

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0110377

(43) 공개일자 2020년09월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/60 (2017.01) A61K 31/475 (2006.01)
 A61K 31/495 (2006.01) A61K 31/4995 (2006.01)
 A61K 31/513 (2006.01) A61K 31/555 (2006.01)
 A61K 33/243 (2019.01) A61K 45/06 (2006.01)
 A61K 47/69 (2017.01) A61K 51/06 (2006.01)
 A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 47/60 (2017.08)
 A61K 31/475 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-7023337

(22) 출원일자(국제) 2019년01월11일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2020년08월12일

(86) 국제출원번호 PCT/US2019/013306

(87) 국제공개번호 WO 2019/140266

국제공개일자 2019년07월18일

(30) 우선권주장

62/617,095 2018년01월12일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(71) 출원인

프로링크스 엘엘시

미국 캘리포니아 94158 샌 프란시스코 스위트 145
미션 베이 블러바드 사우스 455

(72) 발명자

헤른, 브라이언

미국 캘리포니아 94556 모라가 림 블러바드 614

산티, 다니엘 브이.

미국 캘리포니아 94117 샌 프란시스코 벨그레이브
217

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

박장원

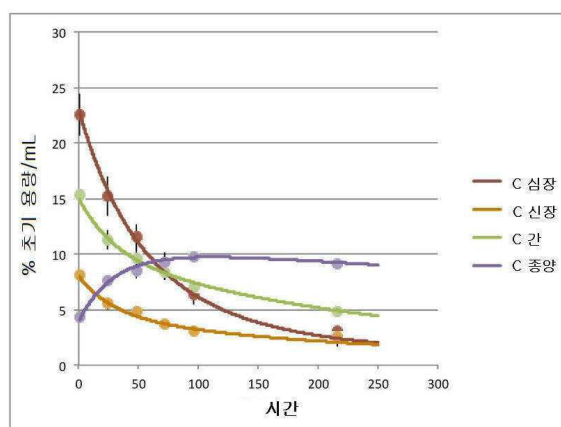
전체 청구항 수 : 총 33 항

(54) 발명의 명칭 조합 용량의 독성을 최소화하기 위한 프로토콜 및 검증을 위한 조영제

(57) 요약

화학요법제의 조합에 대한 노출로부터 정상 조직을 보호하기 위해 향상된 투과성 및 보유성 효과(EPR 효과)를 이용한다. 고형 종양에서 향상된 투과성 및 보유성(EPR) 효과를 나타내는 조영제는 상기 조영제의 담체와 유사한 크기 및 형상의 담체에 컨주게이트된 상기 종양의 치료를 위한 화학요법제 또는 기타 약물의 거동을 모방하는데 유용하다.

대표도 - 도8



HT-29 이종이식편 중의 ^{89}Zr -컨주게이트의 조직 분포. 데이터 포인트는 4-분지형 $\text{PEG}_{40k}\text{Da}$ -(DFB- ^{89}Zr) (실시예 5), 4-아암 $\text{PEG}_{40k}\text{Da}$ -(DFB- ^{89}Zr)₄ (실시예 5), 및 4-아암 $\text{PEG}_{40k}\text{Da}$ -(DFB- ^{89}Zr)₁(SN38)₃ 로 처리된 판독값의 평균이다. 오차 막대는 표준 편차이다. 곡선은 표 2의 파라미터들을 이용하여 계산하였다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/495 (2013.01)
A61K 31/4995 (2013.01)
A61K 31/513 (2013.01)
A61K 31/555 (2013.01)
A61K 33/243 (2019.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61K 47/6935 (2017.08)
A61K 51/065 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)

(72) 발명자

폰테인, 손

미국 캘리포니아 94518 콩코드 스미스 레인 2050

애슐리, 개리 더블유

미국 캘리포니아 94502 알라메다 버데마 1102

(30) 우선권주장

62/674,483	2018년05월21일	미국(US)
62/700,147	2018년07월18일	미국(US)
62/711,421	2018년07월27일	미국(US)
62/711,423	2018년07월27일	미국(US)
62/716,788	2018년08월09일	미국(US)
62/716,796	2018년08월09일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

고형 종양에 대해 제1 화학요법제와 제2 화학요법제를 사용하는 조합 요법을 위한 프로토콜에서 상기 제1 제제 및 제2 제제를 대상체에게 투여함으로써 대상체에서 정상 조직에 대한 독성을 경감하는 방법으로서, 상기 방법은:

제1 제제를 제제-방출 컨쥬게이트로서 유연한 담체에 투여하는 단계로서, 여기서 상기 담체는 각각의 유체역학적 반경이 5-50 nm인 나노입자 또는 거대분자이고 상기 컨쥬게이트는 고형 종양에서 향상된 투과성 및 보유성(EPR)을 나타냄으로써 해서 상기 컨쥬게이트를 종양에 집중시키며 여기서 종양으로부터의 컨쥬게이트의 방출 속도 및 컨쥬게이트로부터의 제1 제제의 방출 속도는 대상체의 전신 순환으로부터 컨쥬게이트 및 방출된 제제의 소거 속도보다 실질적으로 느린 것인 단계;

대상체의 전신 순환으로부터 컨쥬게이트 및 방출된 제제의 소거를 위한 기간을 허용하는 단계; 및

상기 기간 후, 상기 제2 제제를 대상체에 투여하는 단계

를 포함하는, 대상체에서 정상 조직에 대한 독성을 경감하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 제2 제제는 유리 형태로 투여되거나, 또는

제2 화학요법제는 제제-방출성 컨쥬게이트로서 담체에 투여되며,

여기서 상기 담체는 각각의 유체역학적 반경이 5-50 nm인 나노입자 또는 거대분자인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 제2 제제와 독성이 중복되지 않는 제3 제제를 투여하는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 제2 제제의 소거를 위한 기간을 허용하고;

상기 기간 후, 상기 컨쥬게이트된 제1 제제를 대상체에 다시 투여하는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 고형 종양에서 컨쥬게이트의 농도와 관련된 특징들을, 제1 제제와 동일한 담체에 비-방출성으로 커플링된 표지를 투여하고 상기 대상체에서 표지를 생체내 추적함으로써 측정하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 표지는 양전자 방출 단층촬영(PET) 스캐닝에 의해 검출가능한 동위원소인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 컨쥬게이트는 상기 제1 제제를 베타 제거 또는 에스테르, 카보네이트, 또는 카바메이트의 가수분해, 또는 아미드의 단백질분해 또는 니트로리덕타제에 의한 방향족 니트로기의 환원에 의해 방출시키는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 담체는 분자량 10 kD-60 kD의 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, 제1 제제는 토포이소머라제 억제제, 안트라사이클린, 탁산, 에

포틸론, 티로신 키나제 억제제, 상동성 재조합 복구 억제제, 생물학적 제제, 항-스테로이드 또는 뉴클레오사이드인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 제1 제제는 토포이소머라제 억제제인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, 제2 제제는 상동성 재조합 복구 억제제, PARP 억제제에 대해 상승적 또는 상가적인 제제, 또는 mTOR 억제제, 트라벡테딘, 시스-플라티늄, 옥살리플라틴, 플루오로우라실, 테모졸로마이드 또는 빈크리스틴인 방법.

청구항 12

대상체에서 고형 종양을 치료하기 위해 조합 사용되는 제1 및 제2 화학요법 제의 상기 대상체의 정상 조직에 대한 독성 효과를 최소화하는 방법으로서, 상기 방법은 상기 제2 제제를 상기 제1 제제와 동시에 투여하는 것을 포함하며, 상기 제1 제제는 유연한 담체에 대한 컨쥬게이트의 형태이고, 여기서 상기 컨쥬게이트는 향상된 투과성 및 보유성(EPR)을 나타내고, 상기 종양에 상기 컨쥬게이트를 집중시키며,

상기 담체는 유체역학적 반경이 5-50 nm인 나노입자 또는 거대분자인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 제2 제제는 컨쥬게이트되거나 또는 컨쥬게이트 되지 않은 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 제2 제제는 제1 제제에 대한 담체와 동일한 구조로 담체에 컨쥬게이트되는 방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 고형 종양 내 컨쥬게이트(들)의 농도와 관련한 특징은 적어도 제1 제제의 그것과 동일한 담체에 비-방출성으로 커플링된 표지를 투여하고 상기 대상체에서 상기 표지르르 생체내 추적함으로써 측정되는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 표지는 양전자 방출 단층촬영 (PET) 스캐닝에 의해 검출가능한 동위원소인 방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 컨쥬게이트(들)은 상기 제제를 베타 제거 또는 에스테르, 카보네이트, 또는 카바메이트의 가수분해, 또는 아미드의 단백질분해 또는 니트로리덕타제에 의한 방향족 니트로기의 환원에 의해 방출시키는 방법.

청구항 18

제12항에 있어서, 거대분자 담체(들)은 분자량이 10 kD-60 kD인 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 방법.

청구항 19

제12항 내지 제18항 중 어느 하나의 항에 있어서, 제1 제제는 토포이소머라제 억제제, 안트라사이클린, 탁산, 에포틸론, 티로신 키나제 억제제, 상동성 재조합 복구 억제제, 생물학적 제제, 항-스테로이드 또는 뉴클레오사이드인 방법

청구항 20

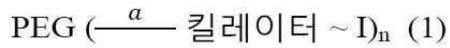
제19항에 있어서, 제1 제제는 토포이소머라제 억제제인 방법.

청구항 21

제12항 내지 제18항 중 어느 하나의 항에 있어서, 제2 제제는 상동성 재조합 복구 억제제, PARP 억제제에 대해 상승적 또는 상가적인 제제, 또는 mTOR 억제제, 트라벡테딘, 시스-플라티늄, 옥살리플라틴, 플루오로우라실, 테 모졸로마이드 또는 빈크리스틴인 방법.

청구항 22

다음 화학식 (1)의 조영제:



식 중, PEG는 40-60 kD의 2-6개의 복수의 아암을 포함하는 폴리에틸렌 글리콜을 나타내고;

킬레이터는 테스페리옥사민 또는 플루르-히드록시피리디논 다좌를 나타내며

I는 양전자 방출 단층촬영(PET)에 적합한 방사능동위원소를 나타내고;

$\text{---}^a \text{---}$ 는 공유 연결자를 나타내며;

~ 는 킬레이터 내 I의 격리를 나타내며;

n은 1 내지 상기 PEG의 아암의 갯수의 정수이다.

청구항 23

제22항에 있어서, I는 ^{89}Zr , ^{94}Tc , ^{101}In , ^{81}Rb , ^{66}Ga , ^{64}Cu , ^{62}Zn , ^{61}Cu 또는 ^{52}Fe 이고; 및/또는

PEG는 4개의 아암을 갖는 대략 40 kD의 폴리에틸렌 글리콜이며, 및

n은 1-4이고; 및/또는

킬레이터는 테스페리옥사민-B이고; 및/또는

$\text{---}^a \text{---}$ 는 직접 결합을 나타내는 조영제.

청구항 24

제22항 또는 제23항의 조성제의 축적을 모니터링하는 방법으로서, 상기 방법은 상기 조영제를 투여하고 PET에 의해 상기 조성제의 위치를 검출하는 것을 포함하는 방법.

청구항 25

약물의 컨쥬게이트의 약물동태 및 종양에서의 그의 축적을 평가하는 방법으로서 상기 방법은 상기 약물의 컨쥬게이트의 크기 및 형상을 제22항 또는 제23항의 조영제의 크기 및 형상에 매칭시키고, 상기 조영제를 종양을 보유하는 대상체에 투여한 다음 종양 내 상기 제제의 축적을 PET에 의해 모니터링하는 것을 포함하는 방법.

청구항 26

제22항 또는 제23항의 조영제 및 약물 컨쥬게이트를 포함하는 키트.

청구항 27

EPR 효과를 나타내도록 변형된 약물의 치료에 의해 이익을 얻을 가능성이 있는, 바람직하지 못한 조직 덩어리를 갖는 대상체를 동정하는 방법으로서, 상기 방법은 제22항 또는 제23항의 조영제를 후보 대상체에 투여하는 단계; 및

상기 대상체에서 상기 조영제의 분포를 모니터링하는 단계를 포함함으로써,

상기 바람직하지 못한 조직 덩어리에 상기 조영제가 축적되는 대상체를, 상기 치료로부터 이익을 얻는 대상체인 것으로 동정하는 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, DNA 복구에 참여하는 단백질을 인코딩하는 유전자의 돌연변이의 존재 또는 부재를 결정하는 것을 더 포함하되, 대상체에 상기 돌연변이가 존재하면 상기 대상체는 상기 종양을 갖는 것으로 동정하는 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 유전자는 BRCA1, BRCA2, ATM 또는 ATR인 방법.

청구항 30

고형 종양의 치료 및 영상화를 위한 하이브리드 컨쥬게이트로서, 상기 컨쥬게이트는 유연한 담체를 포함하고 상기 담체는 각각의 유체역학적 반경이 5-50 nm인 나노입자 또는 거대분자이며, 상기 컨쥬게이트는 고형 종양에서 향상된 투과성 및 보유성(EPR)을 나타내어 상기 컨쥬게이트를 종양에 집중시키고 여기서 상기 담체는 치료제에 방출가능하게 커플링되고 조영제에도 커플링되는 것인 하이브리드 컨쥬게이트.

청구항 31

제30항에 있어서, 다음 화학식 (2)를 갖는 하이브리드 컨쥬게이트



식 중 PEG는 40-60 kD의 2-6개의 복수의 아암을 포함하는 폴리에틸렌 글리콜을 나타내고;

킬레이터는 테스페리옥사민 또는 플루르-히드록시피리딘은 다좌를 나타내며;

I는 양전자 방출 단층촬영(PET)에 적합한 방사능동위원소를 나타내고;

$\text{---}^{\alpha} \text{---}$ 는 공유 연결자를 나타내며;

~ 는 킬레이터에서의 I의 격리를 나타내며;

L은 링커;

D는 치료제;

n은 1 내지 상기 PEG의 아암의 갯수 마이너스 x까지의 정수이며,

x는 상기 PEG의 아암의 갯수 마이너스 n까지의 정수이다.

청구항 32

제31항에 있어서, I는 ^{89}Zr , ^{94}Tc , ^{101}In , ^{81}Rb , ^{66}Ga , ^{64}Cu , ^{62}Zn , ^{61}Cu 또는 ^{52}Fe 이고; 및/또는

PEG는 4개의 아암을 갖는 대략 40 kD의 폴리에틸렌 글리콜이며, 및

n은 1-4이고; 및/또는

킬레이터는 테스페리옥사민-B이고; 및/또는

$\text{---}^{\alpha} \text{---}$ 는 직접 결합이며; 및/또는

D는 SN38, BMN673, VX-970 또는 루카파립을 나타내는 조영제.

청구항 33

고형 종양의 영상화와 치료를 연관짓는 방법으로서, 상기 방법은 고형 종양을 보유하는 대상체에 제30항 내지 제32항 중 어느 하나의 항의 하이브리드 컨쥬게이트를 투여하고 상기 컨쥬게이트의 종양 내 축적을 모니터링하며 상기 종양의 크기를 모니터링하는 것을 포함하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 상호-참조

[0002] [1] 이 출원은 2018년 1월 12일 출원된 미국 가특허출원 62/617,095, 2018년 5월 21일 출원된 미국 가특허출원 62/674,483, 2018년 7월 27일 출원된 미국 가특허출원 62/711,421, 2018년 8월 9일 출원된 미국 가특허출원 62/716,788, 2018년 8월 9일 출원된 미국 가특허출원 62/716,796, 2018년 7월 18일 출원된 미국 가특허출원 62/700,147, 및 2018년 7월 27일 출원된 미국 가특허출원 62/711,423에 기초한 우선권 주장 출원으로서, 상기 문헌의 내용은 그 전체가 본 발명에 참조 병합된다.

[0003] 기술 분야

[0004] [2] 본 발명은 고형 종양의 조합 치료 분야 및 투여된 물질의 약물동태를 평가하는 진단 방법에 관한 것으로, 구체적으로 나노미터 크기의 물질이 고형 종양을 갖는 대상체에게 투여된 경우 나타나는 개선된 투과성 및 보유성(EPR: enhanced permeability and retention) 효과를 평가하는 방법에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 나노미터 크기의 컨쥬게이트가 고형 종양을 갖는 대상체에게 투여될 때 나타나는 EPR 효과를 이용하는 것에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] [3] 고형 종양을 치료하는 데 사용되는 화학요법제는 정상 조직에도 유독하다. 투여되는 이러한 제제의 투여 수준은 그의 최대 허용 용량에 의해 제한된다. 이러한 제제들의 조합이 사용될 때, 정상 조직은 두 가지 제제의 독성을 경험하게 되어 유효량 수준이 추가로 제한된다. 이 문제는 시행 착오 기반으로 두 가지 이상의 제제의 동시 투여를 회피하도록 프로토콜을 설계함으로써 해결되어 왔는데, 이러한 방식은 최적의 결과를 도출하지는 못한다. 2종 이상의 물질을 상승적으로 조합시키는 또 다른 접근법이 이용되어 왔는데 여기서 이들의 상승적 비율은 미국특허 7,850,990 및 9,271,931호에 제시된 바와 같은 적절한 전달 비히클을 이용하여 약물동태를 조절함으로써 유지된다. 약물들이 상승적으로 작용하기 때문에, 저용량 수준으로도 유효하고, 따라서 약물의 내재적인 독성도 완화된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] [4] 기술분야의 이러한 접근법에도 불구하고, 정상 조직에 대한 약물 조합의 독성 효과를 최소화시킬 프로토콜의 성공적인 설계에 대한 필요성이 여전히 존재한다. 본 발명은 독성 약물에 대한 정상 조직의 노출을 제어하기 위해 담체로서 사용될 수 있는 큰 분자의 증강된 투과성 및 보유성 효과(EPR)를 이용함으로써 이러한 문제점을 해결하고, 본 발명에 따라 이들 컨쥬게이트에 의해 EPR 효과가 나타날 수 있게 한다.

[0007] [5] 초창기인 1986년에, Maeda와 동료들은 고형 종양에서의 EPR 효과를 입증하였다(Matsumura, Y., 및 Maeda, H., Cancer Res. (1986) 46:6387-6392). 이 효과는 나중에 같은 연구 그룹에 의해 확인되었다(Maeda, H. 등, J. Controlled Release (2001) 74:47-61; Maeda, H. 등, Eur. J. Pharm. Biopharm. (2009) 71:409-419). 본질적으로, 이들 저자는 직경이 수 밀리미터의 크기를 넘어 성장하는 고형 종양이 그 구조상 정상적인 혈관 구조와는 다른 신생혈관(neovasculature)에 의존한다는 것을 보여 주었다. 정상 혈관 구조의 컷오프 포어 크기는 2-6 nm의 범위인 반면, 고형 종양에서의 신생혈관은 100-700 nm의 포어 컷오프 범위를 갖는다(Dreher, M. R. 등, J. Natl. Cancer Inst. (2006) 98:335-344; Singh, Y. 등, Molecular Pharmaceutics (2012) 9:144-155). 종양 신생혈관의 보다 큰 포어들은 거대 분자 및 나노입자가 종양으로 침투하여 유출될 수 있게 하는 누출을 초래하며, 이는 림프관 배출 불량과 조합되어 EPR 효과를 초래하며, 이는 일반적으로 나노입자 또는 거대분자의 크기 및 유연성 그리고 노출과 관련된 거대분자, 컨쥬게이트 또는 나노입자의 축적을 초래한다(즉, $t_{1/2}$). 이것은 특히 예컨대 문헌 [by Allen, T. 등, Science (2004) 303:1818-1822]에 설명된 바와 같이, 특히 리포솜 전달의 경우 입증되어 왔다. 이 효과를 설명하는 문헌에 대한 유용한 리뷰로는 문헌 [Danhier, F. 등, J. Control Rel. (2010) 148:135-146 및 Eshun, F. K. 등, Gene Ther. (2010) 17:922-929]이 포함된다]을 들 수 있다. 다양한 크기의 텍스트란을 이용한 결과, 최적 크기는 ~40- 내지 60 kDa이고 EPR 효과에 의해 최고의 축적을 제공하는 $t_{1/2}$ (노출 시간)이 있는 것으로 나타났다 (Dreher, M. R. 등 J Natl Cancer Inst (2006) 상기 문헌)

과제의 해결 수단

- [0008] [6] 일 태양에서, 본 발명은 컨쥬게이트를 나노분자 담체, 특히 유연한 담체에 제공하고, 컨쥬게이트로서 투여된 소분자를 나노분자 담체, 특히 유연한 담체에 전달하는데 사용되는 담체와 유사한 크기를 갖는 담체에 커플링된 조영제를 제공함으로써 EPR 효과와 관련된 약물동태를 결정하는 것을 허용함으로써 소분자에 대해서조차 EPR 효과를 이용하는 것에 의존한다.
- [0009] [7] Jain 등은 나노약물 설계와 관련된 EPR 효과의 특징을 설명한 바 있다(Chauhan, V. P., 및 Jain, R. K., Nat. Mater. (2013) 12:958-962; Chauhan, V. P. 등, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (2011) 50:11417-11420; Chauhan, V. P. 등, Nat. Nanotechnol. (2012) 7:383-388). 종양 혈관벽 및 조직 매트릭스는 가변 단면을 갖는 상호-연결된 일련의 포어들로서 존재한다. 컷오프 크기는 단지 침투하는 가장 큰 입자를 나타내며, 대립자는 일반적으로 소립자와 비교할 때 이질적이며 차선적으로(suboptimally) 종양을 관통한다. 단일 종양 내 혈관 포어 크기 분포는 크게 차이가 날 수 있으며, 대부분의 포어는 실제로 포어 컷오프 크기보다 훨씬 작다. 따라서, 소립자의 효과적인 혈관 투과성은 컷오프 크기와 반드시 관련이 있는 것은 아니다; 소립자는 대립자보다 더 빠르고 균일하게 종양에 침투하고 약물을 운반하는 소립자는 대립자보다 고품 종양에 대해 일반적으로 더 효과적이다.
- [0010] [8] 나노입자의 형상 역시도 EPR 효과를 변형시킨다(Chauhan, V.P., (2011) 상기문헌). 포어를 통한 향상된 침투력은 입자의 최단 치수와 연관되어 있으므로, 비-구형 나노입자는 같은 크기의 구체(size-matched spheres)에 비해 종양에 보다 빨리 침투하여 축적될 수 있다. 비-구형 입자의 장점은 더 작은 용기 포어 크기에서는 유지되지만 크기가 큰 포어에서는 상실된다.
- [0011] [9] 나노입자 for EPR 약물 전달 및 조영을 위한 나노입자의 다수의 또는 대부분의 연구는 적절한 약물 또는 동위원소(동위원소들)를 함유하는, 크기가 큰 ~100 nm 리포솜/입자를 이용한다. 전술한 바와 같이, 컷-오프 포어 크기와 무관하게 크기가 더 큰 이들 나노입자들은 많은 종양에서의 축적을 위한 최적 크기는 아닌데, 이는 이들 대부분이 다양한 포어 크기를 갖는 신생혈관을 함유하기 때문이다; 따라서 본 발명은 50 nm 미만의 유체역학적 반경을 갖는 담체에 초점을 맞추었다.
- [0012] [10] 본 발명은 일부 구체예에서, EPR 효과를 이용하도록 설계된 컨쥬게이트를 제조하는데 특히 적합한 결합 기술(linking technologies)을 이용한다. 특히, 메타 제거에 의해 소분자 화학치료제(약물)를 방출하는 결합이 개시된다. [참조: 예를 들어, 미국특허 8,680,315; 미국특허 9,387,254; 미국특허 8,754,190; 미국특허 8,946,405; 및 미국특허 8,703,907, 및 WO 2015/051307, 이들 문헌은 그 내용 전체가 참조 병합됨]. 이러한 링커는 적절한 이탈기에 대해 베타-위치를 점하는 탄소-수소 결합의 산성도를 조정함으로써 커플링된 약물의 방출 시간 조정을 가능케 한다.
- [0013] [11] 또한 나노입자에 커플링된 검출가능한 마커를 사용하여 이 효과를 연구하는 것도 가능했다. Wilks, M. Q. 등(Bioconjug. Chem. (2015) 26:1061-1069)은 30 kDa PEG-DFB-⁸⁹ Zr 컨쥬게이트(형광 Cy5.5도 포함함)를 보고한 바 있다. 마우스에서, 이것은 주입 후 48 시간에 이식된 HT 29 종양에서 13.5 시간의 제거 $t_{1/2}$ 및 높은 체류율(~ 4 내지 5% ID/g)을 보여주었다. 종양 축적, 제거 또는 용량의 동력학은 결정되지 않았다. 이들 나노입자는 크기가 약 10 nm에 불과하고 유연하기 때문에, 이들의 생물학적 분포는 종양 조직에서 강한 EPR 효과를 나타내지는 않는다. 그러나, 이 연구는 표지된 컨쥬게이트가 따라서 이러한 파라미터들을 규명하는데 사용가능함을 보여준다.
- [0014] [12] 본 발명의 방법에 유용한 또 다른 기술은 이러한 연구를 위한 형광 표지 사용에 비해 일부 장점을 제공하는 양전자 방출 단층촬영(PET)이다. 인간 종양에 있어 EPR 효과에 대한 현재의 지식 수준은 대체로 방사능표지된 리포솜의 저해상도 단일 광자 이미징 기술 연구에 기반하는데 c.f. (Harrington, K. J. 등, Clin. Cancer Res. (2001) 7:243-254; Khalifa, A. 등, Nucl. Med. Commun. (1997) 18:17-23), 이 기술은 EPR 효과를 정량화할 수는 없지만 종양을 가시화할 수는 있다. PET의 높은 검출 감도/정량화 및 공간 해상도로 인해 이 기술은 나노입자 생체분포의 정량적 연구에 탁월하다. 예를 들어 Lee H 등 [Clin Cancer Res 23(15):4190-4202]은, ⁶⁴Cu-표지된 HER2-표적화 리포솜 독소루비신(직경 약 100nm 또는 그 이상)이 인간 종양에 축적되어 PET로 정량화될 수 있음을 보여주었다. 측정된 환자내 및 환자간 종양 약물 농도의 범위는 치료 및 진단(PET 표지됨) 모이 어터 두 가지 모두 (본 발명에서 치료진단 나노입자(TNP: theranostic 라 칭함)를 포함하는 이들 리포솜의 가변 종양 활성을 조절하는 것으로 제안되었다. 종양 침착을 계층화하고 흡수 수준을 치료 결과와 소급적으로 연관시켰다: 높은 흡수 종양은 TNP의 효과 (75% 부분 관해/안정 질환)의 영향에 민감한 반면 저흡수 종양 (43% 안정

질환)은 그렇지 않았다. 뇌 전이 역시도 이미지화하였는데, 이의 혈관 구조가 증가된 포어 크기를 가지고 이로 인해 그러한 전이가 TNP에 민감하게될 수 있는 것으로 시사되었다. 이러한 결과는 NP 영상화 접근법이 나노의약품의 개인화하기 위한 예측 전략으로 적용 가능함으로 해서, 이를 통해 진단 절차를 수행한 다음 민감한 종양이 있는 환자만 TNP로 치료가능함을 시사한다. 요약하면, 이러한 데이터는 종양에서 NP 침착의 전처리 영상화를 이용하여 밀접하게 관련된 TNP 치료로 가장 이익을 얻을 가능성이 있는 환자를 식별할 수 있음을 시사한다.

[0015] [13] 당업계에서 이용가능한 이들 도구를 사용하여, 정상 조직에 대한 조합 요법의 독성 효과를 개선하는 프로토콜을 구성한다.

[0016] 발명의 개시

[0017] [14] 본 발명의 한 가지 목적은 조합 투여되는 약물의 세포독성 효과를 종양 조직에 국한시키는 한편 정상 조직에 대해서는 가능한 그 효과를 아끼는 것이다. 한 가지 접근법에서, 이것은 제1 화학치료제는 고형 종양 내로 격리되어 정상 조직에 대해서는 효과를 발휘하지 못하게끔 전신 이용가능하지 못하게 하는 한편, 제2 치료제는 제2 약물의 독성 효과만이, 제1 약물 보충 없이, 전신에서 효과적으로 발휘하도록 하는 한편 조합 효과가 종양에 발휘되도록, 투여 용량 프로토콜을 조정함으로써 달성될 수 있다. 두 번째 접근법에서는, 두 가지 제제 모두를 고형 종양에서 컨쥬게이트로서 격리시켜, 정상 조직이 경험하는 것보다 더 높은 농도로 이들 두 가지 제제가 종양 세포에 의해 경험되도록 하여, 이들 제제를 정상 조직으로부터는 소거하는 한편 종양에서는 유지시킨다.

[0018] [15] 따라서, 일 태양에서, 본 발명은 고형 종양에 대해 제1 화학요법제와 제2 화학요법제를 사용하는 조합 요법을 위한 프로토콜에서 상기 제1 제제 및 제2 제제를 대상체에게 투여함으로써 대상체에서 정상 조직에 대한 독성을 경감하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은:

[0019] 제1 제제를 제제-방출 컨쥬게이트로서 담체에 투여하는 단계로서, 여기서 상기 담체는 각각의 유체역학적 반경이 5-50 nm(즉 직경은 10-100 nm)인 나노입자 또는 거대분자이고 상기 컨쥬게이트는 고형 종양에서 향상된 투과성 및 보유성(EPR)을 나타냄으로써 상기 컨쥬게이트를 종양에 집중시키며 여기서 종양으로부터의 컨쥬게이트의 방출 속도 및 컨쥬게이트로부터의 제1 제제의 방출 속도는 대상체의 전신 순환으로부터 컨쥬게이트 및 방출된 제제의 소거 속도보다 실질적으로 느린 것인 단계;

[0020] 대상체의 전신 순환으로부터 컨쥬게이트 및 방출된 제제의 소거를 위한 기간을 허용하는 단계; 및

[0021] 상기 기간 후, 상기 제2 제제를 대상체에 투여하는 단계

[0022] 를 포함한다.

[0023] [16] 일부 구체예에서, 제2 제제와 중복되지 않는 독성을 갖는 부가적인 제제 역시도 투여가능하다.

[0024] [17] 제2 태양에서, 본 발명은 대상체의 고형 종양을 치료하기 위해 사용되는 제1 및 제2 화학요법제의 정상 조직에 대한 독성 효과를 최소화하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 제1 및 제2 제제를 재사용가능한 컨쥬게이트로서 담체에 투여하는 단계를 포함하되, 여기서 상기 담체는 각각의 유체역학적 반경이 5-50 nm(즉 직경은 10-100 nm)인 나노입자 또는 거대분자이고 상기 컨쥬게이트는 상기 종양에서 두 가지 상기 컨쥬게이트 모두의 향상된 투과성 및 보유성(EPR)과 효과 농도를 나타낸다.

[0025] [18] 동시 투여의 일부 구체예에서, 제1 제제만이 컨쥬게이트되고 제2 제제는 컨쥬게이트되지 않은 형태이다.

[0026] [19] 일부 경우에서, 제3의 유사하게 컨쥬게이트된 또는 컨쥬게이트되지 않은 치료제 역시도 사용가능하다.

[0027] [20] 전술한 방법과 연계하여, 제2 제제 또는 제3 제제가 컨쥬게이트될 경우 담체는 제1 제제의 것들을 모방한다. 어떤 경우든, 약물을 컨쥬게이트하는데 사용된 것들과 동일한 특징을 갖는 담체를 포함하는 표지된 비-방출성 컨쥬게이트들을 사용하여 고형 종양에 의한 컨쥬게이트의 흡수를 모니터링할 수 있다. 담체가 비-방출성으로 결합된 이러한 컨쥬게이트의 투여는 약물의 대응하는 컨쥬게이트가 EPR 효과를 나타낼지를 검증하도록 할 수 있다. 이러한 모니터링에 사용된 표지들은 종기로는 양전자 방출 단층촬영(PET)으로 감지가 가능한 표지이다.

[0028] [21] 따라서, 본 발명은 또한 고형 종양에서 EPR 효과의 맥락에서 그의 거동과 관련하여 약물의 컨쥬게이트의 약물동태를 모방하는 방법도 제공한다. 약물에 컨쥬게이트된 담체와 크기 및 모양이 유사한 담체를 가진 적합한 조영제를 제공함으로써 약물의 약물동태를, 조영제의 약물동태 모니터링에 의해 예측할 수 있다. 이러한 진단제는 치료제의 컨쥬게이트로 환자를 치료하는 데 적합한지를 결정하는 데에도 유용하다.

[0029] [22] 따라서, 일 태양에서, 본 발명은 화학식 1의 조영제에 관한 것이다.

[0030]
$$\text{PEG} \left(\text{---}^{\alpha} \text{---} \right) \text{킬레이터} \sim \text{I}_n \quad (1)$$

[0031] 식 중, PEG는 40-60 kD의 2-6개의 복수의 아암을 포함하는 폴리에틸렌 글리콜을 나타내고;

[0032] 킬레이터는 테스페리옥사민 또는 플루르-히드록시피리디논 다좌(多座: multidentate)를 나타내며

[0033] I는 양전자 방출 단층촬영(PET)에 적합한 방사능동위원소를 나타내고;

[0034] $\text{---}^{\alpha} \text{---}$ 는 공유 연결자(covalent connector)를 나타내며;

[0035] ~ 는 킬레이터에서의 I의 격리(sequestration)를 나타내며;

[0036] n은 1 내지 상기 PEG의 아암의 갯수의 정수이다.

[0037] [23] 본 발명은 또한 화학식 (2)의 하이브리드 컨쥬게이트도 포함한다

[0038]
$$\text{PEG} \left(\text{---}^{\alpha} \text{---} \right) \text{킬레이터} \sim \text{I}_n \text{ (-L-D)}_x \quad (2)$$

[0039] 식 중 PEG는 40-60 kD의 2-6개의 복수의 아암을 포함하는 폴리에틸렌 글리콜을 나타내고;

[0040] 킬레이터는 테스페리옥사민 또는 플루르-히드록시피리디논 다좌를 나타내며;

[0041] I는 양전자 방출 단층촬영(PET)에 적합한 방사능동위원소를 나타내고;

[0042] $\text{---}^{\alpha} \text{---}$ 는 공유 연결자를 나타내며;

[0043] ~ 는 킬레이터에서의 I의 격리를 나타내며;

[0044] L은 링커;

[0045] D는 치료제;

[0046] n은 1 내지 상기 PEG의 아암의 갯수 마이너스 x까지의 정수이며,

[0047] x는 상기 PEG의 아암의 갯수 마이너스 n까지의 정수이다.

[0048] [24] 멀티-아암 PEG의 사용은 결과적인 나노입자가 덜 유연하고, 이에 따라 더욱 좋기로는 종양에서 유지된다는 장점이 있다. 조영제의 대략 20 nm의 최적 직경(대략 10 nm의 유체역학적 반경)을 갖는다. 직경은 10-100 nm, 또는 10-50 nm 또는 10-25 nm 범위이고, 이는 5-50, 5-25 또는 5-12.5 nm의 유체역학적 반경에 대응한다.

[0049] [25] 다른 태양에서, 본 발명은 종양에서의 조영제의 축적을 모니터링하는 방법에 관한 것으로 상기 방법은 상기 조영제를 투여하고 PET에 의해 상기 조영제의 위치를 추적하는 것을 포함한다.

[0050] 26] 또 다른 태양에서, 본 발명은 약물 컨쥬게이트의 약물동태 및 종양에서의 그의 축적을 평가하는 방법에 관한 것으로 상기 방법은 상기 약물의 컨쥬게이트의 크기를 조영제의 크기와 매칭시키고, 상기 조영제를 투여한 다음 약물 컨쥬게이트 거동의 진단으로서 PET에 의해 종양 내 상기 조영제의 축적을 모니터링하는 것을 포함한다.

[0051] [27] 따라서, 본 발명은 컨쥬게이트된 약물에 의한 환자의 치료 적합성을 진단제에 기초하여 평가하는 방법을 추가로 포함한다. 진단제의 크기(dimensions)는 환자 치료를 위한 약물 컨쥬게이트의 크기와 매칭된다. 보다 광범위하게 진단제는 EPR 효과를 이용하여 치료가능한 환자를 간단히 식별할 수 있다.

[0052] [28] 본 발명은 또한 본 발명의 조영제 및 상기 조영제와 유사한 크기 및 형상을 갖는 약물의 컨쥬게이트를 포함하는 키트도 포함한다.

[0053] [29] 다른 태양에서, 본 발명은 EPR 효과를 나타내도록 변형된 약물 치료에 의해 이익을 얻을 가능성이 있는 대상체를 식별하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 본 발명의 조영제를 후보 대상체에게 투여하고 대상체 체 내에서 조영제의 분포를 모니터링함으로써, 바람직하지 못한 조직 덩어리에 상기 조영제를 축적하는 대상체를 이러한 치료에 의해 이익을 볼 수 있는 대상체로서 동정한다. [참조: 예를 들어, Lee, H., et al., Clin.

Canc. Res., (2017) 23:4190-4202 (상기문헌)].

- [0054] [30] 치료 프로토콜과 관련하여, 약물을 컨쥬게이트하는데 사용된 것과 동일한 특성을 갖는 담체를 갖는 본 발명의 조영제를 사용하여 고형 종양에 의한 컨쥬게이트의 흡수를 모니터링한다. 이를 통해 약물의 해당 컨쥬게이트가 EPR 효과를 나타낼 것인지 여부를 확인할 수 있다.
- [0055] [31] 추가의 태양에서 본 발명은 DNA 복구의 억제제에 의한 처리에 반응할 종양을 갖는 대상체를 동정하는 방법을 포함하되 상기 방법은 DNA 복구 수행에 참여하는 단백질을 인코딩하는 유전자에서의 돌연변이의 존재 여부를 결정하는 것을 포함하며, 여기서 대상체내 상기 돌연변이가 존재하면 이러한 종양을 갖는 대상체인 것으로 동정된다.
- [0056] [32] 또 다른 태양에서 본 발명은 컨쥬게이트가 유연한 담체를 포함하는 고형 종양의 치료 및 영상화를 위한 하이브리드 컨쥬게이트에 관한 것으로, 여기서 담체는 각각 5-50 nm의 유체역학적 반경을 갖는 나노입자 또는 거대분자이고 상기 컨쥬게이트는 고형 종양에서 향상된 투과성 및 보유성(EPR)을 나타냄으로써 해서 상기 컨쥬게이트를 종양에 집중시키고 여기서 상기 담체는 치료제 및 조영제에도 방출가능하게 커플링되는 것이다. 본 발명은 또한 상기 하이브리드 컨쥬게이트를 이용하여 고형 종양의 영상화 및 치료를 연관짓는 방법에 관한 것이기도 하다. "치료진단(theranostics)"라 칭해지는 이러한 하이브리드로 지정된 하이브리드와 같은 임의의 약물에 대한 이러한 하이브리드 약물의 예시적인 구조가 도 12에 나타나 있다.

도면의 간단한 설명

- [0057] [33] 도 1은 시간의 함수로서 혈장에서 4-아암의 40kD PEG(PLX038)에 컨쥬게이트 형태로 커플링된 SN-38의 농도를 보여주는 그래프이다. 방출된 SN-38 및 해독된 형태의 약물, 즉 글루쿠로나이드(SN-38G)에 대한 유사한 결과가 동일한 도면에 표시되어 있다. 비율은 유사하며 쥐에서 50 시간의 반감기를 보여준다.
- [34] 도 2는 HT29 이종이식편-보유 래트에 투여된 다양한 농도의 PLX038의 효과를 이리노테칸과 비교하여 나타낸 것이다.
- [35] 도 3A 및 3B는 혈장과 비교하여 종양에서 다양한 용량의 유리 SN-38에서의 PLX038의 농도를 보여준다.
- [36] 도 4는 전신투여된 PLX038과 제2 약물(예를 들어, 폴리 ADP 리보스 폴리머라제(PARP) 억제제)의 조합의 인간에서의 가상 투여 스케줄을 나타내는 다이어그램이다. PLX038은 제1일에 투여된다; 컨쥬게이트는 종양 근방에서 유리 약물(점선)을 방출하며 컨쥬게이트와 유리 약물 양자 모두는 전신으로부터 소거된다(실선). 전신 소거 2회 반감기 후(이 경우 10일), 전신 PLX038은 원래 농도의 ~ 25%로 감소하는데 이 농도는 최소 유효(및 독성) 수준보다 낮다. 이때 제2 약물이 효과적인 스케줄로 투여된다.
- [37] 도 5는 래트에서 PLX038 및 마우스에서 PLX038A로부터 방출된 SN-38의 C vs. t 플롯을 나타낸다. 래트에서 3.2 μmol (200 mg)/kg의 PLX038로부터 방출된 SN-38에 대한 곡선을, 이전에 결정된 약동학적 파라미터를 사용하여 모델링하였다 (Santi, D. V. 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2012) 109:6211-6216).
- [38] 도 6A-6E는 (A) 양쪽 옆구리에 HT-29 이종이식편이 있는 마우스에서 CT 스캔에 중첩된 PEG40kDa-DFB-⁸⁹Zr의 72시간 및 120시간에서의 최대강도투사(MIP); (B) HT-29 이종이식편이 있는 마우스에서 PEG40kDa-DFB-⁸⁹Zr의 생체분포의 생체외 연구 및 (C) HT-29 종양이 있는 바우스에서의 시간에 대한 종양 혈액 비율; (D) 한쪽 옆구리에 종양이 있는 마우스에서 PEG-(SN-38)3-DFB-⁸⁹Zr의 72 시간 MIP 이미지 및 (E) PEG-(SN-38)3-DFB-⁸⁹Zr (흑색) vs. PEG-DFB-⁸⁹Zr (회색)의 72 시간에서의 생체분포를 나타낸 도면이다.
- [39] 도 7A-7C는 종양 보유 마우스에서 PEG_{40kDa}-(DFB)-⁸⁹Zr₄의 생체분포를 나타낸다.
- [40] 도 8은 HT-29 이종이식편에서의 다양한 ⁸⁹Zr 컨쥬게이트의 생체분포를 나타낸다.
- [41] 도 9는 MX-I 이종이식편에서 다양한 ⁸⁹Zr 컨쥬게이트의 생체분포를 나타낸다.
- [42] 도 10은 종양 치료에 있어 PEG-SN38의 유효성을 나타낸다.
- [43] 도 11A-11C는 SN38 컨쥬게이트와 별도 투여된 탈라조파립의 시너지를 나타낸다.
- [44] 도 12는 일반적인 하이브리드 약물/표지 컨쥬게이트 치료진단제(theranostic)를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0058] 본 발명을 수행하기 위한 모드
- [0059] [45] 기본적으로, 조합 요법의 독성 효과를 최소화하는 프로토콜 설계에는 두 가지 접근 방식이 있다. 첫 번째 접근 방식은 EPR 효과가 치료 대상 고형 종양에서 컨쥬게이트 및 방출된 약물을 실질적으로 유지하도록 약물을 담체에 커플링시킴으로써 상기 고형 종양에서 제1 치료제 또는 약물이 포획되도록 하는 한편, 종양 내에 포획되지 않은 투여된 컨쥬게이트와 방출된 약물은 전신 순환으로부터 신속히 소거되도록 하는 것으로, 여기서 담체는 각각 유체역학적 반경이 5-50 nm, 바람직하게는 약 10 nm(직경 10-100 nm, 바람직하게는 약 20 nm인 나노입자 또는 거대 분자)이다. 이에 따라, 컨쥬게이트가 종양 내에 체류하는 동안, 투여된 컨쥬게이트의 상당 부분과 컨쥬게이트로부터 방출된 약물이 종양 내에 유지된다. 전신 순환으로부터의 소거율이 종양으로부터의 컨쥬게이트 및 방출된 약물의 소거율보다 훨씬 크기 때문에, 컨쥬게이트 형태와 유리 형태 모두의 약물의 유효량이, 종양 세포에 세포 독성 효과를 발휘하는 한편, 이들의 전신 순환 내 농도는 목적하는 수준까지 감소하였다. 예를 들어 전신 순환에서 두 번의 반감기 후, 순환 중의 그리고 정상 조직과 접촉하는 컨쥬게이트 및 유리 약물의 수준은 초기 농도의 25%로 감소하는데, 이 농도는 독성을 경감시키기에 충분히 낮은 것일 수 있다. 컨쥬게이트가 종양에 남아 체제를 방출하기 때문에, 체제는 전신 도메인에서의 농도가 상당히 낮음에도 불구하고 종양에 세포 독성 효과를 발휘할 수 있으며, 따라서 약물에 대한 정상 조직의 노출도 매우 낮다.
- [0060] [46] 이 시점에서 제2 약물이 전신 투여되므로 정상 조직은 제2 약물의 독성 효과에만 노출되고 제1 약물은 종양에 닿지 않게된다. 이에 따라 종양에 대한 조합 독성은 유지되면서도 정상 조직에 대한 조합의 독성 효과는 최소화된다. 제2 약물은 유리 형태로 투여되거나, 또한 유사한 담체와의 컨쥬게이트로서 또는 리포솜, 나노입자, 미셀 등과 같은 전달 비히클에 포함되는 방식 등, 임의의 다른 적합한 형태로 투여될 수 있다.
- [0061] [47] 또한, 제2 약물과 독성이 중복되지 않는 제3 약물을 상기 제2 약물과 동시에 또는 순차적으로 투여할 수도 있다.
- [0062] [48] 별법으로, 제1 및 제2 약물은 둘 다 EPR에 의해 종양에서 유지되는 컨쥬게이트의 형태로 동시에 또는 이격된 시점에 투여될 수 있다. 이러한 체류로 인해 각 약물의 주요 농도는 정상 조직과 접촉하지 않고 종양에서 일어난다. 따라서, 이들 약물의 더 높은 용량 수준은 주로 종양에서 경험되며, 방출된 약물과 함께 투여된 컨쥬게이트는 전신 순환에서 빠르게 소거된다.
- [0063] [49] 일부 경우에서, 체제의 부가적인 컨쥬게이트 형태가 공동투여될 수도 있다.
- [0064] [50] 상기 첫 번째 방법에서 적어도 제1 체제를 투여하고 두 번째 언급된 방법에서 제1 및 제2 체제를 모두 방출하기 위해 본 발명의 방법에서 사용되는 담체는 본질적으로 유연하고 약 10nm의 유체역학적 반경을 갖는다. 적절한 거대분자 담체의 예로는 선형 또는 멀티-아암일 수 있고 분자량이 10-50 kD인 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 들 수 있다. 바람직하게는, 담체는 분자량이 적어도 20 kD인 멀티-아암 PEG이다. 이러한 담체의 특성은 EPR 효과를 최대한 활용할 수 있도록 보장한다. 나노미립자형 담체도 포함된다.
- [0065] [51] 나노분자 담체에 화학치료제의 컨쥬게이트의 방출가능한 형태를 제공하는데 특히 유용한 것은 상기 인용된 미국특허 8,680,315; 9,387,254; 8,754,190; 8,946,405; 및 8,703,907에 상세히 기술된 것과 같은 베타 제거 반응에 의해 체제를 방출하는 링커로서, 이들 문헌은 모두 베타 제거에 의해 체제를 방출하는 유용한 링커의 구조뿐만 아니라 본 발명에 유용한 나노분자 담체의 개시와 관련하여서도 본원에 참고로 병합된다.
- [0066] [52] 다른 링커로는 에스테르, 카보네이트 또는 카바메이트의 가수분해, 아미드의 단백질 분해 또는 니트로리덕타제에 의한 방향족 니트로기의 환원에 의해 절단될 수 있는 것들을 들 수 있다.
- [0067] [53] 본 발명의 방법의 대상체는 전형적으로 인간 대상자이지만, 본 발명의 방법은 가축 및 반려동물을 비롯한 수의학적 맥락의 대상에도 적용 가능하다. 본 발명의 방법은 또한 인간 사용을 위한 프로토콜을 설계하기 위해 준비된 래트, 마우스, 토끼 또는 기타 모델 시스템과 같은 실험실에서 유용한 동물 모델에 적합하다.
- [0068] [54] 조합 요법에 사용할 수 있는 약물에 대해서는 다양한 화학요법제가 알려져 있으며 이들 중 임의의 조합이 제1 및 제2 약물로 선택될 수 있다. 부가적으로 또는 상승적으로 작용하는 체제, 예를 들어 각각이 DNA 복구를 억제하는 약물의 조합이 바람직하다.
- [0069] [55] Topo 1 억제제와 같이 DNA 손상을 유발하는 약물이, 보통은 그 게놈이 DNA 복구를 돕는 유전자에 돌연변이를 함유하는 것인 종양을 치료하는데 특히 유용하다. 그 중에서도, 이들 유전자에는 BRCA1, BRCA2, 운동실조 모

세혈관 확장 돌연변이(ATM) 키나아제를 인코딩하는 ATM 및 Rad-3 관련(ATR) 키나아제를 인코딩하는 ATR이 포함된다. 본 발명은 Topo 1 억제제에 의한 치료에 향상된 민감성을 보일 종양을 동정하는 것을 포함하며 여기서 종양-보유 대상체의 계층은 BRCA1, BRCA2, ATM 또는 ATR에 돌연변이를 갖는 적어도 하나의 유전자 또는 돌연변이가 DNA 복구를 증강시키는 유전자의 능력을 방지 또는 억제하는 다른 유전자를 갖는다. 이 반응은 PARP 억제제와 같은, DNA 복구와 관련된 제2 효소를 억제함으로써 더욱 강화될 수 있으며, 이는 다시 Topo 억제제에 의해 야기되는 높은 수준의 DNA 파손으로 인해 증폭되는 합성 치사율을 유발한다. 따라서, 수동적으로 표적화된 PEG_SN38을 사용하는 경우, 종양의 유전적 상태를 알고 DNA 손상 반응 시스템의 억제제를 다양하게 선택하는 것이 유용하다.

- [0070] [56] 제제의 여러 예로는 다음을 들 수 있다:
- [0071] 암세포의 성장 또는 분열을 유발하는 신호를 간섭 또는 방지하는 "신호 전달 억제제";
- [0072] "세포독성제";
- [0073] "세포 주기 억제제" 또는 "세포 주기 제어 억제제" - 이들은 세포에 기원을 제공하는 유사분열로부터 세포를 그의 딸 세포로 분열시키는 유사분열 후 이벤트에 이르기까지, 세포를 그의 정상적인 세포 주기, 세포의 수명을 통해 세포 진행을 간섭한다;
- [0074] "체크포인트 억제제" - 이들은 예컨대 S/G2 체크포인트, G2/M 체크포인트 및 G1/S 체크 포인트와 같은 세포 주기 체크포인트의 정상적인 기능을 간섭한다;
- [0075] DNA 복제 및 전사에 필요한 효소인, 토포이소머라제 I 또는 II 활성을 간섭하는, 캄토테신과 같은 "토포이소머라제 억제제";
- [0076] "수용체 티로신 키나제 억제제" - 이들은 티로신 키나제 활성을 보유하는 성장 인자 수용체의 활성을 간섭한다;
- [0077] "세포자멸사(apoptosis) 유도 물질" - 이들은 프로그램된 세포 사멸을 촉진한다;
- [0078] 필수 대사산물을 밀접하게 모방하고 이에 따라 이와 관련된 생리적 반응을 간섭하는, 겐시타빈 또는 히드록시우레아와 같은 "항대사산물";
- [0079] "텔로머라제 억제제" - 이들은 텔로미어 길이를 연장하고 세포 수명 및 그의 복제능을 연장시켜주는 효소인, 텔로머라제의 활성을 간섭한다;
- [0080] "사이클린-의존성 키나제 억제제" - 이들은 히스톤, 세포골격 단백질, 전사 인자, 종양 억제 유전자 등과 같은 세포 단백질의 인산화를 통해 세포 주기의 여러 상(phases) 사이의 주요 단계를 제어하는 사이클린-의존성 키나제를 간섭한다;
- [0081] "DNA 손상 물질";
- [0082] "DNA 복구 억제제";
- [0083] 종양 성장 동안 발생하는 새로운 혈관의 생성 또는 기존 혈관의 성장을 간섭하는 "항-혈관신생제"; 및
- [0084] 미토콘드리아의 호흡 연쇄 기능을 직접 또는 간접적으로 파괴하는 "미토콘드리아 독".
- [0085] [57] 종양 치료를 위한 이들의 많은 조합이 임상적으로 승인되었다.
- [0086] [58] 조합적으로 사용가능한 바람직한 제제의 예로는 카보플라틴, 시스플라틴, 사이클로포스파미드, 독소루비신, 다우노루비신, 에피루비신, 미토마이신 C, 미토잔트론과 같은 DNA 손상 물질; 5-플루오로우라실 (5-FU) 또는 FUDR, 겐시타빈 및 메토트렉세이트를 비롯한 DNA 복구 억제제; 캄토테신, 이리노테칸 및 토포테칸과 같은 토포이소머라제 I 억제제; 블레오마이신, 도세탁셀, 독소루비신, 에토포시드, 파클리탁셀, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신 및 비노렐빈 등의 S/G2 또는 G2/M 체크포인트 억제제; G1/조기 S 체크포인트 억제제; G2/M 체크포인트 억제제; 제니스테인, 트라스투주맙, ZD1839 등의 수용체 티로신 키나제 억제제; 세포독성 물질; 세포자멸사-유도 물질 및 세포 주기 제어 억제제를 들 수 있다.
- [0087] [59] 예시적인 조합으로는 DNA 복구 억제제와 조합된 DNA 손상 물질, 토포이소머라제 I 또는 토포이소머라제 II 억제제와 조합된 DNA 손상 물질, S/G2 또는 G2/M 체크포인트 억제제와 조합된 토포이소머라제 I 억제제, G2/M 체크포인트 억제제와 조합된 G1/S 체크포인트 억제제 또는 CDK 억제제, 세포독성 물질과 조합된 수용체 티로신 키나제 억제제, 세포독성 물질과 조합된 세포자멸사-유도 물질, 세포-주기 제어 억제제와 조합된 세포자멸

사-유도 물질, 세포독성 물질과 조합된 G1/S 또는 G2/M 체크포인트 억제제, DNA 복구 억제제와 조합된 토포이소머라제 I 또는 II 억제제, 세포 주기 제어 억제제와 조합된 토포이소머라제 I 또는 II 억제제 또는 텔로머라제 억제제, 토포이소머라제 II 억제제와 조합된 토포이소머라제 I 억제제, 및 조합된 2종의 세포독성 물질을 들 수 있다.

[0088] [60] 특정 제제의 예로는 시스플라틴 (또는 카보플라틴) 및 5-FU (또는 FUDR), 시스플라틴 (또는 카보플라틴) 및 이리노테칸, 이리노테칸 및 5-FU (또는 FUDR), 비노렐빈 및 시스플라틴 (또는 카보플라틴), 메토트렉세이트 및 5-FU (또는 FUDR), 이다루비신 및 AraC, 시스플라틴 (또는 카보플라틴) 및 탁솔, 시스플라틴 (또는 카보플라틴) 및 에토포시드, 시스플라틴 (또는 카보플라틴) 및 토토펜, 시스플라틴 (또는 카보플라틴) 및 다우노루비신, 시스플라틴 (또는 카보플라틴) 및 독소루비신, 시스플라틴 (또는 카보플라틴) 및 겐시타빈, 옥살리플라틴 및 5-FU (또는 FUDR), 겐시타빈 및 5-FU (또는 FUDR), 아드리아마이신 및 비노렐빈, 탁솔 및 독소루비신, 플라보피리돌 및 독소루비신, UCN-01 및 독소루비신, 블레오마이신 및 트리클로르페라진, 비노렐빈 및 에텔포신, 비노렐빈 및 스펅고신 (및 스펅고신 유사체), 비노렐빈 및 포스파티딜세린, 비노렐빈 및 캄토테신, 시스플라틴 (또는 카보플라틴) 및 스펅고신 (및 스펅고신 유사체), 스펅고신 (및 스펅고신 유사체) 및 다우노루비신 및 스펅고신 (및 스펅고신 유사체) 및 독소루비신을 들 수 있다.

[0089] [61] 일 구체예에서, 제1 약물은 토포이소머라제 억제제인 SN-38의 본 발명의 방출가능한 컨쥬게이트이고, 예시적인 제2 약물은 PARP 억제제, mTOR 억제제, 트라 벡틴, 시스-백금, 옥살리플라틴, 플루오로우라실, 테모졸로미드 및 빈크리스틴을 포함하며 - 이들 모두 SN-38과 시너지 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다.

[0090] [62] 특정 종양은 특히 PARP 억제제 치료에 민감하며, 이들 종양에서는 PARP 억제제가 조합 약물로 선호된다. 이들은 보통은 DNA 복구를 돕는 단백질을 제공하는 데 도움이 되는 유전자의 돌연변이가 유전자의 이러한 특성을 제거하는 종양이다. 이러한 종양은 또한 SN38과 같은 토포이소머라제 억제제에 반응성인데, 이는 토포이소머라제의 억제가 이들 종양에는 결손된 DNA 복구를 필요로 하는 과도한 DNA 손상을 일으키기 때문이다. 이들 유전자로는 BRCA1, BRCA2, 운동실조 모세혈관 확장 돌연변이(ATM) 키나아제를 인코딩하는 ATM 및 Rad-3 관련(ATR) 키나아제를 인코딩하는 ATR을 들 수 있다. 본 발명은 BRCA1, BRCA2, ATM 또는 ATR에서 또는 돌연변이가 DNA 복구를 향상시키는 유전자의 능력을 방지 또는 억제하는 다른 유전자에서 돌연변이를 갖는 종양을 확인하는 것, 그리고, 본 발명의 SN38 컨쥬게이트를 예컨대 PARP 억제제 또는 DNA 복구의 다른 억제제를 이용한 후속 처리와 조합 치료하는 것을 포함한다. 약물은 신체 나머지 부분으로부터 제거된 후 종양에 축적되어 잔류하므로, SN38의 독성은 종양에만 국한되고 신체 전체는 PARP 억제제의 독성 만 처리하면된다.

[0091] [63] 제2 약물로서 투여되는 상기 나열된 약물 중 일부는 이들의 독성이 중복되지 않는 한 순차적으로 또는 동시에 조합 투여될 수 있다.

[0092] 영상화(Imaging)

[0093] [64] 본 발명의 방법은 위의 첫 번째 접근법에서 제1 제제에 대해 투여된 컨쥬게이트의 능력 및 두 번째 접근법에서 제1 및 제2 제제 두 가지 모두의 EPR 효과를 받을 능력에 의존하기 때문에, 이것이 실제로 그러한지를 확인하는 것이 중요한데, 이는 종양이 이질적이고 선택된 특정 담체가 EPR 효과가 존재한다는 의미에서 대상체에 존재하는 고형 종양의 혈관 구조의 포어 구조와 양립할 수 있어야 하기 때문이다. 따라서, 본 발명의 방법의 일부 구체예에서, 이것은 동일한 담체 또는 약물(들)에 링크된 것과 동일한 특징을 갖는 담체에 비-방출적으로 커플링된 표지의 컨쥬게이트와의 동시 또는 별도 투여에 의해 확인된다. 예를 들어 형광 표지와 같은 검출가능한 표지라면 어느 것이든 사용될 수 있지만, 양전자 방출 단층촬영(PET) 스캔으로 검출가능한 동위원소를 사용하는 것이 가장 편리하다. 이후 동위원소의 비-방출성 컨쥬게이트를 모니터링하여 종양에 의한 우선적인 흡수 및 보유가 나타나는지 여부를 탐지한다. 그렇다면(탐지되면), 본 발명의 방법이 사용된다. 만일 표지된 비-방출성 컨쥬게이트에 의해 종양이 EPR 효과를 나타내지 못하는 경우, 본 발명의 방법은 금기시된다. 따라서 검출가능한 동위원소는 이러한 동위원소를 거대분자 담체에 결합시키는 수단으로서 당업계에 잘 알려져 있다.

[0094] [65] 영상화에는, 유사한 컨쥬게이트가 사용된다. 전술한 바와 같이, 직경이 대략 20 나노미터가 되도록 본 발명의 조영제를 설계하고 과도한 유연성을 피하는 것이 유리하다. 이는 40-60kD 범위의 멀티-아암 PEG 폴리머를 사용하여 수행할 수 있다. 이 폴리머와 관련된 아암의 수는 1-6개 범위일 수 있지만, 본 발명에서는 3-5 개 아암의 멀티-아암 PEG, 더욱 좋기로는 4개의 아암에 초점이 맞추어진다.

[0095] [66] 화학식 (1)에서 n의 값은 1에서 폴리머와 관련된 아암의 갯수까지 다양 할 수 있으며, 본 발명의 조성물에서 n의 값은 조성물 내 모든 개별적인 영상화 모이어티에서 동일하지 않을 수 있음을 이해하여야 한다. 따라서,

예를 들어, n이 4 인 4개 아암의 PEG 또는 n이 1인 단일 사슬 PEG의 경우, 주어진 조성물에서 대부분의 개별 "분자"는 각각 n의 값으로 4 또는 1을 포함할 것이다. 그러나, 예를 들어 4개 아암의 PEG의 경우, $n = 3$ 또는 $n = 2$ 는, 평균을 나타내며 개별 개체 중 일부는 4를, 일부는 3을, 일부는 2를, 그리고 일부는 1을 n 값으로 포함할 수 있다.

[0096] [67] 또한, 상기 언급된 화학식 1의 조영제의 구조와 관련하여, 킬레이터는 본 발명에서 "폴루르-히드록시피리딘 다좌"로 약칭되는, 복수개의 히드록시피리딘으로 이루어진 다좌 킬레이터 또는 데스페리옥사민을 나타낸다. 이러한 다양한 킬레이터는 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 문헌 [Ma, M. T. 등, Dalton Trans (2015) 44:4884-4900 및 Deri, M. A., J Med Chem (2014) 57:4849-4860]에 상세히 설명되어 있다. 이들 문헌에서 이들 리간드에 대한 설명은 구체적으로 본원에 참고로 병합된다.

[0097] [68] 화학식 (1)의 공유 커넥터는 킬레이터에 대한 직접 결합일 수 있거나 또는 1-20개의 연결 원자를 포함하는 디펩티드 또는 이기능성 링커와 같은 중간체 링커가 있을 수 있다. 본 발명의 맥락에서 PET에 유용한 방사능 동위원소 (I)는 당 업계에 공지되어 있으며, 특히, 문헌 [Smith, S. V. 등, "Production and Selection of Metal PET Radioisotopes for Molecular Imaging"의 표 3, Radioisotopes - Applications in Bio-Medical Science, Nirmal Singh, ed., 챕터 10]에 제시된 서브세트들이 ^{89}Zr , ^{94}Tc , ^{101}In , ^{81}Rb , ^{66}Ga , ^{64}Cu , ^{62}Zn , ^{61}Cu 또는 ^{52}Fe 와 같은 적절한 반감기를 갖는 것들이다.

[0098] [69] 본 발명의 조영제를 활성제, 즉 약물의 전달을 위한 대체물로 사용하기 위해, 조영제는 약물 컨쥬게이션에 사용되는 담체와 동일한 특성을 갖는 담체를 함유한다. 이들은 이어서 고형 종양에 의한 컨쥬게이트의 흡수를 모니터링하는데 사용된다. 이를 통해 약물의 대응하는 컨쥬게이트가 EPR 효과를 나타낼 것인지 여부를 확인할 수 있다.

[0099] [70] 별도의 치료 및 영상화 컨쥬게이트를 사용하는 것에 대한 대안은 고형 종양의 치료 및 영상화를 위해 화학식 2의 하이브리드 컨쥬게이트를 사용하며, 상기 컨쥬게이트는 유연한 담체를 포함하는데, 여기서 담체는 각각 유체역학적 반경이 5-50 nm인 나노입자 또는 거대분자로서, 상기 컨쥬게이트는 고형 종양에서 향상된 투과성 및 봉성(EPR)을 나타내어 종양에 상기 컨쥬게이트를 집중시키고, 상기 담체는 치료제에 방출가능하게 커플링되고 조영제에도 커플링된다. 따라서, 화학식 (1)에서와 같이 화학식 (2)

[0100]
$$\text{PEG} \left(\text{---}^{\alpha} \text{ 킬레이터} \sim \text{I} \right)_n \text{ (-L-D)}_x \quad (2)$$

[0101] 에서,

[0102] 일부 구체예에서, I는 ^{89}Zr , ^{94}Tc , ^{101}In , ^{81}Rb , ^{66}Ga , ^{64}Cu , ^{62}Zn , ^{61}Cu 또는 ^{52}Fe 이고, 및/또는 PEG는 대략 40 kD의 α 4 아암의 폴리에틸렌 글리콜이며, n은 1-4이고, 및/또는 킬레이터는 데스페리옥사민-B이고, 및/또는 는 직접 또는 간접 결합이다.

[0103] [71] 도시된 바와 같이, PEG의 아암들 중 적어도 하나는 조영제에 의해 점유되고 적어도 하나는 치료제에 의해 점유된다. PEG 폴리머의 총 아암 갯수 이하의 다양한 조합이 고려된다. 치료제는 SN38 또는 다른 토포이소머라제 억제제 또는 PARP 또는 키나제 억제제와 같이 종양에 축적되어 이로움을 발휘하는 종양 치료를 위한 임의의 다른 적합한 제제일 수 있다.

[0104] [72] 본 발명의 조영제는 또한 EPR 효과를 나타내는 치료제로 치료하기 쉬운 종양 또는 기타 조직 덩어리를 보유한 대상체를 확인하는데 유용하다. 따라서, 조영제를 대상체에 투여한 다음, 종양이 예컨대 실제로 유사한 크기의 실체를 우선적으로 흡수 및 유지할지 여부를 결정하기 위해 모니터링할 수 있다.

[0105] [73] 본 출원에서 "a", "an" 등은 문맥 상 다른 의미가 의도된 것이 분명하지 않은 한 하나 또는 그 이상을 의미하는 것으로 의도된다. 또한, 용어 "화학요법제/화학치료제", "제제" 및 "약물"은 상호교환적으로 사용된다. 특정한 수치적 특성이 제시된 경우, 인용된 숫자는 일반적으로 플러스-또는-마이너스 10%, 종기로는 플러스-또는-마이너스 5%, 더욱 종기로는 플러스-또는-마이너스 1%의 오차 막대를 가질 것이다. 따라서, 10-50 nm의 범위는 9-55 nm의 범위를 포함할 수 있다. "유체역학적 반경"은 겔보기 스톱스 반경 - 문제의 분자가 예컨대 겔 투과 크로마토그래피에 의해 측정된 것과 같은 속도로, 용액을 통해 확산되는 단단한 구체의 반경을 의미한다.

[0106] [74] 본 발명의 대상체는 전형적으로 인간이지만, 실험실 모델 및 수의학 대상체와 같은 비인간 동물도 포함한

다.

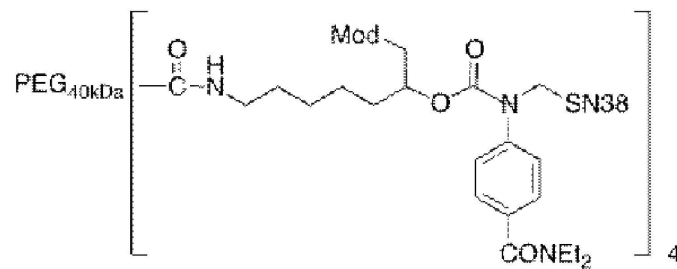
[75] 본 명세서에 인용된 모든 문서는 본 명세서에 참고로 포함된다.

[76] 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위해 제공되는 것으로, 본 발명을 제한하기 위한 것은 아니다.

실시예 1

컨쥬게이트된 SN-38의 투여

[77] SN-38은 전구약물인 이리노테칸에서 방출되는 활성 약물인 토포이소머라제 I 억제제이다. SN-38의 컨쥬게이트는 WO 2015/051307에 설명되어 있다. SN-38의 두 가지 다른 컨쥬게이트인: PLX038 및 PLX038A를 준비하였다. 이들 컨쥬게이트는 β -제거에 의한 방출에 영향을 미치는 링커를 통해 약물을 40kD의 4-아암 PEG에 방출가능하게 커플링시킨다. PLX038 및 PLX038A의 구조는 아래에 나타내었으며, 여기서 "Mod"는 PLX038에서 -CN이고 PLX038A에서 메틸 설포닐이다.



[78] HT29 종양 이종이식편을 보유하는 6 마리의 래트에게 ~ 200 mg/kg의 PLX038을 주입하고, 컨쥬게이트 및 방출된 약물 및 그의 글루쿠로나이드(SN-38G)의 혈장 및 종양 농도를 형광 모니터링과 함께 HPLC로 추적하였다. 도 1에 도시된 바와 같이, 전신 순환에서 PLX038의 반감기는 약 50시간이다. 컨쥬게이트 및 유리 약물 그리고 SN-38G는 유사한 반감기를 나타낸다.

[79] 도 2에 나타난 바와 같이, PLX038 형태의 SN-38 20 nmol/kg의 무독성 용량의 효능은 이리노테칸 대조군의 독성 위장 용량의 효능을 증가한다.

[80] 이는 다양한 용량 수준으로 종양에서 컨쥬게이트로부터 방출된 컨쥬게이트 PLX038 및 SN-38의 수준을 나타낸 그래프인 도 3A 및 3B에 나타난 결과에 의해 설명된다. 도 3A에서 볼 수 있듯이, 200mg/kg의 투여 용량에서 종양(왼쪽 막대)의 PLX038 수준은 약 8 nmol/g 인 반면 혈장(오른쪽 막대로 표시)의 농도는 거의 검출할 수 없다. 마찬가지로, 도 3B에서 방출된 SN-38과 관련하여 동일한 용량에서, 왼쪽 막대는 약 80 pm/g의 종양 농도를 나타내는 반면, 다시 오른쪽 막대는 순환시 거의 검출할 수 없음을 나타낸다. 실제로, 더 낮은 용량에서 컨쥬게이트와 유리 약물은 혈장에서 검출되지 않는 반면, 종양은 이러한 모이어티들을 유의한 농도로 나타낸다.

실시예 2

제안된 인간 프로토콜

[81] 전신 투여된 PLX038과 제2 약물(예를 들어, PARP 억제제)의 조합에 대한 인간 투여 스케줄이 제안되며, 여기서 PLX038은 제1일에 투여되고, 이에 의해 컨쥬게이트가 종양에 축적되어 유리 약물을 방출한다. 컨쥬게이트와 유리 약물은 전신으로부터 동시에 제거된다. 전신 소거 2회 반감기 후 또는 10일 후, 전신 PLX038은 원래 농도의 $\sim 25\%$ 로 감소하는데, 이는 그의 최소 유효 및 독성 수준보다 낮은 것이다. 이때 SN38과 시너지 효과를 내는 제2 약물을 20일 동안 경구 투여한다.

[82] 도 4에서 보는 바와 같이 EPR 효과는 종양(점선)에 PLX038을 집중시키는 반면, 전신 PLX038(실선)은 도시된 바와 같이 제10일에 투여되는, 제2 약물에만 독성 효과가 국한될 정도로 충분히 낮다. 그 시점에서, 종양 내 컨쥬게이트의 농도는 여전히 최소 유효 수준 이상이지만 독성 수준보다는 낮다.

실시예 3

마우스 모델의 설계

[83] 대부분의 이종이식편 종양 모델은 마우스를 숙주로 사용하기 때문에, 본 발명의 프로토콜을 마우스 시험에 적용하는 것이 바람직하다. 마우스에서 PLX038 컨쥬게이트의 반감기는 약 24시간에 불과한 반면, 래트에서는 약

48시간이고 인간에서는 약 6시간이기 때문에 적응이 필요하다. 상당한 양의 SN-38이 방출되기 전에 마우스에서 PLX038의 더 빠른 소거가 일어나기 때문에, 더 높은 절단 속도를 갖는 SN-38의 다른 컨쥬게이트, PLX038A가 쥐 실험에 사용된다.

[0123] [84] 링커 절단은 종 독립적이다. PLX038의 32%는 인간에서 컨쥬게이트의 한번의 반감기에 걸쳐 SN-38로 전환되는 반면, 래트에서는 12%, 마우스에서는 6% 만이 전환된다. PLX038A의 경우, 절단 반감기는 70시간이고 마우스에서 컨쥬게이트의 일회 반감기 동안 26%가 SN-38로 전환된다. 이 컨쥬게이트는 또한 100% 생체이용률을 갖는 마우스에서 복강내(IP)로 투여될 수 있다.

[0124] [85] 그러나, 마우스에서 PLX038A는 여전히 짧은 $t_{1/2}$ 의 신장 제거를 나타내므로 단일 용량은 높은 종양 축적에 영향을 미치지 않을 수 있으며 이를 달성하기 위해 더 긴 노출이 필요할 수 있다. 따라서, 래트에서 높은 종양 축적을 제공하는 컨쥬게이트의 단일 유효 용량을 시뮬레이션하는 마우스에서 PLX038A에 대한 다회-용량 스케줄이 이용된다.

[0125] [86] 비교를 위해, 대장암(HT-29)에 대한 래트 이종이식편 모델에서 단일 200 mg/kg의 PLX038은 위장(GI) 독성 없이 종양 성장을 61% 억제한 반면, 거의-균등한 종양 억제를 나타낸 이리노테칸 대조군은 유의한 GI 독성을 나타냈다. 혈청 수준이 검출불능인 때 투여 14일 후 종양에서는 PLX038 및 SN-38이 대량 축적되었다. 쥐에서 PLX038의 약물동태(PK)를 시뮬레이션 할 마우스에서 PLX038A에 대한 투여 스케줄을 도 5에 도시하였다. 152, 60 및 54 mmol/kg의 1일 3회 감소되는 용량은 PLX038로부터 방출된 SN-38의 래트 PK 프로파일을 효과적으로 시뮬레이션한다. 스케줄에서 SN-38의 "유효" 반감기는 2일을 초과하는 반면, 마우스의 이리노테칸으로부터의 SN-38은 ~ 2 시간이다. 도 5를 뒷받침하는 데이터가 표 1에 제시되어 있다.

표 1

마우스 용량 스케줄	conj 용량, mg	SN-38 용량, mg	SN-38 용량, nmol
용량 1	1.7	0.060	152
용량 2	0.9	0.032	80
용량 3	0.6	0.021	54
합계	3.2	0.1	285.4

		conj 용량,	SN-38 용량,	SN-38 용량,	AUC,	time over 8 nM
		mg/kg	mg/kg	μmol	μM-h	
래트	용량	200	7	3.2	11	~7 일
마우스	총 용량	128	4.5	0.285	11	~5 일

[0126]

[0127] 실시예 4

[0128] 쥐 실험

[0129] [87] EPR 효과를 이용하여 컨쥬게이트를 축적하는 HT29 이종이식편의 능력을, 100g(15nmol/마우스) 당 40kD 4-아암 PEG 플루오레신 50nmol의 1회 용량을 마우스에 IP 주입하여 약 10 μM의 혈청 농도를 얻는다. 혈액과 종양을 다양한 시점 (6, 24, 48 및 96 시간)에서 샘플링하고 플루오레신 수치를 측정한다. (종양을 절제하고 측정을 위해 수산화나트륨으로 절단한다.)

[0130] [88] 실시예 3에서 개발된 3회-용량 스케줄을 이용하여 누드 마우스 HT29 종양 이종이식편에서 종양 성장 억제에 대해 PLX038A를 시험하였다.

[0131] [89] HT29 이종이식편이 있는 누드 마우스 모델을 실시 예 3에서 개발된 PLX038A의 3회-투여 스케줄로 처리하고, 제14일에 마우스에게 매일 PARP 억제제를 경구 투여하였다.

[0132] [90] PLX038A와 유사한 PARP 억제제의 컨쥬게이트를 HT29 종양을 보유하는 누드 마우스에 매일 투여하고 유리 억제제를 매일 투여한 것과 비교 시험하였다.

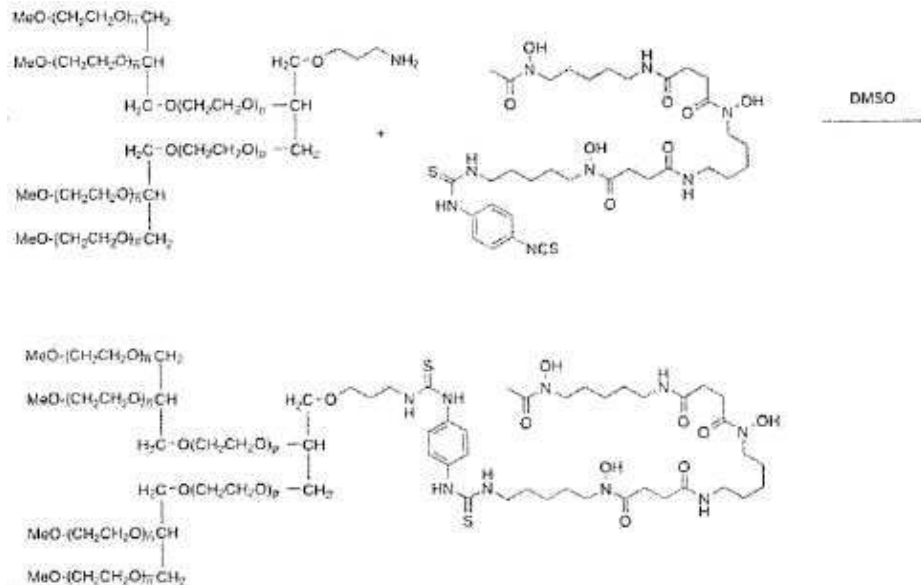
[0133] [91] 컨쥬게이트 PLX038A와 PARP 억제제의 관련 컨쥬게이트의 조합 역시도 이 모델에서 동시에 시험한다.

[0134] 실시예 5

[0135] PEG_{40kDa}-PET 동위원소의 합성

[0136] [92] PEG-테스페리옥사민 컨쥬게이트의 합성

[0137] [93] DFB에 커플링된 4-분지형 PEG_{40kDa}:



[0138]

[0139] [94] 2 mL DMSO 중 4-분지형 40kDa PEG-아민(GL4-400PA, NOF; 150 mg, 3.75 μ mol) 및 p-이소티오시아네이트벤질-테스페리옥사민 B (마크로사이클릭; 4 mg, 5.3 μ mol)의 용액을 주변 온도에서 16시간 유지한 다음, 물에 대해 투석하여 (SpectraPor 2 막, 12-14 kDa 컷오프), 컨쥬게이트되지 않은 물질을 제거하였다. 용액을 증발 건조시키고, 잔사를 2 mL의 THF에 용해시키고 이를 교반하면서 50 mL의 MTBE에 서서히 첨가하였다. 침전된 컨쥬게이트를 수집 및 건조시켜 생성물(140 mg)을 얻었다. 2.4-mg 샘플을 58 μ L의 물에 용해시켜 1 mM 용액을 만들었다. 20- μ L 분주액을 100 μ L의 1 mM Fe(III) 퍼클로레이트에 첨가하여, OD_{425nm} = 0.459를 나타내는 용액을 얻었다. 2,300 M \cdot cm \cdot l의 흡광계수(extinction coefficient)에 기초할 때, 이는 1.1 mM의 DFB 농도를 나타내는 것으로, 예상과 잘 일치한다.

[0140] [95] [DFB=테스페리옥사민 B] (DFB)에 커플링된 PEG_{40kDa}-(DFB)₄: 다음에 나타낸 바와 같이, PEG_{40kDa}(NH₂)₄를 p-이소티오시아네이트벤질-DFB와 반응시켜 PEG_{40kDa}-(DFB)₄를 제조하였다 (Perk, L. R. 등 Eur. J. Nucl. Med. Mol. I. (2010) 37:250-259; Fischer, G. 등, Molecules (2013) 18:6469-6490; 및 van de Watering, F. C. 등 Biomed. Res. Int. (2014) 2014:203601) (macrocylics).

[0141] DFB에 커플링된 4-아암 PEG_{40kDa}-(PEG_{40kDa}-(DFB)₄):



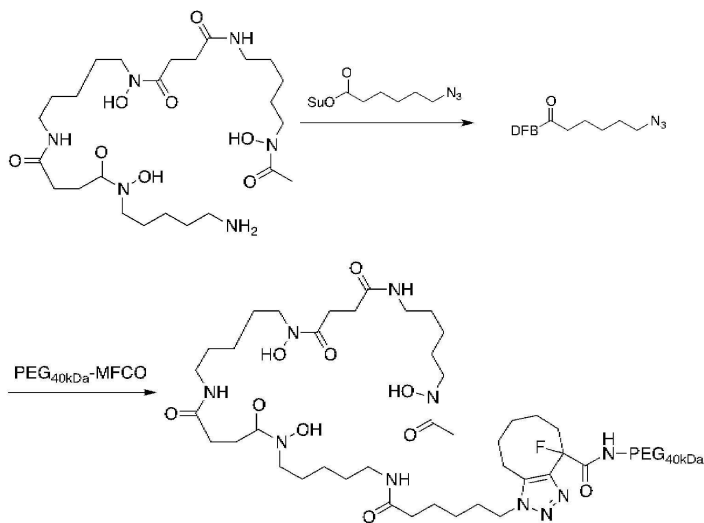
[0142]

[0143] [96] 2 mL의 DMF 중 40-kDa 4-아암 PEG-테트라(숙신이미딜 에스테르) (JenKem Technologies; 100 mg, 10 μ mol 숙신이미딜 에스테르), 테페록사민 메실레이트 (Sigma; 10 mg, 15 μ mol), N,N-디이소프로필에틸아민 (35 μ L, 200 μ mol), 및 HATU (1-[Bis(dimethylamino)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아조 [4,5-b]피리디늄 3-옥사이드 헥사플루오로포스페이트) (7 mg, 18 μ mol)의 용액을 주변 온도에서 16 시간 유지한 후, 물 및 메탄올에 대해 투석하여(SpectraPor 2 막, 12-14 kDa 컷오프) 컨쥬게이트되지 않은 물질을 제거하였다. 용액을 증발 건조시키고 잔사를 2 mL의 THF에 용해시킨 다음 50 mL의 MTBE에 교반과 함께 서서히 첨가하여 컨쥬게이트(84 mg)를 얻었다. 5.0 mg 분주액을 500 μ L의 물에 용해시켜 0.21 mM 컨쥬게이트 용액을 얻었다. 전술한 바와 같이 1 mM Fe(III) 퍼클로레이트에 첨가함으로써 DFB 함량 분석하자 0.84 μ M DFB가 수득되었는데, 이는 컨쥬게이트 하나 당 4개의 DFB를 가리킨다.

[0144] 대안 방법

[0145] [97] DFB를 $N_3-(CH_2)_nCO-HSE$ 로 아실화시킴으로써, 컨쥬게이션을 위한 대안적인 DFB 시약을 제조한다; SPAAC에 의해 사이클로옥틴-유도화된- $PEG_{40kDa}(NH_2)_4$ 와 $N_3-(CH_2)_nCO-DFB$ 를 반응시킨다.

[0146]



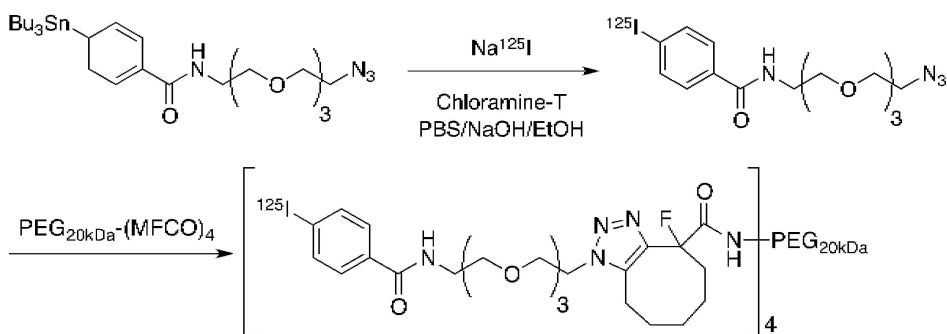
[0147] PET 동위원소와의 커플링:

[0148] [98] PET 동위원소에 대한 커플링은 페길화(PEGylated)-DFB를 ^{89}Zr 옥살레이트로 처리한 다음 크기-배제 크로마토그래피를 이용하여 정제함으로써 수행하였다 (Perk, L. R., 상기문헌; 및 van de Watering, F. C., 상기문헌).

[0149] [99] $PEG_{40kDa}-(DFB)_4 + ^{89}Zr\text{-옥살레이트} \rightarrow PEG_{40kDa}-(DFB-^{89}Zr)_4$

[0150] [100] $PEG_{40kDa}-(BzI^{125}I)_4$ 는 하기 표시된 ^{125}I -아지드를 사이클로옥틴-유도화된- $PEG_{40kDa}(NH_2)_4$ (MFCO-HSE + $PEG_{40kDa}(NH_2)_4$ 로부터 제조)와 반응시켜 제조되며, 이에 의해 청정한 고수율 스트레인-촉진된 아지드-알킨 사이클로부타(SPAAC) 반응이 결과된다. SPAAC를 이용한 거대분자의 안정한 요오드화를 위한 $[^{125}I]$ 요오도벤조일-PEG-아지드의 제조 및 방사능요오드화가 아래에 도시되어 있다.

[0151]

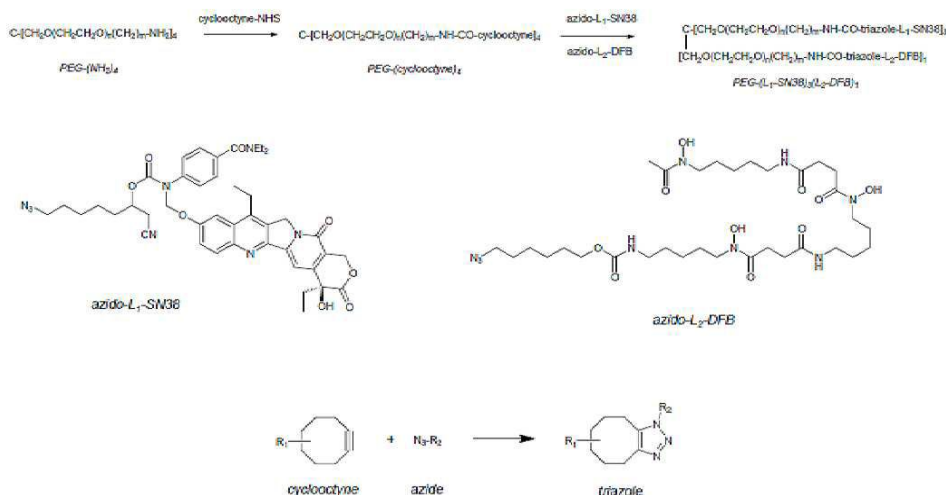


[0152] 실시예 6

[0153] 하이브리드 SN38/DFB 컨쥬게이트

[0154] [101] 1x 안정한-DFB 및 3x 방출성-SN-38 ($PEG_{40kDa}-(sDFB)_1(rSN38)_3$)에 커플링된 4-아암 PEG_{40kDa} :

[0155] A. 하이브리드 SN38/DFB 컨쥬게이트의 제조.



[0156]

[102] N-((6-아지도헥실옥시)카보닐) 테스페리옥사민 B: 2 mL의 아세트니트릴 중 6-아지도헥실 숙신이미딜 카보네이트 (35 mg, 120 μ mol)의 용액을 0.5 M NaHCO₃ 중 테페록사민 메실레이트 (65 mg, 100 μ mol)의 용액에 첨가하였다. 16 시간 교반 후, 얻어진 백색 침전물을 수집하고 물 및 아세트니트릴로 세척한 다음 진공 건조시켜 생성물을 수득하였다 (45 mg; 62%). MS: [M+H]⁺ = 730.46 (C₃₂H₆₀N₉O₁₀ 계산치 = 730.44).

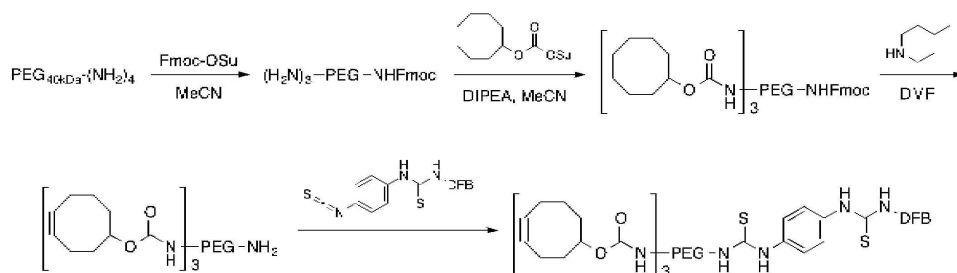
[103] 시아노 모듈레이터를 갖는 아지도-링커-SN38: PCT 공개 W02015/051307에 설명된 바와 같이 제조.

[104] PEG_{40kDa}-(DBCO)₄: 1 mL의 아세트니트릴 중 40-kDa 4-아암 PEG-테트라아민 (PTE400-PA, NOF; 10 μ mol 아민), 디벤조사이클로옥틴-N-히드록시숙신이미딜 에스테르 (DBCO-NHS, ClickChemistryTools; 5 mg, 12 μ mol), 및 N,N-디이소프로필에틸아민 (2 μ L, 12 μ mol)의 용액을 주변 온도에서 1 시간 교반하였다. 혼합물을 증발 건조시킨 다음, 1 mL의 THF에 재용해시키고 10 mL의 MTBE를 첨가함으로써 침전시켰다. 얻어진 고체를 수집하고, MTBE로 세척 및 건조시켜 생성물을 얻었다.

[105] PEG_{40kDa}-(sDFB)₁(rSN38)₃: 안정한-링커-DFB 및 방출성-링커-SN38의 1:3 혼합물을 PEG_{40kDa}(DBCO)₄에 커플링시켜 혼합물을 얻었으며 이것은 HPLC 분석에 의하면 주로 PEG_{40kDa}(sDFB)₁(rSN38)₃ 및 PEG_{40kDa}(rSN38)₄였다. 이를, 물 + 0.1% TFA 중 15 mL/min으로, 30-60% 아세트니트릴 구배 하에, Phenomenex 300A 5 μ m Jupiter C18 컬럼, 21.2x150 mm를 이용하여 예비 HPLC에 의해 분리하였다. 전술한 바와 같이 360 nm UV에 의한 SN38 함량 (e₃₆₀ = 22,400 M⁻¹cm⁻¹) 및 Fe(III) 퍼클로레이트를 이용한 분석에 의한 DFB 함량으로부터 SN-38 대 DFB의 비율은 2.7:1 이었다.

B. 부가적인 하이브리드 약물/DFB 컨쥬게이트의 제조

i. (5HCO)₃-PEG_{40kDa}-DFB 중간체의 대안적인 제조



[0163]

[106] 단계 1. (H₂N)₃-PEG_{40kDa}-NHFmoc. MeCN 중 Fmoc-OSu (0.48 mL, 12 μ mol)의 25 mM 용액을 3.5 mL의 MeCN 중 PEG_{40kDa}-(NH₂)₄ (406 mg, 10.0 μ mol, 5 mM 최종 농도)의 격렬하게 교반된 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 주변 온도에서 교반하자 5분 후, 혼합물은 C18 HPLC (ELSD)에 의해 관측되는 바와 같이, 44% 표제 화합물로 이

루어졌다. 반응 용액을 회전 증발에 의해 ~ 1 mL로 농축시켰다. 이 농축물을 H₂O (0.1% TFA)를 이용하여 6 mL로 희석한 다음 H₂O (0.1% TFA)에서 선형 구배 (35%-60%)의 MeCN으로 용리하는 2회 주입으로 예비 C18 HPLC로 정제하였다. 첫 번째 용출 Fmoc-함유 피크로부터의 분획을 C18 HPLC로 분석하고 깨끗한 생성물-함유 분획을 결합 및 농축 건조시켰다. 고진공 하에 30분 동안 휘발성 물질을 제거한 후, 잔사를 최소 THF (~1 mL)에 용해시키고 칭량된 50 mL Falcon 튜브 내 40 mL의 0°C MTBE에 적가하였다. 현탁액을 볼텍싱하고, 얼음에서 15분 유지한 다음 원심분리(3500x g, 1 분)하고 따라내었다. 침전물을 MTBE (2x 40 mL)로 세척하고, 상기한 바와 같이 분리한 다음 고진공 하에 건조시켜 표제 화합물 (96 mg, 2.2 μmol 주어진 3 TFAs, 22% 수율)을 백색 분말로서 수득하였다. C18 HPLC, ELSD: 99.6% (RV = 9.39 mL)에 의해 순도를 결정하였다.

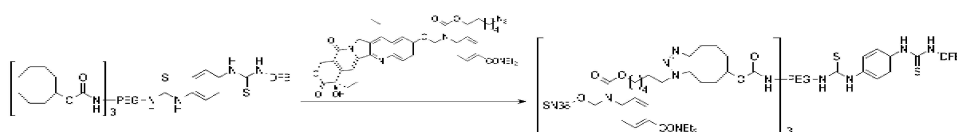
[0165] [107] 단계 2. (사이클로옥-4-틴-1-일옥시카보닐-NH)₃-PEG_{40kDa}-NH-Fmoc. MeCN 중 O-(사이클로옥-4-틴-1-일)-O'-숙신이미딜 카보네이트 (63 μL, 9.5 μmol)의 0.15 M 용액을 1.9 mL의 MeCN 중 (H₂N)₃-PEG_{40kDa}-NH-Fmoc (96 mg, 2.2 μmol, 50 mg/mL 최종 농도; 6.7 μmol NH₂) 및 DIPEA (2.8 μL, 16 μmol)의 교반 용액에 적가하였다. 반응 혼합물을 주변 온도에서 교반하고 C18 HPLC로 모니터링하였다. 출발물질이 보다 느린 2개의 용리 중간체 피크를 통해 단일 생성물 피크로 전환되었다. 2 시간 후, 반응 혼합물을 회전 증발에 의해 ~0.3 mL로 농축시켰다. 농축물을 1 mL의 THF로 희석하고, 용액을 칭량된 50 mL Falcon 튜브 내 40 mL의 빙냉 MTBE에 적가하였다. 혼합물을 얼음에서 15분간 유지한 다음 원심분리하고(3500x g, 1 분) 따라내었다. 젖은 고체를 빙냉 MTBE (2x 40 mL)로 세척하고, 원심분리한 다음(3500x g, 1 분) 및 따라내었다. 잔류 휘발성물질을 고진공 하에 20분간 제거하여 표제 화합물 (40 mg, 0.93 μmol, 66% 수율)을 백색 분말로서 수득하였다. 분해를 방지하기 위해, 고체를 0.78 mL의 무-아민 DMF로 즉시 희석시키고, ELSD에 의해 순도를 결정하자: 93.5% (RV = 9.96 mL) 및 6.5% 불순물 (RV = 9.78 mL)로 나타났다.

[0166] [108] 단계 3. (사이클로옥-4-틴-1-일옥시카보닐-NH)₃-PEG_{40kDa}-NH₂. 4-메틸피페리딘 (39 μL, 5% v/v 최종 농도)을 DMF 중 (사이클로옥-4-틴-1-일옥시카보닐-NH)₃-PEG_{40kDa}-NH-Fmoc (0.78 mL, 78 mg, 1.8 μmol)의 100 mg/mL 용액에 첨가하였다. 반응 튜브를 주변 온도에서 유지시키고 C18 HPLC로 모니터링하였다. 30분 후, 칭량된 50 mL Falcon 튜브 내 40 mL의 빙냉 MTBE에 반응 용액을 적가함으로써, PEG를 침전시켰다. 혼합물을 얼음에서 15분간 유지시킨 다음 원심분리 (3500x g, 1 분)하고 따라내었다. 젖은 고체를 MTBE (2x 40 mL)로 세척, 원심분리 (3500x g, 1 분)하고 따라내었다. 잔류 휘발성물질을 고진공 하에 15분간 제거시켜 표제 화합물 (68 mg, 1.6 μmol, 89% 수율)을 백색 분말로서 수득하였다. 분해를 방지하기 위해, 고체를 0.68 mL의 무-아민 DMF로 즉시 희석시켰다. C18 HPLC, ELSD에 의해 순도를 결정하였다: 87.0% (RV = 9.59 mL) 및 13.0% 불순물 (RV = 9.43 mL).

[0167] [109] 단계 4. (사이클로옥-4-틴-1-일옥시카보닐-NH)₃-PEG_{40kDa}-NHCSNH-페닐-4-(NHCSNHDFB). P-이소티오시아네이 토벤질-테스페리옥사민 B (1.8 mg, 2.4 μmol; Macrocylics)을 DMF 중 (사이클로옥-4-틴-1-일옥시카보닐-NH)₃-PEG_{40kDa}-NH₂ (1.36 mL, 1.6 μmol)의 50 mg/mL 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 37°C 수조에 넣고 C18 HPLC로 모니터링하였다. 4 시간 후, 칭량된 50 mL Falcon 튜브내 40 mL의 빙냉 MTBE에 반응 용액을 적가함으로써 PEG를 침전시켰다. 혼합물을 얼음에서 15분간 유지시킨 다음 원심분리 (3500x g, 2 분)하고 따라내었다. 젖은 고체를 MTBE (2x 40 mL)로 세척, 원심분리하고 (3500x g, 2 분) 따라내었다. 잔류 휘발성물질을 고진공 하에 15분간 제거시켜 표제 화합물 (67 mg, 1.5 μmol, 94% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다. 분해를 방지하기 위해, MeCN (2.61 mL MeCN, 25 mg/mL)에 의해 고체를 2.68 mL 총 부피가 되도록 즉시 희석시켰다. 불용성 DFB-NCS를 펠렛 화하고 (3500x g, 2 분), 및 생성물-함유 MeCN 상등액을 제거하였다. C18 HPLC, ELSD에 의해 순도를 결정하였다: 80.3% (RV = 9.59 mL) 및 19.7% 솔더 (RV = 9.43 mL).

[0168] ii. (약물)₃-PEG_{40kDa}-DFB의 제조

[0169] a. 약물 = SN38



[0170]

[0171] [110] (SN38-L)₃-PEG_{40kDa}-NHCSNH-페닐-4-(NHCSNHDFB). 안정한 아지도-SN38 (4.0 mg 5.2 μmol, 4 mM 최종 농도; Santi 등, J. Med. Chem. 57: 2303-14 (2014))을 MeCN 중 (사이클로옥-4-틴-1-일옥시카보닐-NH)₃-

PEG_{40kDa}-NHCSNH-페닐-4-(NHCSNHDFB) (1.3 mL, 0.75 μmol PEG, 2.3 μmol 사이클로옥틴, 1.8 mM 사이클로옥틴 최종 농도)의 25 mg/mL 용액에 첨가하였다. 반응물을 37°C 수조에 넣고 C18 HPLC로 모니터링하였다. 44 시간 후, 반응 용액을 MeOH (12-14 k MWCO)에 대해 투석하였다. 투석물을 농축 건조시키고 잔류 휘발성물질을 고진공 하에 제거하여 표제 화합물 (24 mg, 0.52 μmol , 69% 수율 질량기준) 백색 필름으로 얻었는데 이것은 A₃₈₃에 결정된 바와 같이 1.4 μmol 의 SN38 및 Fe³⁺-DFB의 A₄₉₀에 의해 측정된 바와 같이 0.50 μmol 의 DFB를 함유하였다. SN38 $\epsilon_{383} = 29,100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 및 Fe³⁺-DFB $\epsilon_{490} = 3,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 이용시 SN38:DFB 비율은 2.8:1인 것으로 나타났다. C18 HPLC, ELSD에 의해 순도를 결정하였다.: 83.0% (RV = 9.67 mL) 및 14.6% 솔더 (RV = 9.52 mL).

[0172] b. 약물 = 루카파립 - PARP 억제제

[0173]

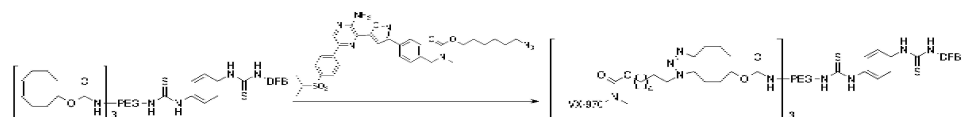
[0174]

[111] (루카파립-L)₃-PEG_{40kDa}-NHCSNH-페닐-4-(NHCSNH-DFB). 안정한 아지도-루카파립 (0.11 mL, 1.1 μmol , 1.8 mM 최종 농도; Santi 등, Proc. Natl. Acad. Sci. 109: 6211-16 (2012)의 공정에 따라 루카파립을 6-아지도헥실 숙신이미딜 카보네이트와 반응시킴으로써 제조됨)의 10 mM 용액을 MeCN 중 (사이클로옥-4-틴-1-일옥시카보닐-NH)₃-PEG_{40kDa}-NHCSNH-페닐-4-(NHCSNHDFB) (0.50 mL, 0.29 μmol PEG, 0.86 μmol 사이클로옥틴, 1.4 mM 사이클로옥틴 최종 농도)의 25 mg/mL 용액에 첨가하였다. 반응물을 37°C 수조에 넣고 C18 HPLC로 모니터링하였다. 68 시간 후, 반응 용액은 비변형:페길화(PEGylated) 약물-링커의 ~35:65 혼합물을 함유하였다. (약물)_n-PEG-DFB의 개별 중 시리즈는 관찰되지 않았다. 반응 용액을 SpeedVac에 의해 0.1 mL로 농축시키고, H₂O에 의해 1.0 mL로 희석한 다음 PD-Midi 컬럼에 로딩시켰다. H₂O 용리에 의해 비변형 및 페길화(PEGylated) 약물-링커 양자 모두를 함유하는 배제된 물질의 혼합한 분획이 수득되었다. 이어서 혼합물을 MeOH (12-14 k MWCO)에 대해 투석하였다. 투석물을 농축 건조시키고, 잔류 휘발성물질을 고진공 하에 제거하여 표제 화합물 (8.7 mg, 0.19 μmol , 66% 수율)을 백색 필름으로 얻었는데, 이것은 A₃₅₅에 의해 결정되는 바와 같이 0.51 μmol 의 루카파립 및 Fe³⁺-DFB의 A₄₉₀에 의해 결정되는 바와 같이 0.19 μmol 의 DFB를 함유하였다. 루카파립 $\epsilon_{355} = 13,260 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (125SF68) 및 Fe³⁺-DFB $\epsilon_{490} = 3,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 를 이용한 루카파립:DFB의 비율은 2.7:1인 것으로 밝혀졌다. C18 HPLC, ELSD에 의해 순도를 결정하였다: 78.5% (RV = 9.41 mL) 및 21.5% 솔더 (RV = 9.27 mL).

[0175] c. 약물 = VX-970 - ATR 키나제 억제제

[0176]

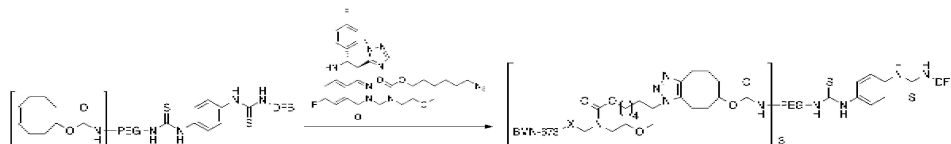
[0177]



[112] (VX970-L)₃-PEG_{40kDa}-NHCSNH-페닐-4-(NHCSNH-DFB). 루카파립에 대해 전술한 바와 같이, 안정한 아지도-VX970 (0.11 mL, 1.1 μmol , 1.8 mM 최종 농도; Santi 등, Proc. Natl. Acad. Sci. 109: 6211-16 (2012)의 공정에 따라 VX970을 6-아지도헥실 숙신이미딜 카보네이트와 반응시켜 제조됨)을, MeCN 중 (사이클로옥-4-틴-1-일옥시카보닐-NH)₃-PEG_{40kDa}-NHCSNH-페닐-4-(NHCSNHDFB) (0.50 mL, 0.29 μmol PEG, 0.86 μmol 사이클로옥틴, 1.4 mM 사이클로옥틴 최종 농도)의 25 mg/mL 용액으로 처리하여 표제 화합물 (10 mg, 0.22 μmol , 76% 수율 질량 기준)을 백색 필름으로서 수득하였는데 이것은 A₃₈₃에 의해 측정되는 바와 같이 0.55 μmol 의 VX970 및 Fe³⁺-DFB의 A₄₉₀에 의해 측정되는 바와 같이 0.24 μmol 의 DFB를 함유하였다. VX970 $\epsilon_{383} = 17,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (127BH52) 및 Fe³⁺-DFB $\epsilon_{490} = 3,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 를 이용한 VX970:DFB 비율은 2.3:1인 것으로 밝혀졌다. C18 HPLC, 순도를 ELSD에 의해 측정하였다: 59.2% (RV = 9.98 mL) 및 38.4% 솔더 (RV = 9.73 mL).

[0178] d. 약물 = BMN673 - PARP 억제제

[0179]



[0180] [113] (BMN673-L)₃-PEG_{40kDa}-NHCSNH-페닐-4-(NHCSNH-DFB). 루카파립에 대해 전술한 바와 같이, 안정한 아지도-BMN673 (0.11 mL, 1.1 μmol, 1.8 mM 최종 농도; Santi 등, Proc. Natl. Acad. Sci. 109: 6211-16 (2012)의 공정에 따라 BMN673을 6-아지도핵심 숙신이미딜 카보네이트와 반응시켜 제조됨)를, MeCN 중 (사이클로옥-4-틴-1-일옥시카보닐-NH)₃-PEG_{40kDa}-NHCSNH-페닐-4-(NHCSNHDFB) (0.50 mL, 0.29 μmol PEG, 0.86 μmol 사이클로옥틴, 1.4 mM 사이클로옥틴 최종 농도)의 25 mg/mL 용액으로 처리하여 표제 화합물 (12 mg, 0.26 μmol, 91% 수율 질량 기준)을 백색 필름으로서 수득하였다. 이것은 A₃₁₀에 의해 측정되는 바와 같이 0.65 μmol의 BMN673 및 Fe³⁺-DFB의 A₄₉₀에 의해 측정되는 바와 같이 0.20 μmol의 DFB를 함유하였다. BMN673 ε₃₁₀ = 9872 M⁻¹cm⁻¹ (125SF39) 및 Fe³⁺-DFB ε₄₉₀ = 3,000 M⁻¹cm⁻¹ 이용시 BMN673:DFB 비율은 3.3:1인 것으로 밝혀졌다. C18 HPLC, ELSD에 의해 순도를 측정하였다: 69.7% (RV = 9.47 mL) 및 30.3% 솔더 (RV = 9.32 mL).

[0181] C. PET 동위원소에 대한 커플링

[0182] [114] 하이브리드 SN38/DFB 및 대체 하이브리드 약물/DFB 컨쥬게이트를 실시예 5에 제시된 방법에 따라 ⁸⁹Zr에 커플링시킨다.

[0183] 실시예 7

[0184] 동물 연구에서 EPR을 탐지하기 위한 PET의 이용

[0185] [115] HT-29 인간 이종이식편 보유 마우스 및 정상 마우스들을 크기와 형상이 실시예 1-4의 약물 컨쥬게이트와 유사한 컨쥬게이트 PEG-PET 동위원소로 처리하였다. t=0, 12, 24, 48 및 96 시간에서 종양의 표지 강도 축적을 측정하기 위해 PET-영상화를, 종양-보유 마우스에서 PEG_{40kDa}-플루오레신을 이용한 유사한 실험 결과와 비교하여 수행하였다 (Singh, Y., 상기문헌). PEG-동위원소의 제거 t_{1/2}(마우스에서 PEG_{40kDa}의 제거 t_{1/2}은 대체로 ~24 시간이다)의 측정, 및 총 신체 방사능활성 측정을 위해 이들 시점에서 혈정을 카운트한다.

[0186] [116] HT-29 종양 보유 마우스 및 정상 대조군 마우스들을 ~200 uCi/마우스로 처리하고, 다양한 시점에서 PET-영상화를 수행하여 축적량 및 축적 비율을 구한다. ~1 uCi/cc에서 신호가 관찰가능하므로 배경 조직이 트레이서를 축적하지 않는 한, 종양이 쉽게 시각화된다. 동일 실험에서, 시약이 몸에서 제거됨에 따라 동위원소가 소거된다. a) PEG-동위원소의 종양 축적(정량적 PET 영상화), b) 혈관 제거(혈청 방사능), c) 전신 제거(전신 방사능) 및 d) 종양 제거(정량적 PET 영상)의 비율이 결정된다.

[0187] [117] 종양 축적이 완료되는 시점에 종양-보유 마우스를 다양한 양의 PEG_{40kDa}-동위원소로 처리하여 축적가능한 나노입자의 최대량을 결정한다.

[0188] [118] 따라서, 이 실시예에서 PET 스캐닝은 약물 투여 프로토콜에 적합한 파라미터를 평가하기 위해 동일하거나 유사한 담체에 커플링된 제제의 거동을 시뮬레이션하는데 이용된다.

[0189] 실시예 8

[0190] PEG_{40kDa}-DFB-⁸⁹Zr의 PET 영상화/생체분포

[0191] [119] 이종이식편(n=5)을 보유한 마우스에 ~300 μCi (8.4 nmol)의 PEG_{40kDa}-DFB-⁸⁹Zr을 주입하고 24 시간(n=2) 및 48 시간(n=2)에 마이크로 PET/CT 영상을 수득하였다. 종양에서 % ID/g 흡수(PEG_{40kDa}-DFB-⁸⁹Zr의 흡수)는 각각 24 시간과 48 시간에 1%와 20% 였고, 간 이외의 장기들은 ≤ 3% 흡수를 나타냈다. 마이크로PET/CT 연구 결과 MX-1 종양에서는 ⁸⁹Zr-DFB-PEG₄₀의 높은 축적이 24시간만에 나타난 반면 건강한 조직에서의 축적은 거의 배경이

었다. 영상 데이터는 24 시간 내지 48 시간까지 종양의 증가된 축적을 입증하였다. 그러나 종양에 이질적인 흡수가 있었는데, 이는 아마도 빠르게 성장하는 이 종양의 괴사를 암시하는 것일 수 있다.

[0192] [120] 느리게 성장하는 HT-29 종양에 대해 실험을 반복하였다. MX-1 종양의 초기 시점 (1.1 ± 0.2 [24 시간]- 1.2 ± 0.1 [48 시간])에서 낮은 종양 대 혈액 비율과 제한된 소거를 감안하여 HT-29 종양의 흡수는 72시간과 120시간에 연구하였다. 마우스 ($n = 8$)에게 $\sim 160 \mu\text{Ci}$ (8.4 nmol)의 ^{89}Zr -DFB-PEG₄₀을 주입하고 72시간과 120시간에 마이크로PET/CT 영상을 취득하였다. 생체의 생체분포 연구를 위해 마우스들을 72- 및 120 시간에 안락사시켰다. HT-29 종양은 72시간 및 120시간에 마이크로PET/CT 상에서 선명하게 시각화되었으며(도 6A), 생체분포 연구 결과 72시간 및 120시간에 20.6 ± 2.4 및 $14.4 \pm 4.5\% \text{ID/g}$ 의 높은 흡수율을 보여주었고(도 6B), 72시간 및 120시간에 종양/혈액은 각각 2.8 ± 0.4 및 5.1 ± 1.3 (도 6C)였다. 도 6D는 한쪽 옆구리에 종양을 보유한 마우스에서의 PEG-SN-38)₃-DFB- ^{89}Zr 의 MIP 이미지이다. 도 6E는 72시간에서의 of PEG-(SN-38)₃-DFB- ^{89}Zr (흑색) 대 PEG-DFB- ^{89}Zr (회색)의 생체 분포를 나타낸다.

[0193] [121] 부가 연구에서, 실시예 5의 PEG_{40kDa}-(DFB- ^{89}Zr)₄를 HT29 종양을 보유하는 마우스에게 주사하였다. 이 연구에 5 마리의 마우스를 이용하였고 각 마우스에게 $200 \mu\text{l}$ 식염수 중 $250\text{--}290 \mu\text{Ci}$ 의 컨쥬게이트를 주사하였다. 2 마리의 마우스를 주사한지 1시간 후에 영상화하였다. 24 시간 후, 2 마리의 마우스 (1 시간에 영상화된 마우스 및 추가 마우스)를 영상화 다음 회색시켜 분포 연구를 수행하였다. 48 시간에, 2 마리의 마우스를 영상화하고 (1 시간에 영상화한 마우스 중 한 마리와 추가 마우스 한 마리) 이들도 나머지 마우스와 함께 희생시켜 분포 연구를 수행하였다.

[0194] [122] 이러한 연구의 결과를 도 7A-7C에 도시하였다. 도 7A에 나타난 바와 같이, 표지는 측정된 모든 시점에 종양에 존재하였다. 도 7B에 도시된 바와 같이, 개별 장기의 그래프 당 주사된 용량(ID)의 %는 대부분의 장기에서 유의하게 높았으며, 뼈, 비장 및 종양에서 최고 수준이었다. 도 7C에 도시된 바와 같이, 장기 그래프 당이 아니라 장기 당 주사된 용량의 백분율로서 계산한 경우, 종양 내 축적은 다른 장기에 비해, 특히 48 시간에서 극적으로 더 높았다. 오직 간 만이 유의한 축적을 나타냈는데 이는 24-48 시간의 기간에 걸쳐 급락하였다. 따라서, 조영제는 컨쥬게이트가 다른 장기에 비해 종양에서 선택적으로 축적됨을 확인해준다.

[0195] 실시예 9

[0196] 추가 분포 연구

[0197] [123] 실시예 8의 실험은 PEG_{40kDa}-DFB- ^{89}Zr (실시예 5), 4-아암 PEG_{40kDa}-(DFB- ^{89}Zr)₄ (실시예 5), 및 4-아암 PEG_{40kDa}-(DFB- ^{89}Zr)₁(SN38)₃ (실시예 6)을 이용하여 MX-1 및 HT-29 이종이식편 두 가지 모두에서 반복되었다. PET 영상은 용량 투여로부터 1, 24, 48, 72, 96 및 216시간에서의 종양, 심장, 간 및 신장에서의 ^{89}Zr 의 축적을 측정하는 데 사용되었다. 얻어진 데이터 (총 용량의 감소-보정된 백분율로 표시됨)는 Li 등의 방법 [Intl. J. Nanomedicine (2012) 7: 1345-56]에 따라 막-제한 조직 분포 모델을 사용하여 분석하였다. 보다 구체적인 조직 분석이 없는 상태에서 측정된 혈중 농도를 일치시키기 위해 나머지 조직에 대한 구획을 포함시켰다. 혈액 데이터는 혈액에서 장기로의 확산 계수 (k , 표 2)와 20 시간의 혈장 반감기로부터 계산된 제거율 상수의 합과 동일한 총 소거율을 이용하여 적합하였다.

[0198] [124] 실험 오차 내에서 세 가지 화합물 모두 특정 종양 이종이식편에서 동일한 조직 분포를 보였다. 도 8은 HT-29 이종이식편에서 ^{89}Zr 의 분포를 나타내며, 도 9는 MX-1 이종이식편에서의 ^{89}Zr 의 분포를 보여준다. 모델 파라미터를 표 2에 나타내었으며, 여기서 R = 조직-혈액 분배 계수, k = 확산 계수, V = 조직 부피, VVF = 조직의 혈관 분율이다.

표 2

HT-29	R	k (h ⁻¹)	V (mL)	VVF	k/RV
순환			2.8	1	
심장	0.7	0.0015	0.15	0.23	0.0143
신장	0.6	0.0017	0.5	0.08	0.00567
간	1.5	0.013	1.65	0.15	0.00523
종양	5	0.0095	1	0.04	0.0019
바디	1	0.03	30	0.1	0.001
MX-1					
순환			2.8	1	
심장	0.7	0.0015	0.15	0.23	0.0143
신장	0.5	0.0015	0.5	0.09	0.006
간	1.2	0.012	1.65	0.134	0.00606
종양	5	0.0062	0.45	0.075	0.00276
바디	1	0.03	30	0.1	0.001

[0199]

[0200] [125] 두 가지 이중이식편 모델 모두에서, ⁸⁹Zr-컨쥬게이트는 종양 조직에 선택적으로 축적되고 다른 조직보다 훨씬 더 오래 유지되는 것으로 관찰되었다.

[0201] 실시예 10

[0202] 조영제 및 활성제의 생체분포의 상관관계

[0203] [126] 이 실시예에서는, 조영제 PEG_{40kDa}-DFB-⁸⁹Zr의 약물동태/생체분포를 PEG-SN-38의 그것과 비교한다.

[0204] [127] SN-38은 널리 사용되는 항암제인 이리노테칸(CPT-11)의 활성 대사산물이다. (PEG-SN-38)은 4개의 균등한 SN-38과 4 아암의 PEG_{40kDa}과의 컨쥬게이트로서, PEG_{40kDa}(SN-38)₄를 제공한다(Santi DV 등, J. of Med. Chem. (2014) 57(6):2303-2314). (PEG-SN-38은 1상 시험에서 용량 증량 중이며 6일이라는 긴 t_{1/2,β}를 나타낸다.)

[0205] [128] 10⁶ - 내지 10⁷개의 HT29 세포를 NSG 마우스의 옆구리에 이식함으로써 이중이식편 마우스를 준비하고 종양이 ~200 mm³ 가 될 때까지 유지한다. 마이크로PET/CT 이미지, 혈액, 종양 및 주요 장기의 시간 대 활동 곡선을 이용하여 종양 중 PEG_{40kDa}-DFB-⁸⁹Zr의 축적/제거율, 혈액 및 신체로부터의 제거율, 마우스의 잔류 부분에서의 일시적 활성 분포를 구한다. PEG_{40kDa}-DFB-⁸⁹Zr의 농도가 증가하면 종양으로부터의 1차수 제거에는 영향을 미침이 없이 축적률도 증가한다.

[0206] [129] 다양한 용량의 표지되지 않은 PEG-(SN-38)₄ 컨쥬게이트를 동물에 주입한다. PEG-(SN-38)의 전임상 독성 연구에서 HT-29 종양/누드 비율에서 50% 종양 성장 억제(TGI)를 제공하는 용량은 150 mg/kg이었다. 알로메트릭 스케일링(allometric scaling)으로부터, 마우스의 50% TGI는 ~280 mg/kg이어야 한다. 측정 가능한 성장 억제에 대한 표적 용량(예컨대 ~50% TGI)이 확인된다.

- [0207] [130] a) 치료 표적 용량을 달성 및, b) 전술한 바와 같이, 10일에 걸쳐 PET에 의해 측정된 PEG-(DFB-⁸⁹Zr)의 종양 흡수/제거 역학을 모니터링하는데 모두 적합한, PEG-(SN-38)₄ 및 PEG-(DFB-⁸⁹Zr)의 혼합물을 제조한다. 생체분포 정량, 혈액 샘플링을 위해 조직을 제거한다. 종양의 총 SN-38 함량을 여러 시점에서 NaOH-절단된 종양 및 혈액 샘플의 HPLC에 의해 측정한다 (Santi 등 (상기문헌)). PEG-(SN-38)₄/PEG-(DFB-⁸⁹Zr) 비율은 비율의 약물/동위원소 실체 대 시간 또는 2 성분의 종양 흡수의 다른 관계를 확인하기 위해 다양한 시점에서 결정된다.
- [0208] [131] PEG-(SN-38)₄의 치료 용량에 해당하는 PEG-(DFB-⁸⁹Zr)의 %ID/g 종양이 확립되었다. 치료 용량을 달성하기에 충분한 PEG-(SN-38)₄를 축적하는 고-흡수 종양이 동정된다.
- [0209] [132] 따라서, 컨쥬게이트된 SN-38의 EPR 효과로부터 이익을 얻을 대상체는 본 발명의 조영제의 초기 투여에 의해 확인된다.
- [0210] 실시예 11
- [0211] PLX038A의 효능
- [0212] [133] 실시예 1에서 PLX038A로 지정되고 여기서 PEG-SN38로 약칭되는 SN38 컨쥬게이트가 이 실시예에서 사용된다.
- [0213] [134] MX-1 종양 이종이식편을 갖는 4개 그룹의 마우스(각 그룹 당 5 마리 마우스)에 비히클 또는 단일 용량의 비히클, 137 μ mole/kg 이리노테칸 (마우스 당 0.137/g 또는 ~ 4 μ mole) 또는 120 μ mole/kg PEG-SN38 qdx x 1d (단일 용량)을 주사하였다. 종양 크기를 시간의 함수로 측정하였다. 제42일에 비히클이 투여된 그룹을 120 μ mole/kg의 PEG-SN28로 처리하였다. 결과를 도 10에 나타내었다.
- [0214] [135] 도시된 바와 같이, 비히클이 주입된 마우스에서의 MX-1 종양 성장은 4 주 후 1200mm³에 이르며 PEG-SN38을 주사할 때까지 최초 42일 동안 빠르게 지속되어 종양 부피가 급격히 감소했다. 시간 0에 PEG-SN38을 투여하자 종양이 즉시 제거되었다. 이리노테칸은, 약간의 효과가 있었지만 비히클보다 약간 더 나은데 그쳤다 - 4 주 후 이 종양은 600mm³에 도달했다.
- [0215] [136] 또한, 종양 성장이 1.7cm³로 컷던 미처리 종양이 있는 마우스의 경우, PEGSN38의 단일 MTD 용량으로 이들 종양 크기가 줄어들었다.
- [0216] [137] 이러한 결과는 PEG-SN38이 고품 종양을 치료하는데 매우 효과적이며 실시예 8의 조영제를 사용한 결과와 일치함을 입증해준다.
- [0217] 실시예 12
- [0218] PLX038A 및 PARP 억제제 탈라조파립(BMN673 또는 TLZ로 표시됨)의 상승 효과
- [0219] [138] 위의 MX-1 이종이식편의 준비: MX-1 세포주는 Charles River Labs (Frederick, Maryland)에서 구입하였다. Ovejera AA 등 Ann Clin Lab Sci (1978) 8:50-6. 37°C, 95% 공기/5% CO₂ 분위기 하, RPMI-1640, 10% FBS 및 1% 2 mM L-글루타민에서 세포를 배양하였다.
- [0220] [139] 타코닉 바이오사이언스(인디애나 주 캠프리지 시티)의 암컷 NCr 누드 마우스(N CrTac:NCr-Foxn1^{nu}; ~6-7 주령)를 UCSF 전임상 치료 코어 비바리움 (캘리포니아 샌프란시스코)에 보관하였다. 모든 동물 연구는 UCSF Institutional Animal Care and Use Committee에 따라 수행하였다. MX-1 종양 세포(Matrigel과 1:1로 혼합된 무혈청 배지 100 μ l 중 2x10⁶ 세포)를 암컷 NCr 누드 마우스의 우측 옆구리에 피하 주입함으로써 종양 이종이식편을 확립하였다. 종양 이종이식편이 공여 마우스에서 1000-1500 mm³에 달했을 때, 이들을 제절제하고, 균일-크기의 단편 (~2.5 x 2.5 x 2.5 mm 크기)로 절단한 다음, Matrigel에 포매하고 수혜 마우스로 피하 트로카(trocar) 이식을 통해 재-이식하였다. Morton CL, Houghton PJ. Nat Protoc. (2007) 2:247-50.
- [0221] [140] **투여 및 종양 크기 측정:** PLX038A 용액(1.02 mM SN38; 0.26 mM PLX038A 컨쥬게이트)을 pH 5 등장성 아세트산에서 제조하고 사용하기 전에 멸균 여과 하였다(0.2 μ m). BMN673(52 μ M)의 용액을 10% 디메틸아세트아

미드/5% Solutol HS15/85% 1X PBS에서 제조하고 사용하기 전에 멸균 여과하였다($0.2\ \mu\text{m}$).

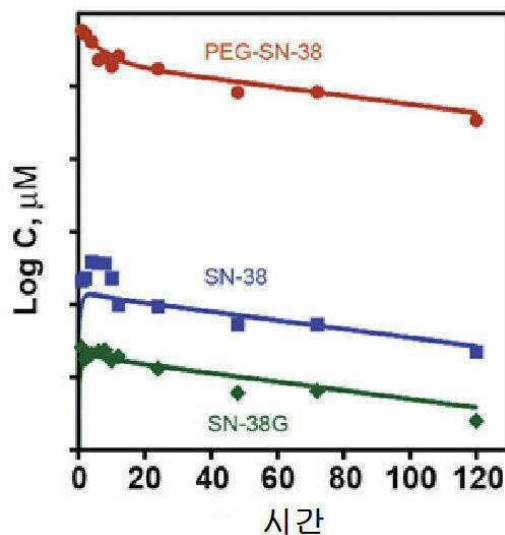
[0222] [141] 그룹 평균 크기가 $100\text{--}200\ \text{nm}^3$ 에 도달했을 때 그룹 ($N = 4\text{--}5/\text{그룹}$)을 투여하였다. 마우스들에게 비히클, 단일 용량의 PLX038A ($14.7\ \text{mL/kg i.p.}, 15\ \mu\text{mol/kg}$), BMN673의 일일 용량 ($7.72\ \text{mL/kg p.o.}, 0.4\ \mu\text{mol/kg}$), 또는 동일한 용량의 PLX038A와 BMN673의 조합을 투여하였다. 조합이 투여된 그룹의 경우, 일일 BMN673 투여는 같은 날(도 11A) 또는 4일 지연 후에 (도 11B) 개시하였다. 종양 크기(캘리퍼스 측정: $0.5 \times (\text{길이} \times \text{너비}^2)$) 및 체중을 매주 2회 측정하였다. 비히클 대조군 종양의 크기가 $\sim 3000\ \text{mm}^3$ 에 도달했을 때, 마우스를 단일 용량의 PLX038A ($15\ \mu\text{mol/kg}$) 및 일일 BMN673 ($0.4\ \mu\text{mol/kg}$) 조합의 조합으로 투여 사이에 지연없이 처리하였다(도 11A).

[0223] [142] 도 11A 및 11B에 도시된 바와 같이, $15\ \mu\text{mol/kg}$ 의 MX-1 종양이 있는 마우스에 PLX038A를 $0.4\ \mu\text{mol/kg}$ 의 일일 용량의 탈라조파립과 함께 투여하자 이들 약물을 단독으로 투여한 경우에 비해 상승 효과가 나타났다. 이것은 TLZ의 일일 투여를 PLX038A와 같은 시간에 개시하였든 4일 후에 개시하였든 사실이었다. 대조군에 투여된 단일 조합은 종양 크기를 즉각 감소시켰다 (도 11A).

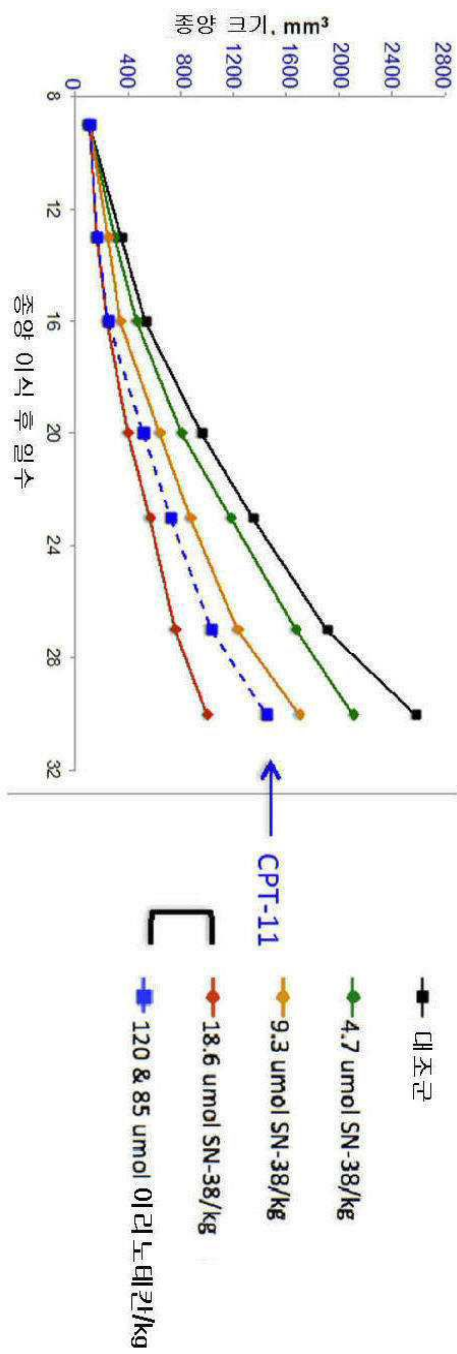
[0224] [143] 도 11C에 도시된 바와 같이, 무-이벤트 생존은 PLX038A 및 TLZ의 조합의 경우 이들 단독에 비해 상승적으로 향상되었다.

도면

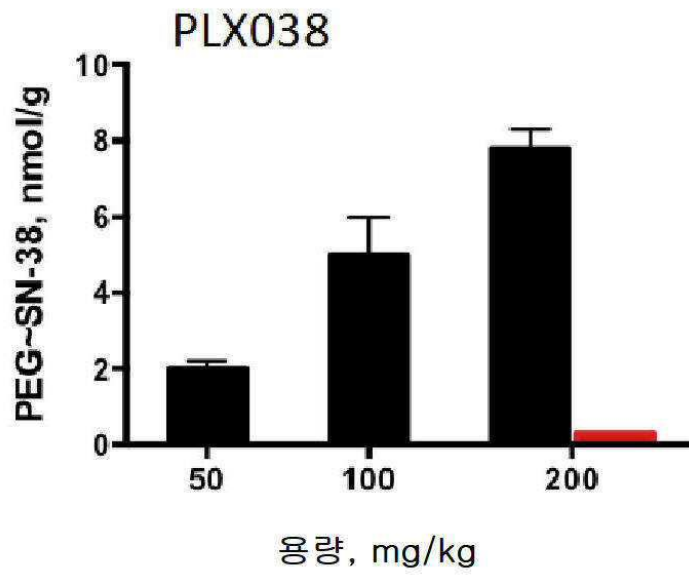
도면1



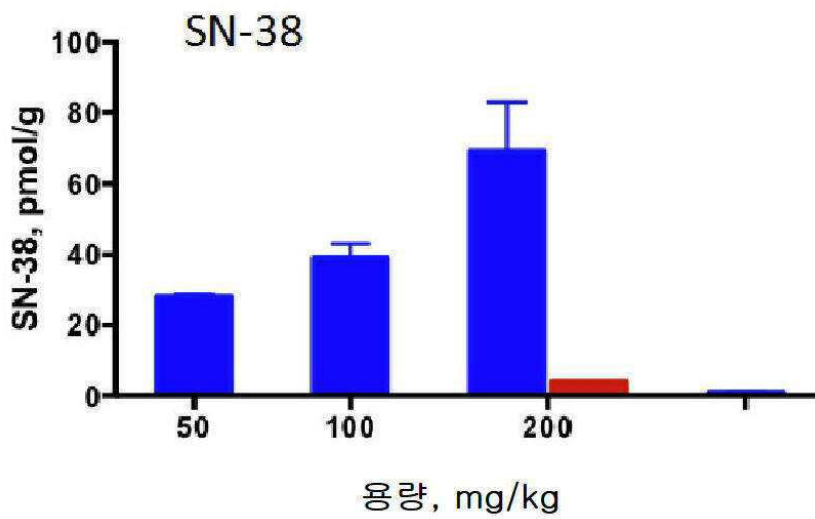
도면2



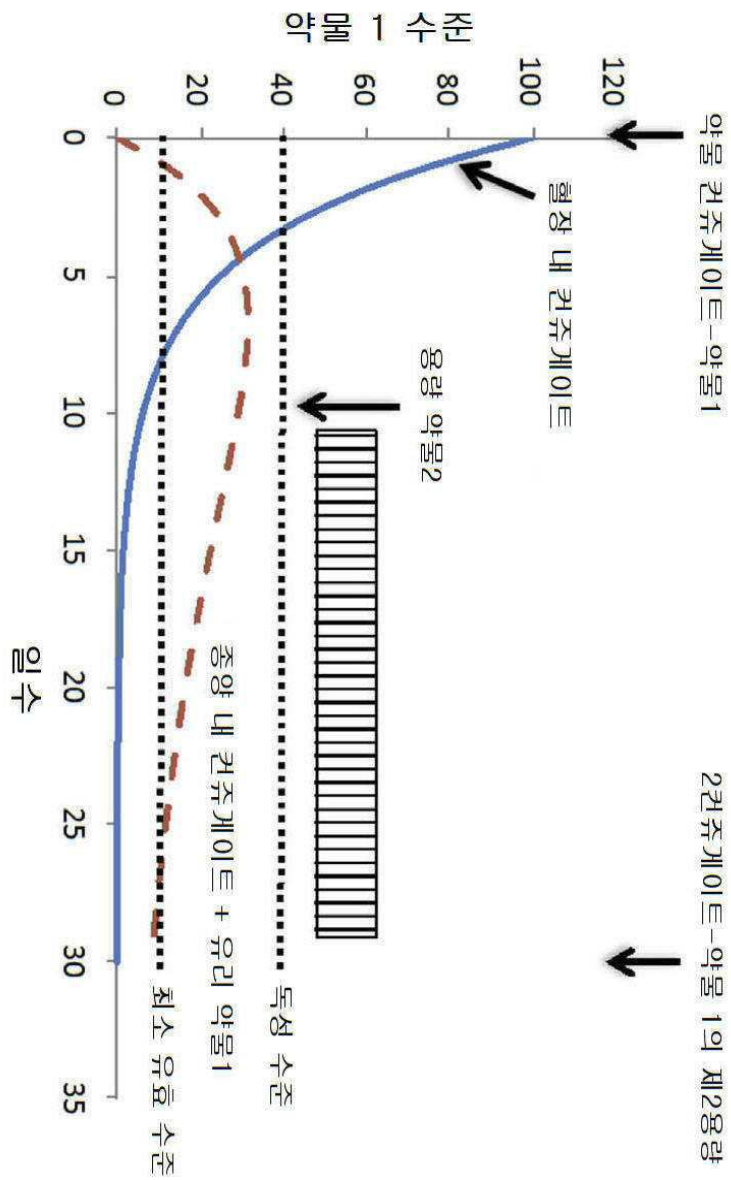
도면3a



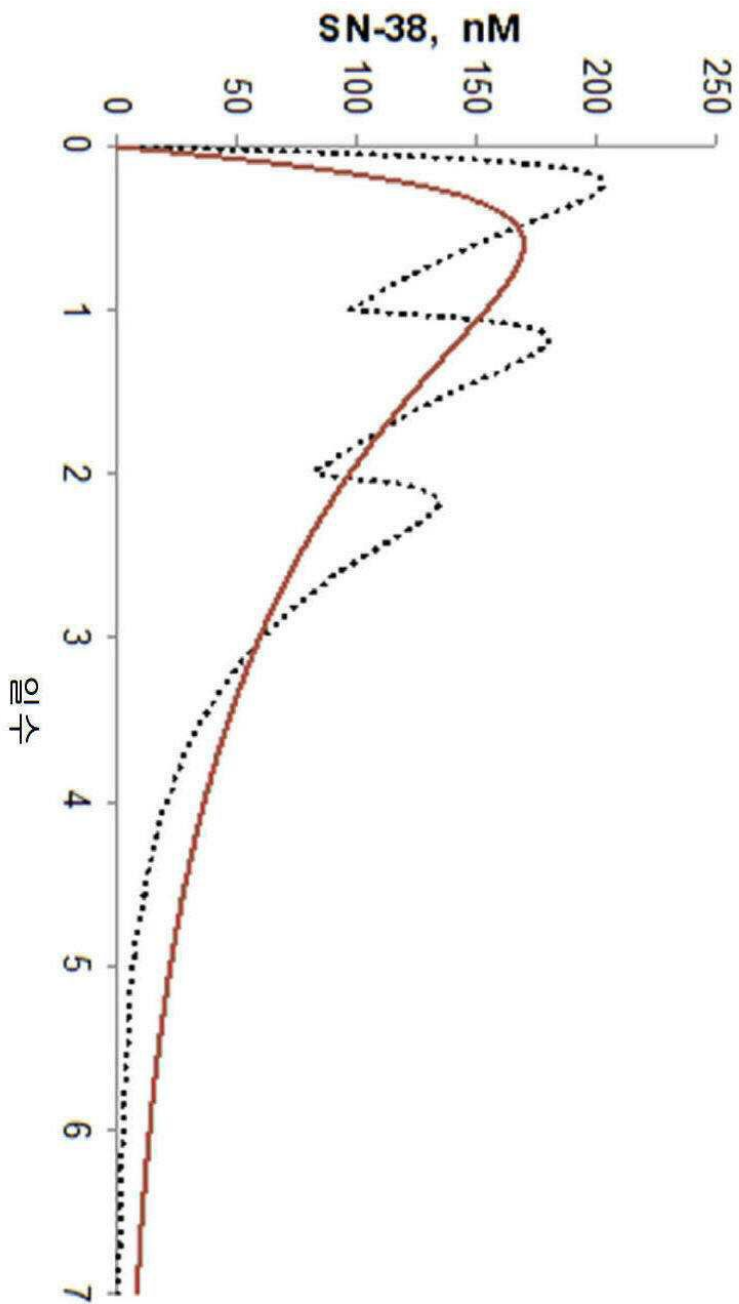
도면3b



도면4

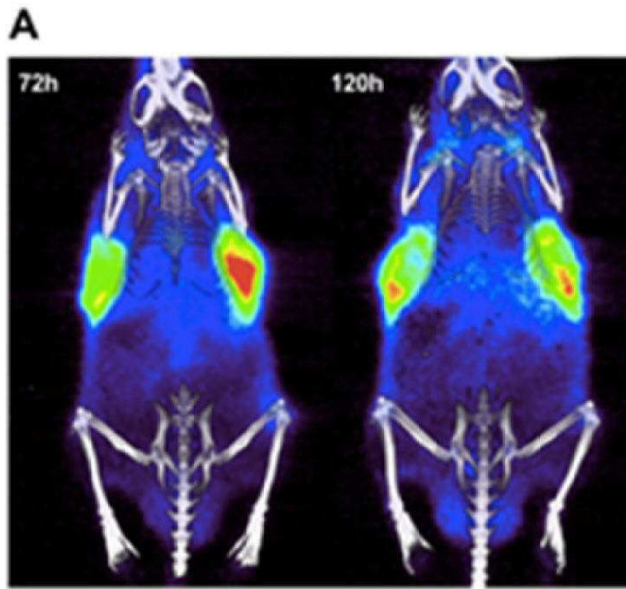


도면5

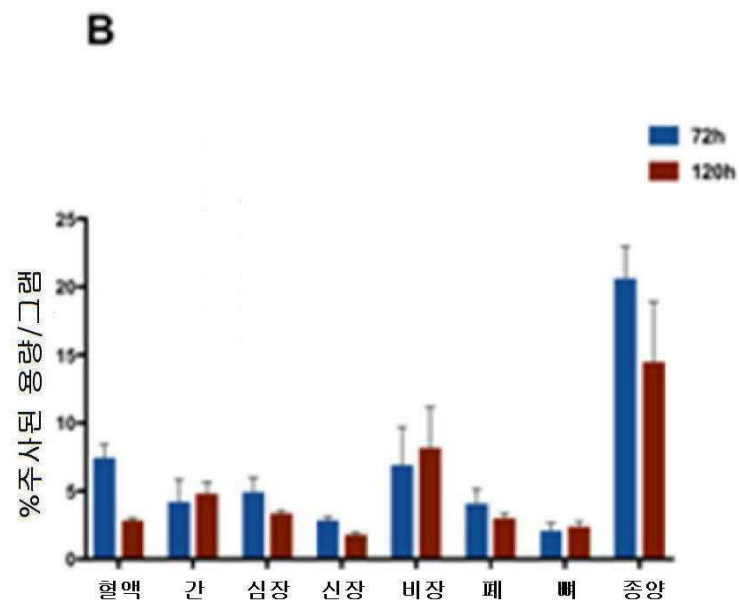


쥐 이종이식편 실험의 마우스 근사치
프로링크스 링커 기술을 이용한 PEG로부터의 SN-38 방출

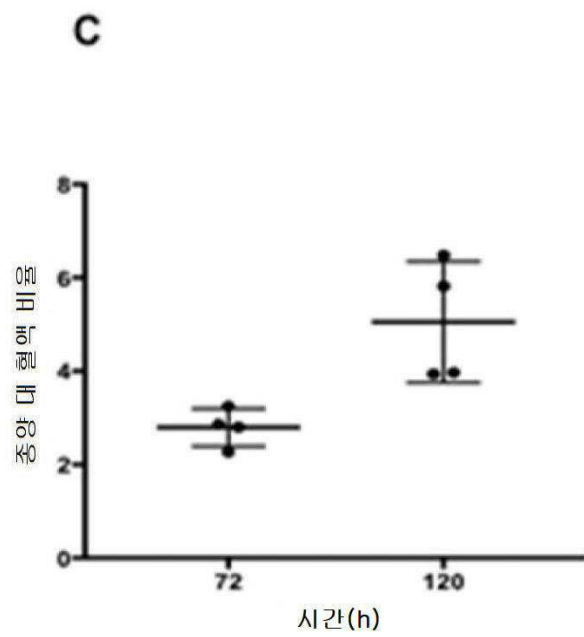
도면6a



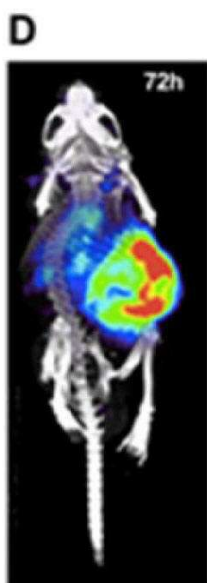
도면6b



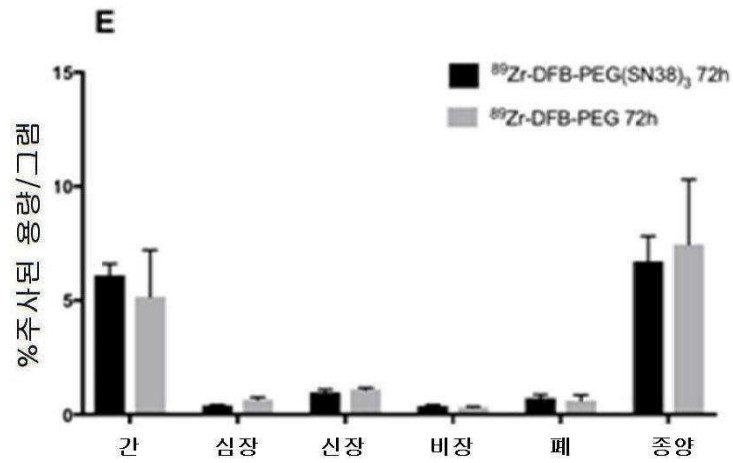
도면6c



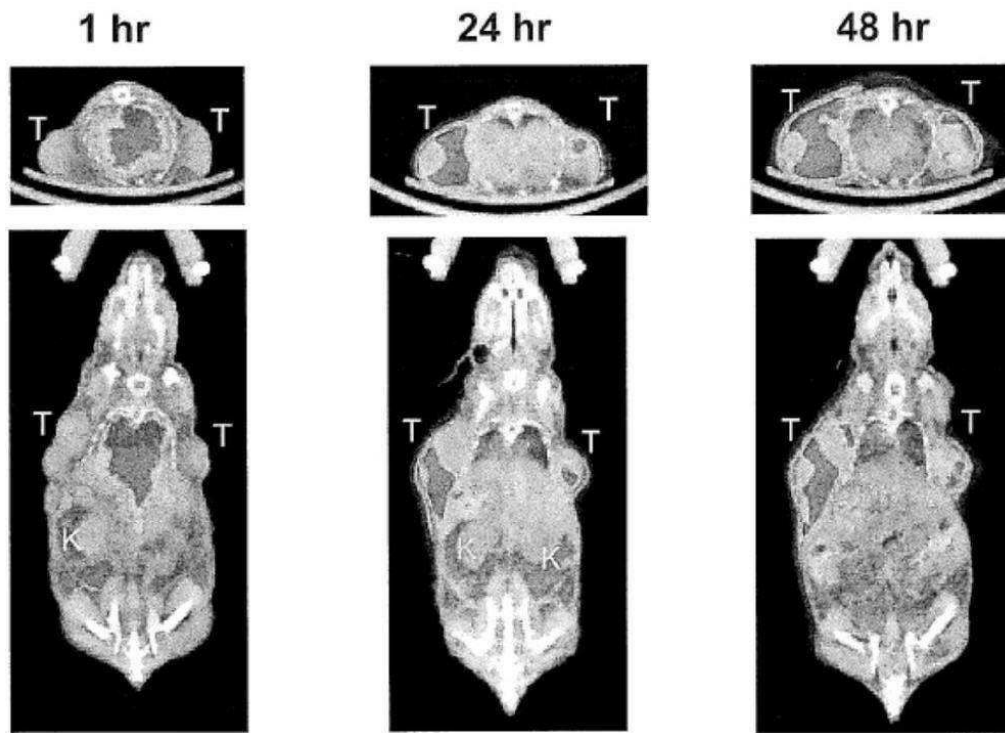
도면6d



도면6e

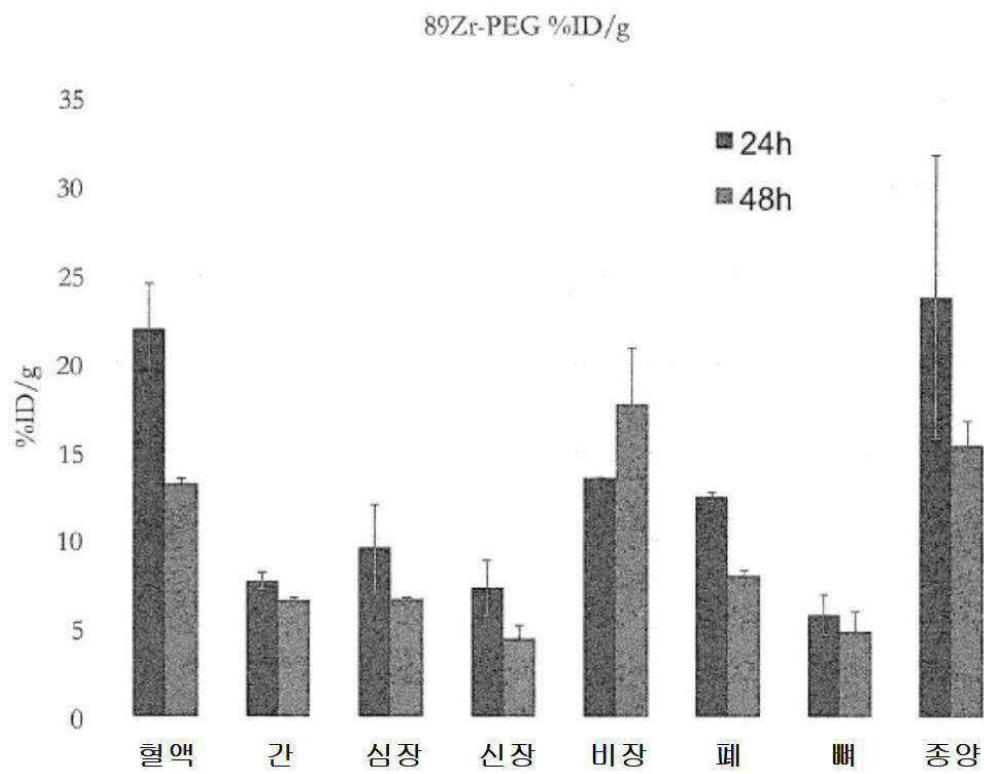


도면7a

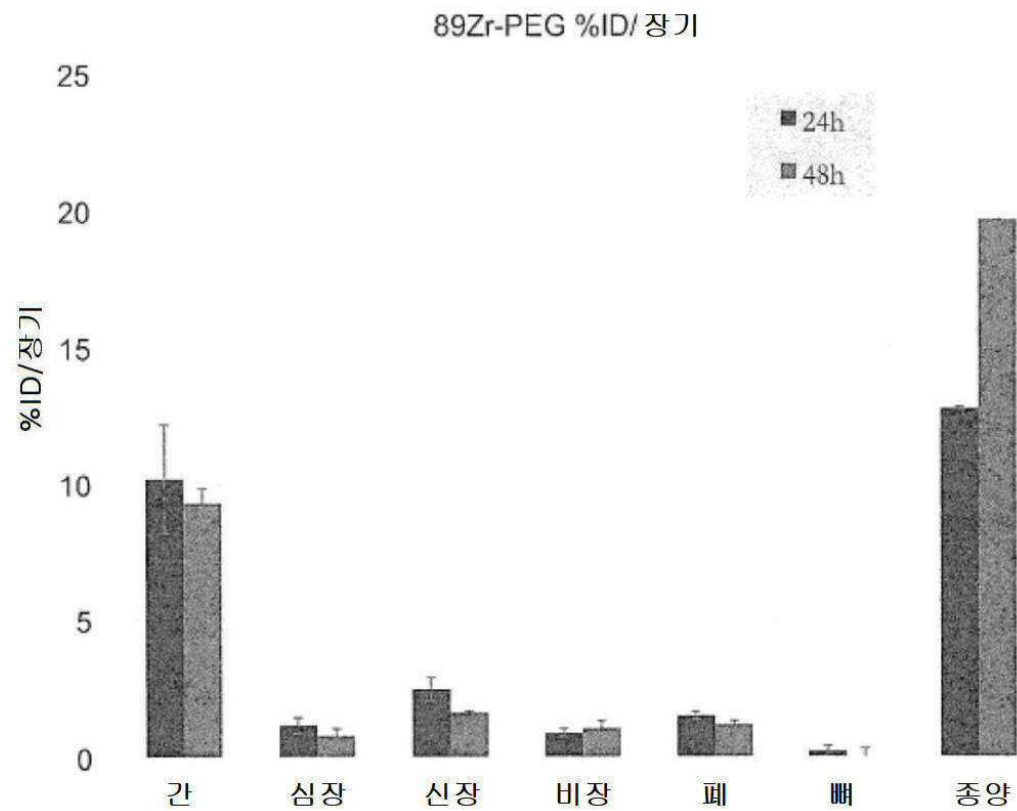


T = 종양; K = 신장

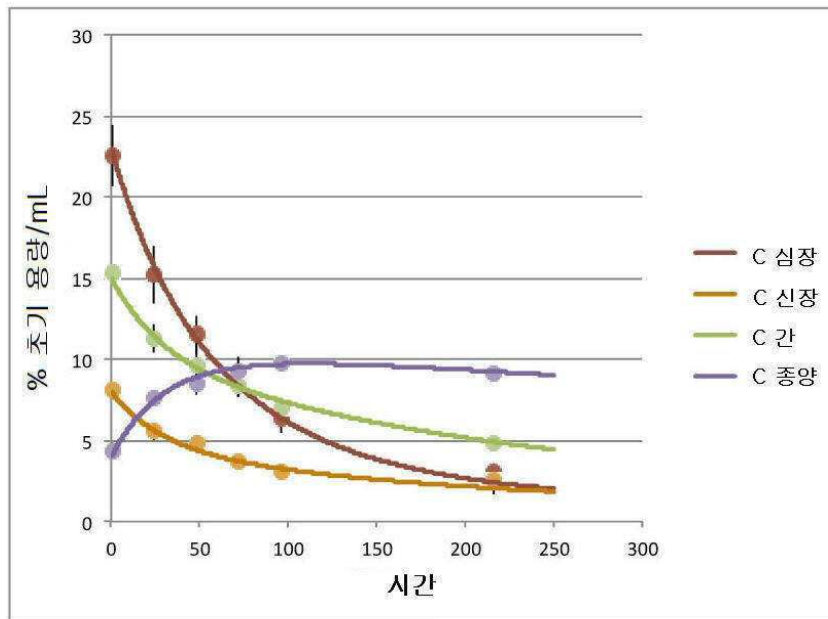
도면7b



도면7c

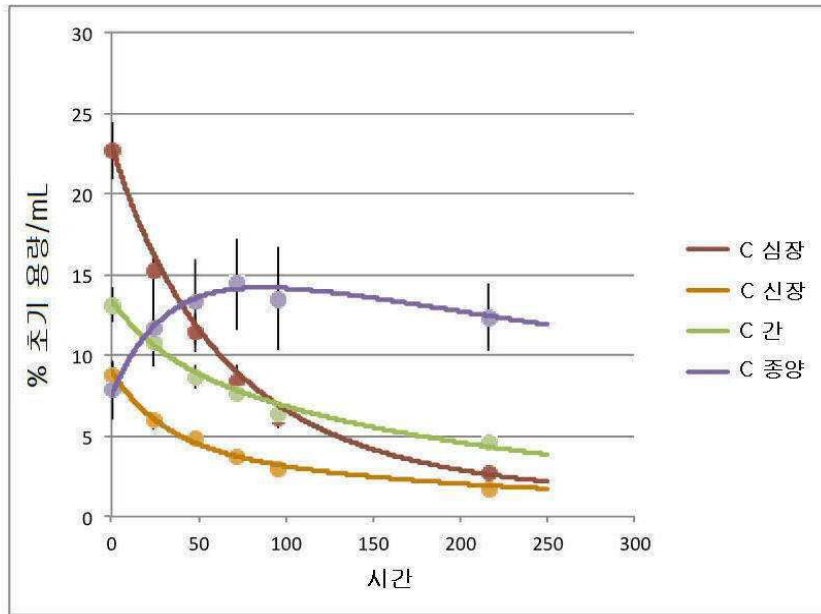


도면8



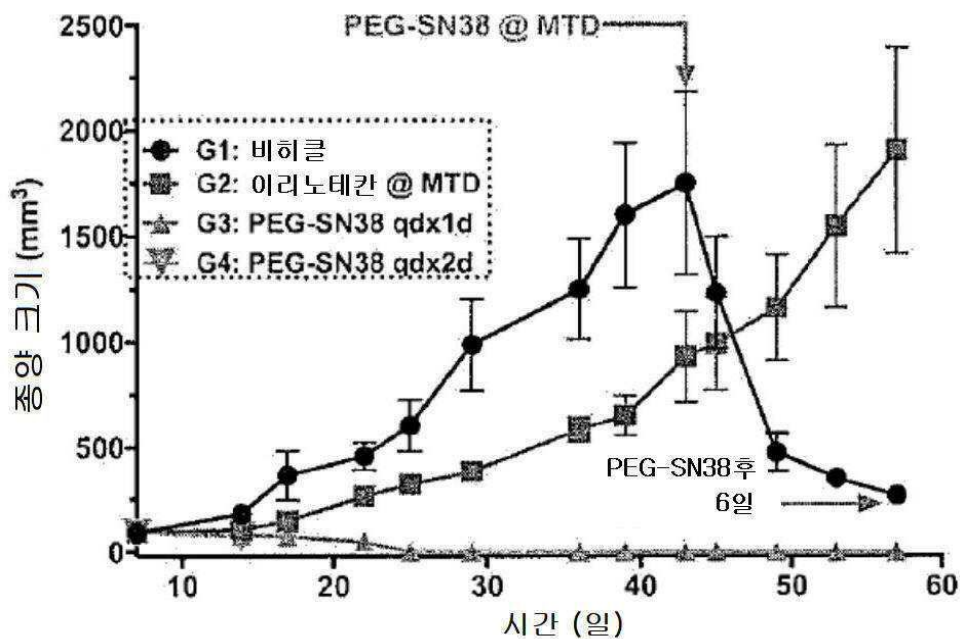
HT-29 이종이식편 중의 ^{89}Zr -컨쥬게이트의 조직 분포. 데이터 포인트는 4-분지형 $\text{PEG}_{40\text{kDa}}\text{-DFB-}^{89}\text{Zr}$ (실시예 5), 4-아암 $\text{PEG}_{40\text{kDa}}\text{-(DFB-}^{89}\text{Zr)}_4$ (실시예 5), 및 4-아암 $\text{PEG}_{40\text{kDa}}\text{-(DFB-}^{89}\text{Zr)}_1(\text{SN38})_3$ 로 처리된 판독값의 평균이다. 오차 막대는 표준 편차이다. 곡선은 표 2의 파라미터들을 이용하여 계산하였다.

도면9

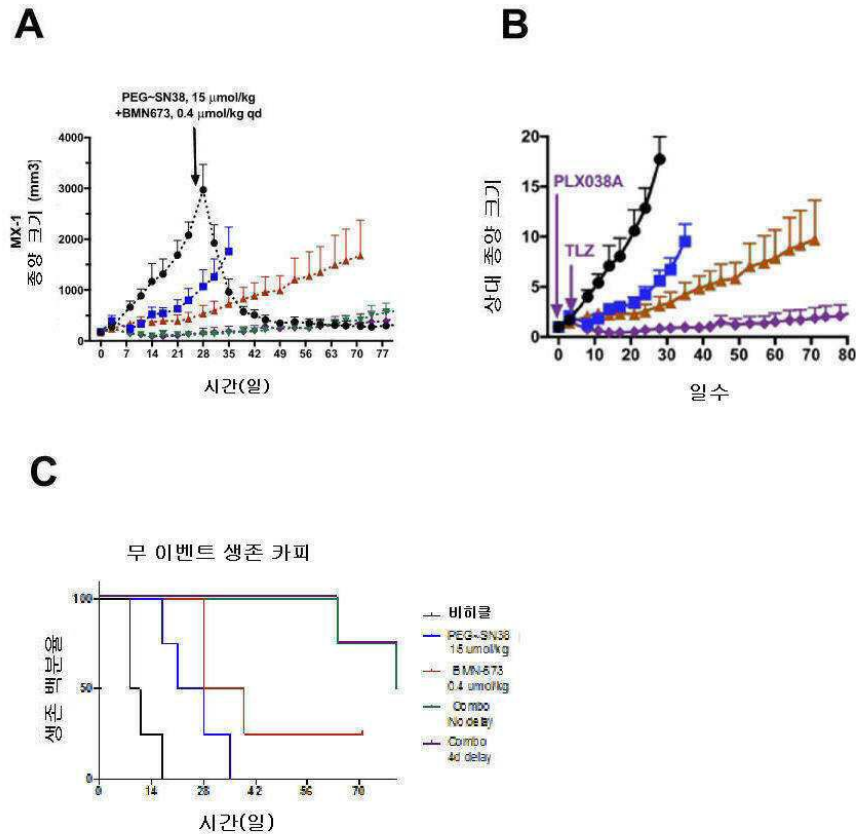


MX-1 이종이식편 중의 ^{89}Zr -컨쥬게이트의 조직 분포. 데이터 포인트는 4-분지형 PEG_{40kDa}-DFB- ^{89}Zr (실시예 5), 4-아암 PEG_{40kDa}-(DFB- ^{89}Zr)₄ (실시예 5), 및 4-아암 PEG_{40kDa}-(DFB- ^{89}Zr)₁(SN38)₃ 로 처리된 판독값의 평균이다. 오차 막대는 표준 편차이다. 곡선은 표 2의 파라미터들을 이용하여 계산하였다.

도면10



도면11



A) 종양 크기 대 시간; 비히클 대조군 (●), 및 15 $\mu\text{mol/kg}$ PLX038A의 1회 복강 주사 후 (■), 0.4 $\mu\text{mol/kg}$ BMN673의 매일 경구 강제투여 (▲), 또는 조합 요법 of a single i.p. 용량 of 15 $\mu\text{mol/kg}$ PLX038A의 1회 복강 용량과 매일 경구 BMN673의 조합 요법을 동일자에 개시 (▼) 또는 4일 후에 개시 (◆). 비히클 대조군 종양 크기가 ~3,000 mm³에 달했을 때 동물을 조합제로 처리함, 단 BMN673 투여는 즉시 개시하였다. (○). 데이터를 평균 종양 크기 \pm SEM으로 플로팅하였다. 이들 그룹은 N=4 동물로 구성되었다. B) PLX038A 투여로부터 4일 후에 매일 TLZ를 투여 개시한 것을 제외하고 A와 유사하게 실시함 (◆). C) 무-이벤트 생존으로서, 여기서 이벤트는 0일의 종양 크기에 비해 종양이 4배 증가한 것으로 정의됨.

도면12

