

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0092702

(43) 공개일자 2015년08월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 51/04 (2006.01) A61K 51/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7034743

(22) 출원일자(국제) 2013년05월13일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2014년12월10일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2013/059841

(87) 국제공개번호 WO 2013/167756

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 27 항

(54) 발명의 명칭 방사성 제약 복합체

(57) 요약

조직 표적 모이어티, 4개의 HOPO 모이어티들을 포함하는 옥타덴테이트 히드록시피리디논-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 치환된다.

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

조직 표적 모이어티, 4개의 HOPO 모이어티들을 포함하는 옥타테트라 히드록시피리디논-함유 리간드, 및 알파-방출 토륨 방사성 핵종의 이온을 포함하는 조직-표적 복합체로서, 상기 4개의 HOPO 모이어티들 중 하나 이상은 N-위치에서 히드록시알킬 가용화 기로 치환되는 것인 복합체.

#### 청구항 2

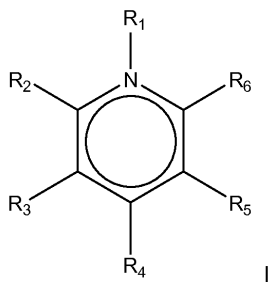
청구항 1에 있어서, 하나 이상의 3,2-HOPO 모이어티를 포함하는 것인 복합체.

#### 청구항 3

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

#### 청구항 4

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



상기 식에서, R<sub>1</sub>은 화학식 I의 상기 4개의 모이어티 중 하나 이상에 존재하는 선택적(optional) N-치환기 가용화 기이고; R<sub>2</sub> 내지 R<sub>6</sub> 기들은 각각 독립적으로 H, OH, =O, 짧은 하이드로카르빌기, 링커 모이어티 및/또는 결합(coupling) 모이어티로부터 선택되고, 여기서 R<sub>2</sub> 내지 R<sub>6</sub> 중 하나는 OH이고 R<sub>2</sub> 내지 R<sub>6</sub> 중 하나는 =O이다.

#### 청구항 5

청구항 4에 있어서, R<sub>1</sub> 내지 R<sub>6</sub> 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

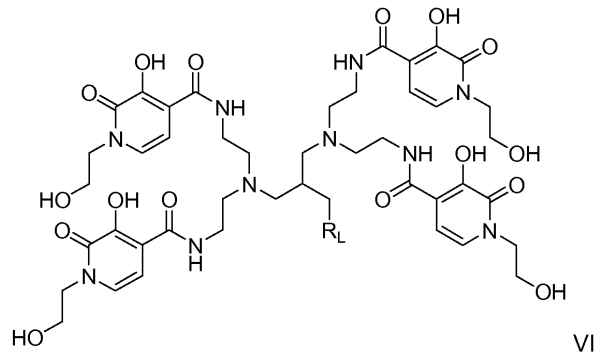
선행하는 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 4개의 HOPO 기들 각각에 대한 N-치환기는 각각 독립적으로 HO-, HOCH<sub>2</sub>-, HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, HO-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, HO-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>-, HO-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, HO-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, HO-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>-, HO-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, HO-CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)- 및 HOCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)-에서 선택되는 것인 복합체.

#### 청구항 8

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

**청구항 9**

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



상기 화학식에서,  $R_L$ 은 임의의 적합한 링커 모이어티이다.

**청구항 10**

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

**청구항 11**

조직 표적 모이어티, 4개의 HOPO 모이어티들을 포함하는 옥타덴테이트 히드록시피리디논-함유 리간드, 및 알파-방출 토폴 방사성 핵종의 이온을 포함하는 조직-표적 복합체의 증식성(hyperplastic) 또는 종양성(neoplastic) 질병의 치료를 위한 약제의 제조에서의 용도로서, 상기 4개의 HOPO 모이어티들 중의 적어도 하나는 N-위치에서 히드록시알킬 가용화 기로 치환되는 것인 용도.

**청구항 12**

청구항 11에 있어서, 상기 조직-표적 복합체는 청구항 1 내지 10 중의 어느 한 항에서 청구된 복합체인 것인 용도.

**청구항 13**

청구항 11 또는 청구항 12에 있어서, 상기 질병은 암종, 육종, 골수종, 백혈병, 림프종 또는 혼합형 암(mixed type cancer)인 것인 용도.

**청구항 14**

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 비인간 동물(특히 치료를 요하는 인간 또는 동물)의 치료 방법으로서, 상기 4개의 HOPO 모이어티들 중 하나 이상은 N-위치에서 히드록시알킬 가용화 기로 치환되는 것인 방법.

**청구항 15**

청구항 14에 있어서, 상기 조직-표적 복합체는 청구항 1 내지 10 중의 어느 한 항에 청구된 복합체인 것인 방법.

**청구항 16**

청구항 14 또는 청구항 15에 있어서, 암종, 육종, 골수종, 백혈병, 림프종 또는 혼합형 암과 같은 증식성 또는 종양성 질병의 치료를 위한 것인 방법.

#### 청구항 17

요법(therapy)에 사용하기 위하여 청구항 1 내지 10 중의 어느 한 항에서 청구된, 조직 표적 복합체.

#### 청구항 18

청구항 17에 있어서, 암종, 육종, 골수종, 백혈병, 림프종 또는 혼합형 암과 같은 증식성 및/또는 종양성 질병의 치료에 사용하기 위한 것인 조직 표적 복합체.

#### 청구항 19

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 약학적 조성물로서, 상기 4개의 HOPO 모이어티들 중 하나 이상은 N-위치에서 히드록시알킬 가용화 기로 치환되는 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 20

청구항 19에 있어서, 상기 조직-표적 복합체는 청구항 1 내지 10 중의 어느 한 항에서 청구된 조직-표적 복합체인 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 21

청구항 12 내지 14 중의 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 중의 적어도 하나는 N-위치에서 히드록시알킬 가용화 기로 치환되며, 상기 키트는 선택적으로 및 바람직하게는  $^{227}\text{Th}$ 과 같은 알파-방출 토폴 방사성 핵종을 포함하는 것인 키트.

#### 청구항 22

조직-표적 복합체의 형성 방법으로서, 상기 방법은 조직 표적 모이어티를 수성 용액에서 옥타덴테이트 히드록시피리딘-함유 리간드에 결합시키는 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 치환되는 것인 방법.

#### 청구항 23

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

#### 청구항 24

청구항 23에 있어서, 상기 접촉 단계는 40°C 미만에서 시행되는, 방법.

#### 청구항 25

청구항 23 또는 청구항 24에 있어서, 상기 접촉 단계는 유기 용매의 실질적인 부재 하에 수행되는 것인 방법.

#### 청구항 26

청구항 22 내지 25 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단계는 상기 리간드 모이어티와 상기 표적 모이어티 사이에 아미드, 에스테르, 에테르 또는 아민 결합을 생성하는 것인 방법.

#### 청구항 27

청구항 26에 있어서, 상기 아미드 또는 에스테르 결합은 적어도 하나의 활성화된 에스테르기에 의해 형성되고, 예를 들면 N-히드록시 말레이미드, 카르보디이미드 또는 아조디카복실레이트 커플링제에 의해 형성되는 것인 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 토폴 동위 원소들의 복합체들, 그리고 특히 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 피험체들에서 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  $\mu$ m 미만이다. 이는 이들의 선원(source)로 하여금 중양 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  $\alpha$ -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 |
|-------------------|-------------|------------------|
| $^{225}\text{Ac}$ | 10.0 일      | 백혈병              |
| $^{211}\text{At}$ | 7.2 시간      | 아교 모세포종          |
| $^{213}\text{Bi}$ | 46 분        | 백혈병              |
| $^{223}\text{Ra}$ | 11.4 일      | 골격 전이            |
| $^{224}\text{Ra}$ | 3.66 일      | 강직성 척추염          |

[0008] \* 반감기

[0009] 지금까지, 방사선 면역 요법에서 그 적용에 관한 주된 관심은  $^{211}\text{At}$ ,  $^{213}\text{Bi}$  및  $^{225}\text{Ac}$ 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]

$^{223}\text{Ra}$  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 함입하고 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,  $^{227}\text{Th}$ 의 붕괴에 따라 방출된  $^{223}\text{Ra}$  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 피험체(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  $^{223}\text{Ra}$ 에 기인한 치명적인 골수 독성 없이 내부 방사성 핵종 요법에 있어 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 피험체에게 투여하지 않는 것이 바람직하다. 따라서, 이러한 새로운 치료 기회의 창을 유용한 이용은 알파-방출 토륨-227 핵종이 높은 신뢰도로 복합체화가 하고 표적이 될 수 있는 경우에 크게 증진될 수 있다.

[0016]

방사성 핵종들은 끊임없이 붕괴하고 있기 때문에, 단리와 피험체에게의 투여 사이에 그 물질을 취급하는 데 쓴 시간은 매우 중요하다. 그 시간은 또한, 알파-방출 토륨 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 하고/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. 이러한 이점 덕분에 오염물질인 딸 생성물로 지속적으로 붕괴하는 방사성제약품의 생성에서 매우 중요한 조제 시간 및 복잡성이 줄어든다.

[0017]

치료하는 데 세포 독성제의 전달에 있어서 선택성이 필요하다는 견지에서, 알파-방사성 핵종 복합체들이 표적이 되는 것이 명백히 필요하다. 그러나, 작은 표적 펩타이드나 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(sp

t)'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 독성체의 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 킬레이터체는 표적 모이어티에의 후속 부착을 위해 알파 방출체 토폴-277을 조정하기에 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 종양 표적 항체에 공액된 실험에서, 상기 분자는 그것이 수성 완충체에 용해될 수 없었기 때문에 유기 용매 DMSO에 용해하였다.

[0021] 세포 독성 요법(예컨대, 암 화학요법 또는 내부 방사성 핵종 요법)에서 특정 표적 모이어티들의 사용은 이제 잘 확립된 방법이고, 수많은 표적 및 잠재적 표적들은 알려져 있다. 이들은 통상적으로, 병든 세포에서 또는 병든 세포와 연관이 있는 세포에서, 또는 근처의 기질에서 어느 정도까지는 우선적으로 발현되는 세포-표면 또는 기질 표지자(예컨대 수용체)이다. 특이적 결합 모이어티는 세포 독성 요소(예컨대, 화학적 독소들 또는 방사성 핵종)를 원치않는 세포 유형(예, 종양성 세포) 근처로 표적화, 전달 및/또는 결합시키는 역할을 할 수 있으며, 그럼으로써 세포 독성제가 제공하는 세포 사멸의 선택성을 증진시킬 수 있다. 그러한 특이적 결합 속성을 이용하기 위해, 상기 결합 모이어티는 세포 독성제(예컨대, 복합된 방사성 핵종)에 공액되거나 또는 공액될 수 있어야 한다. 염산 결합 수용체, CD22, CD33, 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체 및 많은 다른 수용체와 같은 수용체를 포함하는 많은 세포 표면 및 기질 표적들은 알려져 있다. 일반적으로, 항체, 항체 단편 또는 더 작은 결합 분자(예컨대, "어피바디(affibody)")는 그러한 세포 표면 표지자에 대한 특이성에 의해 생성되고 세포 독성제에 공액된다. 임의의 이러한 알려진 방법들 및 표지자들은 잠재적으로 방사성 핵종 시약들과 함께 사용할 수 있다. 그러나, 조제 용이성 및 시간은 중요하고, 더 작은 결합체들의 경우, 용해성은 공액체가 전체로서 투여를 위한 용해성이 있어야 하기 때문에 대단히 중요할 수 있다.

[0022] 이제 본 발명자들은 적어도 하나가 적합한 가용화 모이어티에 의해 치환되는 4개의 HOPO 모이어티들을 포함하는 옥타덴테이트 히드록시피리딘-함유 리간드에 의해 복합된 4+ 토폴-227 이온의 사용이 상기 복합체의 용해성 및 상용하는 특성을 획기적으로 증진시킬 수 있다는 것을 뜻밖에도 규명하였다.

[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 상기 N-위치에서(위치 1) 히드록시알킬 가용화 기로 치환된다. 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 히드록시피리딘-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 결합은 바람직한 방법이다.

[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 제약의 제조에 있어서 N-위치에서 히드록시알킬 가용화 기(본원에 기술된 임의의 그러한 복합체를 포함함)로 치환된다.

[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 기(본원에 기술된 임의의 그러한 복합체를 포함함)로 치환된다. 그러한 방법은 바람직하게는 본원에 기술된 임의의 그러한 질병을 비롯한 증식성 또는 종양성 질병의 치료를 위한 것이다. 그러한 방법은 통상적으로 인간 또는 비인간 포유동물 피험체에 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 기(본원에 개시된 바의 모든 그러한 복합체들을 포함함)로 치환된다.

[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 기(본원에 기술된 임의의 그러한 복합체를 포함함)로 치환된다.

[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] 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 복합체는 4개의 HOPO 모이어티들 및 알파-방출 토폴 방사성 핵종의 이온을 포함하고, 이 경우에 상기 4개의 HOPO 모이어티들 중 적어도 하나는 N-위치에서 히드록시알킬 가용화 기로 치환된다. 그러한 방법은 임의의 유기 용매의 실질적인 부재 하에 시행될 수 있다.

[0035] 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 치환된다. 모든 결합 모이어티 및 리간드는 바람직하게는 본원에 기술된 것이다. 그러한 키트는 선택적으로 그리고 바람직하게는 알파-방출 토폴 방사성 핵종, 예컨대  $^{227}\text{Th}$ 를 포함할 것이다.

[0036] 발명의 상세한 설명

[0037] 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 토크 복합체를 국소화하는) 역할을 한다는 것을 나타내기 위한 것이다. 따라서, 조직 표적 기 또는 모이어티는 피험체에게 투여한 후 그 피험체의 신체 내에서 적어도 하나의 원하는 부위에 평균보다 더 높은 정도의 국소화를 제공하는 역할을 한다. 상기 표적 모이어티는, 예를 들면, 병든 세포들에 존재하는 세포-표면 표지자(예, 수용체, 수송 단백질, 세포 공액 분자, 등)에 결합할 수 있다. 마찬가지로, 조직 표적 모이어티는 병든 세포 근처의 세포에 존재하는 세포-표면 표지자(예, 수용체, 수송 단백질, 세포 공액 분자, 등)에 결합할 수 있다. 그러한 세포-표면 표지자는 건강한 세포 표면보다 병든 세포 표면에서 더 심하게 발현되는 단백질을 포함하거나, 또는 휴면 단계 동안보다 성장 또는 복제 기간 동안 세포 표면에서 더 심하게 발현되는 단백질을 포함한다. 표적 세포 또는 조직 근처에 존재하거나, 또는 그와 연관이 있는 성분은 또한 본 발명의 임의의 측면에 따라 치료를 위한 표적에서 이용될 수 있다. 예를 들면, 표적화된 세포 또는 조직 주변의 기질 내에 존재하거나, 또는 그 내부로 방출되는 성분은, 그 존재, 형태 또는 농도에 의하여 그 영역이 건강한 조직과 구별될 수 있는 경우, 표적화하는 데 사용될 수 있다. 이것의 예는 뇌 종양과 연관되지만 세포들 사이의 기질에서 발현되는 테나신과 같은 기질 항원들이다. 그러한 기질 항원들은 본원에서 고찰된 단일 또는 복합체 표적화 모이어티에 의해 표적화될 수 있다.

[0038] 상기 조직 표적 모이어티는 또한 원하는 조직(들)에 대한 토크 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 토크에 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).

[0039] 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, 제약, 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.

[0040] 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, 또한 상이할 수도 있다(예컨대, 전이 부위가 특정적으로 표적화된 경우). 하나 이상의 부위가 포함되는 경우, 이에는 기원 부위가 포함될 수 있거나 또는 복수의 제2 부위일 수 있다.

[0041] 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. 또한, 상기 "연조직 질병"은 유일한 일차 종양 또는 골격 질병인 일차 종양에 의한 유일한 전이로 구성될 수 있다.

[0042] 특정 알파-방사성 토크 동위 원소들(예, <sup>227</sup>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 토크-227 방사선 동위 원소의 붕괴에 의해 생성된 라듐-223의 양이 일반적으로 피험체에게 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 피험체에 대한 예후에 따라 현저히 다를 것이라는 것은 당업자에게 분명할 것이다. 본 발명에 대한 바람직한 피험체들은 인간이지만, 다른 포유동물들, 특히 개에게 본 발명을 사용하면 유익할 것이고, 용인할 수 있는 골수 손상 수준은 또한 피험체의 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,  $^{223}\text{Ra}$ 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,  $^{223}\text{Ra}$ 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.

[0043]

또한, 방사성 토륨(예,  $^{227}\text{Th}$ ) 함유 화합물은 줄기 세포 지지체 또는 비슷한 회수 방법이 포함될 때 생성된 라듐(예,  $^{223}\text{Ra}$ )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.

[0044]

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  $^{226}\text{Ra}$ 에서 간접적으로 조제될 수 있는 데, 중성자 조사된  $^{226}\text{Ra}$ 는  $^{227}\text{Th}$ , 즉,  $^{227}\text{Ac}(T_{1/2} = 22 \text{ 년})$ 의 모 핵종을 함유할 것이다. 악티늄-227은  $^{226}\text{Ra}$  표적에서 아주 용이하게 분리될 수 있고  $^{227}\text{Th}$ 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.

[0045]

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

[0046]

표 2

| 핵종                | 붕괴 모드    | 평균 입자 에너지 (MeV) | 반감기     |
|-------------------|----------|-----------------|---------|
| $^{227}\text{Th}$ | $\alpha$ | 6.02            | 18.72 일 |
| $^{223}\text{Ra}$ | $\alpha$ | 5.78            | 11.43 일 |
| $^{219}\text{Rn}$ | $\alpha$ | 6.88            | 3.96 초  |
| $^{215}\text{Po}$ | $\alpha$ | 7.53            | 1.78 ms |
| $^{211}\text{Pb}$ | $\beta$  | 0.45            | 36.1 분  |
| $^{211}\text{Bi}$ | $\alpha$ | 6.67            | 2.17 분  |
| $^{207}\text{Tl}$ | $\beta$  | 1.42            | 4.77 분  |
| $^{207}\text{Pb}$ |          |                 | 안정됨     |

[0047]

[0048]

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

[0049]

토륨-227은 견딜 수 없는 골수 억제를 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.

[0050]

종양 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-

$^{227}\text{Th}$ 에 상응하는 투여량은 적어도 체중 kg당 36-200 kBq이 될 것이다. 이에 의하여 치료 효과를 기대하여 유용하게 투여될 수 있는  $^{227}\text{Th}$ 의 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 필시 초래될 것이다. 따라서, 이렇게 계산된 투여량은 일반적으로 최소 유효량으로 간주되어야 한다. 완전히 잔류된  $^{227}\text{Th}$ (즉,  $^{227}\text{Th}$ 는 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, 실시예 1 및 2의 문헌에) 나와있다.

[0051]

방사선 동위원소를 써서 표식된 화합물이 딸 핵종들을 방출하는 경우, 임의의 방사성 딸 핵종(들)의 운명을 아는 것은, 해당되는 경우에, 중요하다.  $^{227}\text{Th}$ 의 경우, 주된 딸 산물은  $^{223}\text{Ra}$ 이고, 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,  $^{227}\text{Th}$ 에서 생체 내로 방출된 라듐-223은 건강한 연조직에 영향을 크게 미치지 않을 것이다. 용해된 시트레이트 염으로서  $^{227}\text{Th}$ 의 분포에 관한 Int. J. Radiat. Biol. 20:233-243(1971)에서의 Müller에 의한 연구에서, 연조직 내의  $^{227}\text{Th}$ 에서 생성된  $^{223}\text{Ra}$ 는 빠르게 즉시 재분포되거나 또는 배설된 것으로 밝혀졌다. 그래서, 특히 골수에 대한 알파 방출 라듐의 알려진 독성은 토륨 투여량과 관련된 문제이다.

[0052]

사실은,  $^{223}\text{Ra}$ 의 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  $^{227}\text{Th}$ (예컨대, 36 kBq/kg 이상)이 포유동물 피험체가 심각하거나 또는 심지어 치명적인 골수 독성의 용인할 수 없는 위험을 겪을 것이라고 예상하지 않고 포유동물 피험체에게 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 복합체화하고, 매우 높은 친화도로 유지되어, 가능한 한 투여량의 최대 분량이 표적 부위에 전달되는 것이 극히 중요하다.

[0053]

$^{227}\text{Th}$  제약으로부터 생성된  $^{223}\text{Ra}$ 의 양은 방사선 동위원소를 써서 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  $^{223}\text{Ra}$ 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.  $^{227}\text{Th}$ 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.

[0054]

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 미만인 되게 하는 정도가 될 것이다. 또한, 이렇게 됨으로써 이들 범위에 표시된 임의의 체중을 곱함으로써 나타낸  $^{223}\text{Ra}$ 에 대한 노출이 구현될 것이다. 상기 투여량 수준은 바람직하게는  $^{227}\text{Th}$ 의 완전히 잔류된 투여량이지만, 일부  $^{227}\text{Th}$ 가 그것의 붕괴 전에 신체에서 배출될 것을 고려하여 투여된 투여량일 수 있다.

[0055]  $^{227}\text{Th}$  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.

[0056] 하나의  $^{227}\text{Th}$  핵의 붕괴는 하나의  $^{223}\text{Ra}$  원자를 제공하기 때문에,  $^{227}\text{Th}$ 의 잔류 및 치료 활성은 환자가 겪는  $^{223}\text{Ra}$  투여량에 직접적으로 관련될 것이다. 임의의 특정 상황에서 생성된  $^{223}\text{Ra}$ 의 양은 잘 알려진 방법을 사용하여 계산될 수 있다.

[0057] 따라서, 바람직한 구현예에서, 본 발명은(본원에 기술된 바와 같이) 포유동물 피험체에서 질병의 치료 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 피험체에게 조직 표적 모이어티, 옥타덴테이트 리간드(특히, 본원에 기술된 것들 중의 임의의 것) 및 방사성 토폴 동위 원소(예, 토폴-227)를 포함하는 공액체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.

[0058]  $^{223}\text{Ra}$  딸 동위 원소에 대한 피험체의 노출을 최소화하는 것은 이의 특성이 유용하게 사용되지 않는 한, 분명히 바람직하다. 특히, 생체 내에서 생성된 라듐-223의 양은 일반적으로 40 kBq/kg 이상, 예를 들면, 60 kBq/Kg 이상일 것이다. 일부 경우에, 생체 내에서 생성된  $^{223}\text{Ra}$ 가 80 kBq/kg 이상, 예를 들면, 100 또는 115 kBq/kg 이상이 되는 것이 필요하다.

[0059] 적절한 담체 용액 내의 토폴-227를 써서 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.

[0060] 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/제약은 상응하여 적어도 하나의 추가의 치료학적 활성제, 예컨대 또 하나의 방사성제 또는 화학요법제를 포함할 수 있다.

[0061] 하나의 특히 바람직한 구현예에서, 상기 피험체는 또한 라듐-223 유래 골수 독성의 효과를 감소시키기 위해 줄기 세포 치료 및/또는 다른 지지 요법도 받을 수 있다.

[0062] 본 발명에 따라,  $^{227}\text{Th}$ 은 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  $^{227}\text{Th}$ 를 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 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')<sub>2</sub>, Fab' 및/또는 scFv를 포함한다. 항체 작제물은 본원에서 나타낸 임의의 항체 또는 단편을 가질 수 있다.

[0063] 일 구현예에서, 상기 표적 모이어티는 세포 표면 수용체, 예컨대 CD22, CD33, 엽산 수용체, 에스트로젠 및/또는 프로게스테론 수용체들 또는 종양성 세포 유형들과 연관된 임의의 세포 표면 수용체에 대한 특이성을 가질 수 있다.

[0064] 대안의 구현예에서, 상기 표적 모이어티는 CD22 또는 CD33에 대한 특이성을 갖지 않는다. 일 구현예에서, 상기

표적 모이어티는 수용체 CD22에 결합되지 않고/않거나 수용체 CD33에 결합되지 않는다. 비결합은, 인슐린 수용체와 같은 대조군 수용체에 대한 결합보다 더 크지 않은 정도에서 행해질 수 있다.

[0065] 더 심층적 구현예에서, 상기 특이적 결합 모이어티는 "항체 모방체", 예컨대 항체의 결합 부위와 유사한 적어도 하나의 특이적 결합 부위를 갖고 약 10 kD 미만(예, 8 kD 이하, 예컨대 0.5 내지 7 kD)의 분자 질량을 갖는 펩티드 결합제일 수 있다. 그러한 특이적 결합제는, 예를 들면, 20 내지 100개의 아미노산, 바람직하게는 35 내지 80개의 아미노산(예, 약 45 내지 약 70개의 아미노산)으로 구성된 펩티드일 수 있다. 이러한 종류의 잘 알려진 특이적 결합제들은 약 5-7kD의 분자량을 갖는 약 55-60개의 아미노산으로 구성된 어피바디 분자를 포함한다. 어피바디 함유 융합 단백질이 본원에 예시되어 있다. 그러한 결합제는 하나의 바람직한 구현예를 형성한다. 비교를 위해, 일반적인 항체의 질량은 약 150 kDa이고, 단일-도메인 항체 단편(scFv)은 약 12-15 kDa이다.

[0066] 또한 본 발명에서 사용하는 데 적합한 것은 펩티드, 아미노산, 스테로이드성 또는 비-스테로이드성 호르몬, 염산, 에스트로겐, 테스토스테론, 비오틴, 또는 일반적으로 10 000 g/mol 미만의 분량을 갖는 다른 특이적-결합 화합물을 갖는 복합된  $^{227}\text{Th}$ 의 치료 공액체이다.

[0067] 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 제약 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.

[0068] 히드록시피리딘은 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.

[0069] 토폴을 위한 이전에 알려진 킬레이터는 또한 골격 질소들에 부착된 산성(예, 카르복시알킬)기를 갖는 선형, 고리형 또는 분지형 폴리아자알칸 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.

[0070] 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.

[0071] 게다가, 불가역 변성에 대한 표적 모이어티의 상대적으로 높은 민감성 때문에, 모든 가열 단계가 완료될 때까지 표적 모이어티의 부작을 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. 또한, 공액체를 조제하는 데 소비되는 모든 시간은 이러한 준비기간 동안 붕괴될 토폴의 일 부분을 소모시킨다.

[0072] 본 발명의 모든 측면에서 알파-방출 토폴과 옥타덴테이트 리간드의 복합체는 60°C 이상 가열하지 않고(예, 50°C 이상 가열하지 않음), 바람직하게는 38°C 이상 가열하지 않고, 가장 바람직하게는 25°C 이상 가열하지 않고 형성되거나 또는 형성될 수 있는 것이 바람직하다.

[0073] 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.

[0074] 킬레이터들은 비-포스포네이트 분자들일 수 있고, 본 발명의 일 구현예에서  $^{227}\text{Th}$ 는 임의의 포스포네이트에 또는 다른 골-표적 기에 부착되지 않을 것이고, 그러한 물질들과 함께 투여되지도 않을 것이다.

[0075] 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.

[0076] 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 옥토덴테이트 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.

[0077] 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.

[0078] 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.

[0079] 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.

[0080] 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 기체들에서 선택될 수 있고, 이 기체들은 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 기체들은 RNA, DNA, 또는 그들의 단편들(예컨대, 앵타머), 올리고뉴클레오타이드, 탄수화물, 지질을 포함하거나, 또는 단백질 등을 갖거나 갖지 않는 그러한 기체들을 결합함으로써 만든 화합물을 포함한다. PEG 모이어티들은 상기에 나타난 바와 같이, 예컨대, 생물학적 잔류 시간을 증가시키고/시키거나 면역 자극을 감소시키기 위해 포함될 수 있다.

[0081] 조직 표적 모이어티는, 일 구현예에서, 골 친화물질, 리포솜 및 염산 공액된 항체 또는 항체 단편을 제외시킬 수 있다. 대안으로, 그러한 모이어티들이 포함될 수 있다.

[0082] 본 발명의 토폴을 써서(예, 토폴-227) 표식된 분자들은 질병과 관련이 있는 수용체들을 표적화함으로써 암성 또는 비-암성 질병들의 치료에 사용될 수 있다. 통상적으로,  $^{227}\text{Th}$ 의 그러한 의학적 용도는 암성(cancerous) 또는 비암성(non-cancerous) 질병의 치료를 위해  $^{227}\text{Th}$ 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  $^{227}\text{Th}$ 의 용도는 암종, 육종, 림프종 및 백혈병, 특히, 폐, 유방, 전립선, 방광, 신장, 위, 췌장, 식도, 뇌, 난소, 자궁의 암, 구강암, 결장암, 흑색 종, 다발성 골수종 및 비-호지킨(non-Hodgkin's) 림프종을 포함하는 임의의 형태의 암 치료에 특히 적합하다.

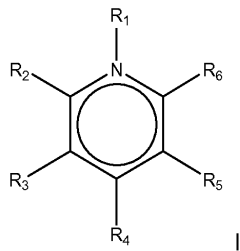
[0083] 방사성 핵종은 높은 비율의  $^{227}\text{Th}$ 가  $^{223}\text{Ra}$ 로 붕괴하기 전에 대부분 소실될 수 있기 때문에  $^{227}\text{Th}$ 를 전달하는 분자가 생체 내에서 짧은 생물학적 잔류 반감기를 갖는 경우 방출되는  $^{223}\text{Ra}$ 의 양은 감소될 수 있다. 그러나,  $^{227}\text{Th}$ 의 양은 본 발명에 따라 치료학적으로 효과적으로 남기 위해 증가될 필요가 있다. 복합체가  $^{227}\text{Th}$ 를 표적화된 세포들의 내부로 전달하도록 선택되는 경우, 이로 인해 특이적 세포 독성이 더 증가될 것이고, 중앙 부위에서 딸 동위 원소들의 적어도 부분적인 잔류 때문에 방사성 딸들의 전신성 독성 효과가 감소될 것이다. 이들 특징 모두는  $^{227}\text{Th}$  치료 기회의 창을 확대하고, 따라서 본 발명의 바람직한 구현예들을 형성한다.

[0084] 본 발명의 더 심층적 구현예에서, 연조직 질병과 골격 질병, 둘 모두를 갖는 환자는 투여된 토폴에 의해 생체 내에서 생성된  $^{227}\text{Th}$ 에 의해서 그리고  $^{223}\text{Ra}$ 에 의해서, 두 가지 모두에 의해서 치료될 수 있다. 이렇게 특히 유

리한 측면에서, 치료에 쓰이는 별도의 치료 성분은 골격 질병의 표적화에 의해 용인할 수 있는 정도의 비-골수 독성량의  $^{223}\text{Ra}$ 에서 유도된다. 이러한 치료 방법에서,  $^{227}\text{Th}$ 는 연조직의 일차/및 전이성 암의 적합한 표적화에 의해 당해 암을 치료하는 데 통상적으로 이용하고,  $^{227}\text{Th}$  붕괴로 인하여 생성된  $^{223}\text{Ra}$ 는 동일한 피험체에서 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).

[0085]

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



[0086]

[0087]

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.

[0088]

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 토크 이온의 킬레이트화에 적합하다는 것을 입증하였다. 신규 킬레이터들은 N-위치에 히드록시에틸을 포함하여, 유입된 대안의 기들을 갖는다. 놀랍게도, 메틸에서 히드록시에틸까지의 작은 변화는 순수한 물에 완전히 용해된 킬레이터를 초래하였다. 이러한 분자 및 일부 관련된 예들은 아래에 도시된다.

[0089]

본원에 사용된 바와 같이, 모든 히드로카르빌 모이어티는 C1 내지 C8 알킬, 알케닐 또는 알키닐 기들을 포함하여 C1 내지 C8 히드로카르빌과 같은 짧은 하이드로카르빌 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.

[0090]

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 매우 바람직하다. 일 구현예에서, 옥타텐테이트 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).

[0091]

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 디히드록시프로필이 가장 바람직하다.

[0092]

화학식 I에서,  $R_2$  내지  $R_6$  기들은 각각 독립적으로 H, OH, =O, (본원에 기술된) 짧은 히드로카르빌, (본원에 기

술된) 링커 모이어티 및/또는(본원에 기술된) 결합 모이어티에서 선택될 수 있다. 일반적으로,  $R_2$  내지  $R_6$  기들의 적어도 하나는 OH일 것이다. 바람직하게는, 바로  $R_2$  내지  $R_6$  기들의 적어도 하나는 =O일 것이다. 바람직하게는,  $R_2$  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.

[0093]

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.

[0094]

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.

[0095]

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. 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, 알케닐 또는 알키닐 기를 포함하는 C1 내지 C12 히드로카르빌과 같은 짧은 하이드로카르빌 기들을 포함한다.

[0096]

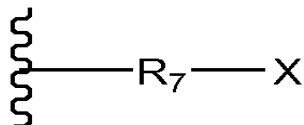
링커 모이어티들은 또한 에스테르, 에테르, 아민 및/또는 아마이드 기들을 포함하는 임의의 다른 적합한 강건한 화학적 연결일 수 있거나 또는 이들을 포함할 수 있다. 2개의 킬레이트화 모이어티를 결합시키는 원자들의 전체 수(하나 이상의 경로가 존재하는 경우 가장 짧은 경로에 의해 계수)는 복합체 형성을 위한 적합한 배치에서 킬레이트화 모이어티들을 구속하기 위해 일반적으로 제한될 수 있다. 따라서, 링커 모이어티들은 일반적으로 킬레이트화 모이어티들 사이의 15개 이하의 원자들, 바람직하게는, 1 내지 12개의 원자들, 더욱 바람직하게는 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 연결을 갖는 것들과 같은 기들이 적합하다).

[0097]

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 모이어티의 기능은 옥타덴테이트 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 킬레이

트화 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.

[0098] 일 구현예에서, 결합 모이어티는 다음과 같은 구조를 가질 수 있다:



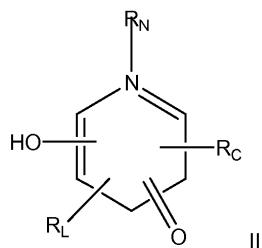
[0099]

[0100] 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;  $X$ 는 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,  $\text{COOH}$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{SH}$ ,  $\text{NHR}$  및  $\text{COH}$  기들을 포함하여 표적 모이어티에 공유 연계를 형성할 수 있는 임의의 기를 포함하고, 이 경우에  $\text{NHR}$  중  $R$ 은  $H$  또는 본원에 기술된 짧은 하이드로카르빌 기들 중 임의의 기일 수 있다. 표적 모이어티에 부착하는 데 매우 바람직한 기들은 라이신 잔기들의 입실론-아민 및 시스테인 잔기들의 티올 기들을 포함한다.

[0101] 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.

[0102] 결합 모이어티는 바람직하게 부착되어서 그 결과적으로 결합된 옥타덴테이트 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.

[0103] 바람직한 킬레이트화 기들은 아래 화학식 II의 킬레이트화 기들을 포함한다:



[0104]

[0105] 상기 화학식 II에서,  $=O$  모이어티는 피리딘 고리의 임의의 탄소에 부착된 케토-기를 나타내고,  $-OH$ 는 피리딘 고리의 임의의 탄소에 부착된 히드록시 모이어티를 나타내며,  $-R_L$ 은 전체적인 옥타덴테이트 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 하이드로카르빌과 같은 짧은 하이드로카르빌 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 옥타덴테이트 리간드를 형성하도록 선택된다.

[0106] 하나의 바람직한 구현예에서, 피리딘 고리의 이웃하는 원자들에 존재하는 화학식 II의  $-OH$  및  $=O$  모이어티들, 예컨대 2,3-, 3,2-; 4,3-; 및 3,4-히드록시피리딘 유도체들은 모두 매우 적합하다.

[0107]  $R_L$  모이어티는 피리딘 고리의 질소에 존재한다.  $R_N$  기는 화학식 II의 일부 기에서 존재하지 않을 수 있고, 이 경우에 화학식 II의 1개 이상의 상이한 기는 옥타덴테이트 리간드에 존재한다. 그러나, 각각의 옥타덴테이트 리

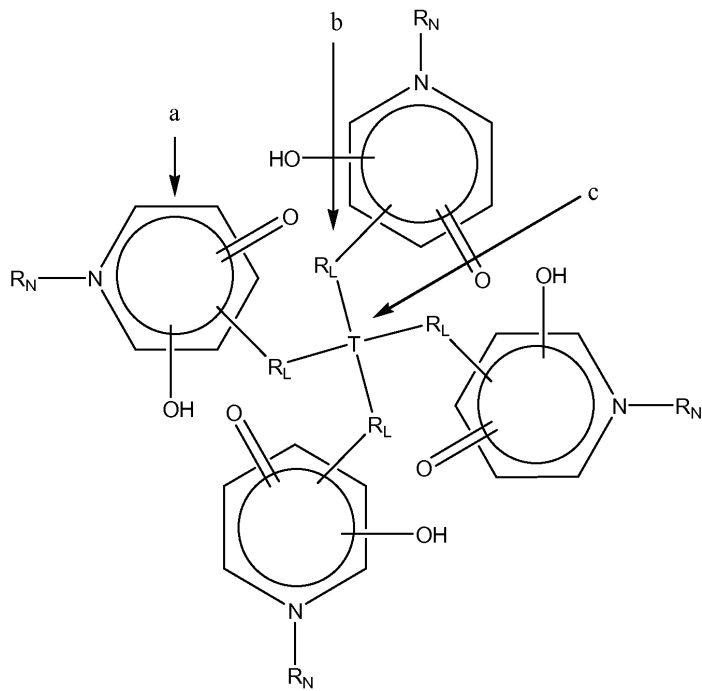
간드에서 적어도 하나의  $R_N$  기는 본원에 나타난 히드록시알킬 기일 것이다.

[0108] 하나의 바람직한 구현예에서, 적어도 하나의 3,2-히드록시피리딘은 모이어티는 옥타덴테이트 리간드 구조에 존재한다. 이 모이어티는 본원에 나타난 여러 가지 치환기 모이어티들 중 임의의 모이어티로 치환될 수 있다.

[0109] 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 옥타덴테이트 리간드를 제공한다. 화학식 II의 각각의 모이어티는 독립적인 치환 패턴을 가질 수 있지만, 하나의 바람직한 구현예에서, 적어도 하나의 모이어티는 3,2-히드록시피리딘은 모이어티이다. 상기 리간드는 2, 3 또는 4개의 3,2-히드록시피리딘은 모이어티들(적합한 바에 따라 치환됨, 본원에 기술됨)을 포함할 수 있다.

[0110] 옥타덴테이트 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.

[0111] "별 모양의(stellar)" 배치는 아래 화학식 III으로 나타낸다:



[0112] 식 중에서, 모든 기들 및 위치들은 위에 나타난 바와 같으며 "T"는 추가적으로 중심 원자 또는 템플레이트 기, 예컨대 탄소 원자, 히드록카르비 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.

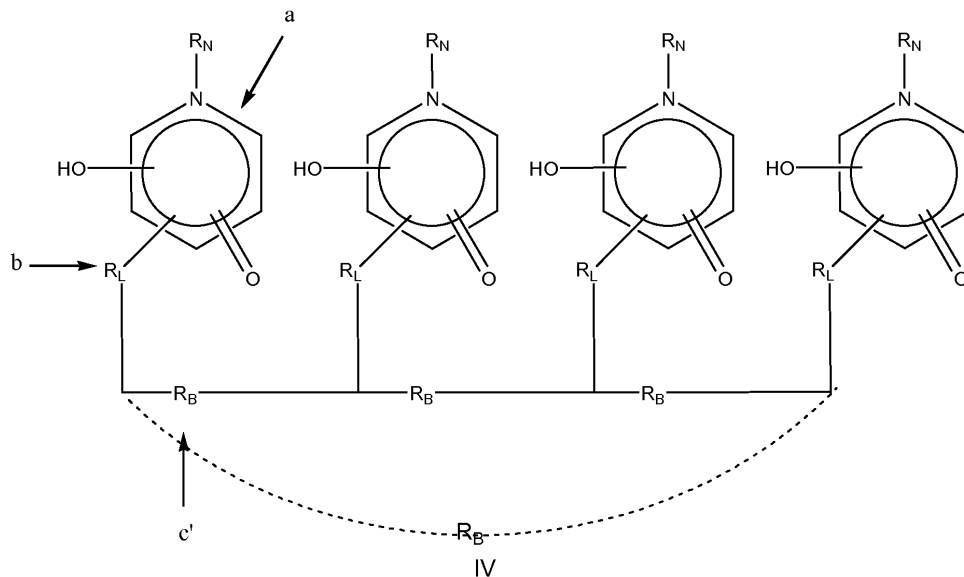
[0114] 분명히, 화학식 II III, IV 및 IVb의 구조들에서,(예, 링커 또는 결합 모이어티로) 달리 치환되지 않은 피리딘 고리(들)의 그러한 위치는, 적합한 바에 따라 화학식 I에서  $R_1$  내지  $R_5$ 에 대해 기술된 치환기들을 운반할 수 있

다. 특히, 작은 알킬 치환기들이, 예컨대 메틸, 에틸 또는 프로필 기들이 임의의 위치에 존재할 수 있다.

[0115] 옥타텐테이트 리간드는 일반적으로 상기 기술된 적어도 하나의 결합 모이어티를 추가적으로 포함할 것이다. 이것은 본원에 나타난 모이어티들 중 임의의 모이어티를 포함하는 임의의 적합한 구조일 수 있고, 표적 모이어티, 특정 결합제 또는 그러한 표적 모이어티에 또는 특정 결합제에 연결될 수 있는 작용기에 의해 종료될 것이다.

[0116] 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. 마찬가지로, 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.

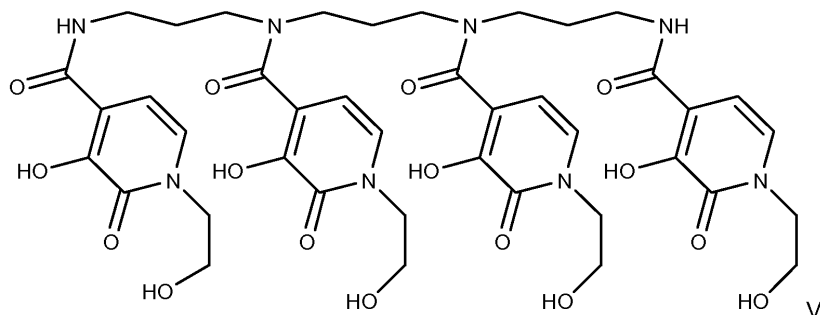
[0117] 대안의, "중추(backbone)" 형 구조는 아래 화학식 IV으로 나타낸다:



[0118] 상기 식에서, 모든 기 및 위치는 위에 나타난 바와 같고, "R<sub>B</sub>"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.

[0120] 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. 마찬가지로, 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.

[0121] 아마이드 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:



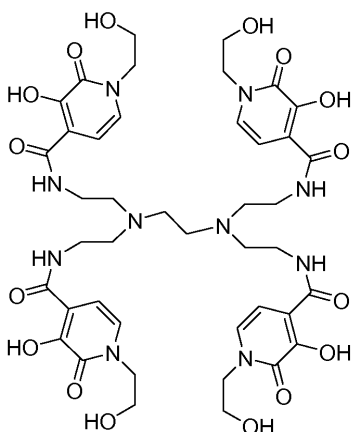
[0122]

[0123]

분명히, 링커 기  $R_L$ 은 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 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌, 및 부틸렌)로 치환될 수 있다.

[0124]

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



VI

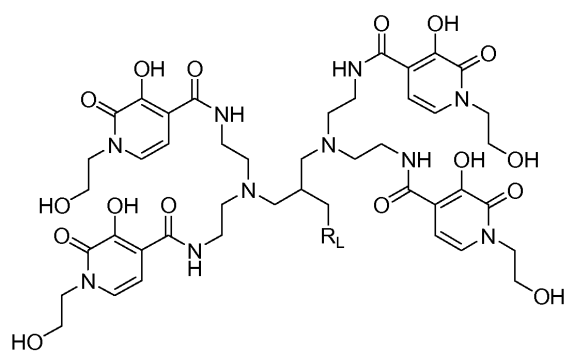
[0125]

[0126]

분명히, 에틸렌 모이어티들로서 화학식 VI에 나타난 알킬렌 기들 중 임의의 기는 다른 작은 알킬렌 기들, 예컨대 메틸렌, 프로필렌 또는 n-부틸렌으로 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. 마찬가지로, 본원에 고찰된 바와 같이, N-치환 기들은 본원에서 전반적으로 고찰된 임의의 다른 히드록시알킬 기로 치환될 수 있다.

[0127]

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



VI

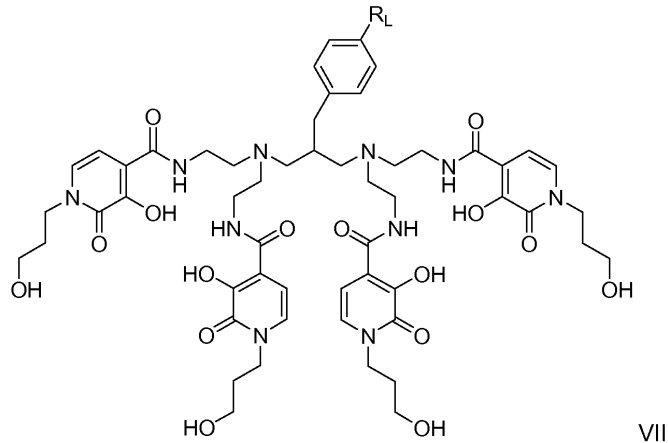
[0128]

[0129]

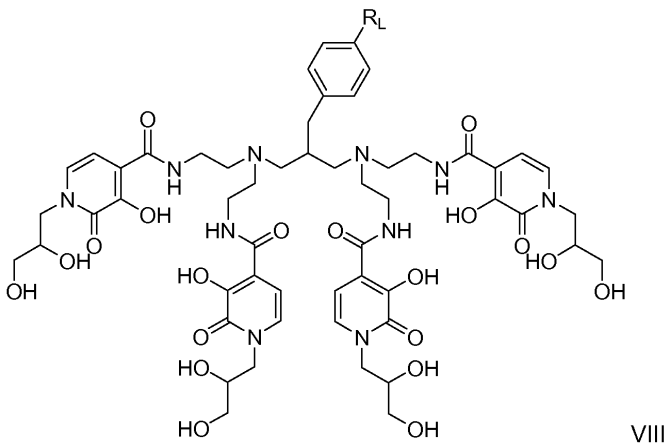
상기 식에서,  $R_L$ 은 특히 조직 표적 기에 부착하기 위한 임의의 적합한 연결 모이어티이다. 아민과 같은 활성 기에서 끝나는 C1 내지 C8 고리형, 분지쇄 또는 직쇄 방향족 또는 지방족 기와 같은 짧은 히드로카르빌 기는 화학식 VI에서 그리고 본원 전역에서  $R_L$  기로서 매우 적합하다.

[0130]

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



[0131]



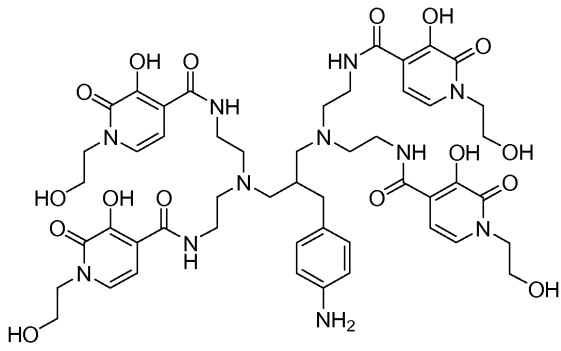
[0132]

[0133]

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.

[0134]

이러한 구현예에 따라, 결합 모이어티를 끝내는 작용화된 모이어티를 갖는 예시적인 화합물은 하기 구조 IX이다 (링커 페닐아민 기는 적절하게는 본원에 나타낸 임의의 다른  $R_L$  기로 분명히 치환될 수 있다):

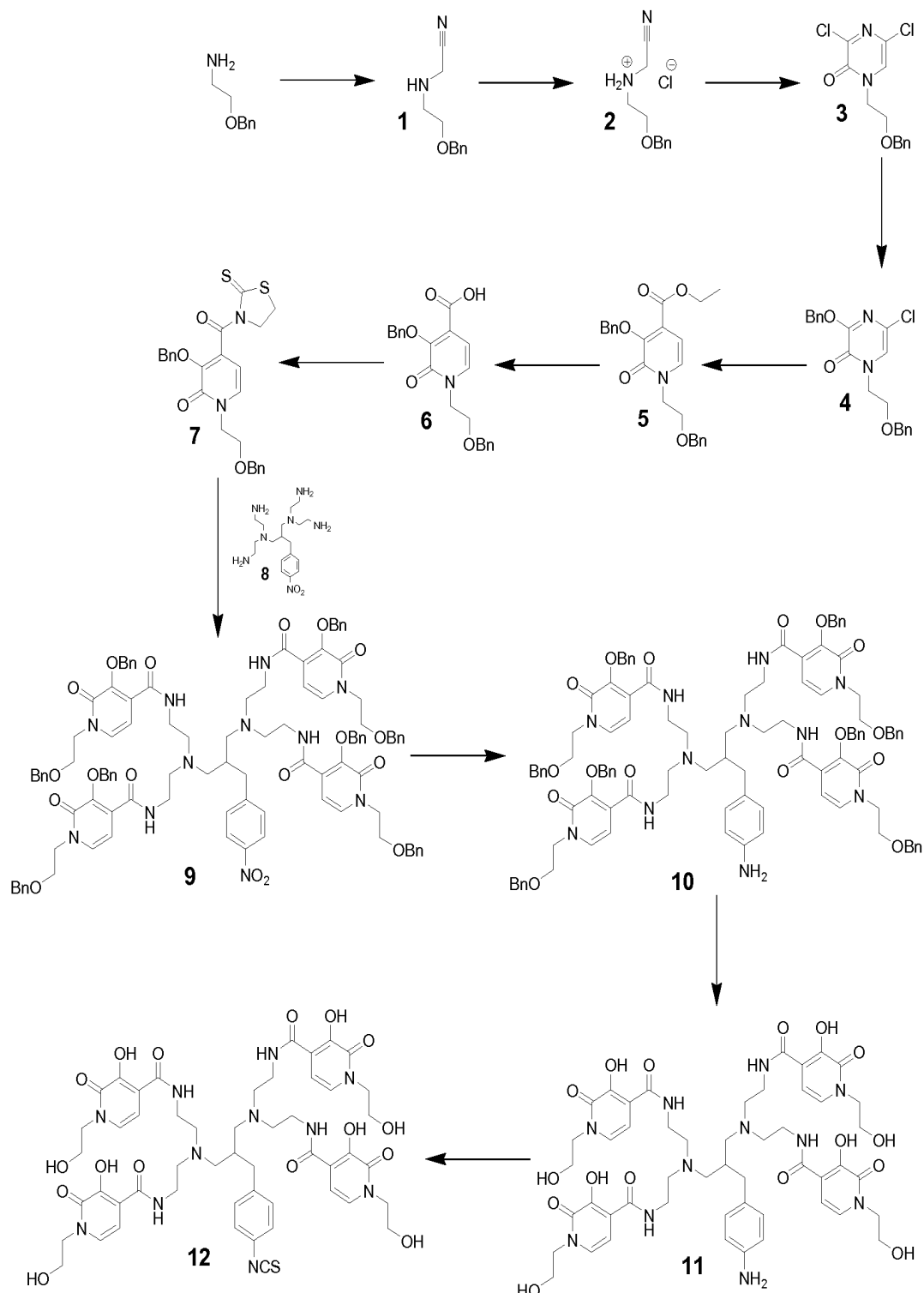


IX

[0135]

[0136]

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



[0137]

[0138]

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.

[0139]

본 발명의 복합체들의 형성 방법에서, 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 제약의 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.

[0140] 일 구현예에서, 상기 방법은(본원 전역에 기술된) 옥타덴테이트 히드록시피리디논-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.

[0141] 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, 아미드, 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. 일반적으로 이들 화합물은 실온 또는 주변 온도에서 액체가 아니고, 따라서 유기 용매가 아니다.

[0142] 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 아미드, 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 공지되어 있고, 이에 N-히드록시 말레이미드, 카르보디이미드 및/또는 아조디카르복실레이트 활성화제, 예컨대 DCC DIC DEAD DIAD 등을 포함하는 잘 알려진 활성화제를 이용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0143] 도 1: 공액되지 않은 mAb 및 1 또는 2 킬레이터 각각에 의해 공액된 mAb의 분포를 보여주는 질량 스펙트럼 AGC0715(위). 평균 킬레이터-대-항체 비율(CAR)은 대략적으로 0.3이다.

도 2a-b. CD33-양성 HL-60 세포들에 대한 유세포 분석에 의해 분석된 AGC0700 및 AGC0715의 결합. 항체들은 염소 항-인간 Fc를 사용하여 검출하였고, Alexa488 공액된 이차 항체 및 평균 형광 세기(MFI)는 일차 항체 농도에 대한 그래프가  $\mu\text{g/ml}$  단위로 작성하였다. AC0103(헤르셉틴)은 이소형-유사 대조군으로서 사용하였다. 상이한 킬레이터-대-항체(CAR) 비율에서 AGC0715는 공액되지 않은 AGC700(A)와 비교하였다. 대조 실험에서, AGC700은 기준 생쥐 항-인간 CD33 항체(B)인 50:50 혼합물과 혼합하였다.

도 3: AGC0715-Th-227(채워진 사각형) 및 AGC0703-Th-227(열린 사각형), 및 음성 대조군 트라스투주맵-AC0015-Th-227(삼각형)의 내재화.

도 4a 및 b: Th-227 라벨된 AGC0015 공액된 CD33-결합 mAb AGC0715(채워진 원), Th-227를 써서 표식된 AGC0015 공액된 대조군 mAb 트라스투주맵(채워진 사각형), 또는 배양 배지(채워진 다이아몬드)에 의해 배양된 HL-60 림프종 세포들. 두 mAbs는 동일한 특이적 활성화에 이르기까지 Th-227를 써서 표식하였고 3 nM(a) 또는 0.3 nM(b)으로 사용하였다.

도 5: HL-60 종양 포함 누드 생쥐들에서  $^{227}\text{Th}$ -AGC0715의 생체 분포. 데이터는 7 일 p.i.에 높은 종양 흡수를 보여준다( $23 \pm 0.7\%$  ID/g).

도 6: 280 nm(a) 및 335 nm(b)에서 AGC1115의 SEC-UV 크로마토그램. 평균 킬레이터-대-항체 비율(CAR)은 대략적으로 0.9이다.

도 7 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.

도 8: Th-227를 써서 표식된 AGC0015에 공액된 C22-결합 mAb AGC1115(채워진 원), Th-227를 써서 표식된 AGC0015에 공액된 대조군 mAb 트라스투주맙(채워진 사각형), 또는 배양 배지(채워진 다이아몬드)에 의해 배양된 Ramos 세포들. 두 mAbs는 동일한 특이적 활성( $44 \text{ kBq}/\mu\text{g}$ )에 이르기까지 Th-227를 써서 표식하였고,  $3 \text{ nM(A)}$ 에서 사용하였다.

도 9: 실시예 18의 생성물 15의 HPLC 분석. 출발 물질 11은 6.041 분에 도시하고, 목적하는 아마이드 생성물 15은 7.616 분에 도시하고, 디아실화된 부-생성물은 8.157 분에 도시된다.

도 10: FPLC-SEC, 크로마토그램 AGC0203,(도 10a), 및 AGC0215,(도 10b). 흡광도는  $280 \text{ nm}$ 에서 모니터링하였다. 피크 아래 전에 영역은  $166 \text{ mAU}^{\circ}\text{mL}$  및  $409 \text{ mAU}^{\circ}\text{mL}$  각각에 대해 결정하였다.

도 11: 크기 배제 크로마토그래피에 의해 분리된 AGC0200, AGC0203 및 AGC0215의 주된 단백질 분획의 다이오드 배열 흡광 분광 분석. 공액체 중의 킬레이터는 대략적으로  $335 \text{ nm}$ 에서 흡수하고, 단백질은 약  $280 \text{ nm}$ 에서 흡수된다.

도 12: AGC0200(12a), AGC0203(12b), 및 AGC0215(12c)의 제조의 MS 스펙트럼들.

본 발명은 이하 다음의 비제한적인 실시예에 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.

실시예들에서, 다음 리간드, 항체 및 항체 공액체는 다음과 같이 지칭된다:

AG0003 - 비교용 리간드(아래 구조 13)

AG0015 - 본 발명의 높은 용해성 리간드.

AG0700 - 실시예 5에서 생성된 항-CD33 항체

AG0715 - 높은-용해성 리간드(12)에 공액된 AG0700

AGC1100 - 실시예(13)에서 생성된 항-DC22 항체

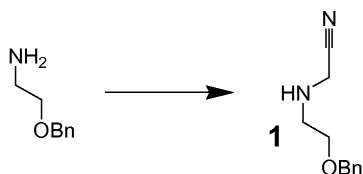
AGC1115 - 높은-용해성 리간드(12)에 공액된 AGC1100

### 실시예 1 - 순수한 토폴-227의 분리

토폴-227을 악티늄-227 암소로부터 분리한다. 악티늄-227을 라듐-227( $t_{1/2}=42.2 \text{ m}$ )의 악티늄-227로의 붕괴가 뒤따른 라듐-226의 열적 중성자 조사를 통해 생성하였다. 토폴-227을 양이온 교환 크로마토그래피에 의해  $8 \text{ M HNO}_3$  용액에 함유된 악티늄-227 붕괴 혼합물로부터 선택적으로 잔류시켰다.  $\text{AG}^{\circ} 1\text{-X8}$  수지( $200\text{-}400$  메쉬, 질산염 형태)  $70 \text{ mg}$ 을 함유하는  $2 \text{ mm}$  내부 직경,  $30 \text{ mm}$  길이의 컬럼을 사용하였다. 악티늄-227 다음에, 라듐-223 및 딸들을 상기 컬럼에서 용출시켰고, 토폴-227을  $12 \text{ M HCl}$ 에 의해 상기 컬럼에서 추출하였다. 토폴-227을 함유하는 용출물을 건조될 때까지 증발하였고, 잔기를  $0.01 \text{ M HCl}$ 에서 재현탁하였다.

### 실시예 2 - 화합물 IX의 합성

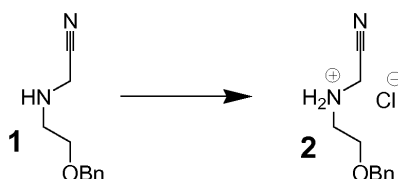
#### 단계 1



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

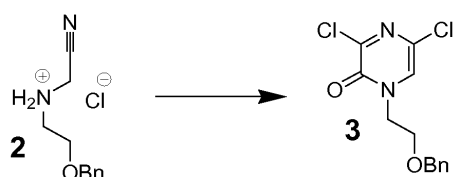
$^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz): 2.92(m, 2H), 3.58-3.62(m, 4H), 4.51(s, 2H), 7.25-7.37(m, 5H)

## 단계 2



**1**(24.7g, 130 mmol)을 무수 에테르에 용해하였다.  $\text{HCl(g)}$ 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.

## 단계 3

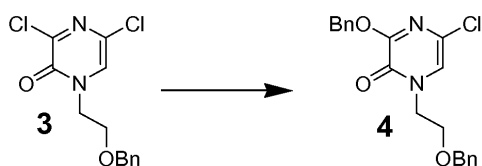


**2**(27.8g, 122.6 mmol)는 실온에서 230mL 클로로벤젠에 용해하였다. 100mL 클로로벤젠에 용해된 옥살릴 클로라이드(45mL, 530 mmol)를 실온에서 30분에 걸쳐 적가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 45시간 동안 교반하였다. 반응을 100mL 물의 적가에 의해 조심스럽게 급냉하였다. 상들을 분리하였고, 수성 상(aqueous phase)을 3\*100mL DCM으로 추출하였다. 유기 상들을 결합하고 100mL 염수로 세척하였다. 상기 유기 상을  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  상에서 건조하고, 여과하고, 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 조질 생성물을 DCM 중의 MeOH(0-2%)의 구배 (gradient)를 사용하여  $\text{SiO}_2$ 에 대한 건조 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하여, 원하는 생성물(21.2g, 70.8mmol)을 산출하였다.

$^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 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)

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

## 단계 4



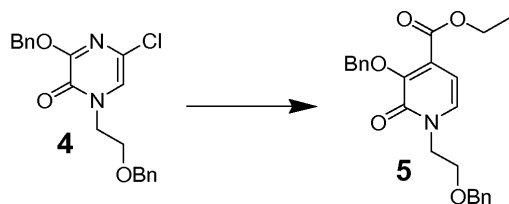
수소화 나트륨(60% 분산, 3.60g, 90mmol)을 0 °C에서 50mL THF 중에서 교반하였고, 벤질 알콜(8.3mL, 80mmol)을 10분에 걸쳐 적가하였다. 반응 혼합물을 100mL THF에 용해된 **3**(21.2g, 70.8mmol)이 0 °C에서 적가하기 전에 0 °C에서 30 분 동안 교반하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 밤새 암실에서 교반하였다. 반응 혼합물이 진공에서 환원되기 전에 디옥산(4M) 50mL HCl을 적가하였다. 500mL DCM을 첨가하였고, 이어서 200mL 물을 첨가하였다. 상기 상들을 분리하였고 수성 상을 200mL DCM으로 추출하였다. 유기 상들을 결합하고 100mL 염수로 세척하였다. 상기 유기 상들을  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  상에서 건조하고, 여과하고, 휘발물을 감압 하에 제거하였다. DCM 중의 MeOH(0-6%)의 구배를 사용하는  $\text{SiO}_2$ 에 대한 건조 플래쉬 크로마토그래피에 의해 원하는 생성물(25.6g, 69mmol)을 산출하였다.

$^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 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)

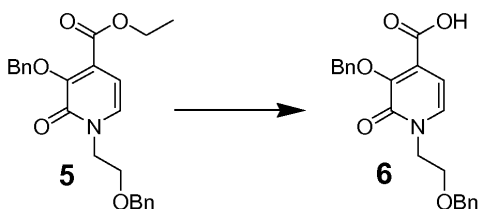
MS(ESI-pos, m/z): 371.1, 763.2

#### 단계 5



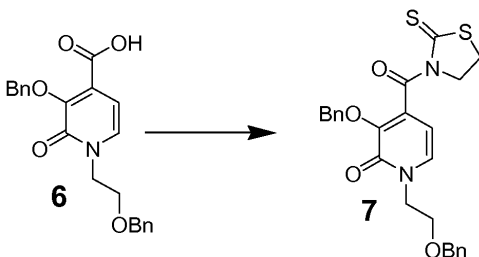
**4**(25.6g, 69 mmol) 및 에틸 프로피올레이트(41 mL, 0.4 mol)를 140 °C에서 5 시간 동안 가열하였다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각하였고 상기 반응 혼합물을 SiO<sub>2</sub>에 대한 건조 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하였다. DCM 중의 MeOH(0-10%)의 구배에 의하여 **5**-이성질체와 함께 원하는 **4**-이성질체의 분리될 수 없는 혼합물로서 원하는 생성물을 산출하였다. 이러한 혼합물(28.6g, ~65 mmol)을 추가의 정제 없이 다음 단계에서 직접적으로 사용하였다.

#### 단계 6



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)이 첨가하였고 상기 수성 상을 3\*250mL CHCl<sub>3</sub>로 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.

#### 단계 7

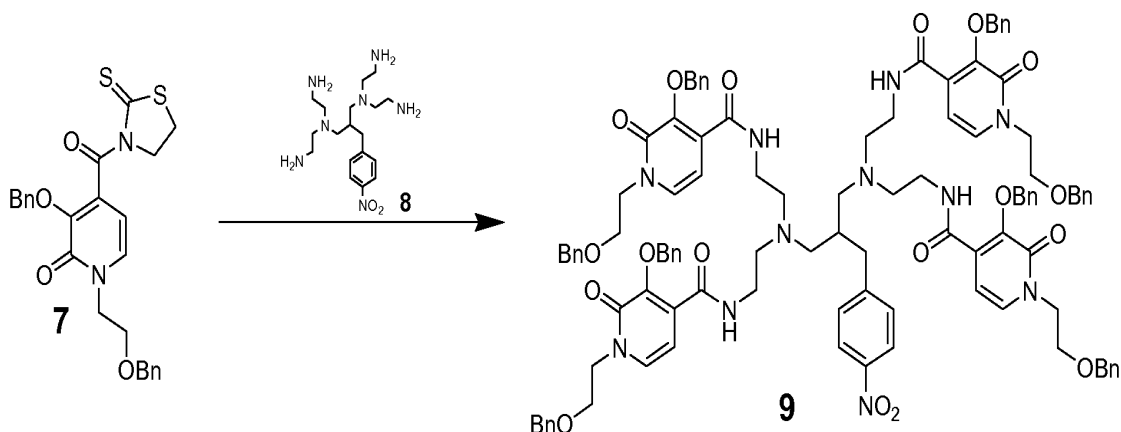


이전 단계에서 수득된 **6**(25.9g, ~64mmol)을 400mL DCM에 부분적으로 용해하였다. 2-티아졸린-2-티올(8.94g, 75mmol) 및 DMAP(0.86g, 7mmol)을 첨가하였고, 이어서 DCC(15.48g, 75mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 상기 반응 혼합물을 셀라이트-패드를 통해 여과하였고 상기 셀라이트-패드를 100mL DCM으로 세척하였다. 휘발물을 진공에서 제거하였다. 상기 생성물 혼합물을 먼저 헵탄 중의 DCM(50-100%)의 구배, 이어서 DCM 중의 THF(0-15%)의 구배를 사용하여 SiO<sub>2</sub>에 대한 건조 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 적절한 분획들은 진공에서 환원되어, 생성물들의 혼합물을 제공하였다. 이러한 불순한 혼합물은 헵탄 중의 EtOAc(25-75%)의 구배를 사용하여 SiO<sub>2</sub>에 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.

$^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz): 2.90(t,  $J=7.3\text{Hz}$ , 2H), 3.77-3.84(m, 2H), 4.18-4.23(m, 2H), 4.35(t,  $J=7.3\text{Hz}$ , 2H), 4.51(s, 2H), 5.33(s, 2H), 6.11(d, 7.0Hz, 1H), 7.21-7.48(m, 11H)

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

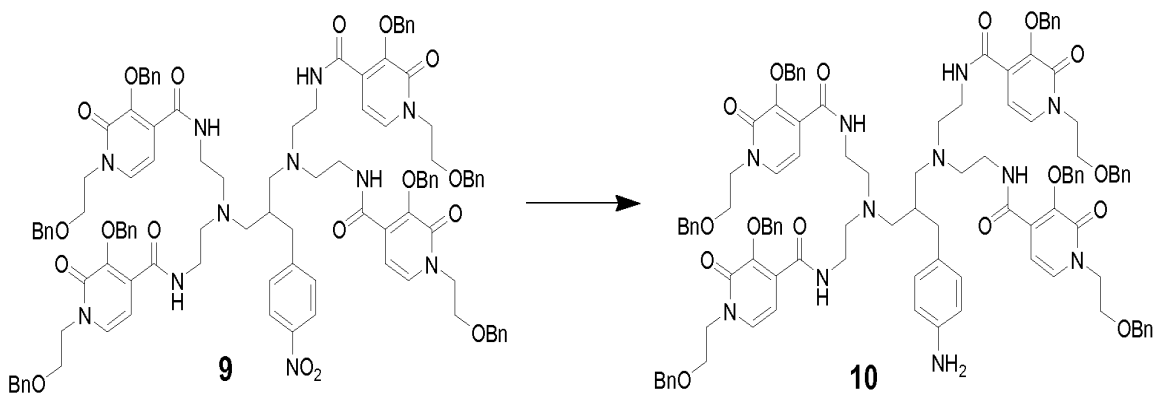
#### 단계 8



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  $\text{SiO}_2$ 에 대한 건조 플래쉬 크로마토그래피에 의한 정제는 원하는 생성물(3.93g, 2.15mmol)을 제공하였다.

$^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 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,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 7.13(d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 7.16-7.38(m, 42H), 7.82-7.93(m, 6H)

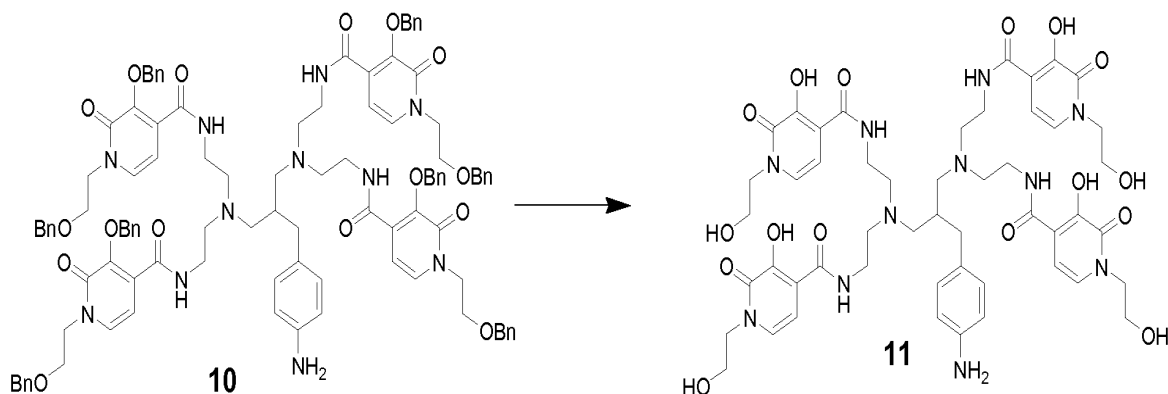
#### 단계 9



9(3.93g, 2.15mmol)를 실온에서 300mL EtOH에 용해하였다. 60mL 물을 첨가하였고, 이어서  $\text{NH}_4\text{Cl}$ (5.94g, 32.3mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물은 철 분말(1.80g, 32.3mmol)이 첨가되기 전에 60  $^{\circ}\text{C}$ 로 하였다. 상기 반응 혼합물을 60  $^{\circ}\text{C}$ 에서 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,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  위에서 건조하고, 여과하고, 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 생성물 혼합물을 DCM 중의 MeOH(0-7%)의 구배를 사용하여  $\text{SiO}_2$ 에 대한 건조 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제되어 원하는 생성물(3.52g, 1.96mmol)을 산출하였다.

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

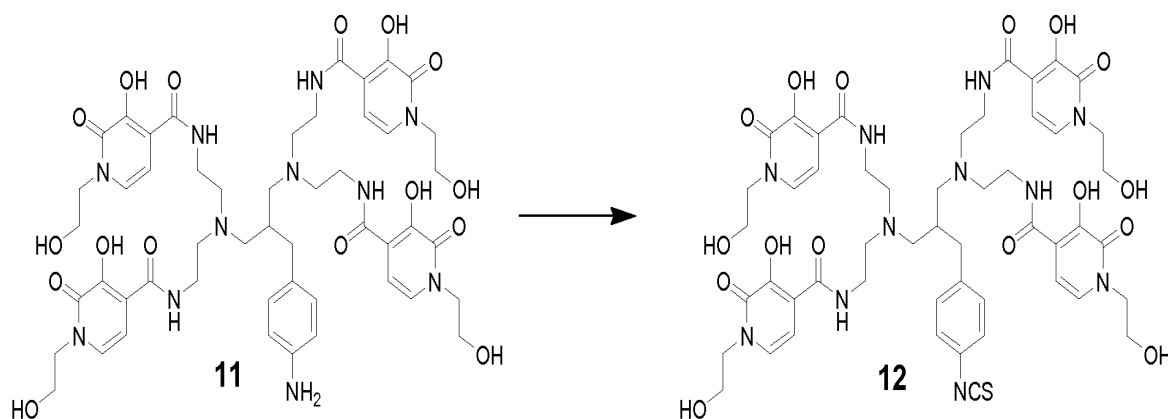
# 단계 10



10(1.00g, 0.56mmol), Pd(OH)<sub>2</sub>/C(펠먼의 촉매, 1.00g) 및 10mL AcOH를 압력 반응기에 넣었다. 반응기를 물 흡입기에 의해 비웠고 H<sub>2</sub>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<sub>2</sub>는 일단 다시 유입시켰다(7 바(bar)). 7일 동안 교반 후, HPLC는 완전한 전환을 나타냈다. 반응 혼합물을 여과하고 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 잔류물을 MeOH/MeCN(1:1)에 용해하였고 생성물을 Et<sub>2</sub>O의 첨가에 의해 침전시켰다. 고형물을 원심 분리기에 의해서 그리고 생성물이 진공에서 건조되기 전에 상청액을 따라냄으로써 수집하였다(484mg, 0.45mmol).

<sup>1</sup>H-NMR(D<sub>2</sub>O, 400MHz): 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=7.0Hz, 4H), 7.44(d, J=8.2Hz, 2H), 7.57(d, J=8.2Hz, 2H) MS(ESI-pos, m/z): 1076.4

# 단계 11



화합물 11(20mg, 18 μ몰)을 3mL MeCN 및 3mL 물에 용해하였다. 20 μL 티오포스젠을 첨가하였다. 반응 혼합물을 1 시간 동안 엄격하게 교반하였다. 휘발물을 감압 하에 제거하였고 잔류물을 4mL MeCN에 용해하였다. 생성물은 아세토니트릴 상을 40mL Et<sub>2</sub>O에 첨가함으로써 침전시켰다. 고형물은 원심 분리에 의해서 및 생성물이 진공에서 건조되기 전에 상청액을 따라냄으로써 수집하였다(10mg, 9 μ몰).

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

## 실시예 3 - 공액

1.0 mL 0.9 % NaCl 용액(9.5 mg/mL) 중의 여과된 트라스투주맙(trastuzumab), 및 5 -35 μL 금속 없는 물(10 mg/mL) 중의 신규 킬레이터(화학식 IX)를 1.0 mL 멸균 여과된 붕사 완충액(70 mM, pH 9)에 첨가하였다. 반응 혼합물을 37 °C에서 밤새 조심스럽게 교반하였고, 수득된 공액체를 Amicon Ultra-4(30k MWC) 원심 분리 필터 유

닛을 사용하여 0.9 % NaCl 용액에서 정제하고 농축하였다. 성공적인 공액은 LC/MS 분석에 의해 확인되었다.

#### 실시예 4 - 킬레이트화

50  $\mu$ L 0.9 % NaCl(5 g/L) 중의 실시예 3의 공액체를 100  $\mu$ L 아세트산 나트륨 완충액(0.5 M, pH 5.5)에 첨가하였고, 이어서  $^{227}\text{Th}$ -용액(1 ~4  $\mu$ L 0.05 M HCl 중의 대략적으로 0.5-1 MBq)을 첨가하였다. 반응을 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 시간 동안 또는 실온에서(대략적으로 20  $^{\circ}\text{C}$ ) 15 분 동안 조심스러운 혼합 하에 시행하였고, 수득된 생성물을 용출 완충액으로서 아세트산 나트륨 완충액을 사용하여 NAP-5 컬럼에서 정제하였다. 잔류된 자유 방사성 금속을 함유하는 사용한 컬럼 및 표식된 단백질을 함유하는 용출된 분획들을 생성물의 반응 수율 및 특정 활성을 측정하기 위해 HPGe-검출기 GEM(15)에서 측정하였다(표 1).

표 1 : 요약, 킬레이트화 반응들

| 반응 조건                        | 방사성 화학적 수율 (%) |
|------------------------------|----------------|
| 37 $^{\circ}\text{C}$ , 1시간  | 96             |
| 37 $^{\circ}\text{C}$ , 1시간  | 93             |
| 20 $^{\circ}\text{C}$ , 15 분 | 95             |
| 20 $^{\circ}\text{C}$ , 15 분 | 95             |

#### 실시예 5: 항-CD33 모노클로날 항체(AGC0700)의 발생.

(1)에 기술되고 (2)에 공표된 모노클로날 항체(mAb) HuM195의 서열은 AGC0700의 생성을 위한 템플레이트(template)의 역할을 하였다. C-말단 라이신(Lys)을 인코딩하는 코돈을 IgG1 중쇄 유전자에서 누락하였다. 수득된 단백질은 전체 길이 유전자들로부터 생성되었을 때 항체 내에 존재하는 3개의 변종들 중의 하나이고, 라이신을 갖는 나머지 2개의 변종들은 각각 중쇄들 중의 하나 또는 모두에 부착되어 있다. 이러한 Lys-잔류물을 제거함으로써 실시예 6에 약술된 항체에 대한 공액체의 비율(CAR)이 더 정확하게 측정될 수 있을 것으로 예상된다. AGC0700의 완전한 아미노산 서열의 개요는 표 2에 나와 있다.

AGC0700을 인코딩하는 유전자들을 표준 분자 생물학 기법들을 사용하여 생성하였다. 간단히, 각각의 사슬의 아미노산 서열은 Vector NTI® 소프트웨어를 사용하여 DNA 서열 내로 역-번역하였다(Invitrogen/Life-Technologies Ltd., Paisley, United Kingdom). 최적화된 DNA 서열은 포유동물 발현을 위해 최적화하고 GeneArt에 의해 합성된 코돈이었다(GeneArt/ Life-Technologies Ltd., Paisley, United Kingdom). VH- 및 VL-도메인들을 Cobra Biologies에 의해 발현 벡터 내로의 엔도뉴클레아제 제한 소화를 통해 서브-클론화하였다

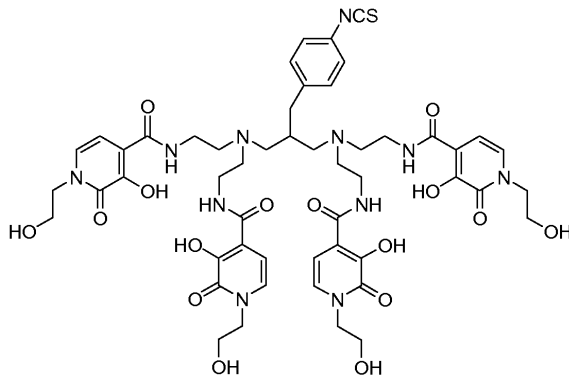
(Södertälje, Sweden). 중국 햄스터 난소 현탁(CHO-S) 세포들을 AGC0700의 VH- 및 VL-도메인들을 인코딩하는 플라스미드에 의해 안정적으로 형질감염하였고, 푸로마이신(12.5 mg/l; Sigma Aldrich)이 보충된 표준 CD-CHO 배지(Invitrogen/Life-Technologies Ltd., Paisley, United Kingdom)가 있는 데에서 성장시켰다. AGC0700을 발현하는 안정적인 클론들은 25 세대에 걸쳐 희석을 제한함으로써 선택되었다. 클론 안정성은 상청액의 단백질 역가를 측정함으로써 평가하였다. 가장 안정적인 클론의 세포 은행이 설립되었고 냉동-보관되었다. mAb의 발현은 일회용 생체 반응기 내에서 대략 14일 동안 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 시행되었다. 모노클로날 항체를 상청액의 여과 후에 수확하였다. AGC0700을 단백질 A 친화도 크로마토그래피(MabSelect SuRe, Atoll, Weingarten/Germany)에 의해, 이어서 이온 교환 단계에 의해 추가로 정제한다. 정전기 및 소수성에 기초한 제3 정제 단계는 생산으로부터 응집물 및 불순물을 추가로 제거하기 위해 사용된다. AGC0700의 정체성은 등전점 전기영동 및 SDS-PAGE 분석에 의해 확인될 것이다. 샘플 순도는 크기-배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 추가로 분석될 것이다.

표 2. AGC0700의 아미노산 서열.

|  |   |
|--|---|
| 단편 가변 V <sub>H</sub><br>도메인<br>(서열 ID 1) | QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIYPYNG<br>GTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPAMDYWGQGTLLV<br>TVSS   |
| 단편 가변 V <sub>L</sub><br>도메인<br>(서열 ID 2) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAAS<br>NQGSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPDDEFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIK  |
| 완전 V <sub>H</sub><br>도메인<br>(서열 ID 3)    | QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIYPYNG<br>GTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPAMDYWGQGTLLV<br>TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT<br>FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT<br>CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG<br>VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS<br>KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGGQPENNYK<br>TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPG |
| 완전 V <sub>L</sub><br>도메인<br>(서열 ID 4)    | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAAS<br>NQGSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPDDEFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIKR<br>TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT<br>EQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  |

실시예 6: AGC0700의 킬레이터 AGC0015와의 공액.

노출된 항체 AGC0700은 수용성 킬레이터 AGC0015(12)와 공액하였다(결합하였다). AGC0015를 금속 없는 용액에서 조제하였다. 킬레이터(12)는 아래에 제시된다:



12

반응을 8.5의 pH에서 70 mM 붕산염 완충액과 혼합된 PBS의 1:1(v/v) 혼합물에서 시행하였다. 1.3:1의 항체에 대한 공칭 물 킬레이터 비율이 사용되었고, 상기 반응을 21 °C에서 20 시간 동안 배양하였다. 반응 시간의 종료 시에, 항체들을 HiLoad Superdex 200 16/600 PG 컬럼(GE Healthcare; part.no. 29-9893-35) 및 이동상으로서 pH 6.0의 50mM 히스티딘 완충액을 사용하여 AEKTA 정화기(Amersham)에서 크기 배제 크로마토그래피에 의해 유리 킬레이터로부터 분리하였다. 정제된 공액체들의 최종 킬레이터-항체-비율(CAR)을 크기 배제 크로마토그래피-질량 분석계(SEC-MS) 분석에 의해 측정하였다. 샘플들을 LC-MS 분석 전에 재조합 EndoS(IgGZERO, Genovis, Sweden)을 사용하여 효소적으로 탈글리코실화하였다. 간단히, 크로마토그래피는 Acquity UPLC 시스템(Waters)에서 행해졌고 컬럼은 실온에서 유지된 2.0 x 300 mm, 4 μm 입자들의 TSK Gel Super SW 3000(부품 번호.21485)이었다. 이동 상(mobile phase)은 다음과 같다: 수중 50% 아세토니트릴, 0.1 %(v/v) 트리플루오로아세트산(등용매 용출). 주입 부피는 15 μL까지였고 LC 유동률은 온전한 공액체 및 환원된 공액체, 각각에 대해 75 μL/분 또는

50  $\mu$ l/분이었다. 전체 SEC 실행 시간은 16 분이였다. Xevo QTOF 질량 분광계(Waters)에는 전기 분무 이온화(ESI) 소스를 장착하였다. 상기 이온 소스는 양성 이온 모드로 작동하였고 스캔 범위는 2000-4000 Da였다. 다중 하전된 이온들을 Maximum Entropy 소프트웨어를 사용함으로써 단일 하전된 종들로 변환하였다. 질량 분광계는 주어진 질량 범위 내의 요오드화 나트륨에 의해 이전에 검정하였다. 온전한 공액체는 하나의 피크에 모든 공액체 종들(킬레이터들 0-n)을 함유하는 SEC-MS 크로마토그램을 제공하였다. CAR-결정의 대표적인 결과는 도 1에 제시되어 있다. 노출된 mAb(킬레이터 없음), 하나의 킬레이터를 함유하는 공액체, 및 2개의 킬레이터를 함유하는 공액체에 상응하는 m/z 신호를 식별하였다. 환원된 탈글리코실화된 공액체를 어떠한 킬레이터도 없거나, 1개 또는 2개의 킬레이터가 부착된 중쇄 및 경쇄에 상응하는 피크들로 분리하였다.

#### 실시예 7: Th-227에 의한 항체-킬레이터 공액체 AGC0715의 킬레이트화.

4+ 이온으로서 토폴-227을 악티늄-227 발생기 시스템으로부터 분리하였다. 간단히, Th-227을 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 8M HN03 중의 Ac-227 붕괴 혼합물에서 선택적으로 잔류시켰다(음으로 하전된 질산염 복합체들은 <sup>227</sup>Th4+에 의해 형성된다). Ac-227, Ra-223 및 딸들을 컬럼으로부터 세척한 후, Th-227은 12M HCl을 사용하여 용출시켰다. Th-227 용출물은 건조되기까지 증발시켰고, 잔류물은 0.5M HCl에 용해하였다.

항체-공액체 AGC0715는 1 MBq의 Th-227/0.5 mg의 항체의 존재 하에 37 °C에서 pH 6.0의 히스티딘 완충액에서 1 시간 동안 배양하였다. 방사선을 써서 표식된 항체-공액체들을 함유하는 고분자 분획이 NAP-5 DNA Grade 컬럼들을 사용하는 크기 배제 크로마토그래피에 의해 유리 Th-227 및 딸 핵종으로부터 분리하였다(GE Healthcare). 표식 효율은 NAP-5 탈염 단계에서 잠재적 손실을 포함하여 통상적으로 96-98%였다.

#### 실시예 8: 유동 세포 계측법에 의한 CD33-양성 세포들에 대한 AGC0700 및 AGC0715의 결합 연구.

CD33-양성 HL-60 세포들에 대한 결합을 유동 세포 계측법에 의해 연구하였다. 그래프로 작성한 곡선에 기초한 EC<sub>50</sub>의 결정은 친화도에 대한 대략적인 값을 제공한다. 상업적으로 구입할 수 있는 생쥐 항인간 CD33(BD Pharmingen; #555450, 1 mg/mL)을 분석되어야 할 mAb와 50:50 혼합물에 의한 셋업을 포함하여 친화도의 평가를 위해 기준 항체로서 사용하였다. 이러한 분석은 또한 표적 결합 친화도가 킬레이터에 의한 공액에 의해 부정적인 영향을 받았음을 확인하기 위해 사용되었다.

HL-60 세포들을 20%의 소(bovine) 태아 혈청 및 페니실린/스트렙토마이신의 존재하에 Iscove의 수정된 둘베코 배지(IMDM; Invitrogen; #12440-046)에서 성장시켰다. 대략적으로 20 mL의 세포 배양액을 300 g으로 4 °C에서 5분 동안 원심 분리에 의해 수확하였다. 세포들을 10 mL PBS에서 재현탁하였고, 1%의 소 태아 혈청(FBS)으로 보충하였고, 300 g으로 4 °C에서 5분 동안 원심 분리에 의해 펠렛화하였다. 순차적으로, 재현탁된 세포들의 20  $\mu$ L의 제제를 Coulter Isoton II 희석제 중에서 1:500으로 희석하였고, Beckman Coulter Z2 도구(Beckman Coulter; CA, USA)를 사용하여 계수하였다. 이 제제를 3-4 x 10<sup>6</sup> 세포들/mL의 세포 밀도로 조절하였고, 100  $\mu$ L를 둥근 바닥 또는 V-자형 바닥 96-웰 플레이트(Nunc/Fisher Scientific; NH, USA) 내의 각각의 웰로 옮겼다. 세포들을 스핀 다운하고, 기울여 따른 후 재현탁하였고, 이는 결과로 웰(well) 당 50  $\mu$ L 세포 현탁의 대략적 부피를 초래하였다.

분석되어야 할 mAb 또는 공액체를 저장 완충액을 PBS로 이동시킴으로써 냉동 스톱으로부터 신선하게 조제하였고, 4°C에서 유지하였고, 조제 후 며칠 내에 사용하였다. F(ab)<sub>2</sub>' Alexa488 공액된 염소 항-인간 IgG Fc(Jackson Immuno Research; # 109-546-170)을 인간 mAb의 검출을 위한 이차 항체 시약으로서 사용하였다. 이차 항체 시약을 PBS에서 0.015 mg/mL로 조제하였고, 0.1 % BSA에 의해 보충하였다. mAb 스톱을 5 mg/mL로 시작하여 10-배 희석 단계에서 희석하였다. 이소형 대조군 mAb(트라스투주맵)을 그에 따라 조제하였다. 항-인간 CD33 mAb의 희석 단계로부터 20  $\mu$ L를 HL-60 세포들을 함유하는 웰들에 첨가하였다. 4 °C에서 1시간 동안 배양 후 상기 세포들을 스핀 다운하였고, 200  $\mu$ L의 차가운 PBS로 3회 세척하였고, 0.1% BSA로 보충하였다. 4% 염소 혈청을 함유하는 용액을 차단제로서 첨가하였고, 15 분 동안 배양하였다. 이차 항체 시약의 20  $\mu$ L를 암실에서 4 °C에서 30분 동안 배양하기 전에 순차로 각각의 웰에 첨가하였다.

상기한 바와 같이, 세포들은 2회 세척하였고, 200  $\mu$ L PBS에서 재현탁하였고, 0.1 % BSA로 보충하였다. 모든 샘플은 96-웰 둥근 바닥 또는 원주형 바닥 플레이트에서 분석하였다. 형광 신호들을 Beckman Coulter 세포 실험실 Quant SC 유동 세포 계측기(Beckman Coulter; CA, USA)로 기록하였다. 중간 값들을 Excel 그래프 시트로 내보내고, 농도에 대한 그래프를 작성하였다. 데이터를 GraphPadPrism에서 "단일-부위 특이적" 결합 모델(PrismSoftware; CA, USA)(도 2A-B)을 사용하여 피팅하였다.

이차 항체를 갖지만 어떠한 일차 항체도 갖지 않는 음성 대조군은 대략적으로 5의 평균 형광 세기(MFI) 값들(높은 양성 값들의 1-2%)의 낮은 수준(low background)을 나타냈다.

공액체 AGC0715의 결합 친화도는 공액되지 않은 AGC0700와 비슷하였다. 따라서, 공액은 감소된 결합 친화도(도 2a)를 초래하지 않았다. 시판중인 생쥐 항-인간 CD33 기준 mAb는 2개의 항체들의 50:50 혼합물에서 AGC0700보다 더 낮은 친화도로 결합하고, 약 0.7배 적은 항체 결합을 초래하였다(도 2b).

#### 실시예 9: AGC0715의 내재화.

외부 세포 막에 부착 후 방사선 면역 공액체의 내재화 정도는 세포 사멸 효능을 결정하는 하나의 인자이다. 방사선 면역 공액체 AGC0715-Th-227 및 음성 대조군 트라스투주맵-AC0015-Th-227의 HL-60 세포들 내로의 내재화가 연구되었다.

공액된 mAbs를 약 20 Bq/ug의 특이적 활성까지 실시예 5에 기술된 절차에 따라 병렬로 표식하였다. 500  $\mu$ L 성장 배지(20 %의 소 태아 혈청 및 페니실린/스트렙토마이신으로 보충된 Iscove의 수정된 둘베코 배지(IMDM; Invitrogen; #12440-046)) 중의 200,000개 세포들을 함유하는 웰들을 12 kBq에 상응하는 동일한 양의 방사선 면역 공액체에 첨가하였다.

세포들의 샘플들을 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 0, 30, 60, 120, 및 240 분의 배양 후에 수확하였다. 수확 후 상기 세포들을 pH 2.5의 글리신, 0.9% NaCl로 세척하여 막 결합(membrane bound)된 항체-공액체들을 제거하였다. 유동 세포 계측법에 의한 분석은 어떠한 막 결합된 항체도 2-4 분의 산 세척 후에 남아있지 않다는 것을 나타냈다. 내재화는 감마 카운터(Wizard)의 세포 펠렛들 상에서 60 초 동안 측정하였고, 분당 측정된 수들을 시간에 대하여 표시하였다(도 3).

#### 실시예 10: AGC0715-Th-227에 의해 Th-227-유도된 세포의 세포 독성.

시험관 내 세포의 세포 독성을 CD33 양성 HL-60 세포들에서 연구조사하였다. AGC0715 및 대조군 트라스투주맵에 공액된 AGC0015를 44 kBq/ $\mu$ g의 특정 친화도까지 Th-227을 킬레이트화하기 위해 사용하였다. HL-60 세포들을 5 % CO<sub>2</sub>와 함께 37°C에서 성장시켰고 일주일에 3회 1:5로 분할하였다. 분석 전날 배양 배지(20 % FBS 및 1 % 페니실린/스트렙토마이신을 갖는 Iscove의 수정된 둘베코 배지(IMDM))를 새로운 배지로 대체하였고 부피를 400,000개 세포/mL을 제공하도록 조절하였다.

약 1,600,000개 세포(4 mL)를 6 웰 플레이트 내의 각각의 웰에 첨가하였다. 상기 플레이트를 표식된 mAb, 또는 배양 배지의 첨가를 위해 다음날까지 배양하였다. 라벨된 mAb, 또는 배양 배지를 첨가한 후, 상기 플레이트를 추가로 4 시간 동안 배양하였다. 하나의 실험에서, AGC0715 또는 트라스투주맵-AGC0015를 3 nM의 최종 농도까지 각각의 웰에 첨가하였다. 또 다른 실험에서, 최종 농도는 0.3 nM이었다.

배양 후, 세포들을 배양 배지에서 2회 세척하였고, 상청액 및 펠렛 중의 ATP를 측정하였다. 이어서, 세포들을 1:2로 분할하였고 배양 배지에서 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>와 함께 배양하였다. 동일한, 그러나 단 1회 세척의, 절차가 제2, 4, 및 7일에 반복되었다. ATP의 정량화(quantification)는 상이한 샘플 시간에 세포 생존률의 척도로서 사용하였고(Promega로부터 CellTiter-Glo Luminescent 세포 생존률 분석), 결과로 도 4a 및 b에 도시된 성장 곡선을 초래하였다.

HL-60 종양 세포 결합 AGC0715-Th-227은 결과로 세포 독성을 초래하였고, 트라스투주맵 작제물과 대조적으로, HL60 세포들에 결합하지 않았다. 배양 배지 대조군에서 4 일 내지 7 일의 생존률의 손실은 배지 교체 간의 너무 긴 간격으로 인한 것으로 생각된다.

#### 실시예 11 : 인간 이중 이식 모델에서 AGC0715에 의한 효과적인 종양 표적.

암컷 NMRI 누드 생쥐들은 인간 HL-60 종양 세포주에서 세포들로 이중 이식하였다. HL-60 세포들은 급성 전골수구성 백혈병인 환자에서 유도되고, Sutherland 등(3)에 따라 CD33을 발현한다. 이러한 세포주는 누드 생쥐들(4) 내로 피하로 접종되었을 때 발암성인 것으로 입증되었다. 54 마리의 암컷 NMRI 누드 생쥐들(Taconic, Europe)이 연구에 사용되었다.

동물들은 연구에 들어가기 전에 적어도 5일의 순화 기간을 거칠 수 있게 하였고, 종양 접종 전 4주령이었다. 생쥐들은 연구 시작 시에 대략 20 그램의 근사 체중을 가졌다. 동물들은 HEPA 여과된 공기를 갖는 별개의 환기된 우리(IVC, Scanbur)에 가두어 지내게 했고, 1 mM(pH 3.0)의 물 농도까지 HCl의 첨가에 의해 산화된 "쥐 및 생쥐

nr.3 사육" 식이(Scanbur BK) 및 물에 임의로 접근시켰다. HL-60 세포들(ATCC/United Kingdom; Catalog Number CCL-240)를 IMDM(Invitrogen; #12440-046)에서 20 % FCS 및 페니실린/스트렙토마이신의 존재 하에 피하 접종을 위해 성장시키고 준비하였다. 스톡들(stocks)을 계대 접종 번호 4(P4)에서 조제하였고 5% DMSO를 함유하는 배양 배지 내의 3x10<sup>7</sup> 세포/바이알로 액체 질소 내의 저장을 위해 동결하였다.

접종일에, 세포들을 37℃ 수조에서(대략적으로 2분) 급속히 해동하였고, 세척하였고 2% FCS로 보충된 PBS에서 재현탁하였다(1200 rpm으로 10 분 동안 원심 분리). 세포는 세포가 투약 주사기 내로 흡기되기 전에 매번 철저히 혼합하였다. 0.1 mL의 세포 현탁액의 부피를 미세 구멍 바늘(25G)을 사용하여 등에 피하 주입하는 한편 동물들은 광-가스 마취(N<sub>2</sub>O)하였다. 동물들을 그들의 우리로 귀환시켰고 종양들을 15일 동안 성장시켰다. 시험 물품(0.1 mL)의 투약은 꼬리 정맥(tail vein)을 통해 정맥 내 볼러스(bolus) 주입으로서 시행하였다.

동물들을 종양 성장시킨지 21일 후에 3개의 군들(n=6)로 무작위로 배정하였고, 15 kBq/동물의 투여량으로 시험 화합물 <sup>227</sup>Th-AGC0715를 주입하였다. 동물들은 주입 후 소정의 시점에서 안락사시켰고, 혈액, 근육, 대퇴골, 신장, 폐, 간, 위, 소장, 대장 및 종양을 수집하였다. 조직들 및 혈액 샘플들을 칭량하고, 각각의 샘플에서 방사능을 감마 분광기(HPGe15p 또는 HPGe50p 게르마늄 검출기)를 사용하여 측정하였다.

측정된 방사능(Bq)을 10% 주입 표준 샘플에서 측정된 방사능과 연관짓고, Th-227 및 Ra-223의 백분율을 산출하고 %ID로서, 또는 조직의 그램당 %ID로서 제시하였다. 2마리의 동물은, 회고 분석이 종양 흡수와 종양 크기 사이의 역전 관계를 보여주듯이(데이터는 도시되지 않음), 그룹의 나머지에 비해 종양이 크기 때문에 분석에서 배제하였다. 데이터는 AGC0715-Th-227의 특이적 종양 흡수를 확인한다. 이전의 연구들은 혈관 누출로 인해 종양 내의 mAb의 비특이적 잔류가 시간이 지남에 따라 세척되어 없어지고, 제7일에는 몇몇 %ID/g를 넘지 않는다는 것(데이터는 도시되지 않음)을 보여주었다.

생체 분포 연구의 결과는 도 5에 나와 있다. 데이터는 예상되는 종양 표적을 나타낸다. 방사능의 증가는 종양에서 보였지만, 어떠한 정상 조직 내에도 존재하지 않았다.

#### 실시예 12: 이종 이식된 생쥐들에서 AGC0715-Th-227의 생체 내 효능.

암컷 NMRI 누드 생쥐의 세포 제제 및 이종 이식은 실시예 9에 기술된 바와 같이 시행하였다. 그 동물은 연구에 들어가기 전에 적어도 5일의 순화 기간을 거칠 수 있게 하고, 종양 접종 전 4주령이었다. 생쥐들은 연구 시작 시에 대략 20 그램의 근사 체중을 갖는다. 동물은 HEPA 여과된 공기를 갖는 별개의 환기된 우리(IVC, Scanbur)에 가두어 지내게 하였고, 1 mM(pH 3.0)의 물 농도까지 HCl의 첨가에 의해 산화된 "쥐 및 생쥐 nr.3 사육(breeding)" 식이(Scanbur BK) 및 물에 임의로 접근시켰다. 생쥐는 75-150 mm<sup>3</sup> 범위의 종양의 평균 크기를 갖도록 투여 전에 약 10일 동안 종양 세포들로 접종될 것이다. 동물은 4개의 치료군들 및 3개의 대조군들(n=10/군)로 무작위로 배정하였다.

치료군의 생쥐에게 250, 500, 750 또는 1000 kBq/kg 체중(b.w.)을 달성하도록 75 kBq/mL, 150 kBq/mL, 225 kBq/mL 또는 300 kBq/mL AGC0715-Th-227을 함유하는 100 µL를 꼬리 정맥 내로 주입하였다. 대조군의 생쥐에게는 비히클 단독(완충액), 비-방사성 항체(AGC0715) 또는 트라스투주맙-Th-227를 투여하고, 500 kBq/kg(이소형 대조군)의 특이적 활성화에 맞추어 표식하였다.

종양들의 외관은 주의깊게 모니터링될 것이고, 상기 종양들은 하기 반응식에 따라 1주일에 3회 점수를 매기거나(측정되기에 충분한 크기가 아닌 경우) 또는 측정될 것이다:

| 점수: |                  |
|-----|------------------|
| 0   | 종양이 검출될 수 없다     |
| 1   | 종양이 손으로 만져질 수 있음 |
| 2   | 측정이 가능하기 바로 전    |
| 표시: |                  |
| R   | 적색               |
| W   | 상처 조직의 징후        |
| N   | 괴사               |
| B   | 청색               |

종양 직경은 디지털 캘리퍼를 사용하여 2차원으로 측정될 것이고, 부피는 다음 화학식에 의해 추산될 것이다: L

x W x ½W(길이 x 폭 x ½폭). 측정/관찰은 0 일, 즉, 접종일에 시작될 것이다. 종양 부피의 측정은 1주일에 3 회, 월요일, 수요일, 및 금요일일 것이다. 체중은 1주일에 1회 기록될 것이다. 데이터는 도면에 제시될 것이고, 기술적 통계가 시행될 것이다.

생쥐들은 15 mm 직경의 최대 종양 크기 후에 생명을 종식시킬 것이다. 이러한 직경은 구형 형태로 추산할 때 1,688 mm<sup>3</sup>의 부피와 동일하다. 어떠한 해로운 임상 징후도 이 연구에서 예상되지 않는다. 해로운 임상 징후가 관찰되는 경우에, 이들은 파일에 주의 사항으로 기록될 것이다.

연구 후, 상이한 치료군들이 Caplan Meyer 생존 곡선에 의해 비교된다. 치료-유도된 종양 성장도 또한 그래프가 작성하고 성장 지연은 평균 성장 대 시간의 비선형 회귀 후에 산출하고 스튜던트 T 검정을 사용하여 비교된다.

효능 연구의 데이터는 토폴 227을 써서 표식된 모노클로날 항체들인 트라스투주매파와 리톡시매파의 투여 후 획득된, 이전에 공표된 효능 데이터와 유사할 것으로 예상된다.

### 실시예 13: 항-CD22 모노클로날 항체(AGC1100)의 생성.

에프라투주매파라 칭하기도 하고, 여기서 AGC1100을 나타내는 모노클로날 항체(mAb) hLL2의 서열은 (1)에 기술된 바와 같이 작제하였다. 본 실시예에 사용된 mAb는 Immunomedics Inc, New Jersey, USA가 생산하였다. 이러한 mAb의 생산은 예를 들면 경쇄 및 중쇄를 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 남아 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.

CD22 결합 항체(쥐과 그리고 인간화된)의 알려진 서열들은 다음(CDRs는 볼드체이고, CDRs 바깥쪽의 예측되는 접촉 영역은 밑줄 그어짐)을 포함한다:

경쇄:

DIQLTQSPSSLAVSAGENVTMSC**KSSQSVLYSANHKNYLA**WYQQKPGQSPKLLIY**WASTRE**  
SGVPDRFTGSGSGTDFTLTISRQVEDLAIYY**CHQYLS**SWTFGGGTKLEIKR (서열 ID 5)

DIQLTQSPSSLASAAVEDRTMSC**KSSQSVLYSANHKNYLA**WYQQKPGQKAKLLIY**WASTRE**  
SGVPSRFRSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYY**CHQYLS**SWTFGGGTKLEIKR (서열 ID 6)

중쇄:

QVQLQESGAELSKPGASVKMSCKASGYTFT**SYWLHWIKQ**RPGQGLEWIGYINPRNDYTEYN  
**QNF**KDKATLTADKSSSTAYMQLSLTSEDSAVYYC**ARDITTFY**WGQGTTLTVSS  
(서열 ID 7)

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFT**SYWLHWVRQ**APGQGLEWIGYINPRNDYTEYN  
**QNF**KDKATITADESTNTAYMELSLRSEDTAFYFC**ARDITTFY**WGQGTTLTVSS  
(서열 ID 8)

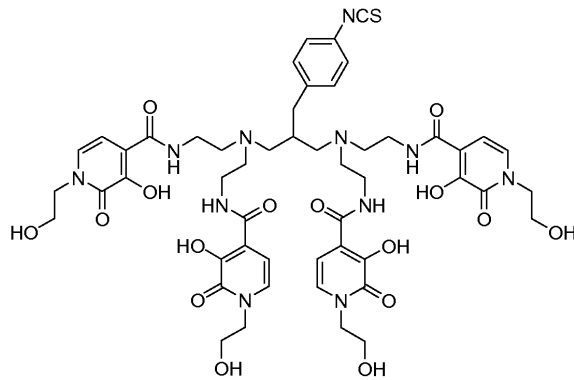
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFT**SYWLHWVRQ**APGQGLEWIGYINPRNDYTEYN  
**QNF**KDKATITADESTNTAYMELSLRSEDTAFYFC**ARDITTFY**WGQGTTLTVSS  
(서열 ID 9)

참고 문헌:

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

### 실시예 14: 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 6에 나와 있다.

#### 실시예 15: 항체/킬레이터 공액체 AGC1115의 Th-227과의 킬레이트화

4+ 이온으로서 토륨-227(<sup>227</sup>Th)을 악티늄-227(<sup>227</sup>Ac) 발생기 시스템에서 분리하였다. <sup>227</sup>Th을 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 8M HNO<sub>3</sub> 중의 <sup>227</sup>Ac 붕괴 혼합물에서 선택적으로 잔류시켰고, 여기서 음으로 하전된 질산염 복합체는 <sup>227</sup>Th<sup>4+</sup>과 함께 형성된다. <sup>227</sup>Ac 및 딸 핵종을 컬럼에서 세척하였고 <sup>227</sup>Th을 12M HCl에서 용출하였다. 상기 <sup>227</sup>Th-용출물을 건조될때까지 증발시켰고 잔류물을 0.5M HCl에 용해하였다.

킬레이트화 반응에서 항체-공액체 AGC1115는 0.5 mg의 항체 공액체당 1 MBq <sup>227</sup>Th의 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 <sup>227</sup>Th 및 딸 핵종에서 분리하였다. 표식 효율은 NAP-5 탈염 단계에서의 잠재적인 손실을 포함하여 통상적으로 96-98%였다.

#### 실시예 16: 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 EC<sub>50</sub> 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.

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°C에서 5분 동안 340xg로 원심 분리에 의해 수확하였다. 세포를 재현탁하고 1 % FBS로 보충된 10 ml PBS 에서 2회 세척하였고, 4°C에서 5 분 동안 340xg로 원심 분리에 의해 펠렛화하였다. 순차적으로, 재현탁된 세포의 20 µl의 제제를 1:500으로 Coulter Isoton II 희석제로 희석하였고, Beckman Coulter Z2 도구화(Beckman Coulter; CA, USA)를 사용하여 계수하였다. 상기 제제를 1x10<sup>6</sup> 세포들/ml의 세포 밀도까지 조절하였고, 100 µL를 V-자형 바닥 96-웰 플레이트(Nunc/Fisher Scientific; NH, USA) 내의 각각의 웰로 옮겼다. 세포를 스핀 다운하고, 기올여 따른 후 재현탁

하였고, 이는 결과로 웰 당 50  $\mu$ l 세포 현탁의 대략적 부피를 초래하였다.

AGC1115 및 AGC1100를 50  $\mu$ g/ml까지 희석하였고 3배 희석 단계의 12개 지점에서 적정하였다. 이소형 대조군 항체(트라스투주맵)을 그에 따라 조제하였다. 항체의 각각의 희석 후 100  $\mu$ l를 Raji 세포를 함유하는 웰에 첨가하였다. 1.5 시간 동안 4°C에서 배양 후, 세포를 스핀 다운하였고 1 % FBS로 보충된 200  $\mu$ l의 차가운 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  $\mu$ g/ml로 조제하였다. 이차 항체 시약의 100  $\mu$ l를 암실에서 4°C에서 1 시간 동안 배양 전에 각각의 웰에 순차적으로 첨가하였다. 세포를 상기한 바와 같이 2회 세척하였고, 1 % FBS로 보충된 200  $\mu$ 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 표시하였다.

데이터를 GraphPadPrism(Prism소프트웨어; CA, USA)의 "로그(작용제) 대 반응 - 가변 기울기(4개의 파라미터들)" 결합 모델을 사용하여 피팅하였고  $EC_{50}$  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.

AGC1100 및 AGC1115의 보관된 적정 곡선의 산출된  $EC_{50}$  값은 각각 9 nM 및 6 nM이었고, 공액체 AGC1115의 결합 효능은 AGC1100와 비슷하였다는 것을 나타내었다.

#### 실시예 17: AGC1115-Th-227에 의한 Th-227-유도된 세포의 세포 독성.

시험관 내 세포의 세포 독성을 CD22 양성 Ramos 세포에서 연구조사하였다(실시예 6 참조). AGC1115 및 AGC0015에 의해 공액된 대조군 트라스투주맵을 44 kBq/ $\mu$ g의 특정 활성까지 Th-227을 킬레이트화하기 위해 사용하였다.

Ramos 세포를 5 % CO<sub>2</sub>와 함께 37°C에서 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 대체하였고, 부피를 400,000개 세포/mL를 제공하도록 조절하였다. 약 1,600,000개 세포(4 mL)를 6개의 웰 플레이트들에서 각각의 웰에 첨가하였다. 상기 플레이트를 표식된 mAb, 또는 배양 배지의 첨가를 위해 다음날까지 배양하였다.

표식된 mAb, 또는 배양 배지를 첨가한 후, 플레이트는 4시간 더 배양하였다. 실험에서 AGC1115 또는 트라스투주맵-AGC0015을 3 nM의 최종 농도까지 각각의 웰에 첨가하였다. 배양 후, 상기 세포를 배양 배지에서 2회 세척하였고, 상청액 및 펠렛 중의 ATP를 측정하였다. 이어서 세포는 1:2로 분할하였고, 5% CO<sub>2</sub>와 함께 37°C에서 배양 배지에서 배양하였다. 동일한, 그러나 단지 1회 세척의, 절차가 제3, 5 및 7일에 반복되었다.

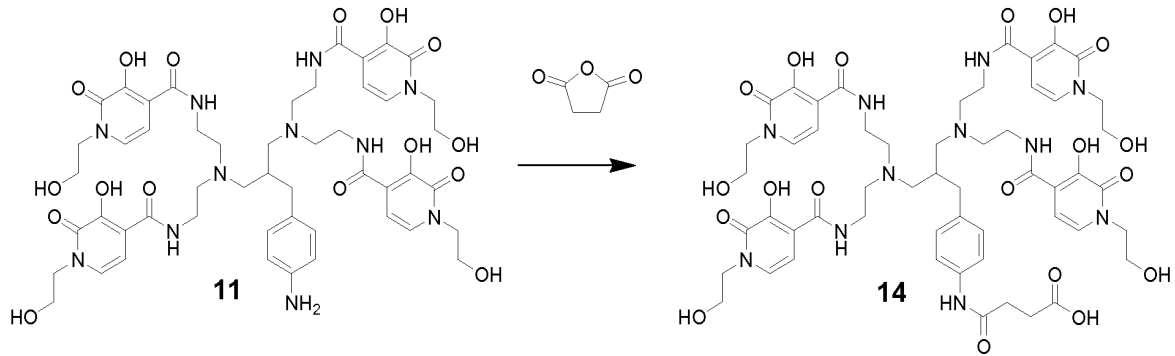
ATP의 정량화는 상이한 샘플 시간에 세포 생존 능력의 척도로서 사용하였고(CellTiter-Glo Luminescent Cell viability assay from Promega), 이는 도 8에 나타난 곡선들을 초래한다. Ramos 세포 결합 AGC1115-Th-227은 결과로 세포 독성을 초래하였고, Th-227을 써서 표식된 대조군 작제물과 대조적으로, Ramos 세포에 결합되지 않는다.

#### 실시예 18 - 산 유도체

대안의 결합 화학을 가능하게 하는 수용성 킬레이터의 산 유도체 조제.

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

본 실시예는 용해성 킬레이터의 합성을 보여주고 물질 11로부터 시작한다(실시예 2). 43 mg(~0.04 mmol)의 물질 11을 4 mL DMSO, 4 mL 아세토니트릴, 및 30  $\mu$ L NEt<sub>3</sub>에 용해하였다. 6 mg의 숙신산 무수물을 첨가하였다(0.06 mmol). 실온에서 22시간 반응 후 반응 혼합물의 LC/MS 분석은 물질 15가 형성되었음을 보여주었다. 일부 오염물 디아실화된 부산물이 형성되었다. 무수물의 부분들로서 첨가는 에스테르 형성을 최소화하고 생성물 14의 물 수율을 증진시킬 것이다. 수득된 반응 혼합물의 HPLC 분석은 도 9에 나와있다.



#### 실시예 19. AGC0003 및 AGC0015의 작은 단백질에 대한 공액

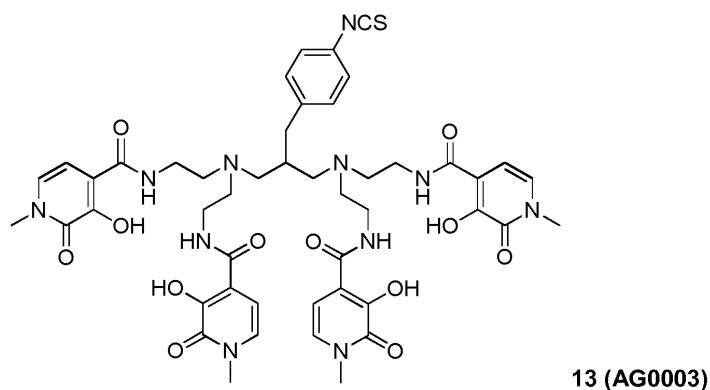
라이신 결합이 사용될 것이기 때문에, 어피바디 융합 단백질의 유리 시스테인을 킬레이터들과의 공액 전에 화학적으로 차단하였다. Tolmachev 등 (1)에 의해 기술된 바와 같이 본질적으로 E. 콜라이에서 조제된 어피바디 융합 단백질 PEP9237(서열 ID 10)을 디설파이드 형성을 저해하는 2mM 트리스(2-클로로에틸)포스핀(TCEP)을 함유하는 PBS(Biochrom L1825; 0.9% NaCl, 인산염 완충액, pH7.4)에서 1.32 mg/ml로 용해하였다. 1 ml의 어피바디 융합 단백질 용액을 0.985 ml 0.14 M 붕산염 완충액과 혼합하였고, pH는 약 8.4인 것으로 확인하였다. 요오도아세트아미드의 1 mg/ml 용액(Sigma 1149-5g)의 15  $\mu$ L를 첨가하였고, 반응 혼합물은 실온에서 1시간 동안 배양하였다.

공액 전에, 설프히드릴 차단된 어피바디 융합 단백질을 함유하는 용액 4 ml를 Amicon 스핀 필터를 사용하여 0.5 mL로 농축하였고, 과도한 반응물들을 붕산염 완충액에 의해 평형화된 NAP5 탈염 컬럼(GE Healthcare, lot# 83892624)에서 제거하였다. 용출된 1 mL 고 분자량 분획을 AGC0003 또는 AGC0015과 반응하도록 두 부분으로 분할하였다.

킬레이터 AGC0003(8.3  $\mu$ L DMF(Sigma 227056, lot# STBB4668)- 아래 **13** - 10 mg/ml 함유)을 0.5 mL 설프히드릴 차단된 어피바디 융합 단백질을 함유하는 바이알에 첨가하였다. 킬레이터 AGC0015(9.3  $\mu$ L H<sub>2</sub>O 함유 10 mg/ml)을 0.5 mL 설프히드릴 차단된 어피바디 융합 단백질을 함유하는 별개의 바이알에 첨가하였다. 킬레이터 단백질 반응 혼합물들을 함유하는 두 바이알을 30°C에서 밤새 배양하였다. 수득된 투명한 용액은 NAP5 컬럼을 사용하여 PBS와 교환된 완충액이었다.

#### 서열ID10:

AEAKYAKEMRNAYWEIALLPNLTNQKRAFIRKLYDDPSQSSELLSEAKKL  
NDSQAPSGSGSLAEAKEAANAELDCYGVSDIFYKRLIDKAKTVEGVEALKD  
AIIAALPG



#### 실시예 20 - AGC0003 및 AGC0015에 의한 작은 단백질 공액체들의 용해도 분석

실시예 19에서 생성된 2개의 어피바디 융합 단백질 킬레이터 공액체들의 투명한 PBS 용액을 해동 전에 -20°C에서 동결하였다. 독특한 유상 침전이 AGC0003 공액체를 함유하는 용액에 의해 나타났지만, AGC0015 공액체에 의해서는 그렇지 못하였다. 침전은 얼음 상에서 냉각된 후 더 가시적이었다.

각각의 반응으로부터 투명한 용액을 가능한 응집물들을 연구조사하기 위해 FPLC-SEC에 의해 분석하였다(도 10). 50% 이상의 AGC0003 공액체는 응집된 상태로 존재하는 것으로 밝혀진 한편, 소량 분획의 AGC0015 공액체(크로마토그램에서 어깨로서 보임)는 응집된 상태로 존재하였다. 곡선 아래의 통합된 영역은 AGC0215(AUC: 166 및 409 mAU<sup>2</sup>mL 각각) 보다 AGC0203(AGC0003 공액체)에 대해 회수된 총 단백질이 훨씬 더 적다는 것을 보여주었다.

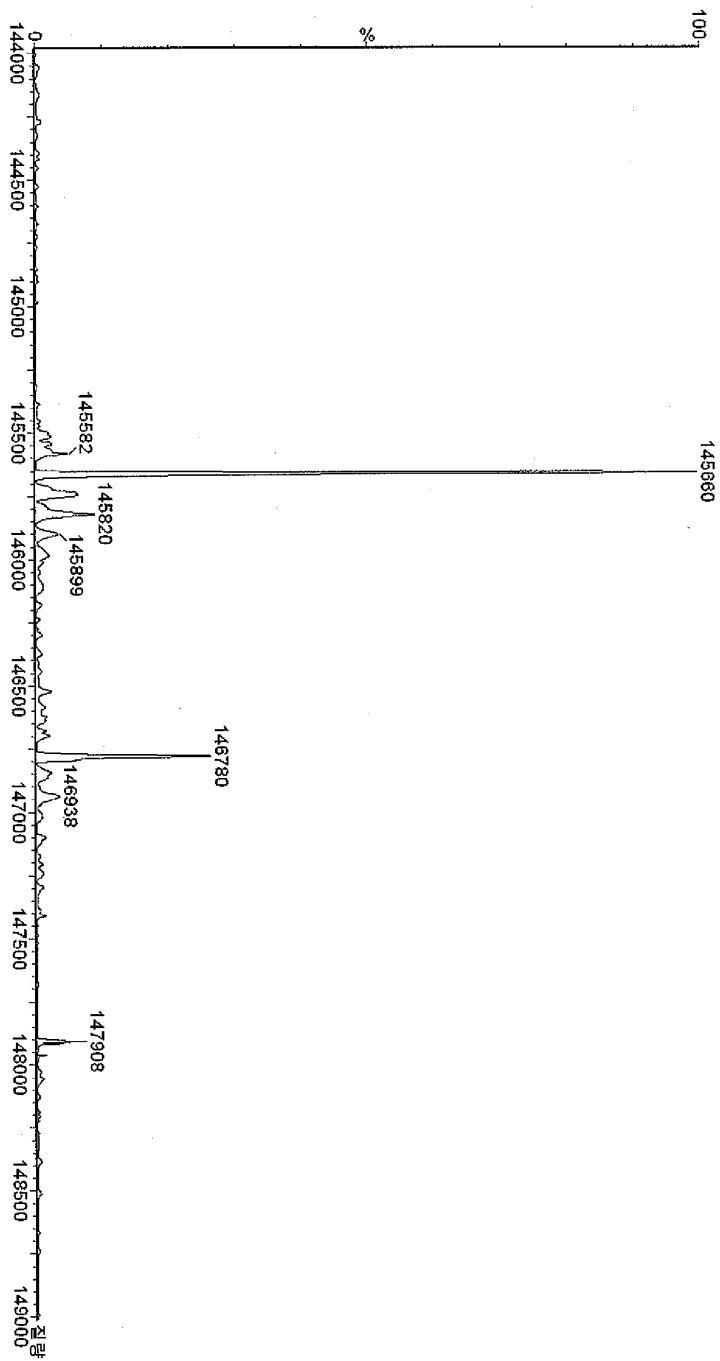
다음으로, 킬레이터에 대한 단백질 비율을 LC/MS 분석에 의해 연구조사하였다. 공액되지 않은 어피바디 융합 단백질(AGC200)은 대조군으로서 포함하였다. LC 동안 흡수는 280 및 335 nm에서 모니터링하였고(킬레이터는 대략적으로 335 nm에서 흡수함), 킬레이터는 2개의 공액체 용액에 존재하였지만 AGC200 제제에는 존재하지 않음을 보여주었다(도 11). AGC0003 공액체(AGC0203)의 경우, MS 분석은 공액되지 않은 융합 단백질 및 하나의 킬레이터를 갖는 단백질 공액체 모두를 보여주는 한편, AGC0015 공액체(AGC0215)의 경우, MS 분석은 공액되지 않은 융합 단백질 및 1개 및 2개의 킬레이터를 갖는 단백질 공액체를 보여주었다(도 12). 이는 하나 이상의 킬레이터를 갖는 AGC0203이 침전시켰다는 것을 나타낸다.

#### 참고 문헌

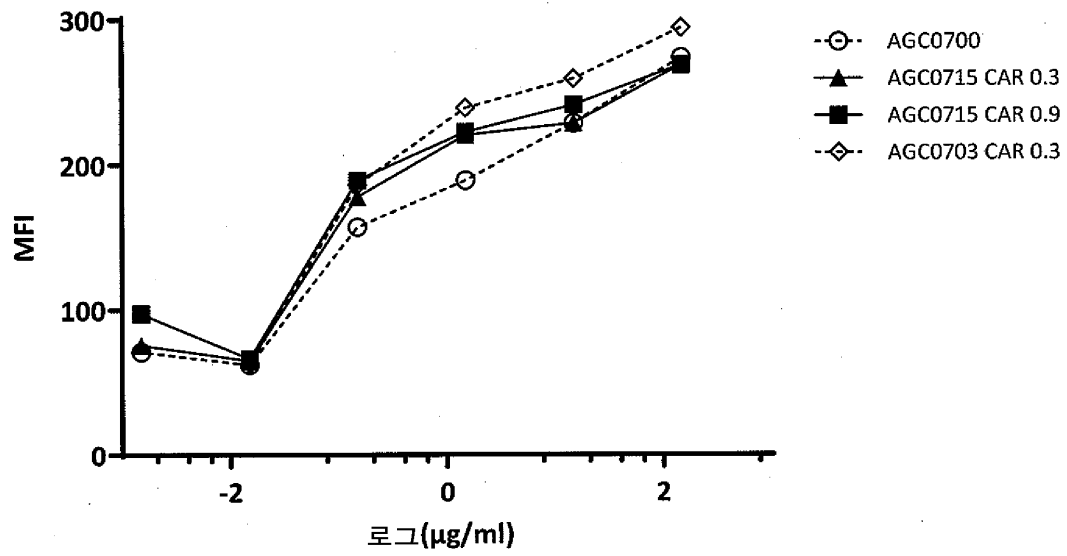
Tolmachev, Orlova, Pehrson, Galli, Baastrup, Andersson, Sandström, Rosik, Carlsson, Lundqvist, Wennborg, Nilsson. Radionuclide therapy of HER2-positive microxenografts using a <sup>177</sup>Lu-Labeled HER2-specific Affibody molecule. Cancer Res. 67: 2773-82, 2007.

도면

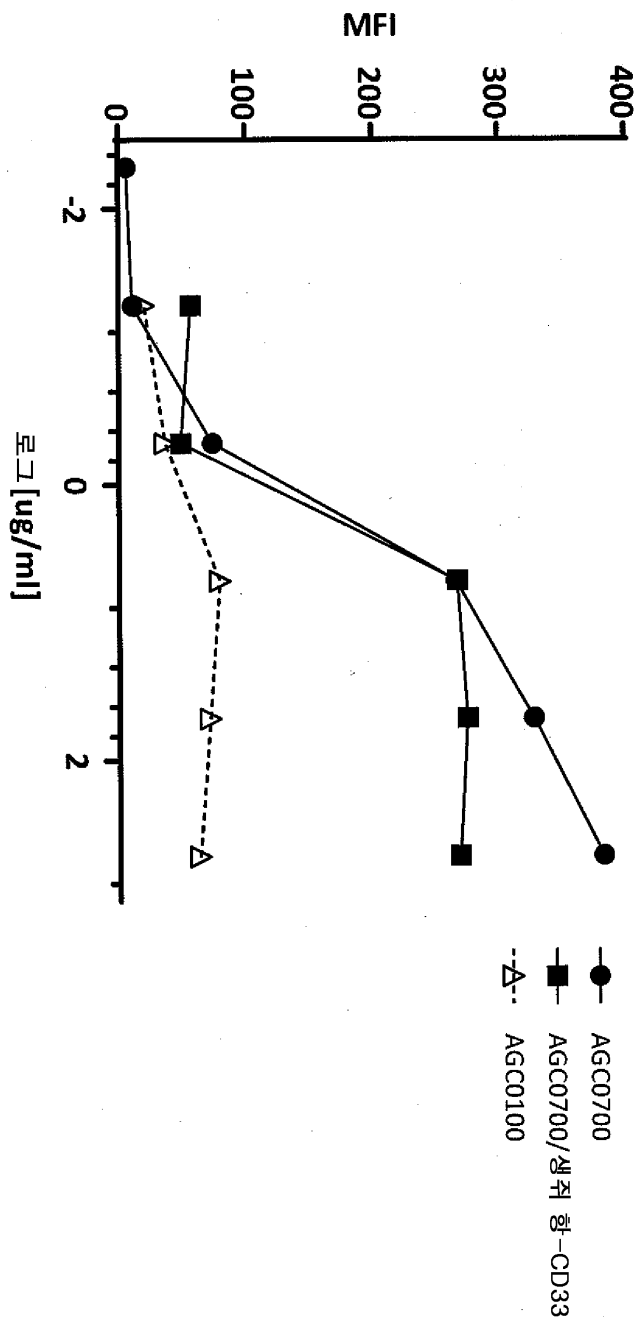
도면1



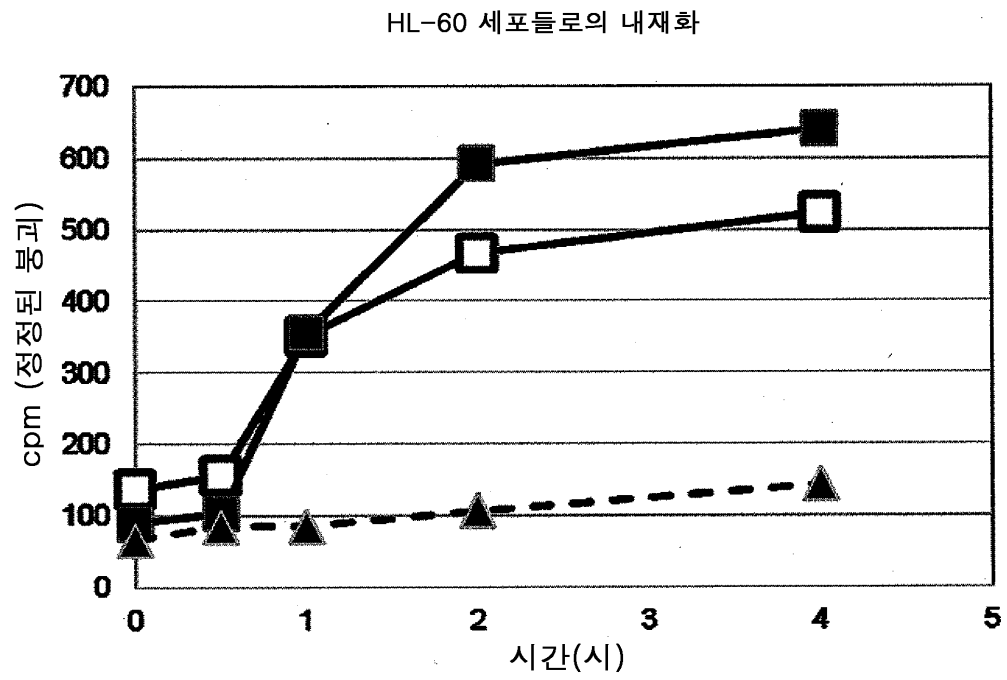
도면2a



도면2b



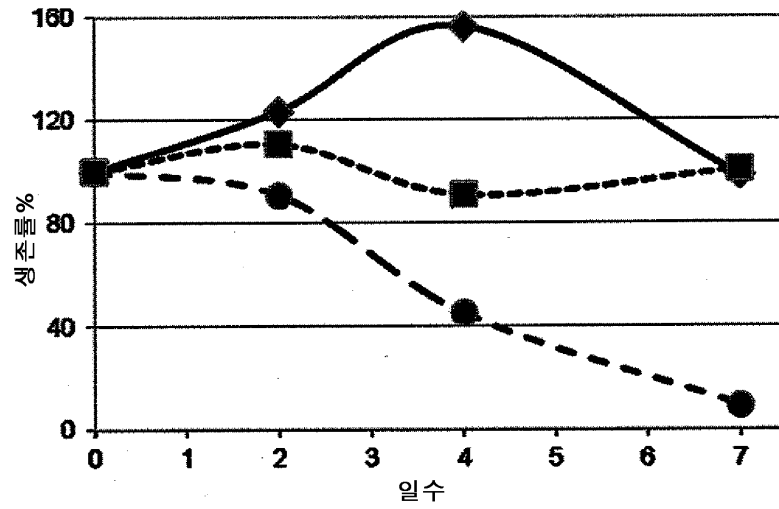
도면3



도면4

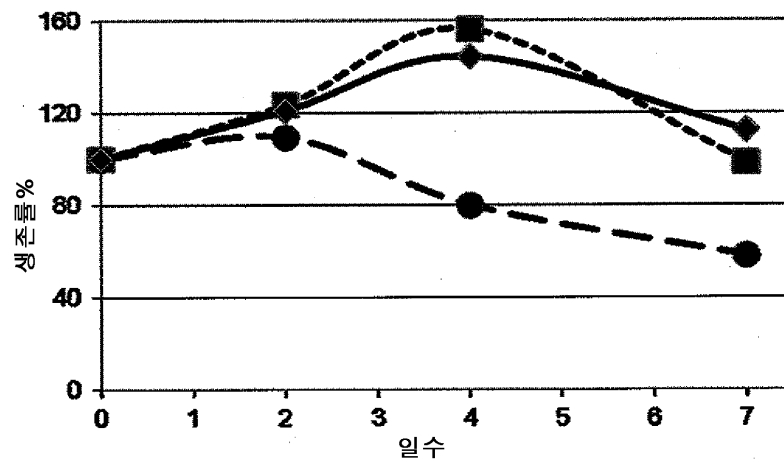
a

Th-227-AC0715의 HL-60 세포들에 대한 세포 독성

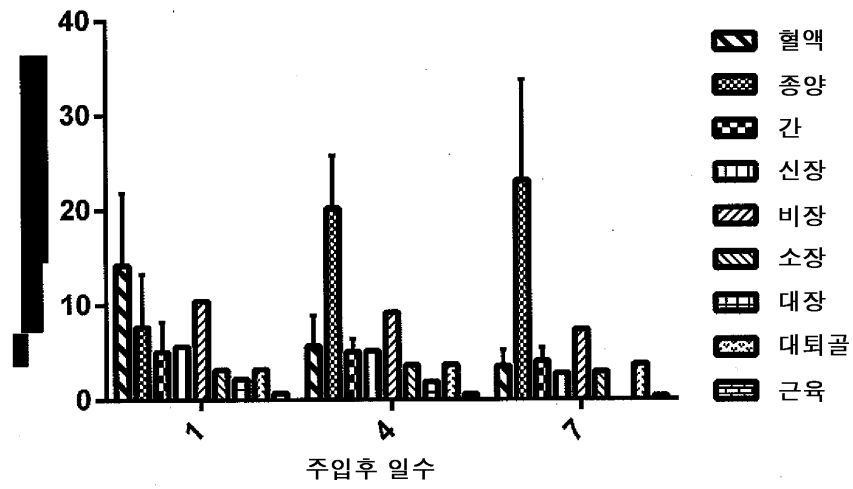


b

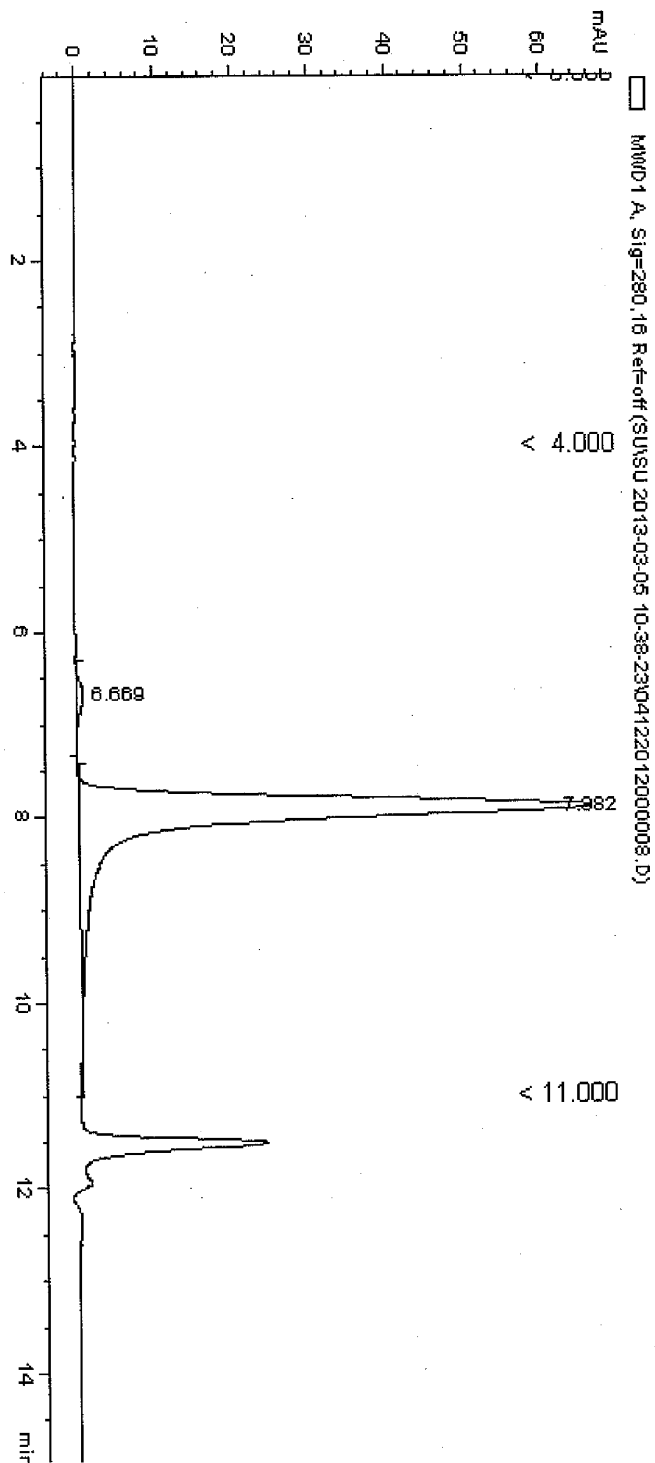
Th-227-AC0715의 HL-60 세포들에 대한 세포 독성



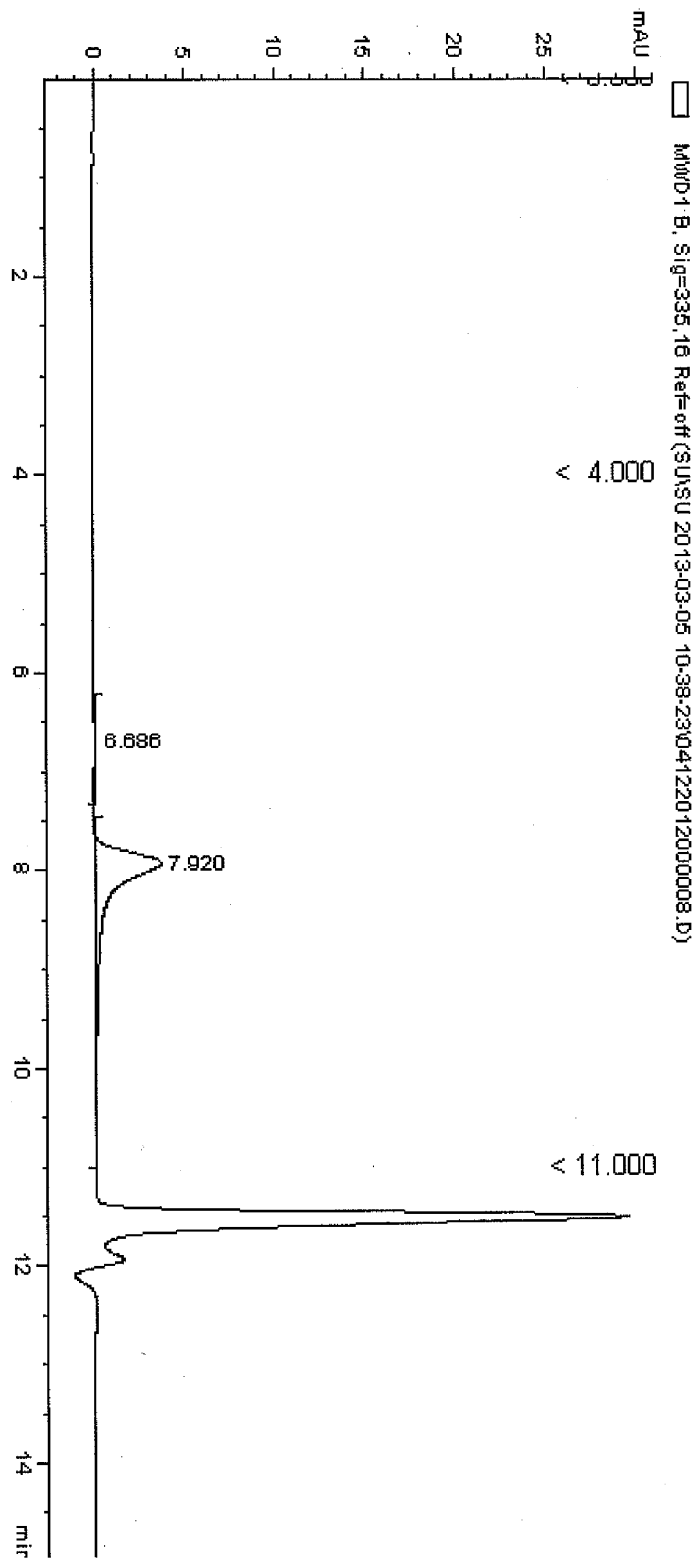
도면5



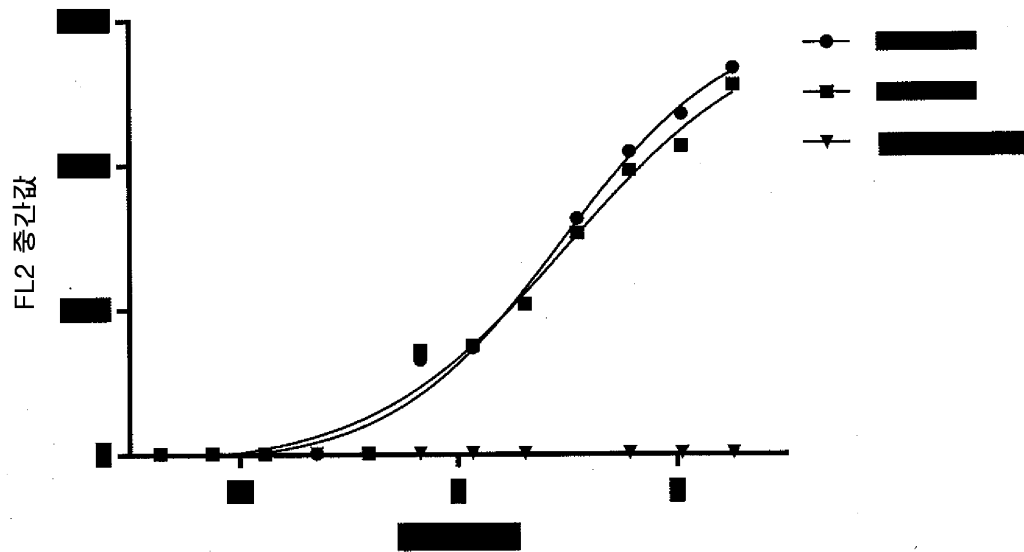
도면6a



도면6b

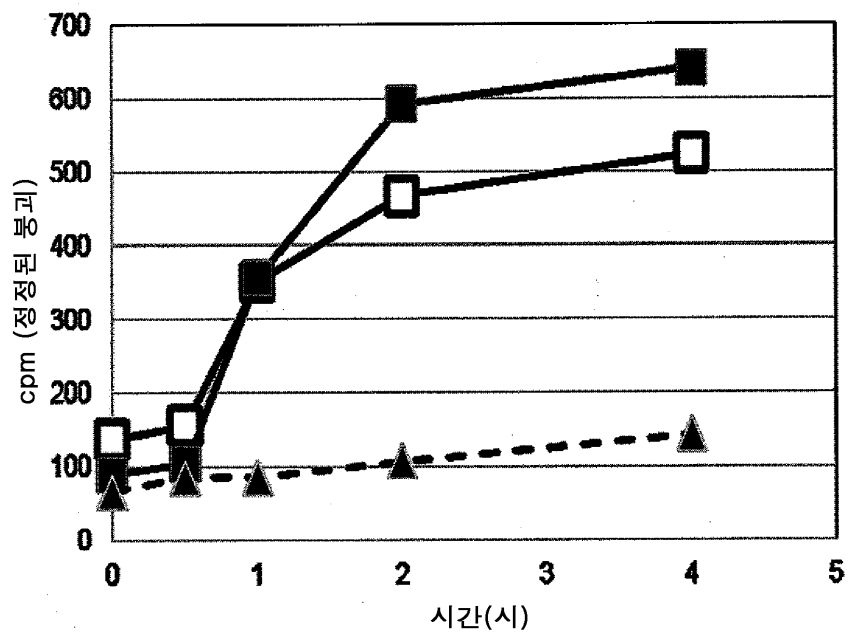


도면7

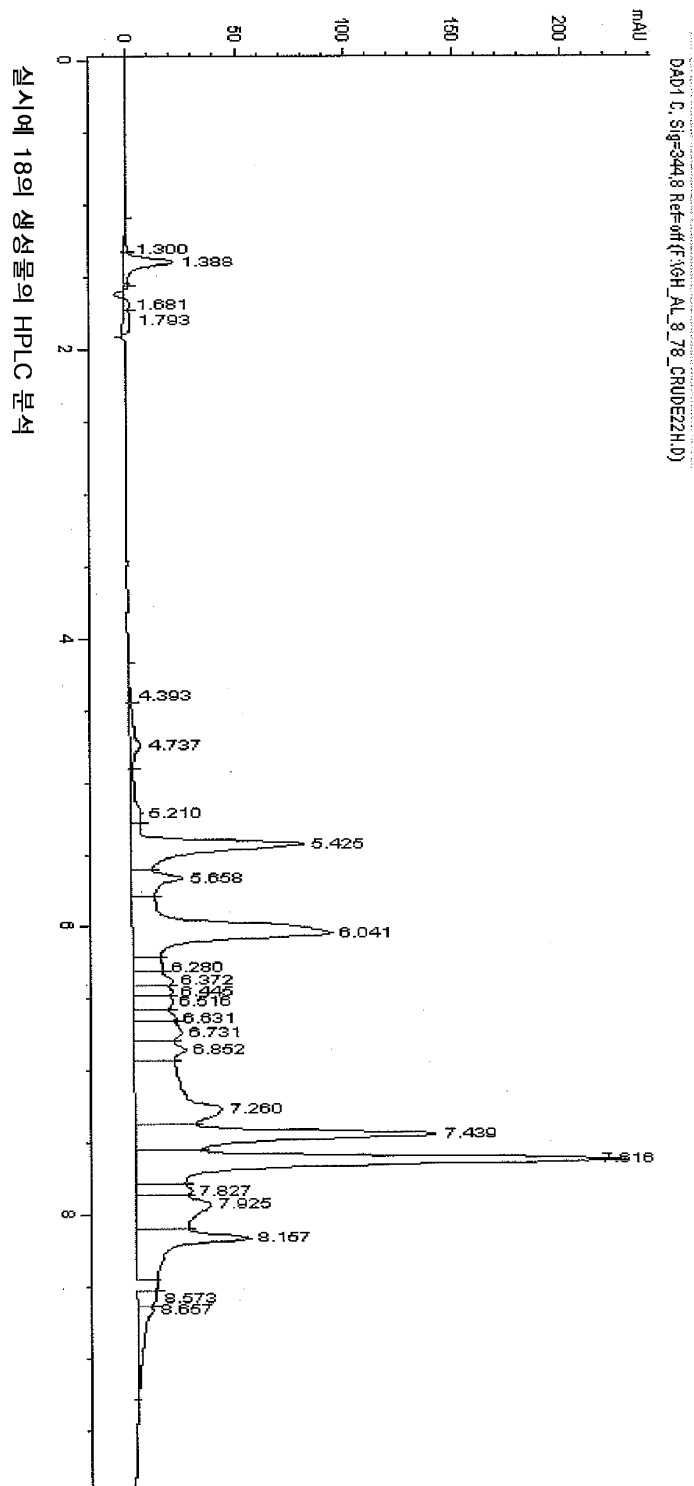


도면8

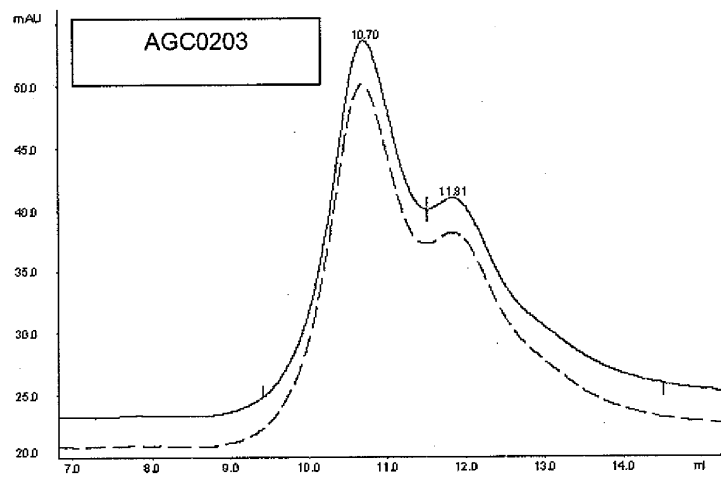
HL-60 세포들로의 내재화



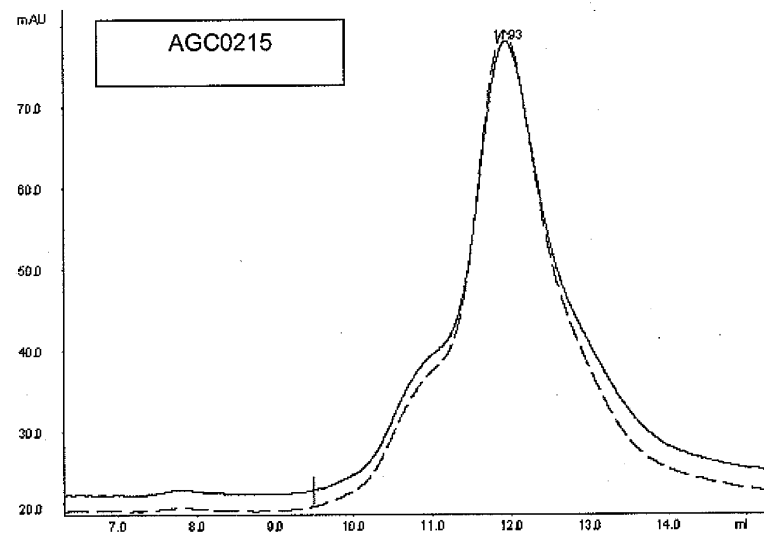
도면9



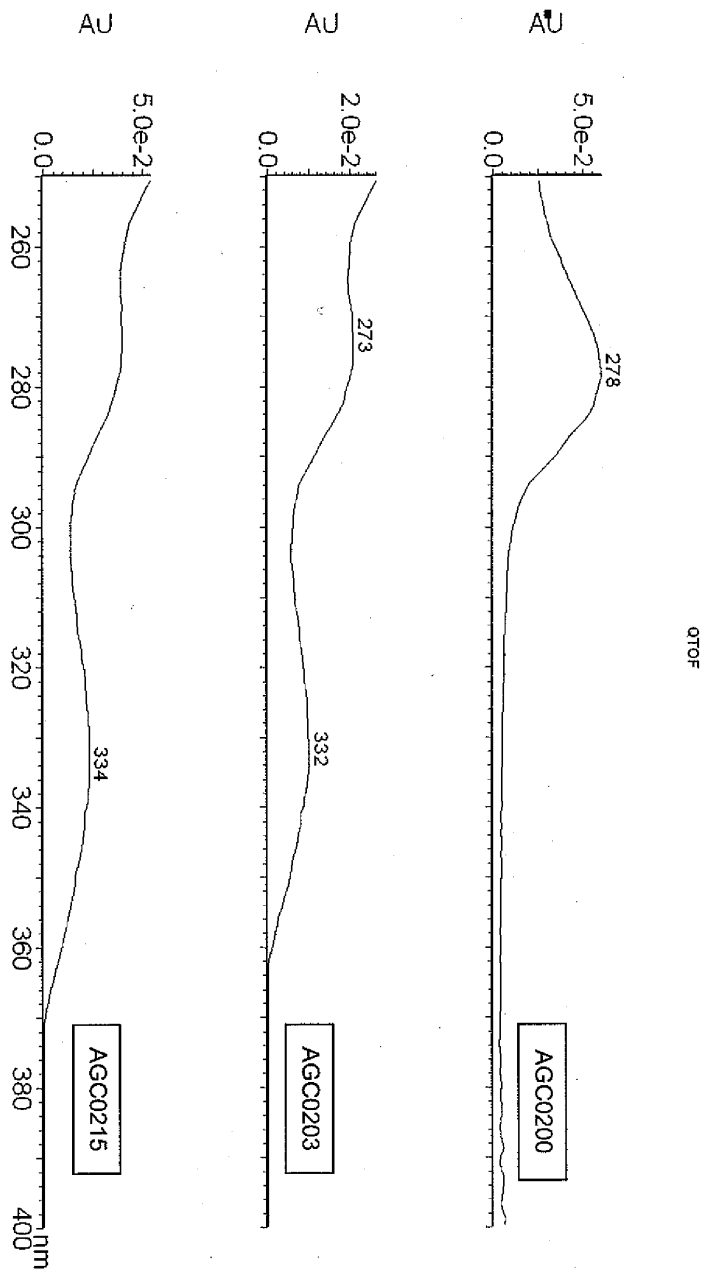
도면10a



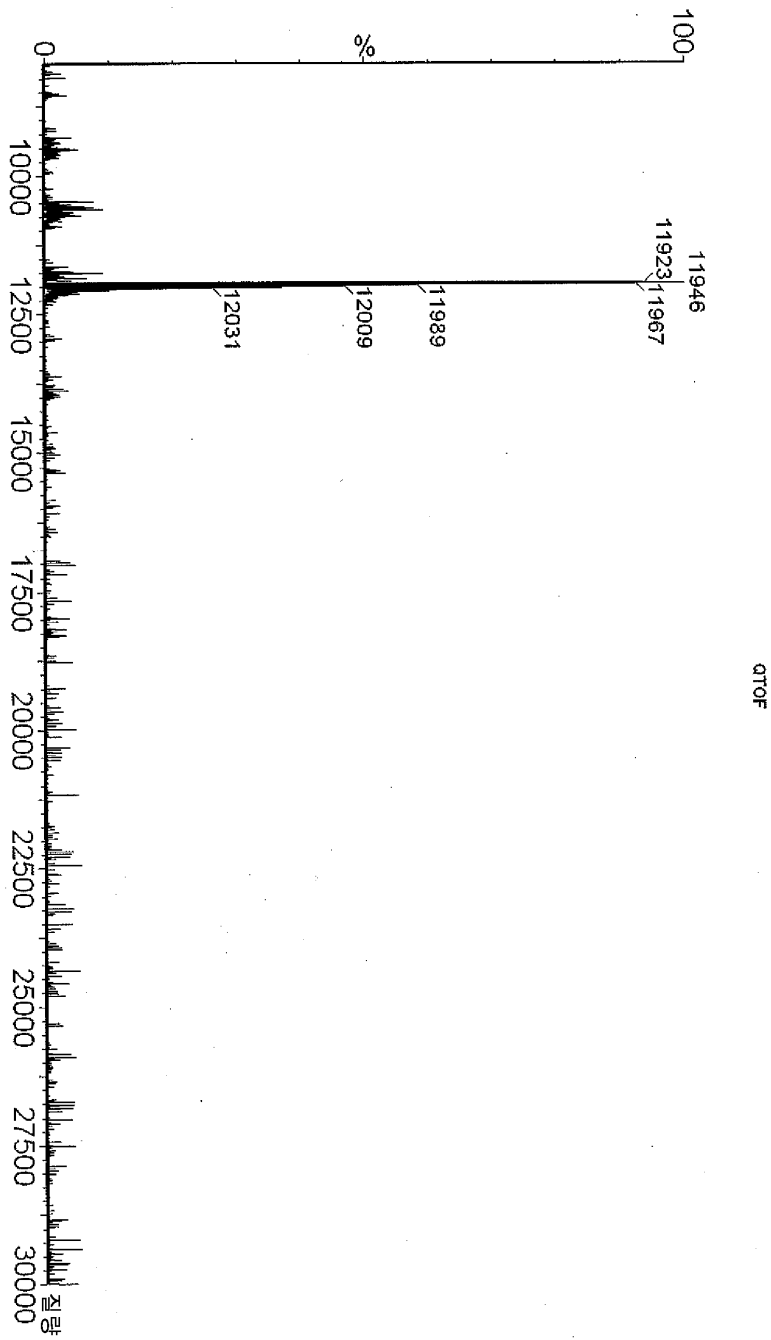
도면10b



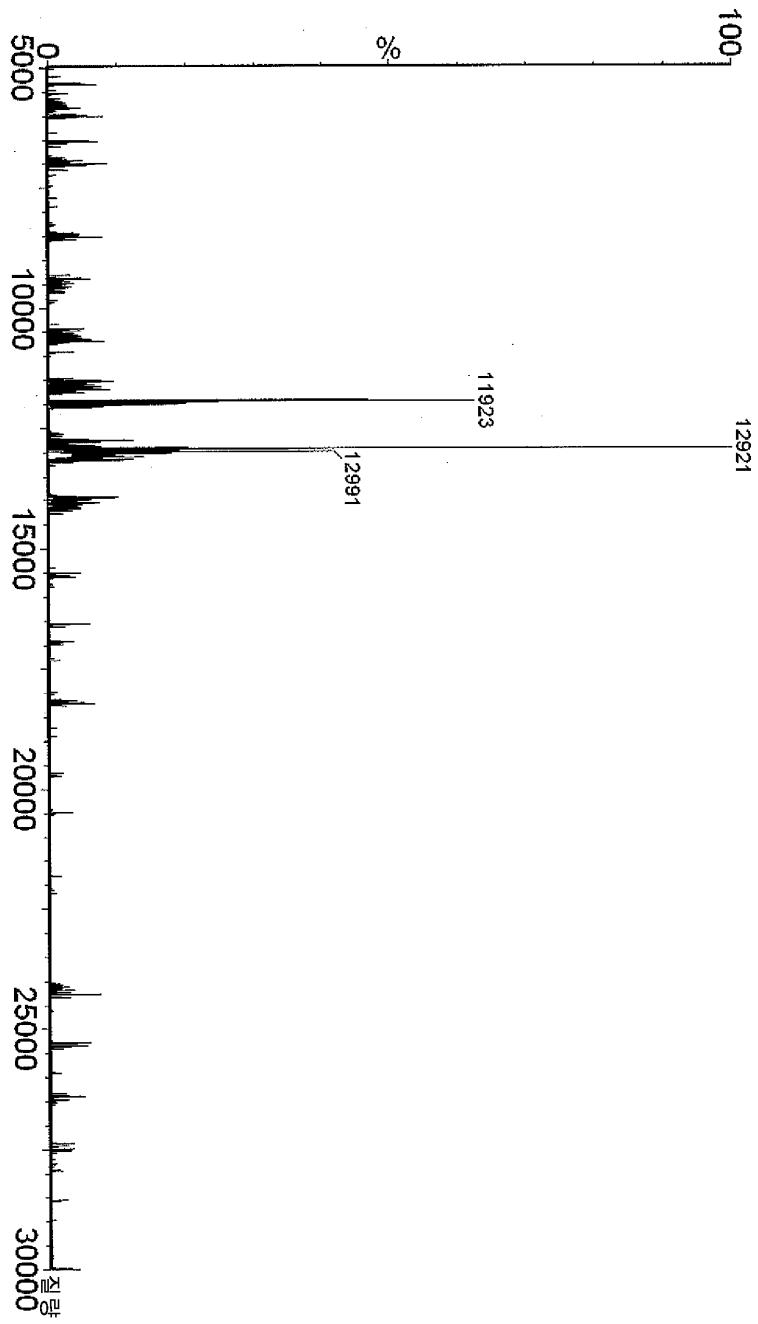
도면11



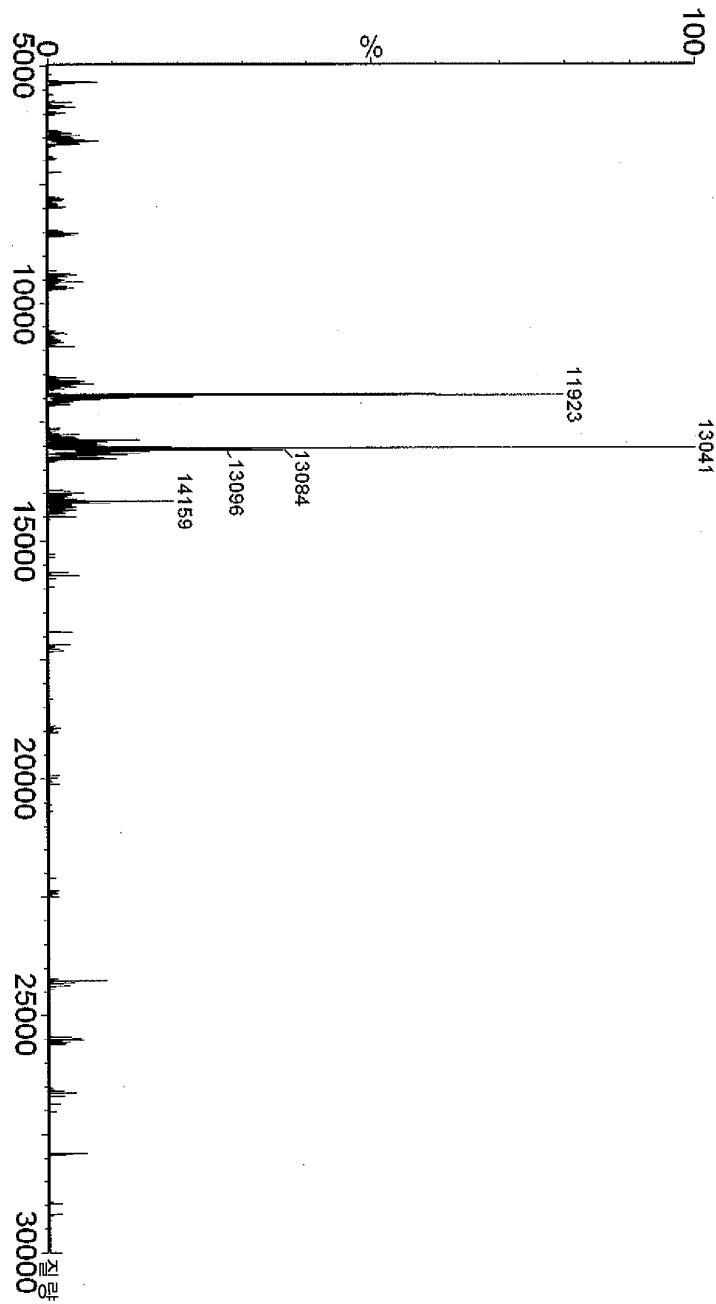
도면12a



도면12b



도면12c



서열목록

- <110> Algeta ASA
- <120> Radio-Pharmaceutical Complexes
- <130> 95.112974/01
- <160> 10
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Back-translated from mAb HuM195, optimised and sub-cloned into Chinese hamster ovarian suspension cells.

<400> 1

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 Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Ser 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 Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Arg Pro Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 2

<211> 55

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Back-translated from mAb HuM195, optimised and sub-cloned into Chinese hamster ovarian suspension cells.

<400> 2

Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln  
35 40 45

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
50 55

<210> 3

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Back-translated from mAb HuM195, optimised and sub-cloned into  
Chinese hamster ovarian suspension cells.

<400> 3

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 Asp Tyr  
20 25 30  
Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45  
Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60  
Lys Ser 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 Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Gly Arg Pro Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110  
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala  
115 120 125  
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
130 135 140  
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

145 150 155 160  
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

|     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     | 165 |     | 170 |     | 175 |
| Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser |
| Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val |
| Pro | Ser | Ser | Ser | Leu |     |
|     | 180 |     | 185 |     | 190 |
| Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile |
| Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys |
| Pro | Ser | Asn | Thr |     |     |
|     | 195 |     | 200 |     | 205 |
| Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val |
| Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp |
| Lys | Thr | His | Thr |     |     |
|     | 210 |     | 215 |     | 220 |
|     |     |     |     |     |     |
| Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala |
| Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly |
| Pro | Ser | Val | Phe |     |     |
|     | 225 |     | 230 |     | 235 |
|     |     |     |     |     | 240 |
| Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro |
| Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile |
| Ser | Arg | Thr | Pro |     |     |
|     | 245 |     | 250 |     | 255 |
| Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val |
| Val | Asp | Val | Ser | His | Glu |
| Asp | Pro | Glu | Val |     |     |
|     | 260 |     | 265 |     | 270 |
| Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val |
| Asp | Gly | Val | Glu | Val | His |
| Asn | Ala | Lys | Thr |     |     |
|     | 275 |     | 280 |     | 285 |
| Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln |
| Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg |
| Val | Val | Ser | Val |     |     |
|     |     |     |     |     |     |
|     | 290 |     | 295 |     | 300 |
| Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln |
| Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys |
| Glu | Tyr | Lys | Cys |     |     |
|     | 305 |     | 310 |     | 315 |
|     |     |     |     |     | 320 |
| Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala |
| Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu |
| Lys | Thr | Ile | Ser |     |     |
|     | 325 |     | 330 |     | 335 |
| Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro |
| Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr |
| Thr | Leu | Pro | Pro |     |     |
|     | 340 |     | 345 |     | 350 |
| Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr |
| Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu |
| Thr | Cys | Leu | Val |     |     |
|     | 355 |     | 360 |     | 365 |
|     |     |     |     |     |     |
| Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser |
| Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp |
| Glu | Ser | Asn | Gly |     |     |
|     | 370 |     | 375 |     | 380 |
| Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn |
| Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro |
| Val | Leu | Asp | Ser |     |     |
|     | 385 |     | 390 |     | 395 |
|     |     |     |     |     | 400 |
| Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu |
| Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val |
| Asp | Lys | Ser | Arg |     |     |
|     | 405 |     | 410 |     | 415 |
| Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val |
| Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met |
| His | Glu | Ala | Leu |     |     |

420 425 430  
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435 440 445

<210> 4

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Back-translated from mAb HuM195, optimised and sub-cloned into Chinese hamster ovarian suspension cells.

<400> 4

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr

20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys

85 90 95

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

115 120 125

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

130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 5

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine derived mAb

<400> 5

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> 6

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 6

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> 7

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine derived mAb

<400> 7

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> 8

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 8

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> 9

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 9

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

<210> 10

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Affibody Fusion protein expressed in E.coli

<400> 10

Ala Glu Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Met Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile

1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg

20 25 30

Lys Leu Tyr Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ser Glu Ala

35

40

45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Ser Gly Ser Gly Ser Leu Ala

50

55

60

Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Cys Tyr Gly Val Ser

65

70

75

80

Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val

85

90

95

Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro Gly

100

105