합에 있어 그 중요성이 2차적인 것으로 여겨지고, 강조되지 않은 영역들은 특이적 결합 영역들보다 구조적인 것을 나타내고 있다고 여겨진다.

[0068] 본 발명의 모든 측면들에서, 조직 표적 모이어티는 서열 ID 1 내지 5에 개시된 서열들 중 임의의 것 중 적어도 하나와 실질적인 서열 상동성 또는 실질적인 서열 유사성을 갖는 서열을 포함할 수 있다. 실질적인 서열 상동성/유사성은 상기 완전한 서열들과 적어도 80%의 및/또는 특이적 결합 영역들(상기 서열들 중 볼드체로 나타난 영역들 및 선택적으로 밀줄 친 섹션들)과 적어도 90%의 유사성/상동성을 갖는 것으로 간주되어질 수 있다. 바람직한 서열 유사성 또는 더욱 바람직한 상동성은 볼드체 영역들에 대해, 및 바람직하게는 또한 상기 전체 서열들에 대해, 적어도 92%, 95%, 97%, 98%, 또는 99%일 수 있다. 서열 유사성 및/또는 상동성은 위스콘신 대학의 유전학 컴퓨터 그룹 버전 10 소프트웨어 패키지의 "베스트핏(BestFit)" 프로그램을 사용하여 결정될 수 있다. 상기 프

로그그램은 하기 디폴트값들을 갖는 스미스 및 워터맨(Smith and Waterman)의 국소 알고리즘을 사용한다: 겹 생성 패널티(Gap creation penalty)=8, 겹 연장 패널티(Gap extension penalty)=2, 평균 매치(Average match)=2.912, 평균 미스매치(average mismatch) 2.003.

[0069] 조직 표적 모이어티는 하나 이상의 펩티드 서열을 포함할 수 있으며, 이 경우 적어도 하나의, 그리고 바람직하게는 모든 서열들이 (독립적으로) 서열 ID 1 내지 5 중 임의의 것과의 상기 기술된 서열 유사성 및 바람직하게는 상동성과 부합할 수 있다.

[0070] 조직 표적 모이어티는 CD22와 결합 친화도를 가질 것이며, 일 구현예에서는 전체 도메인들에 대해 40 이하의 변이(variation)들을 갖는 서열을 또한 가질 수 있다(바람직하게 0 내지 30 변이들). 변이체들은 삽입, 삭제, 및/또는 치환에 의할 수 있으며, 서열 ID 1 내지 5에 대하여 인접하거나 인접하지 않을 수 있다. 치환 및 삽입은 전형적으로 상기 유전자 코드의 상기 20개의 아미노산들의 적어도 하나에 의하여 행해질 것이며, 치환은 가장 일반적으로 보존적 치환일 것이다. 그러나, 일 구현예에서, 적어도 하나의 삽입 및/또는 치환은 상기 리간드 모이어티에 결합하기 위하여 유용한 반응성 측쇄를 갖는 아미노산에 행해질 수 있다. 그러한 측쇄는, 예를 들어, 적어도 하나의 티올, 아민, 알코올, 산, 또는 아미드 그룹 또는 그의 임의의 보호된 균등물(예를 들어, 에스테르, 티오에스테르 등)을 포함할 수 있다. 보호기들은 유기 화학에서 잘 알려져 있으며, 예컨대 Theodora Greene의 "유기화학에서의 보호기들(Protective Groups in Organic Chemistry)"(본원에 참조로서 포함됨)과 같은 표준 텍스트로부터 선택될 수 있다.

[0071] 일반적으로, 상기 옥타덴테이트 리간드는 직접적으로 또는 간접적으로(예, 링커 모이어티를 통해) 표적 모이어티에 공액된다. 이러한 유형의; 즉, 활성인(예, 치료학적으로 또는 진단학적으로 활성인) 금속 - 복합체화 모이어티 - 선택적 링커 모이어티 - 표적 모이어티의 일반 작제물은 표적화된 방사성 약제 및 표적화된 조영제의 분야에 잘 공지되어 있다. 그러나, 토폴 4+ 이온에 의한 특정 용도에 대한 다양한 리간드의 적합성을 평가하는 데 이용할 수 있는 연구 작업은 거의 없거나 또는 전혀 없다. 이와 관련하여, 예를 들면, 다음 문헌이 참조될 수 있다: "Handbook of Targeted Delivery of Imaging Agents", Ed. Torchilin, CRC Press, 1995.

[0072] 히드록시피리디는 리간드를 갖는 토폴 이온에 대하여 가장 관련이 많은 이전 연구작업은 W02011/098611로서 공고되어 있고 옥타덴테이트 HOPO-함유 리간드로 복합된 토폴 이온의 발생의 상대적 용이성을 개시하고 있다.

[0073] 토폴을 위한 이전에 알려진 킬레이터는 또한 골격 질소들에 부착된 산성(예, 카르복시알킬)기를 갖는 선형, 고리형 또는 분지형 폴리azaalkane(polyazaalkane) 골격을 포함한다. 그러한 킬레이터의 예는 DOTA 유도체, 예컨대 p-이소티오시아네이트벤질-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(p-SCN-Bz-DOTA) 및 DTPA 유도체들, 예컨대 p-이소티오시아네이트벤질-디에틸렌트리아민펜타아세트산(p-SCN-Bz-DTPA)을 포함하고, 전자는 고리형 킬레이터들이고, 후자는 선형 킬레이터들이다.

[0074] 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산의 유도체들은 이전에 예시되었지만, 표준 방법들은 토폴을 DOTA 유도체들로 킬레이트화하는 데 쉽게 사용할 수 없다. 금속이 있는 DOTA 유도체의 가열은 킬레이터를 효과적으로 제공하지만, 흔히 낮은 수율로 제공한다. 리간드의 적어도 일 부분은 그 절차 동안 불가역적으로 변성되는 경향이 있다.

[0075] 게다가, 불가역 변성에 대한 표적 모이어티의 상대적으로 높은 민감성 때문에, 모든 가열 단계가 완료될 때까지 표적 모이어티의 부착을 피하는 것이 일반적으로 필요하다. 이로 인하여 알파-방출 토폴 동위 원소의 붕괴 수명 동안 시행되어야 하는 별도의 화학 단계(모든 필요한 워크업 및 분리가 있음)가 추가된다. 분명히, 이러한 방식으로 알파-방출 물질을 처리하지 않거나, 필요한 것보다 더 많이 상응하는 폐기물을 발생시키지 않는 것이 바람직하다. 더욱이, 공액체를 조제하는 데 소비되는 모든 시간은 이러한 준비기간 동안 붕괴될 토폴의 일 부분을 소모시킨다.

[0076] 본 발명의 모든 측면에서 알파-방출 토폴과 옥타덴테이트 리간드의 복합체는 60℃ 이상 가열하지 않고(예, 50℃ 이상 가열하지 않음), 바람직하게는 38℃ 이상 가열하지 않고, 가장 바람직하게는 25℃ 이상 가열하지 않고 형성되거나 또는 형성될 수 있는 것이 바람직하다.

[0077] 표적 모이어티와 옥타덴테이트 리간드의 공액체는 알파-방출 토폴 동위 원소(예, $^{227}\text{Th}^{4+}$ 이온)의 추가 전에 조제되는 것이 또한 바람직하다. 따라서, 본 발명의 생성물은 바람직하게는 옥타덴테이트 리간드 및 조직-표적 모이어티의 공액체에 의한 알파-방출 토폴 동위 원소(예, $^{227}\text{Th}^{4+}$ 이온)의 복합체화에 의해 형성되거나 또는 형성될 수 있다.

- [0078] 킬레이터들은 비-포스포네이트 분자들일 수 있고, 본 발명의 일 구현예에서 ^{227}Th 는 임의의 포스포네이트에 또는 다른 골-표적 기에 부착되지 않을 것이고, 그러한 물질들과 함께 투여되지도 않을 것이다.
- [0079] 본 발명자들은 이제, 4개의 HOPO 모이어티들을 포함하는 옥타덴테이트 히드록시피리딘-함유 리간드 및 알파-방출 토폴 방사성 핵종의 이온을 포함하는 복합체가 실온에서 그리고/또는 생리학적 온도에서(예, 20℃ 또는 37℃에서) 아주 쉽게 생성될 수 있다는 것을 규명하였다. 그러한 복합체들은 신속하게 생성될 수 있고, 또한 생성 온도는 비교적 낮기 때문에 토폴 성분의 복합체화는 리간드 모이어티가 조직-표적 모이어티에 결합되거나 또는 달리 공액된 후에 발생할 수 있고, 그에 따라 방사선 동위 원소의 추가 후 요구되는 단계들의 수가 감소된다.
- [0080] 상기한 현상 외에, 적어도 하나의 HOPO 모이어티가 히드록시알킬 가용화 기를 포함하는 4개의 HOPO 모이어티들을 포함하는 옥타덴테이트 히드록시피리딘-함유 리간드의 더 큰 수용성 특성은 완전한 공액체의 제조의 용이성을 더욱 증진시키는 역할을 한다. 특히, 공액체를 제조하는 동안 소수성 킬레이터는, 예컨대 이전에 알려진 옥토펜테이트 리간드는 유기 용매에, 예컨대 DMSO 또는 DMA에 용해되어야 한다. 공액 후 모든 미량의 유기 용매의 제거는 필요하지만, 그러한 비-휘발성 극성 유기 용매의 경우는 어렵고 완전한 제거는 분석적으로 입증하기 어렵다. 방사성 핵종은 계속 붕괴하고 공액체의 효능은 시간 경과에 따라 감소되기 때문에 알파-방출체가 함유된 경우에 분석에 쓴 시간은 분명히 바람직하지 못하다.
- [0081] 유기 용매에 대한 요구 조건 때문에, 소수성 킬레이터는 단백질성 표적 분자 뿐만 아니라 표면에 PEG 또는 텍스트란을 갖는 나노입자들을 포함하여, 더 친수성인 대안의 표적 분자와도 결합하는 것이 호락호락하지 않다.
- [0082] PEG 또는 대안의 친수성의 고도의 수용성 스페이서(spacer)는, 연장된 반감기 또는 면역 반응을 감소시키는 것과 같은 생물학적 이유로 원할 수 있다. 단백질에 공액하기 전에 킬레이터 - PEG 유닛의 제조도 또한 두 부분의 용해성 특성들의 차이로 인해 호락호락하지 않다.
- [0083] PEG, 또는 유사한 스페이서는 더 많은 친수성을 킬레이트화 모이어티와 담체 단백질 사이의 분자 내로 유입시킨다. 그러나, 이러한 현상은 단지 상기 킬레이터를 상기 담체 단백질로부터 더 멀리 이동시키는 한편, 킬레이터의 소수성은 영향받지 않는다. 따라서, 소수성 킬레이터는 여전히(PEG화된) 표적 분자의 표면의 소수성 스팟으로서 인지될 수 있고, 본원에서 상기 고찰된 바와 같은 바람직하지 못한 반응들을 발생시킬 수 있다.
- [0084] 다양한 유형의 표적 화합물이 옥타덴테이트 킬레이터(본원에 기술된 결합 모이어티를 포함함)를 통해 토폴(예, 토폴-227)에 연결될 수 있다. 상기 표적 모이어티는 알려진 표적 기들에서 선택될 수 있고, 이 기들은 모노클로날 또는 폴리클로날 항체, 성장 인자, 펩티드, 호르몬 및 호르몬 유사체, 염산 및 염산 유도체, 비오틴, 아비딘 및 스트렙타비딘 또는 그것들의 유사체들을 포함한다. 다른 가능한 표적 기들은 RNA, DNA, 또는 그들의 단편들(예컨대, 앵타머), 올리고뉴클레오타이드, 탄수화물, 지질을 포함하거나, 또는 단백질 등을 갖거나 갖지 않는 그러한 기들을 결합함으로써 만든 화합물을 포함한다. PEG 모이어티들은 상기에 나타낸 바와 같이, 예컨대, 생물학적 잔류 시간을 증가시키고/시키거나 면역 자극을 감소시키기 위해 포함될 수 있다.
- [0085] 조직 표적 모이어티는, 일 구현예에서, 골 친화물질, 리포솜 및 염산 공액된 항체 또는 항체 단편을 제외시킬 수 있다. 대안으로, 그러한 모이어티들이 포함될 수 있다.
- [0086] 본 발명의 토폴을 써서(예, 토폴-227) 표식된 분자들은 질병과 관련이 있는 수용체들을 표적화함으로써 암성 또는 비-암성 질병들의 치료에 사용될 수 있다. 통상적으로, ^{227}Th 의 그러한 의학적 용도는 암성(cancerous) 또는 비암성(non-cancerous) 질병의 치료를 위해 ^{227}Th 를 킬레이터에 의해 항체, 항체 단편, 또는 항체의 작제물 또는 항체 단편에 연결시키는 것에 기초한 방사선 면역 요법에 의한 용도가 될 것이다. 본 발명에 따른 방법 및 제약품에서 ^{227}Th 의 용도는 암종, 육종, 림프종 및 백혈병, 특히, 폐, 유방, 전립선, 방광, 신장, 위, 췌장, 식도, 뇌, 난소, 자궁의 암, 구강암, 결장암, 흑색종, 다발성 골수종 및 비-호지킨(non-Hodgkin's) 림프종을 포함하는 임의의 형태의 암 치료에 특히 적합하다.
- [0087] 방사성 핵종은 높은 비율의 ^{227}Th 가 ^{223}Ra 로 붕괴하기 전에 대부분 소실될 수 있기 때문에 ^{227}Th 를 전달하는 분자가 생체 내에서 짧은 생물학적 잔류 반감기를 갖는 경우 방출되는 ^{223}Ra 의 양은 감소될 수 있다. 그러나, ^{227}Th 의 양은 본 발명에 따라 치료학적으로 효과적으로 남기 위해 증가될 필요가 있다. 복합체가 ^{227}Th 를 표적화된 세포들의 내부로 전달하도록 선택되는 경우, 이로 인해 특이적 세포 독성이 더 증가될 것이고, 종양 부위에서 딸 동위 원소들의 적어도 부분적인 잔류 때문에 방사성 딸들의 전신성 독성 효과가 감소될 것이다. 이들 특정

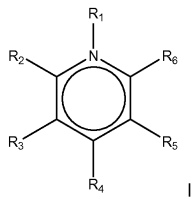
모두는 ^{227}Th 치료 기회의 창을 확대하고, 따라서 본 발명의 바람직한 구현예들을 형성한다.

[0088]

본 발명의 더 심층적 구현예에서, 연조직 질병과 골격 질병, 둘 모두를 갖는 환자는 투여된 토폴에 의해 생체 내에서 생성된 ^{227}Th 에 의해서 그리고 ^{223}Ra 에 의해서, 두 가지 모두에 의해서 치료될 수 있다. 이렇게 특히 유리한 측면에서, 치료에 쓰이는 별도의 치료 성분은 골격 질병의 표적화에 의해 용인할 수 있는 정도의 비-골수 독성량의 ^{223}Ra 에서 유도된다. 이러한 치료 방법에서, ^{227}Th 는 연조직의 일차/및 전이성 암의 적합한 표적화에 의해 당해 암을 치료하는 데 통상적으로 이용하고, ^{227}Th 붕괴로 인하여 생성된 ^{223}Ra 는 동일한 대상자에서 관련된 골격 질병을 치료하는 데 이용된다. 이러한 골격 질병은 일차 연조직 암에 기인하여 골격으로 전이될 수 있거나, 또는 연조직 치료가 전이성 암에 대응하는 경우에 일차 질병일 수 있다. 때때로 연조직 질병과 골격 질병은 관련이 없을 수 있다(예, 류머티즘학적 연조직 질병이 있는 환자에서 골격 질병의 추가 치료).

[0089]

모든 측면들 중에서 본 발명의 중요한 측면은 옥타덴테이트 리간드, 특히 4개의 HOPO 모이어티들을 포함하는 옥타덴테이트 히드록시피리딘-함유 리간드의 용도이다. 그러한 리간드는 통상적으로 각각 독립적으로 다음과 같은 치환된 피리딘 구조(I)를 갖는 적어도 4개의 킬레이트화 기들을 포함할 것이다:



[0090]

[0091]

상기 식에서, R_1 은 화학식 I의 4개의 모이어티 중 적어도 하나에 존재할 것이고 2개, 3개 또는 4개 전부의 그러한 모이어티들에 존재할 수 있는 임의의 N-치환기 가용화 기이다. 따라서, R_1 은 존재하지 않을 수 있거나 OH 및 히드록시알킬 모이어티들에서 선택될 수 있다. 적합한 히드록시알킬 모이어티는 적어도 하나의 OH 기를 포함할 것이지만, 선택적으로 1개 이상, 예컨대 2개, 3개 또는 4개의 OH 기들을 포함할 수 있다. 1개 또는 2개의 OH 기들이 히드록시알킬 모이어티에서 가장 바람직하다.

[0092]

HOPO 모이어티의 피리딘은 고리 상의 질소(특히, 3,2-HOPO 및 2,3-HOPO)는 고리의 특성에 심하게 영향을 미치지 않으면서 친수성 치환기들을 유입할 적합한 지점이고, 중요하게는 담체 단백질 또는 다른 표적 분자에 상기 분자를 공액시킨 후 밖으로 향하게 될 것이다. 우리는 이미 이 위치에 메틸 기(group)를 갖는 피리미돈 고리에 기초한 킬레이터가 토폴 이온의 킬레이트화에 적합하다는 것을 입증하였다. 신규한 킬레이터들은 N-위치에 히드록시에틸을 포함하는, 대안적인 도입된 기들을 갖는다. 놀랍게도, 메틸에서 히드록시에틸까지의 작은 변화는 순수한 물에 완전히 용해된 킬레이터를 초래하였다. 이러한 분자 및 일부 관련된 예들은 아래에 도시된다.

[0093]

본원에 사용된 바와 같이, 모든 히드로카르빌 모이어티는 C1 내지 C8 알킬, 알케닐 또는 알키닐 기들을 포함하여 C1 내지 C8 히드로카르빌과 같은 짧은 히드로카르빌 기들에서 독립적으로 선택된다. 상응하여, 알킬 기들은 메틸, 에틸, n-또는 이소-프로필, n-, 이소- 또는 sec-부틸 등과 같은 직쇄 또는 분지쇄 C1 내지 C8 알킬 기들일 것이다.

[0094]

매우 바람직한 R_1 기들은 알킬 사슬의 탄소 원자에 부착된 1개, 2개 또는 그 이상의 히드록시 기들을 갖는 직쇄 또는 분지쇄 알킬 기들(예컨대, 위에 나타낸 것들)을 포함한다. 일부 매우 바람직한 히드록시알킬 기들은 히드록시메틸, 히드록시에틸, 히드록시 n-프로필, 히드록시 이소-프로필, 디-히드록시 n-프로필(예, 1,2-, 2,3- 또는 1,3-디-히드록시 프로필), 히드록시 n-부틸, 디-히드록시 n-부틸 및 트리-히드록시 n-부틸을 포함하고, 히드록시에틸이 가장 높게 바람직하다. 일 구현예에서, 옥타덴테이트 리간드의 4개의 HOPO 모이어티 각각은 R_1 위치에서 히드록시알킬(예컨대 히드록시에틸) 기를 포함할 것이다. 더 심층적 구현예에서, 모두 4개의 HOPO 모이어티들은 동일한 히드록시알킬 기를 포함할 것이다(예, 모두 4개의 HOPO 기들은 히드록시에틸로 N-치환되거나 또는 모두 4개가 디-히드록시 프로필로 치환될 것이다).

[0095]

매우 바람직한 구현예에서, 모두 4개의 HOPO 기들은 3,2 HOPO 및 2,3, HOPO 기들에서 선택된 동일한 HOPO 기일 것이다. 더 심층적인 매우 바람직한 구현예에서(임의로 이전의 구현예와 조합될 수 있음), 모두 4개의 HOPO 기들은 히드록시메틸, 히드록시에틸, 히드록시 프로필, 히드록시부틸, 디히드록시프로필 및 디히드록시부틸에서 선택된 동일한 히드록시알킬 기에 의해 N-치환될 것이다. 이 목록 중에서 히드록시에틸, 히드록시프로필 및 디

히드록시프로필이 가장 바람직하다.

[0096] 화학식 I에서, R_2 내지 R_6 기들은 각각 독립적으로 H, OH, =O, (본원에 기술된) 짧은 히드로카르빌, (본원에 기술된) 링커 모이어티 및/또는(본원에 기술된) 결합 모이어티에서 선택될 수 있다. 일반적으로, R_2 내지 R_6 기들의 적어도 하나는 OH일 것이다. 일반적으로, 바로 R_2 내지 R_6 기들의 적어도 하나는 =O일 것이다. 일반적으로, R_2 내지 R_6 기들의 적어도 하나는(본원에 기술된) 링커 모이어티일 것이다. 바람직하게는, 바로 R_2 내지 R_6 기들 중 하나는 =O일 것이다. 바람직하게는, 바로 R_2 내지 R_6 기들 중 하계 하나는 OH일 것이다. 바람직하게는, 바로 R_2 내지 R_6 기들 중 하나는(본원에 기술된) 링커 모이어티일 것이다. 나머지 R_2 내지 R_6 기들은 본원에 지시된 그들 모이어티들 중 임의의 것일 수 있지만, 바람직하게는 H이다. 링커 모이어티 또는 임의의 추가 링커, 링커 모이어티에 부착된 템플레이트 또는 킬레이트화 기들이 결합 모이어티를 포함하지 않는 경우 R_1 내지 R_6 기들 중의 하나는 바람직하게는(본원에 기술된) 결합 모이어티이다.

[0097] 바람직한 구현예에서, R_2 내지 R_6 기들 중 하나는 OH일 것이고, R_2 내지 R_6 기들 중 하나는 =O일 것이고, 상기 OH 및 =O 기들은 고리의 이웃하는 원자일 것이다. 따라서, 바람직한 구현예에서, OH 및 =O는 각각 원자들 2,3; 3,2; 3,4; 또는 4,3(예상되는 바와 같이 질소에서부터 번호 매김)에 존재할 것이다. OH 및 =O 기들이 위치들 3 및 2에 각각 존재하는 적어도 하나의 킬레이트화 모이어티를 갖는 옥타덴테이트 리간드가 매우 바람직하다. 상기 옥타덴테이트 리간드는 2, 3 또는 4개의 그러한 킬레이트화 기들을 가질 수 있고, 이 경우에 2 또는 4개의 그러한 기들이 매우 바람직하다. N-치환된 3,2-HOPO 모이어티들은 옥타덴테이트 리간드의 모든 4개의 복합체화 모이어티로서 매우 바람직하다.

[0098] 적합한 킬레이트화 모이어티들은 US 5,624,901(예, 실시예 1 및 2) 및 W02008/063721(모두 본원에 참고 문헌으로 인용됨)에 기술된 방법들을 포함하여 당업계에 알려진 방법들에 의해 형성될 수 있다.

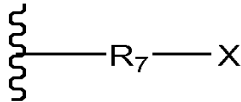
[0099] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "링커 모이어티"(화학식 II에서 R_L)는 옥타덴테이트 리간드에서 적어도 2개의 킬레이트화 기들을 결합시키는 역할을 하는 화학적 실체를 나타내는 데 사용하고, 이 리간드는 본 발명의 여러 측면에서 중요한 성분을 형성한다. 링커 모이어티들은 또한 상기 옥타덴테이트 리간드 부분을 상기 조직 표적 모이어티에 결합시킬 수 있다. 통상적으로, 각각의 킬레이트화 기(예, 상기 화학식 I 및/또는 아래 화학식 II의 킬레이트화 기)는 2좌(bi-dentate)이고 그러므로 4개의 킬레이트화 기들일 것이고, 그 중 적어도 하나는 화학식 I을 갖고, 이는 통상적으로 상기 리간드에 존재할 것이다. 그러한 킬레이트화 기들은 그들의 링커 모이어티들에 의해 상호 결합된다. 따라서, 링커 모이어티(예, 아래 R_L 기)는 화학식 I 및/또는 II의 하나 이상의 킬레이트화 기 사이에 공유될 수 있다. 상기 링커 모이어티들은 또한 옥타덴테이트 리간드와 표적 모이어티의 복합체화 부분 사이에서 부착 지점으로서의 역할도 할 수 있다. 그러한 경우에, 적어도 하나의 링커 모이어티는 결합 모이어티(R_c)에 결합할 것이다. 적합한 링커 모이어티들은 모든 위상의 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸 및/또는 헥실 기들을 포함하여, C1 내지 C12 알킬, 알케닐오르알킬닐 또는 알킬닐 기를 포함하는 C1 내지 C12 히드로카르빌과 같은 짧은 히드로카르빌 기들을 포함한다.

[0100] 링커 모이어티들은 또한 에스테르, 에테르, 아민 및/또는 아마이드 기들을 포함하는 임의의 다른 적합한 강건한 화학적 연계될 수 있거나 또는 이들을 포함할 수 있다. 2개의 킬레이트화 모이어티를 결합시키는 원자들의 전체 수(하나 이상의 경로가 존재하는 경우 가장 짧은 경로에 의해 계수)는 복합체 형성을 위한 적합한 배치에서 킬레이트화 모이어티들을 구속하기 위해 일반적으로 제한될 수 있다. 따라서, 링커 모이어티들은 일반적으로 킬레이트화 모이어티들 사이의 15개 이하의 원자들, 바람직하게는, 1 내지 12개의 원자들, 더욱 바람직하게는 킬레이트화 모이어티들 사이에서 1 내지 10개의 원자들을 제공하기 위해 선택될 것이다. 링커 모이어티가 2개의 킬레이트화 모이어티를 직접적으로 결합시키는 경우, 상기 링커는 일반적으로 1 내지 12개 원자들의 길이, 바람직하게는 2 내지 10개(예컨대 에틸, 프로필, n-부틸 등)일 것이다. 상기 링커 모이어티가 중심 템플레이트(아래 참조)에 결합되는 경우 각각의 링커는 킬레이트화 모이어티들을 결합시키는 2개의 별개의 링커들에 의해 더 짧아질 수 있다. 1 내지 8개의 원자들, 바람직하게는 1 내지 6개의 원자들의 링커 길이가 이 경우에 바람직할 수 있다(메틸, 에틸 및 프로필이 적합하고, 한쪽 또는 양쪽 단부에 에스테르, 에테르 또는 아마이드 연계를 갖는 것들과 같은 기들이 적합하다).

[0101] 옥타덴테이트 리간드의 여러 가지 킬레이트화 기들을 상호 및/또는 중심 템플레이트에 연결하는 역할을 주로 하는 링커 모이어티 외에, 상기 옥타덴테이트는 바람직하게는 "결합 모이어티"(R_c)를 추가로 포함한다. 결합 모이

어티의 기능은 옥타텐테이트 리간드를 표적 모이어티에 연결시키는 것이다. 이는 공유 또는 비-공유 부착에 의해(예, 비오틴/아비딘(스트렙타비딘)과 같은 특이적 결합 쌍에 의해) 달성될 수 있다. 상기 기술된 링커 모이어티들은 가능성 있는 결합 모이어티들을 형성한다. 바람직하게는, 결합 모이어티는 킬레이트화 기들 중 하나에의 직접적인 공유 부착에 의해 또는 더 통상적으로는 링커 모이어티 또는 템플레이트에의 부착에 의해 상기 킬레이트화 기들에 공유적으로 연결될 것이다. 2개 이상의 결합 모이어티가 사용되어야 한다면, 각각의 결합 모이어티는 이용할 수 있는 부위들 중의 임의의 부위, 예컨대 임의의 템플레이트, 링커 또는 킬레이트화 기에 부착될 수 있다.

[0102] 일 구현예에서, 결합 모이어티는 다음과 같은 구조를 가질 수 있다:



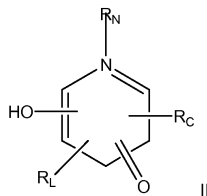
[0103]

[0104] 상기 식에서, R_7 은 가교 모이어티이고, 이는 치환되거나 치환되지 않은 알킬, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로 알킬, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로시클로알킬, 치환되거나 치환되지 않은 아릴 및 치환되거나 치환되지 않은 헤테로아릴에서 선택된 구성원이고; X는 표적 모이어티 또는 반응성 작용기이다. 바람직한 가교 모이어티들은 적합한 링커 모이어티와 같이 본원에 나타난 그러한 기들 모두를 포함한다. 바람직한 표적 모이어티들은 본원에 기술된 것들 모두를 포함하고, 바람직한 반응성 X 기들은 예를 들면, COOH , OH , SH , NHR 및 COH 기들을 포함하여 표적 모이어티에 공유 연계를 형성할 수 있는 임의의 기를 포함하고, 이 경우에 NHR 중 R은 H 또는 본원에 기술된 짧은 히드록카르빌 기들 중 임의의 기일 수 있다. 표적 모이어티에 부착하는 데 매우 바람직한 기들은 라이신 잔기들의 입실론-아민 및 시스테인 잔기들의 티올 기들을 포함한다.

[0105] 적합한 반응성 X 기들의 비제한적인 예는 N-히드록시석시미딜에스테르, 이미도에스테르, 아실할라이드, N-말레이미드, 알파-할로 아세틸 및 이소티오시아네이트를 포함하고, 이 경우에 후자 3가지는 티올 기와의 반응에 적합하다.

[0106] 결합 모이어티는 바람직하게 부착되어서 그 결과적으로 결합된 옥타텐테이트 리간드가 안정된 금속 이온 복합체들의 형성을 거칠 수 있다. 따라서, 상기 결합 모이어티는 바람직하게는 복합체화에 의해 현저히 간섭되지 않는 부위에서 링커, 템플레이트 또는 킬레이트화 모이어티에 연결될 것이다. 그러한 부위는 바람직하게는 링커 또는 템플레이트에 존재할 것이고, 더욱 바람직하게는 상기 표면 결합에서 상기 표적까지 먼 위치에 존재할 것이다.

[0107] 바람직한 킬레이트화 기들은 아래 화학식 II의 킬레이트화 기들을 포함한다:



[0108]

[0109] 상기 화학식 II에서, $=\text{O}$ 모이어티는 피리딘 고리의 임의의 탄소에 부착된 케토-기를 나타내고, $-\text{OH}$ 는 피리딘 고리의 임의의 탄소에 부착된 히드록시 모이어티를 나타내며, $-\text{R}_L$ 은 전체적인 옥타텐테이트 리간드를 형성하도록 다른 복합체화 모이어티들에 히드록시피리딘 모이어티를 부착시키는 링커 모이어티를 나타낸다. 본원에 기술된 임의의 링커 모이어티는, 모든 위상의 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸 및/또는 헥실 기들을 포함하여, C1 내지 C8 알킬, 알케닐 또는 알키닐 기를 포함하는 C1 내지 C8 히드록카르빌과 같은 짧은 히드록카르빌 기들을 포함하는 R_L 로서 적합하다. R_L 은 피리딘 고리의 임의의 탄소에서 화학식 II의 고리에 연결된다. 이어서, R_L 기들은 다시 또 하나의 킬레이트화 모이어티에, 또 하나의 링커 기에 그리고/또는 중심 원자 또는 기에, 예컨대 고리 또는(본원에 기술된) 다른 템플레이트에 직접적으로 결합할 수 있다. 링커들, 킬레이트화 기들 및 선택적 템플레이트 모이어티들은 적절한 옥타텐테이트 리간드를 형성하도록 선택된다.

[0110] 하나의 바람직한 구현예에서, 피리딘 고리의 이웃하는 원자들에 존재하는 화학식 II의 $-\text{OH}$ 및 $=\text{O}$ 모이어티들, 예컨대 2,3-, 3,2-; 4,3-; 및 3,4-히드록시피리딘은 유도체들은 모두 매우 적합하다.

[0111] R_L 모이어티는 피리딘 고리의 질소에 존재한다. R_N 기는 화학식 II의 일부 기에서 존재하지 않을 수 있고, 이

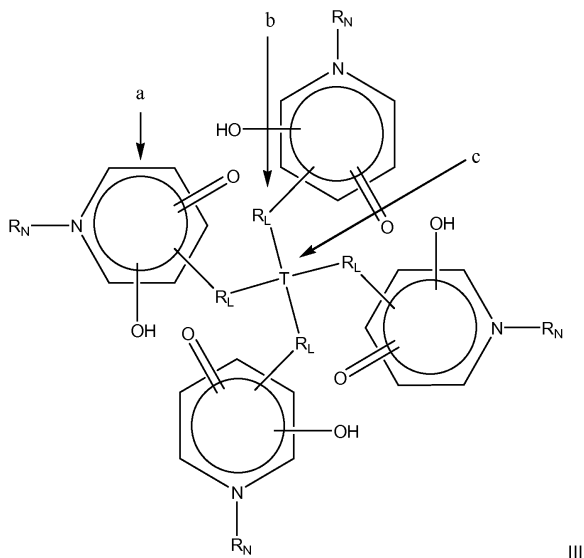
경우에 화학식 II의 1개 이상의 상이한 기는 옥타텐테이트 리간드에 존재한다. 그러나, 각각의 옥타텐테이트 리간드에서 적어도 하나의 R_N 기는 본원에 나타난 히드록시알킬 기일 것이다.

[0112] 하나의 바람직한 구현예에서, 적어도 하나의 3,2-히드록시피리디논 모이어티는 옥타텐테이트 리간드 구조에 존재한다. 이 모이어티는 본원에 나타난 여러 가지 치환기 모이어티들 중 임의의 모이어티로 치환될 수 있다.

[0113] 화학식 II의 모이어티들 각각은 2개의 잠재적 복합체화 산소를 갖기 때문에, 본 발명의 일 구현예는 화학식 II의 적어도 2개, 바람직하게는 적어도 3개, 그리고 가장 바람직하게는 4개의 독립적으로 선택된 모이어티들을 포함하는 옥타텐테이트 리간드를 제공한다. 화학식 II의 각각의 모이어티는 독립적인 치환 패턴을 가질 수 있지만, 하나의 바람직한 구현예에서, 적어도 하나의 모이어티는 3,2-히드록시피리디논 모이어티이다. 상기 리간드는 2, 3 또는 4개의 3,2-히드록시피리디논 모이어티들(적합한 바에 따라 치환됨, 본원에 기술됨)을 포함할 수 있다.

[0114] 옥타텐테이트 리간드에서 화학식 I 또는 II의 각각의 모이어티는 본원에서 그리고 임의의 적절한 위상에서 고찰된 임의의 적절한 링커 기에 의해 리간드의 나머지에 결합될 수 있다. 예를 들면, 화학식 I의 4개의 기들은 선형 리간드를 형성하도록 그들의 링커 기들에 의해 골격에 결합될 수 있거나, 또는 선형 또는 고리형일 수 있는 "올리고머" 형 구조를 형성하도록 링커 기들에 의해 가교될 수 있다. 대안적으로, 화학식 I 및/또는 II의 리간드 모이어티들은 각각 링커(예, " R_L " 모이어티)에 의해 "십자가" 또는 "별" 양상으로 중심 원자 또는 기에 결합될 수 있다. 링커(R_L) 모이어티들은 탄소-탄소 결합을 통해 단독으로 결합될 수 있거나, 또는 서로에게, 다른 킬레이트화 기들, 골격, 템플레이트, 결합 모이어티 또는 다른 링커에의 아민, 아마이드, 에스테르, 에테르, 티오-에테르 또는 디설파이드 결합을 포함하는 임의의 적절한 강력한 작용기에 의해 부착될 수 있다.

[0115] "별 모양의(stellar)" 배치는 아래 화학식 III으로 나타낸다:



[0116] 식 중에서, 모든 기들 및 위치들은 위에 나타난 바와 같으며 "T"는 추가적으로 중심 원자 또는 템플레이트 기, 예컨대 탄소 원자, 히드로카르비 사슬(예컨대, 상기 본원에 기술된 것들 중의 임의의 것), 지방족 또는 방향족 고리(헤테로사이클릭 고리를 포함함) 또는 융합된 고리 시스템이다. 가장 기본적인 템플레이트는 단일 탄소일 수 있고, 이어서 이들의 연결 기들에 의해 킬레이트화 모이어티들 각각에 부착될 수 있다. 에틸 또는 프로필과 같은 더 긴 사슬은 2개의 킬레이트화 모이어티들이 템플레이트의 각각의 단부에 부착된 상태에서 똑같이 독자 생존 가능하다. 분명히, 임의의 적합한 강고한 연계는 탄소-탄소 결합, 에스테르, 에테르, 아민, 아마이드, 티오-에테르 또는 디설파이드 결합을 포함하는 링커 모이어티들과 템플레이트를 연결하는 데 사용될 수 있다.

[0118] 분명히, 화학식 II III, IV 및 IVb의 구조들에서,(예, 링커 또는 결합 모이어티로) 달리 치환되지 않은 피리딘 고리(들)의 그러한 위치는, 적합한 바에 따라 화학식 I에서 R_1 내지 R_5 에 대해 기술된 치환기들을 운반할 수 있다. 특히, 작은 알킬 치환기들이, 예컨대 메틸, 에틸 또는 프로필 기들이 임의의 위치에 존재할 수 있다.

[0119] 옥타텐테이트 리간드는 일반적으로 상기 기술된 적어도 하나의 결합 모이어티를 추가적으로 포함할 것이다. 이

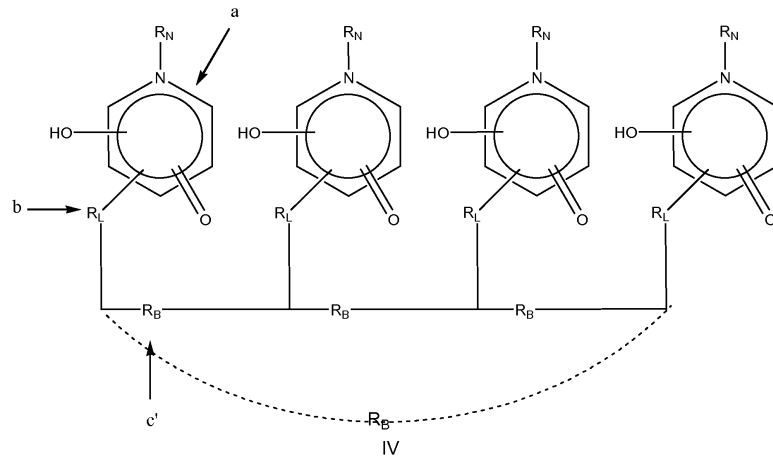
것은 본원에 나타난 모이어티들 중 임의의 모이어티를 포함하는 임의의 적합한 구조일 수 있고, 표적 모이어티, 특정 결합체 또는 그러한 표적 모이어티에 또는 특정 결합체에 연결될 수 있는 작용기에 의해 종료될 것이다.

[0120]

결합 모이어티는 화학식 III에 나타난 지점들 a), b) 및/또는 c)와 같이 링커, 템플레이트 또는 킬레이트화 모이어티의 임의의 적합한 지점에 부착될 수 있다. 결합 모이어티의 부착은 임의의 적합한 강건한 연계에 의해, 예컨대 탄소-탄소 결합들, 에스테르, 에테르, 아민, 아마이드, 티오-에테르 또는 디설파이드 결합에 의해 이루어질 수 있다. 유사하게, 상기 표적 모이어티에 대해 임의의 그러한 연계를 형성할 수 있는 기들은 상기 결합 모이어티의 기능성 단부에 적합하고 그 모이어티는 표적 부분에 부착되었을 때 그러한 기들로 끝날 것이다.

[0121]

대안의, "중추(backbone)" 형 구조는 아래 화학식 IV으로 나타낸다:



[0122]

[0123]

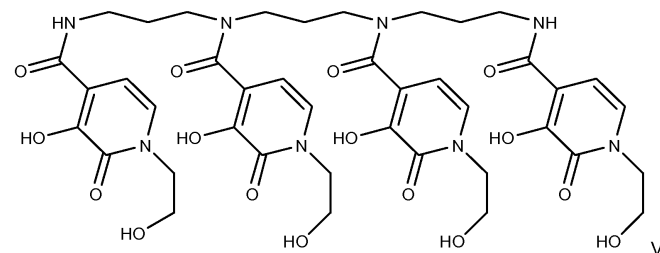
상기 식에서, 모든 기 및 위치는 위에 나타난 바와 같고, "R_B"는 추가적으로 중추 모이어티이고, 이것은 본원에 나타난 링커 모이어티들 중 임의의 링커 모이어티에 대한 유사한 구조 및 기능이 통상적으로 있을 것이고, 따라서 링커 모이어티의 임의의 정의는 문맥에 따라 중추 모이어티에 적용되도록 취할 수 있다. 적합한 중추 모이어티들은 킬레이트화 모이어티들이 그들의 링커 기들에 의해 부착됨에 따라 골격을 형성할 것이다. 보통 3개 또는 4개의 중추 모이어티들이 필요하다. 통상적으로 이것은 선형 중추에 대해 3개 또는 중추가 고리화되는 경우 4개일 것이다. 특히 바람직한 중추 모이어티들은 한쪽 또는 양쪽 단부에 임의로 헤테로원자 또는 기능성 모이어티를 갖는 짧은 탄화수소 사슬(예컨대, 본원에 기술된 사슬들)을 포함한다. 아민 및 아마이드 기들이 이러한 면에서 특히 적합하다.

[0124]

결합 모이어티는 화학식 IV에 나타난 바와 같은 지점들 a), b) 및/또는 c')와 같이 링커, 골격 또는 킬레이트화 모이어티의 임의의 적합한 지점에 부착될 수 있다. 결합 모이어티의 부착은 임의의 적합하게 강건한 연계에 의해, 예컨대 탄소-탄소 결합들, 에스테르, 에테르, 아민, 아마이드, 티오-에테르 또는 디설파이드 결합에 의해 이루어질 수 있다. 유사하게, 상기 표적 모이어티에 임의의 그러한 연계를 형성할 수 있는 기들은 상기 결합 모이어티의 기능성 단부에 대해 적합하고 그 모이어티는 표적 부분에 부착되었을 때 그러한 기들로 끝날 것이다.

[0125]

아미드 링커 기들에 의해 중추에 부착된 4개의 3,2-HOPO 킬레이트화 모이어티들(각각 히드록시에틸 가용화 기를 가짐)을 갖는 "중추"형 옥타텐테이트 리간드의 예는 다음과 같은 화학식 V가 될 것이다:



[0126]

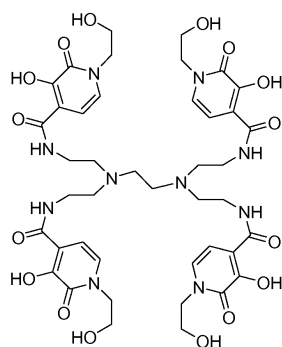
[0127]

분명히, 링커 기 R_L은 이러한 분자의 임의의 적합한 지점에, 예컨대 이차 아민 기들 중의 하나에 또는 중추 알킬 기들 중 임의의 기의 분지 지점으로서 추가될 수 있다. 작은 알킬 기들 모두, 예컨대 중추 프로필렌 또는 n-치환 에틸렌 기들은 다른 작은 알킬렌, 예컨대 본원에 기술된 기들 중 임의의 기(그것들 중에서 매우 적합한 메틸

렌, 에틸렌, 프로필렌, 및 부틸렌)로 치환될 수 있다.

[0128]

에틸 아미드 기들에 의해 에틸 및 프로필 디아민에 각각 연결된 4개의 3,2-HOPO 킬레이트화 모이어티들을 각각 갖는 예시적인 "템플레이트된(templated)" 옥타덴테이트 리간드들은 다음과 같은 화학식 VI이 될 것이다:



VI

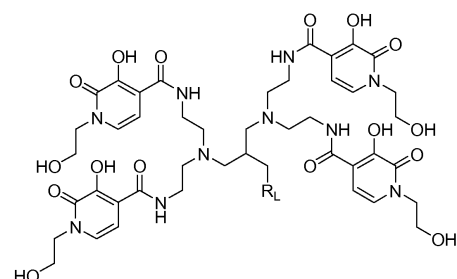
[0129]

[0130]

분명히, 에틸렌 모이어티들로서 화학식 VI에 나타난 알킬렌 기들 중 임의의 기는 다른 작은 알킬렌 기들, 예컨대 메틸렌, 프로필렌 또는 n-부틸렌로 독립적으로 치환될 수 있다. 일부 대칭성이 분자에서 유지되는 것이 바람직하고, 따라서, 예를 들면, 중앙 에틸렌 기는 프로필렌으로 치환될지도 모르는 한편, 다른 에틸렌 기들이 남아 있거나, 또는 HOPO 모이어티들을 하나 또는 양 중심 t-아민들에 연결시키는 2개의 에틸렌은 메틸렌 또는 프로필렌으로 치환될 수 있다. 유사하게, 본원에 고찰된 바와 같이, N-치환 기들은 본원에서 전반적으로 고찰된 임의의 다른 히드록시알킬 기로 치환될 수 있다.

[0131]

상기 지시된 바와 같이, 옥타덴테이트 리간드는 일반적으로 임의의 지점에서 리간드의 나머지에 결합될 수 있는 결합 모이어티를 포함할 것이다. 링커 부착에 적합한 지점은 아래 화학식 VI에서 도시된다:



VI

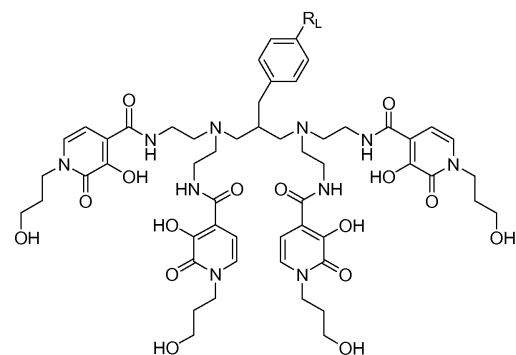
[0132]

[0133]

상기 식에서, R_L 은 특히 조직 표적 기에 부착하기 위한 임의의 적합한 연결 모이어티이다. 아민과 같은 활성 기에서 끝나는 C1 내지 C8 고리형, 분지쇄 또는 직쇄 방향족 또는 지방족 기와 같은 짧은 히드رو카르빌 기는 화학식 VI에서 그리고 본원 전역에서 R_L 기로서 매우 적합하다.

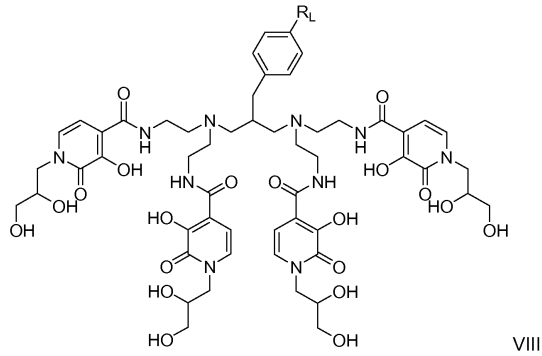
[0134]

리간드 부착을 위해 적합한 부위들을 보여주는 매우 바람직한 옥타덴테이트 리간드들은 아래 화학식 VII 및 VIII의 리간드들을 포함한다:



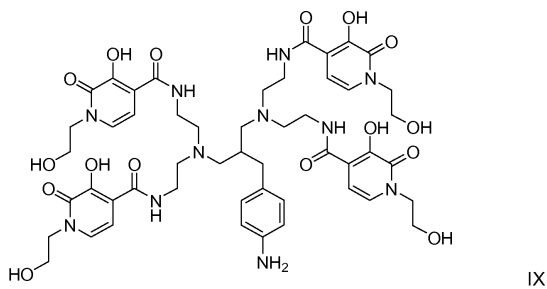
VII

[0135]

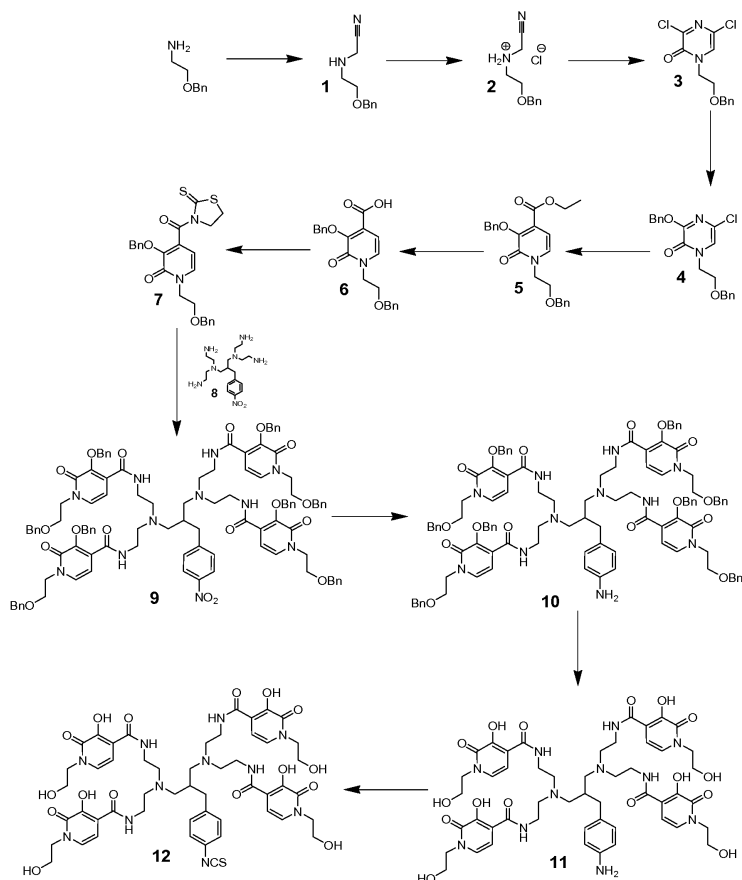


상기 화학식 VII 및 VIII에서, R_L 은 본원에 기술된 임의의 적합한 링커 기 또는 반응성 모이어티일 수 있다. R_L 은 통상적으로 표적 모이어티에 리간드를 부착하는 지점을 형성할 것이고, 따라서 임의의 적합한 반응성 기는 직접적으로 또는 추가의 링커를 사용하여 이러한 부착을 위해 사용될 수 있다. 화학식 VII 및 VIII에서 R_L 에 적합한 반응성 모이어티들은 NH_2 및 NCS 기들을 포함한다.

이러한 구현예에 따라, 결합 모이어티를 끝내는 작용화된 모이어티를 갖는 예시적인 화합물은 하기 구조 IX이다 (링커 페닐아민 기는 적절하게는 본원에 나타난 임의의 다른 R_L 기로, 예컨대 화합물 12의 NCS로 분명히 치환될 수 있다):



[0140] 화합물 IX의 합성은 본원에서 아래에 기술되어 있고 다음 합성 경로에 따른다:



[0141]

[0142] 본원에 인용된 모든 문헌은 이로써 Gordon AEV 등의 Rational design of sequestering agents for plutonium and other actinides. Chem. Rev. 2003, 103, 4207-4282, PCT 특허 출원 WO 2008/063721 A2 및 T.N. Lambert 등의 Tetrahedron Letters 43(2002) 7379-7383을 포함하여, 참고로서 포함된다.

[0143] 본 발명의 복합체들의 형성 방법들에서, 그 반응은 수용액에서 시행되는 것이 바람직하다. 이는 여러 가지 장점들을 갖는다. 첫째, 모든 용매를 용인할 수 있는 수준 이하로 제거하고 그러한 제거를 인증하는 제조업체에 대한 부담을 없앤다. 둘째로, 낭비를 감소시키고 가장 중요하게는 분리 또는 제거 단계를 피함으로써 생산을 가속화한다. 본 발명의 방사성 약제의 맥락에서, 방사선 동위 원소는 항상 붕괴할 것이고, 조제에 쓰는 시간은 귀중한 재료를 낭비하고 오염물 딸 동위 원소들을 유입하기 때문에 합성은 가능한 신속히 시행되는 것이 중요하다.

[0144] 일 구현예에서, 상기 방법은(본원 전역에 기술된) 옥타덴테이트 히드록시피리딘-함유 리간드의 제1 수용액 및(본원 전역에 기술된) 조직 표적 모이어티의 제2 수용액을 형성하는 단계 및 상기 제1 및 상기 제2 수용액을 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0145] 하나의 관련된 구현예에서, 본 발명의 형성 방법은 임의의 유기 용매의 실질적인 부재 하에 시행된다. 이러한 맥락에서, "유기 용매"는 실온에서 또는 실온 근처에서 액체이고, 적어도 하나의 탄소를 포함하는 물질의 자연적인 의미를 갖는다. 그러한 유기 용매는 통상적으로 탄화 수소, 알콜, 에스테르, 아마이드, 에스테르 및/또는 할로겐화된 모이어티들을 포함하고 그러한 용매는 본원에 언급된 수용액에서 바람직하게는 1 중량% 이하(예, 0.0001 내지 1 중량%), 바람직하게는 0.5 중량% 이하, 가장 바람직하게는 0.2 중량% 이하로 존재한다. 의문점을 피하기 위해, 본원에 언급된 표적 모이어티 및 리간드는 용어 "유기 용매"에 포함되지 않는다. 특정 유기 물질들, 예컨대 유기산, 아민 및 이들의 염은 수성 용매에서 pH 완충액으로서의 역할을 할 수 있도록 다소 더 높은 농도로 존재할 수 있다. 존재하는 경우, 이들은 일반적으로 10 중량% 이하(예, 0.001 내지 10 중량%), 바람직하게는 5 중량% 이하, 더욱 바람직하게는 1 중량% 이하의 농도로 존재할 것이다.

[0146] 적합한 결합 모이어티들이 위에 상세히 고찰되어 있고, 결합 및/또는 연결 기로서 본원에서 고찰된 모든 기 및 모이어티는 적절하게는 리간드에 대한 표적 모이어티의 결합에 사용될 수 있다. 일부 바람직한 결합 기들은 아

미드, 에스테르, 에테르 및 아민 결합 기들을 포함한다. 에스테르 및 아미드는 편리하게는 카르복실산으로부터 활성화된 에스테르 기들의 생성에 의해 형성될 수 있다. 그러한 카르복실산은 표적 모이어티에, 결합 모이어티에 그리고/또는 리간드 모이어티에 존재할 수 있고 통상적으로 알콜 또는 아민과 반응하여 에스테르 또는 아미드를 형성할 것이다. 그러한 방법들은 당업계에 매우 잘 알려져 있고, 이에 N-히드록시 말레이미드, 카르보다이미드 및/또는 아조디카르복실레이트 활성화제, 예컨대 DCC DIC DEAD DIAD 등을 포함하는 잘 알려진 활성화제를 이용될 수 있다.

[0147] 도면의 간단한 설명:

[0148] 도 1: 280 nm(a) 및 335 nm(b)에서 AGC1115의 SEC-UV 크로마토그램. 평균 킬레이터-대-항체 비율(CAR)은 대략적으로 0.9이다.

[0149] 도 2: CD22-양성 Raji 세포들 상의 유동 세포 계측법에 의해 분석된 AGC1100 및 AGC1115의 결합. 검출은 생쥐 항-인간 IgG Fc를 사용하여 시행하였고, PE 공액된 이차 항체 및 중간 형광 세기(MFI)를 일차 항체 nM의 로그 농도에 대하여 표시하였다. 트라스투주맵은 이소형 대조군으로서 사용하였다.

[0150] 도 3: Th-227로 표식된 AGC0015에 공액된 C22-결합 mAb AGC1115(채워진 원), Th-227로 표식된 AGC0015에 공액된 대조군 mAb 트라스투주맵(채워진 사각형), 또는 배양 배지(채워진 다이아몬드)에 의해 배양된 라모스(Ramos) 세포들. 두 mAbs는 동일한 특이적 활성(44 kBq/ μ g)에 이르기까지 Th-227로 표식하였고, 3 nM(A)에서 사용하였다.

[0151] 본 발명은 이하 다음의 비제한적인 실시예들에 의해 예시될 것이다. 실시예에서 예시된 모든 화합물은 본 발명의 바람직한 구현예를 형성하고(바람직한 중간체 및 전구 물질을 포함함), 문맥이 허용하는 임의의 측면에서 개별적으로 또는 임의의 조합으로 사용될 수 있다. 따라서, 예를 들면, 실시예 2의 화합물들 2 내지 4, 실시예 3의 화합물 10 및 실시예 4의 화합물 7 각각 및 모두는 이들의 다양한 유형의 바람직한 구현예들을 형성한다.

[0152] 실시예들에서, 다음의 항체들 및 항체 공액체들은 다음과 같이 지칭된다:

[0153] AG01100 - 실시예 3에서 생성된 항-CD22 항체

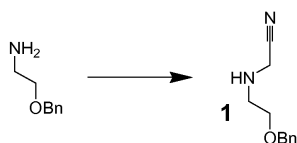
[0154] AG01115 - 높은-용해성 공액자(conjugator)(12)에 공액된 AG01100

[0155] **실시예 1 - 순수한 토륨-227의 분리**

[0156] 토륨-227을 악티늄-227 암소로부터 분리한다. 악티늄-227을 라듐-227($t_{1/2}=42.2$ m)의 악티늄-227로의 붕괴가 뒤따른 라듐-226의 열적 중성자 조사(thermal neutron irradiation)를 통해 생성하였다. 토륨-227을 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 8 M HNO₃ 용액에 함유된 악티늄-227 붕괴 혼합물로부터 선택적으로 잔류시켰다. AG[®] 1-X8 수지(200-400 메쉬, 질산염 형태) 70 mg을 함유하는 2 mm 내부 직경, 30 mm 길이의 컬럼을 사용하였다. 악티늄-227 다음에, 라듐-223 및 딸들을 상기 컬럼에서 용출시켰고, 토륨-227을 12 M HCl에 의해 상기 컬럼에서 추출하였다. 토륨-227을 함유하는 용출물을 건조될 때까지 증발하였고, 잔기를 0.01 M HCl에서 재현탁하였다.

[0157] **실시예 2 - 화합물 12의 합성**

[0158] **단계 1**



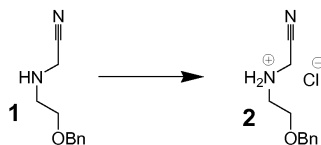
[0159]

[0160] 2-벤질옥시에틸아민(31g, 207mmol) 및 글리콜로니트릴(16mL, 수증 70% 용액, 207mmol)을 300mL EtOH(abs)에 용해하였고, 4시간 동안 환류하였다. 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 조질(crude) 생성물(24.7g, 130mmol)은 추가의 정제 없이 다음 단계로 넘겼다.

[0161] ¹H-NMR(CDC₃, 400MHz): 2.92(m, 2H), 3.58-3.62(m, 4H), 4.51(s, 2H), 7.25-7.37(m, 5H)

[0162]

단계 2



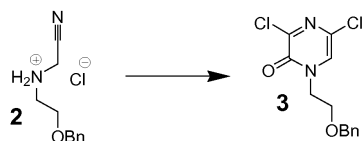
[0163]

[0164]

1(24.7g, 130 mmol)을 건식(dry) 에테르에 용해하였다. HCl(g)은 용액을 통해 30분 동안 거품을 일게 하였다. 침전물이 여과하고 감압 하에 건조되어 원하는 생성물(27.8g, 122.6 mmol)을 제공하였다. 생성물은 추가의 정제 또는 분석 없이 다음 단계로 넘겼다.

[0165]

단계 3



[0166]

[0167]

2(27.8g, 122.6 mmol)는 실온에서 230mL 클로로벤젠에 용해하였다. 100mL 클로로벤젠에 용해된 옥살릴 클로라이드(45mL, 530 mmol)를 실온에서 30분에 걸쳐 적가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 45시간 동안 교반하였다. 반응을 100mL 물의 적가에 의해 조심스럽게 급냉하였다. 상들을 분리하였고, 수성 상(aqueous phase)을 3*100mL DCM으로 추출하였다. 유기 상들을 결합하고 100mL 염수로 세척하였다. 상기 유기 상을 Na₂SO₄ 상에서 건조하고, 여과하고, 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 조질 생성물을 DCM 중의 MeOH(0-2%)의 구배(gradient)를 사용하여 SiO₂에 대한 건조 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하여, 원하는 생성물(21.2g, 70.8mmol)을 산출하였다.

[0168]

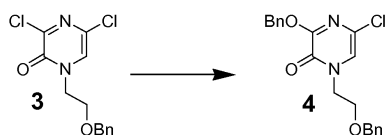
¹H-NMR(CDCl₃, 400MHz): 3.71-3.76(m, 2H), 4.06-4.12(m, 2H), 4.47(s, 2H), 7.217-7.22(m, 2H), 7.26-7.36(m, 4H)

[0169]

MS(ESI-pos, m/z,): 321.0

[0170]

단계 4



[0171]

[0172]

수소화 나트륨(60% 분산, 3.60g, 90mmol)을 0 °C에서 50mL THF 중에서 교반하였고, 벤질 알콜(8.3mL, 80mmol)을 10분에 걸쳐 적가하였다. 반응 혼합물을 100mL THF에 용해된 3(21.2g, 70.8mmol)이 0 °C에서 적가하기 전에 0 °C에서 30 분 동안 교반하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 밤새 암실에서 교반하였다. 반응 혼합물이 진공에서 환원되기 전에 디옥산(4M) 50mL HCl을 적가하였다. 500mL DCM을 첨가하였고, 이어서 200mL 물을 첨가하였다. 상기 상들을 분리하였고 수성 상을 200mL DCM으로 추출하였다. 유기 상들을 결합하고 100mL 염수로 세척하였다. 상기 유기 상들을 Na₂SO₄ 상에서 건조하고, 여과하고, 휘발물을 감압 하에 제거하였다. DCM 중의 MeOH(0-6%)의 구배를 사용하는 SiO₂에 대한 건조 플래쉬 크로마토그래피에 의해 원하는 생성물(25.6g, 69mmol)을 산출하였다.

[0173]

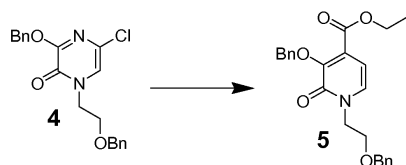
¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz): 3.69-3.75(m, 2H), 4.01-4.07(m, 2H), 4.46(s, 2H), 5.37(s, 2H), 6.97(s, 1H), 7.19-7.39(m, 8H), 7.44-7.51(m, 2H)

[0174]

MS(ESI-pos, m/z): 371.1, 763.2

[0175]

단계 5



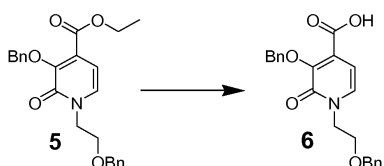
[0176]

[0177]

4(25.6g, 69 mmol) 및 에틸 프로피올레이트(41 mL, 0.4 mol)를 140 °C에서 5 시간 동안 가열하였다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각하였고 상기 반응 혼합물을 SiO₂에 대한 건조 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하였다. DCM 중의 MeOH(0-10%)의 구배에 의하여 5-이성질체와 함께 원하는 4-이성질체의 분리될 수 없는 혼합물로서 원하는 생성물을 산출하였다. 이러한 혼합물(28.6g, ~65 mmol)을 추가의 정제 없이 다음 단계에서 직접적으로 사용하였다.

[0178]

단계 6



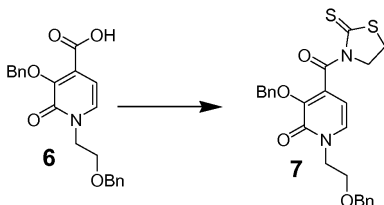
[0179]

[0180]

이전 단계에서 수득된 5(28.6g, ~65mmol)를 0 °C에서 300mL THF에 용해하였다. 100mL KOH(1M, aq)를 첨가하였고, 반응 혼합물은 실온에서 40 시간 동안 교반하였다. pH~2(125mL)로 될 때까지 HCL(1M, aq)을 첨가하였고 상기 수성 상을 3*250mL CHCl₃로 추출하였다. 유기 상들을 결합하고 100mL 염수로 세척하고, 여과하고, 휘발물을 진공에서 제거하였다. 수득된 물질(25.9g, ~65mmol)을 추가의 정제 또는 분석 없이 다음 단계에서 사용하였다.

[0181]

단계 7



[0182]

[0183]

이전 단계에서 수득된 6(25.9g, ~64mmol)을 400mL DCM에 부분적으로 용해하였다. 2-티아졸린-2-티올(8.94g, 75mmol) 및 DMAP(0.86g, 7mmol)을 첨가하였고, 이어서 DCC(15.48g, 75mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 상기 반응 혼합물을 셀라이트-패드를 통해 여과하였고 상기 셀라이트-패드를 100mL DCM으로 세척하였다. 휘발물을 진공에서 제거하였다. 상기 생성물 혼합물을 먼저 헵탄 중의 DCM(50-100%)의 구배, 이어서 DCM 중의 THF(0-15%)의 구배를 사용하여 SiO₂에 대한 건조 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 적절한 분획들은 진공에서 환원되어, 생성물들의 혼합물을 제공하였다. 이러한 불순한 혼합물은 헵탄 중의 EtOAc(25-75%)의 구배를 사용하여 SiO₂에 대한 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 적절한 분획들이 진공에서 환원되어, 생성물들의 혼합물을 제공하였다. 마지막으로, 원하는 생성물을 얻기 위해, 상기 생성물 혼합물을 수증의 MeCN(25-75%)의 구배를 사용하여 RP18-실리카에 대한 건조 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 이는 원하는 생성물(8.65g, 18mmol)을 제공하였다.

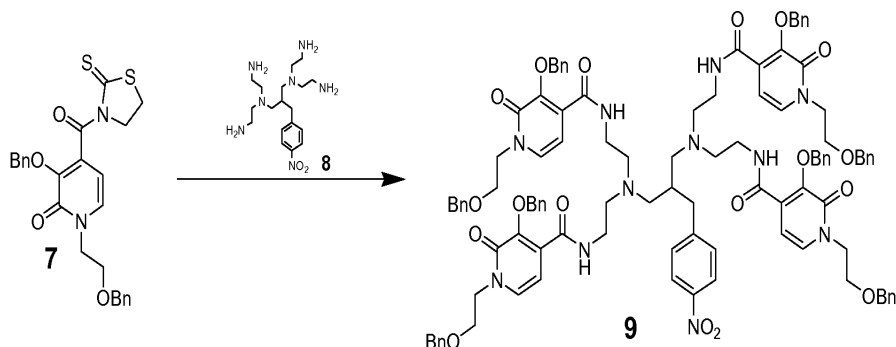
[0184]

¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz): 2.90(t, J=7.3Hz, 2H), 3.77-3.84(m, 2H), 4.18-4.23(m, 2H), 4.35(t, J=7.3Hz, 2H), 4.51(s, 2H), 5.33(s, 2H), 6.11(d, 7.0Hz, 1H), 7.21-7.48(m, 11H)

[0185]

MS(ESI-pos, m/z): 503.1

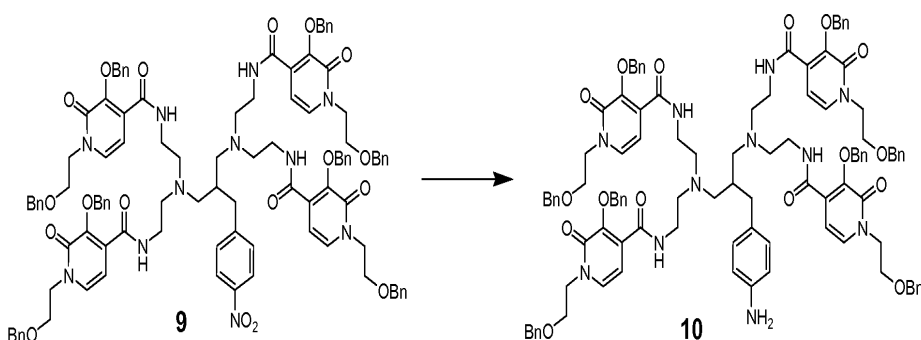
단계 8



7(5.77g, 12 mmol) 및 8(1.44g, 2.4 mmol)을 40mL DMPU에 부분적으로 용해하였다. DBU(2.7mL, 18mmol)를 적가하였다. 상기 반응을 실온에서 4일 동안 교반하였다. EtOAc 중의 DCM 및 MeOH의 구배를 사용하는 SiO₂에 대한 건조 플래쉬 크로마토그래피에 의한 정제는 원하는 생성물(3.93g, 2.15mmol)을 제공하였다.

¹H-NMR(CDCl₃, 400MHz): 2.20-2.32(m, 10H), 2.44-2.50(m, 2H), 3.05-3.20(m, 10H), 3.23-3.27(m, 1H), 3.69-3.77(m, 8H), 4.06-4.15(m, 8H), 4.43(s, 8H), 5.24(s, 8H), 6.62(d, *J*=7.2Hz, 4H), 7.13(d, *J*=7.2Hz, 4H), 7.16-7.38(m, 42H), 7.82-7.93(m, 6H)

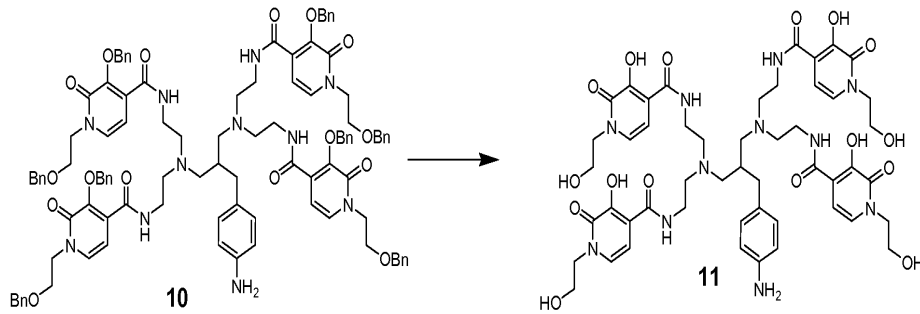
단계 9



9(3.93g, 2.15mmol)를 실온에서 300mL EtOH에 용해하였다. 60mL 물을 첨가하였고, 이어서 NH₄Cl(5.94g, 32.3mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물은 철 분말(1.80g, 32.3mmol)이 첨가되기 전에 60 °C로 하였다. 상기 반응 혼합물을 60 °C에서 1 시간 동안 교반하였다. 상기 반응 혼합물을 실온으로 냉각하였고 400mL DCM 및 100mL 물을 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 여과하였고, 상기 유기 상을 100mL 물 및 100mL 염수로 세척하였다. 수성 상들을 결합하고 3*100mL DCM으로 다시 추출하였다. 유기 상들을 결합하고, Na₂SO₄ 위에서 건조하고, 여과하고, 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 생성물 혼합물을 DCM 중의 MeOH(0-7%)의 구배를 사용하여 SiO₂에 대한 건조 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제되어 원하는 생성물(3.52g, 1.96mmol)을 산출하였다.

MS(ESI-pos, *m/z*): 899.2

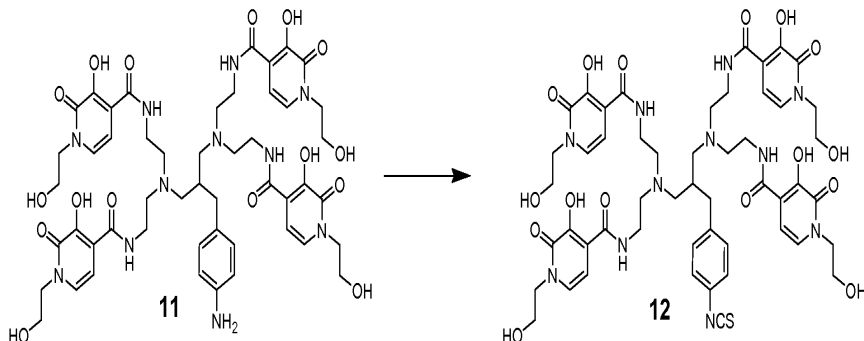
단계 10



10(1.00g, 0.56mmol), $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (펄먼(Pearlman))의 촉매, 1.00g) 및 10mL AcOH를 압력 반응기에 넣었다. 반응기를 물 흡입기에 의해 비웠고 H_2 를 유입시켰다(7 바(bar)). 반응 혼합물을 압력이 해제되기 전에 1시간 동안 교반하였고, 5mL HCl(6M, aq)이 반응 혼합물에 첨가하였다. 반응기를 이전과 같이 비웠고 H_2 는 일단 다시 유입시켰다(7 바(bar)). 7일 동안 교반 후, HPLC는 완전한 전환을 나타냈다. 반응 혼합물을 여과하고 휘발물을 감압하에 제거하였다. 잔류물을 MeOH/MeCN(1:1)에 용해하였고 생성물을 Et_2O 의 첨가에 의해 침전시켰다. 고형물은 원심 분리에 의해서 그리고 생성물이 진공에서 건조되기 전에 상청액을 따라냄으로써 수집하였다(484mg, 0.45mmol).

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O}, 400\text{MHz})$: 2.70-2.95(m, 2H), 3.00-3.10(m, 2H), 3.15-3.65(m, 19H), 3.75-4.23(m, 16H), 6.25(bs, 4H), 7.04(d, $J=7.0\text{Hz}$, 4H), 7.44(d, $J=8.2\text{Hz}$, 2H), 7.57(d, $J=8.2\text{Hz}$, 2H) MS(ESI-pos, m/z): 1076.4

단계 11



화합물 11(20mg, 18 μmol)을 3mL MeCN 및 3mL 물에 용해하였다. 20 μL 티오포스젠(thiophosgene)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 1 시간 동안 엄격하게 교반하였다. 휘발물을 감압하에 제거하였고 잔류물을 4mL MeCN에 용해하였다. 생성물은 아세토니트릴 상을 40mL Et_2O 에 첨가함으로써 침전시켰다. 고형물은 원심 분리에 의해서 및 생성물이 진공에서 건조되기 전에 상청액을 따라냄으로써 수집하였다(10mg, 9 μmol).

MS(ESI-pos, m/z): 1118.4

실시예 3 - 항-CD22 모노클로날 항체(AGC1100)의 생성.

에프라투주맙이라 칭하기도 하고, 여기서 AGC1100을 나타내는 모노클로날 항체(mAb) hLL2의 서열은 (1)에 기술된 바와 같이 작성하였다. 본 실시예에 사용된 mAb는 Immunomedics Inc, New Jersey, USA가 생산하였다. 이러한 mAb의 생산은 예를 들면 경채 및 증쇄를 인코딩하는 유전자들을 인코딩하는 플라스미드로 형질 감염된 중국 햄스터 난소 현탁(CHO-S) 세포에서 시행될 수 있다. 우선 안정적인 클론이 표준 절차들을 사용하기 위해 선택될 것이다. 일회용 생체 반응기에서 대략 14 일 후에, 모노클로날 항체는 상청액의 여과 후에 수확될 수 있다. AGC1100는 단백질 A 친화도 크로마토그래피(MabSelect SuRe, Atoll, Weingarten/Germany)에 의해, 이어서 이온 교환 단계에 의해 추가로 정제될 것이다. 정전기 및 소수성에 기초한 제3 정제 단계는 응집물 및 잠재적으로 남

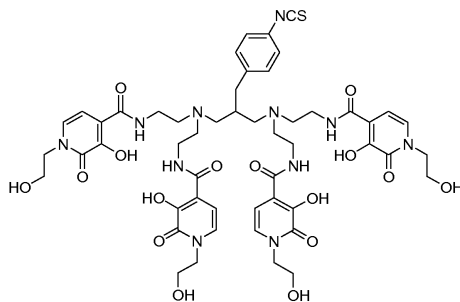
아 있는 불순물을 제거하기 위해 사용될 수 있다. AGC1100의 정체성은 등전점 전기영동, SDS-PAGE 분석, N-말단 서열화 및 LC/MS 분석에 의해 확인될 것이다. 샘플 순도는 크기-배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 추가로 분석될 것이다.

참고 문헌:

(1) Leung, Goldenberg, Dion, Pellegrini, Shevitz, Shih, and Hansen. Molecular Immunology 32: 1413-27, 1995.

실시예 4: AGC1100의 킬레이터 AGC0015와의 공액.

항체 AGC1100은 수용성 킬레이터 AGC0015와 공액되었다. (12) 공액 반응은 pH 8.5의 70 mM 붕산염 완충액과 혼합된 PBS의 1:1(v/v) 혼합물에서 시행되었다. 킬레이터 AGC0015는 아래 도시된 바와 같다:



12

킬레이터 AGC0015(상기 12)를 그것이 공액 반응에 첨가되기 전에 금속 없는 물에 용해하였다. 1.3:1의 공칭 물 킬레이터 대 항체 비율을 사용하였고, 21 °C에서 22 시간 동안 배양하였다. 반응 시간의 종료 시에 항체 분획을 HiLoad Superdex 200 16/600 PG 컬럼(GE Healthcare; part.no. 29-9893-35) 및 이동상으로서 pH 5.5의 0.9% NaCl 100 mM 시트레이트 완충액을 사용하여 ÄKTA 정화기(GE Healthcare)에서 크기 배제 크로마토그래피에 의해 유리 킬레이터로부터 분리하였다. 정제된 공액체들의 최종 킬레이터-항체-비율(CAR)을 HPLC 크기 배제 크로마토그래피-UV(SEC-UV) 분석에 의해 측정하였다. CAR 결정을 Agilent 1200 시리즈 HPLC 시스템(Agilent Technologies)에서 실온에서 유지된 4.6 x 300 mm, 4 µm 입자들의 컬럼 TSKgel SuperSW 3000(Tosoh Bioscience, 부품 번호. 18675) 및 pH 6.8(등용매(isocratic) 용출)의 이동 상 300 mM NaCl 200 mM 아세트산 암모늄에 의해 15분의 전체 시행 시간으로 시행하였다. 주입 부피는 5 µl이었고 LC 유동률은 0.35 ml/분이었다. UV 신호들은 각각 mAb 및 킬레이터 최대 흡광도에 상응하는 280 및 335 nm에서 모니터링하였다. CAR-결정의 대표적인 결과는 도 1에 나와 있다.

실시예 5: 항체/킬레이터 공액체 AGC1115의 Th-227과의 킬레이트화

4+ 이온으로서 토륨-227(²²⁷Th)을 악티늄-227(²²⁷Ac) 발생기 시스템에서 분리하였다. ²²⁷Th을 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 8M HNO₃ 중의 ²²⁷Ac 붕괴 혼합물에서 선택적으로 잔류시켰고, 여기서 음으로 하전된 질산염 복합체는 ²²⁷Th⁴⁺과 함께 형성된다. ²²⁷Ac 및 딸 핵종을 컬럼에서 세척하였고 ²²⁷Th을 12M HCl에서 용출하였다. 상기 ²²⁷Th-용출물을 건조될때까지 증발시켰고 잔류물을 0.5M HCl에 용해하였다.

킬레이트화 반응에서 항체-공액체 AGC1115는 0.5 mg의 항체 공액체당 1 MBq ²²⁷Th의 존재 하의 21 °C/실온에서 pH 5.5의 0.9% NaCl 100 mM 시트르산염 완충액에서 15분 동안 배양하였다. 방사선으로 써서 표식된 항체-공액체를 함유하는 고분자 분획은 NAP-5 DNA Grade 컬럼(GE Healthcare)을 사용하여 크기 배제 크로마토그래피에 의해 유리 ²²⁷Th 및 딸 핵종에서 분리하였다. 표식 효율은 NAP-5 탈염 단계에서의 잠재적인 손실을 포함하여 통상적으로 96-98%였다.

실시예 6: 유동 세포 계측법에 의한 CD22-양성 Raji 세포들에 대한 AGC1115 및 AGC1100의 결합 분석.

CD22-양성 Raji 세포(ATCC, #CCL-86)에 대한 AGC1115 및 AGC1100(항-인간 CD22, Immunomedics; hLL2, #1003164, 10 mg/ml)의 결합을 유동 세포 계측법에 의해 분석하였다. 보관된 곡선으로부터 결정된 EC₅₀ 값을 항체 대 항체 공액체 결합 효능의 비교를 위해 사용하였다. 이러한 분석은 CD22에 대한 항체 공액체 결합 효능은

공액 절차에 의해 영향받지 않음을 확인하기 위해 사용되었다.

[0215] Raji 세포를 RPMI 1640(PAA; #E 15-840)에서 10% 소 태아 혈청(FBS) 및 1 % 페니실린/스트렙토마이신의 존재 하에 성장시켰다. 유동 세포 계측법 분석을 위해 50 ml의 세포 배양액이 4℃에서 5분 동안 340xg으로 원심 분리 에 의해 수확하였다. 세포를 재현탁하고 1 % FBS로 보충된 10 ml PBS 에서 2회 세척하였고, 4℃에서 5 분 동안 340xg으로 원심 분리에 의해 펠렛화하였다. 순차적으로, 재현탁된 세포의 20 μ l의 제제를 1:500으로 Coulter Isoton II 희석제로 희석하였고, Beckman Coulter Z2 도구화(instrumentation)(Beckman Coulter; CA, USA)를 사용하여 계수하였다. 상기 제제를 1×10^6 세포들/ml의 세포 밀도까지 조절하였고, 100 μ L를 V-자형 바닥 96-웰 플레이트(Nunc/Fisher Scientific; NH, USA) 내의 각각의 웰로 옮겼다. 세포를 스핀 다운하고, 기울여 따른 후 재현탁하였고, 이는 결과로 웰 당 50 μ l 세포 현탁의 대략적 부피를 초래하였다.

[0216] AGC1115 및 AGC1100를 50 μ g/ml까지 희석하였고 3배 희석 단계의 12개 지점에서 적정하였다. 이소형 대조군 항 체(트라스투주맙(trastuzumab)을 그에 따라 조제하였다. 항체의 각각의 희석 후 100 μ l를 Raji 세포를 함유하 는 웰에 첨가하였다. 1.5 시간 동안 4℃에서 배양 후, 세포를 스핀 다운하였고 1 % FBS로 보충된 200 μ l의 차 가운 PBS로 2회 세척하였다. PE 공액된 생쥐 항-인간 IgG Fc(BioLegend; #409304)를 인간 mAb의 검출을 위한 이차 항체 시약으로서 사용하였다. 상기 이차 항체 시약은 1 % FBS로 보충된 PBS의 1 μ g/ml로 조제하였다. 이차 항체 시약의 100 μ l를 암실에서 4℃에서 1 시간 동안 배양 전에 각각의 웰에 순차적으로 첨가하였다. 세포를 상기한 바와 같이 2회 세척하였고, 1 % FBS로 보충된 200 μ l PBS에 재현탁하였다. 모든 샘플을 V-자형 바닥 96-웰 플레이트에서 분석하였다. 형광 신호를 Beckman Coulter Cell Lab Quanta SC MPL 유동 세포 계측기 (Beckman Coulter; CA, USA)로 기록하였다. 중간 값들(MFI)을 Excel 시트로 내보내고 농도([nM])에 대해 표시 하였다.

[0217] 데이터를 GraphPadPrism(Prism소프트웨어; CA, USA)의 "로그(작용제) 대 반응 - 가변 기울기(4개의 파라미터 들)" 결합 모델을 사용하여 피팅하였고 EC₅₀ 값을 상기 피팅으로부터 산출하였다(도 7). 이차 항체를 갖는 Raji 세포들의 직접적인 염색은 대략적으로 1의 MFI 값들(0.5-1 %의 AGC1115 MFI 값들)로 낮은 수준(low background)을 보였다.

[0218] AGC1100 및 AGC1115의 보관된 적정 곡선의 산출된 EC₅₀ 값은 각각 9 nM 및 6 nM이었고, 공액체 AGC1115의 결합 효능은 AGC1100와 비슷하였다는 것을 나타내었다.

[0219] **실시예 7: AGC1115-Th-227에 의한 Th-227-유도된 세포의 세포 독성.**

[0220] 시험관 내 세포의 세포 독성을 CD22 양성 라모스(Ramos) 세포에서 연구조사하였다(실시예 6 참조). AGC1115 및 AGC0015에 의해 공액된 대조군 트라스투주맙을 44 kBq/ μ g의 특이적 활성까지 Th-227을 킬레이트화하기 위해 사 용하였다.

[0221] 라모스(Ramos) 세포를 5 % CO₂로 37℃에서 성장시켰고 1:5로 일주일에 3회 분할하였다. 분석 전날 배양 배지(20 % FBS와 1 % 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 Iscove's Modified Dulbecco's 배지(IMDM))를 새로운 배지로 대 체하였고, 부피를 400,000개 세포/mL를 제공하도록 조절하였다. 약 1,600,000개 세포(4 mL)를 6개의 웰 플레이 트들에서 각각의 웰에 첨가하였다. 상기 플레이트를 표식된 mAb, 또는 배양 배지의 첨가를 위해 다음날까지 배 양하였다.

[0222] 표식된 mAb, 또는 배양 배지를 첨가한 후, 플레이트는 4시간 더 배양하였다. 실험에서 AGC1115 또는 트라스투주 맙-AGC0015을 3 nM의 최종 농도까지 각각의 웰에 첨가하였다. 배양 후, 상기 세포를 배양 배지에서 2회 세척하 였고, 상청액 및 펠렛 중의 ATP를 측정하였다. 이어서 세포는 1:2로 분할하였고, 5% CO₂와 함께 37℃에서 배양 배지에서 배양하였다. 동일한, 그러나 단지 1회 세척의, 절차가 제3, 5 및 7일에 반복되었다.

[0223] ATP의 정량화는 상이한 샘플 시간에 세포 생존 능력의 척도로서 사용하였고(CellTiter-Glo Luminescent Cell viability assay from Promega), 이는 도 3에 나타낸 곡선들을 초래하였다. 라모스(Ramos) 세포 결합 AGC1115-Th-227은 결과로 세포 독성을 초래하였고, Th-227로 표식된 대조군 작제물과 대조적으로, 라모스(Ramos) 세포에 결합되지 않는다.

[0224] **실시예 8 - 산 유도체**

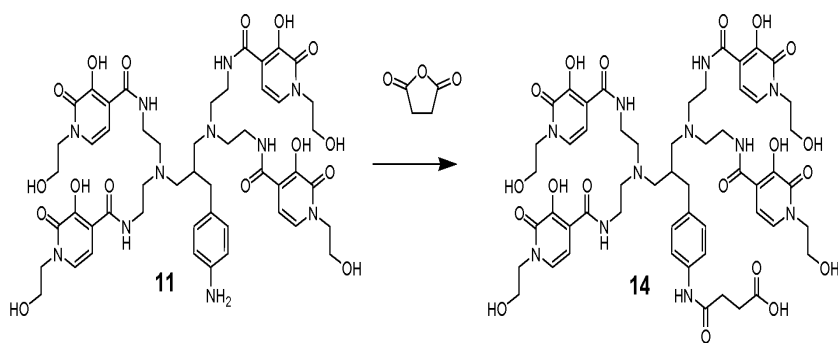
[0225] 대안의 결합 화학을 가능하게 하는 수용성 킬레이터의 산 유도체 조제.

[0226]

본 실시예는 산 유도체의 성공적인 합성을 보여준다. 킬레이터의 이러한 유도체는 예를 들면, 종양 표적 단백질의 앵클론 아민에 의한 아마이드 결합의 형성을 가능하게 한다.

[0227]

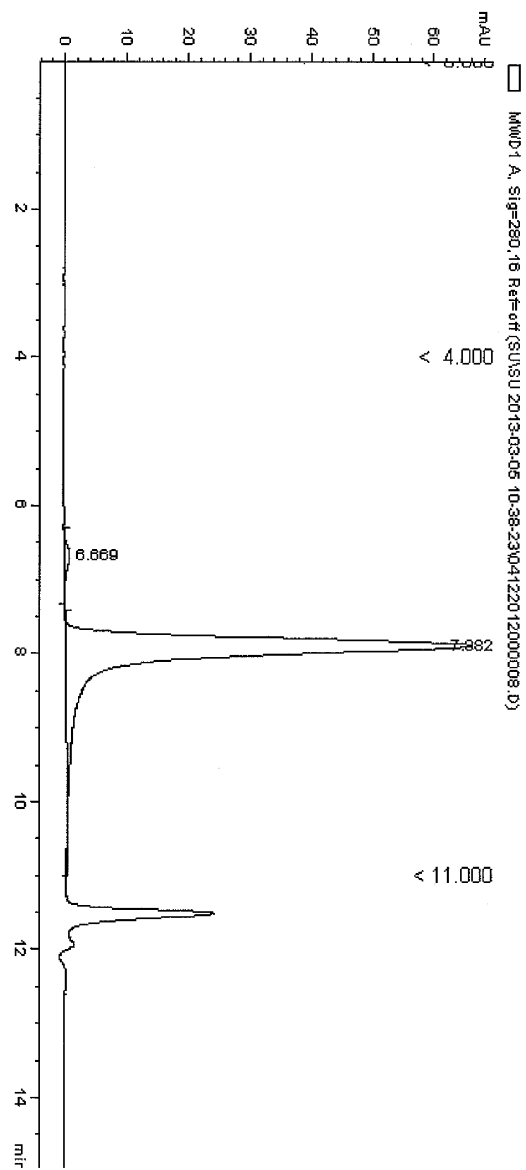
본 실시예는 용해성 킬레이터의 합성을 보여주고 물질 **11**로부터 시작한다(실시예 2). 43 mg(~0.04 mmol)의 물질 **11**을 4 mL DMSO, 4 mL 아세토니트릴, 및 30 μ L NEt₃에 용해하였다. 6 mg의 숙신산 무수물을 첨가하였다(0.06 mmol). 실온에서 22시간 반응 후 반응 혼합물의 LC/MS 분석은 물질 **15**가 형성되었음을 보여주었다. 일부 오염물 디아실화된 부산물이 형성되었다. 무수물의 부분들로서 첨가는 에스테르 형성을 최소화하고 생성물 **14**의 물 수율을 증진시킬 것이다. 수득된 반응 혼합물의 HPLC 분석은 도 6에 나와있다.



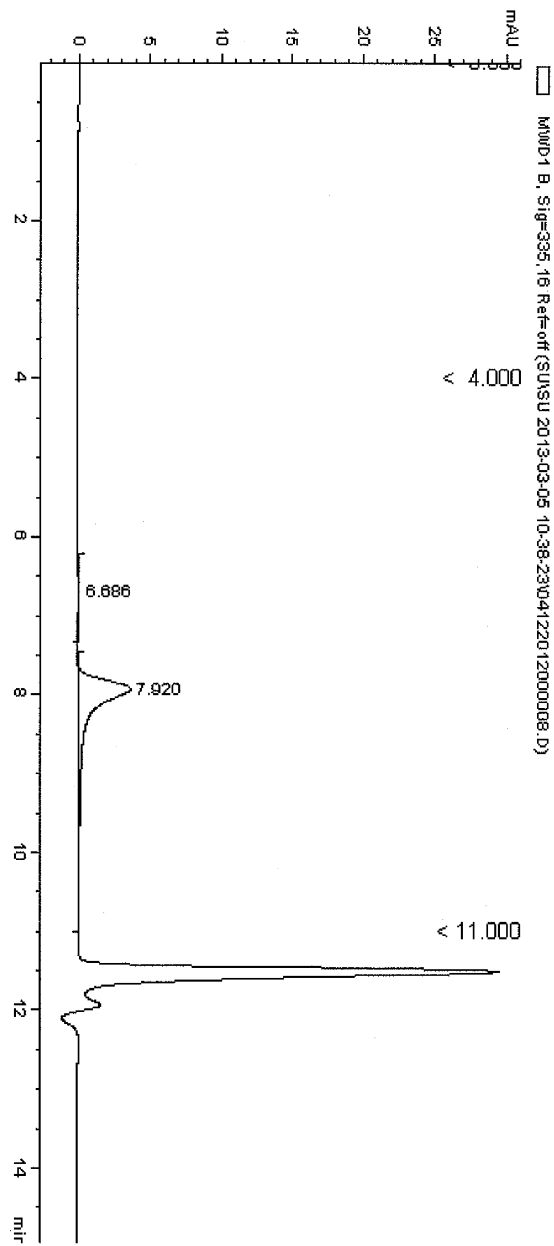
[0228]

도면

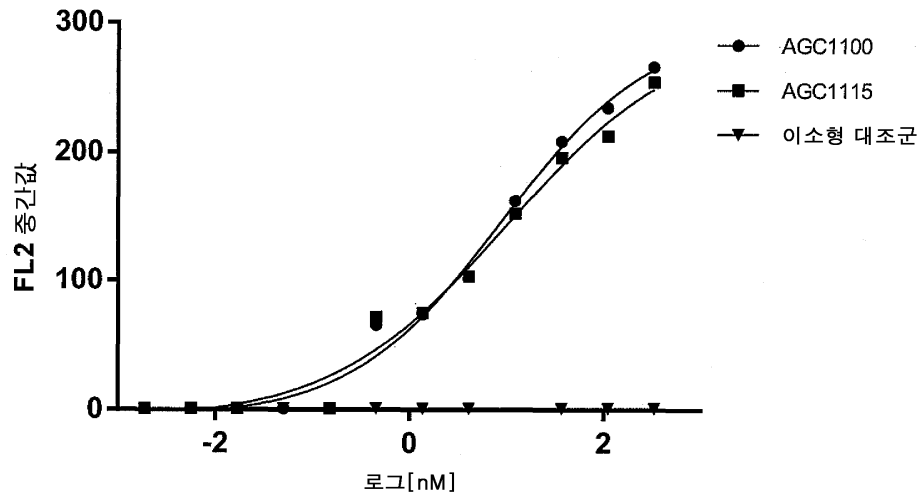
도면1a



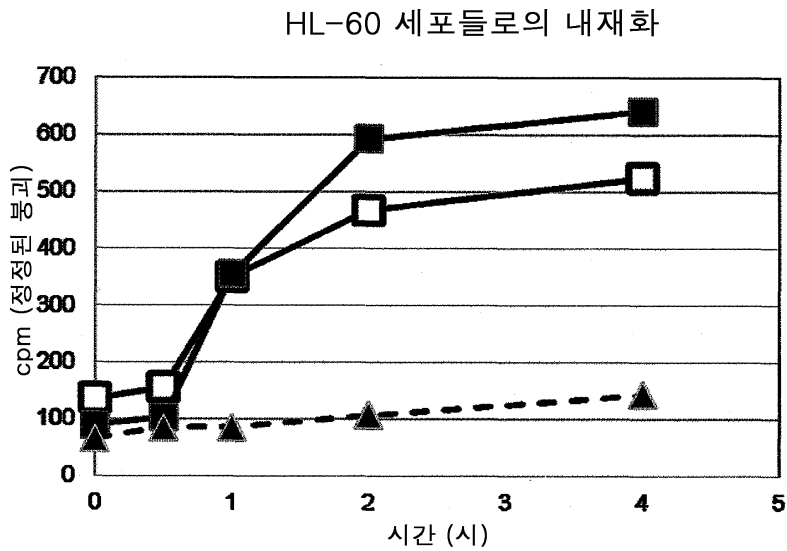
도면1b



도면2



도면3



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Algeta ASA

<120> Radio-Pharmaceutical Complexes

<130> 95.116619

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine derived mAb

<400> 1

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly

1 5 10 15

Glu Asn Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

Ala Asn His Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Gln Val Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln

85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg

<210> 2

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanised version of murine derived mAb

<400> 2

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Ser Ala Ala Val

1 5 10 15

Glu Asp Arg Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

Ala Asn His Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Lys Ala Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln
 85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 3

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine derived mAb

<400> 3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Ser Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Leu His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Asp Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 4

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanised version of murine derived mAb

<400> 4

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Asn Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Asp Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 5

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanised version of murine anti-CD22 mAb

<400> 5

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35	40	45	
Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Asn Phe			
50	55	60	
Lys Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Phe Cys			
85	90	95	
Ala Arg Arg Asp Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val			
100	105	110	
Thr Val Ser Ser			
115			