



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년09월10일

(11) 등록번호 10-1551232

(24) 등록일자 2015년09월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C07D 487/04 (2006.01) A61K 31/519 (2006.01)
 A61K 51/04 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-0127479
 (22) 출원일자 2013년10월25일
 심사청구일자 2013년10월25일
 (65) 공개번호 10-2014-0057159
 (43) 공개일자 2014년05월12일
 (30) 우선권주장
 1020120119743 2012년10월26일 대한민국(KR)
 (56) 선행기술조사문헌
 WO2010102238 A1
 US7128893 B2
 Bioconjugate Chem., 2002, 13, 1200-1210.

(73) 특허권자
 한국원자력연구원
 대전광역시 유성구 대덕대로989번길 111(덕진동)
 (72) 발명자
 홍영돈
 대전 서구 문예로 174, 101동 1203호 (문산동, 샘
 머리아파트)
 최선주
 대전 유성구 엑스포로339번길 320, 4동 303호 (원
 촌동, 사이언스빌)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 이원희

전체 청구항 수 : 총 10 항

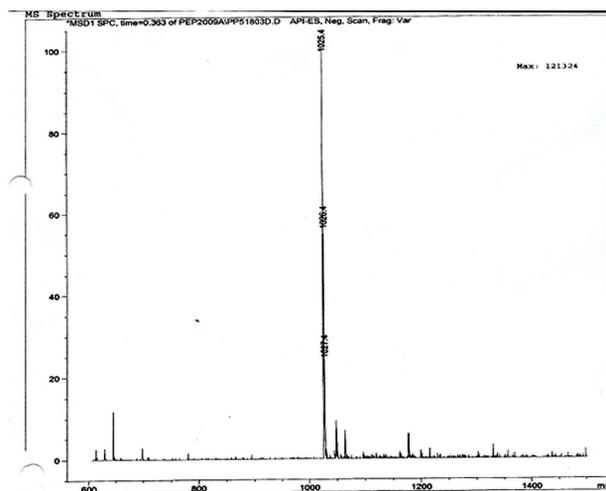
심사관 : 김병숙

(54) 발명의 명칭 N₃S₁형의 새로운 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체, 이의 제조방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 암 진단 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 N₃S₁형의 새로운 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체, 이의 제조방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 암 진단 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 의한 N₃S₁형의 새로운 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 난소암 등의 α-폴레이트 수용체(α-FR)가 발현되어 있는 종양에 수용체 결합을 이용하여 세포 내로 유입이 유용하다. 따라서, 상기 폴레이트 유도체에 테크네튬, 레늄 등의 방사성 동위원소를 표지하여 종양의 영상화 및 동위원소가 방출하는 방사선을 이용한 종양의 진단 및 치료에 유용하게 사용될 수 있으므로 다양한 방사성 의약품 표지에 널리 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이소영

대전 유성구 대덕대로 549, 11동 304호 (도룡동, 공동관리아파트)

임재청

대전 유성구 봉산로 39, 202동 1103호 (송강동, 송강마을2단지)

이동은

대전 유성구 가정로 65, 101동 905호 (신성동, 대림두레아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 525140-12

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국원자력연구원

연구사업명 정부 출연금 사업

연구과제명 연구로 동위원소 활용 융합기술개발 및 생산기술 선진화 사업

기 여 율 1/1

주관기관 한국원자력연구원

연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31

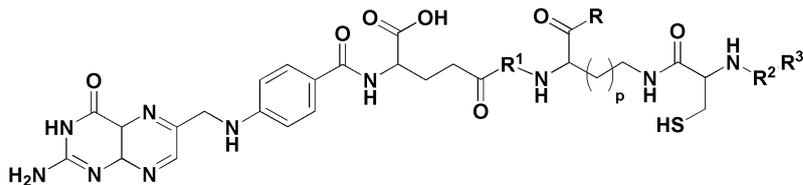
명세서

청구범위

청구항 1

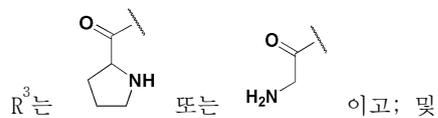
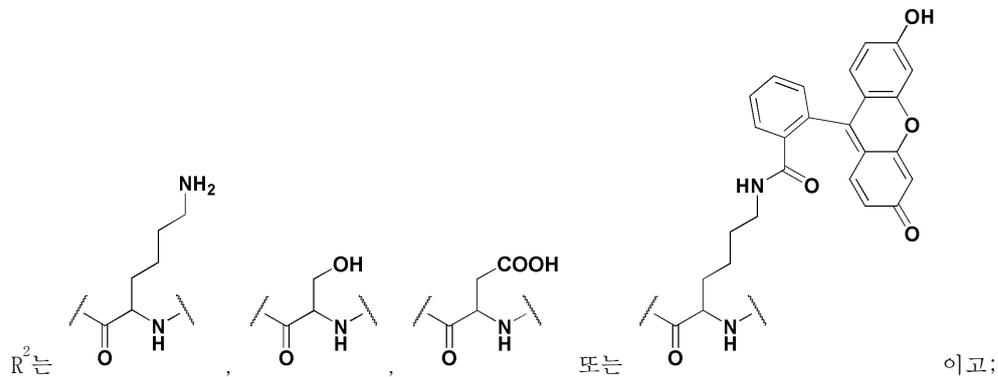
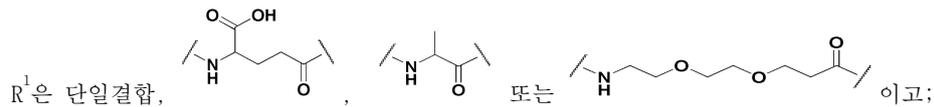
하기 화학식 1로 표시되는 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 플레이트 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

R은 하이드록시(-OH) 또는 아민(-NH₂)이고;



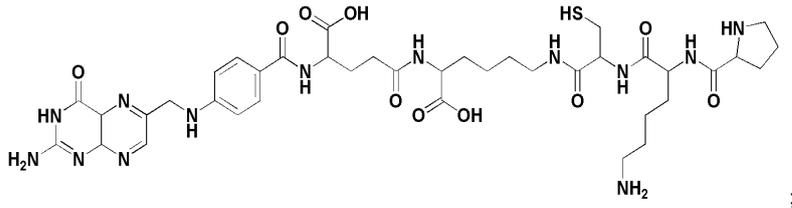
p는 3의 정수이다).

청구항 2

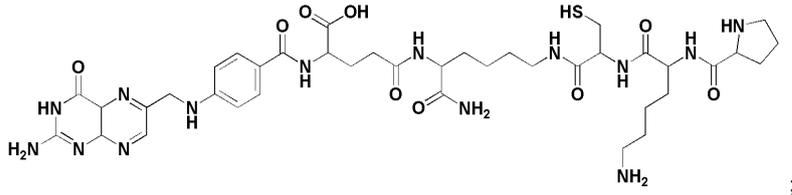
제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 a 내지 g로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종인 것을 특징으로 하는 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 플레이트 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

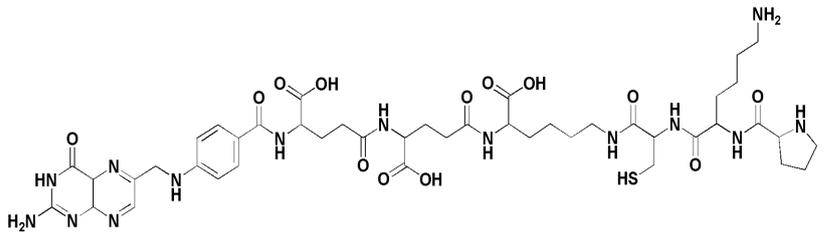
[화학식 a]



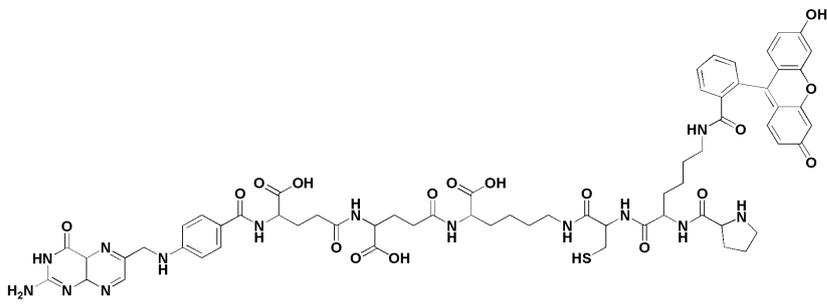
[화학식 b]



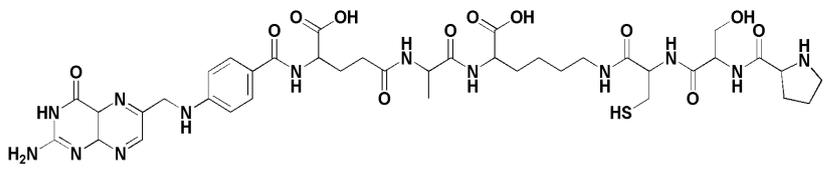
[화학식 c]



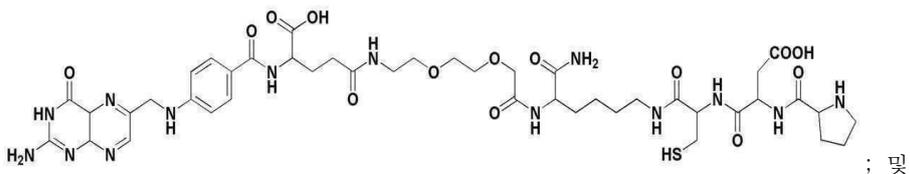
[화학식 d]



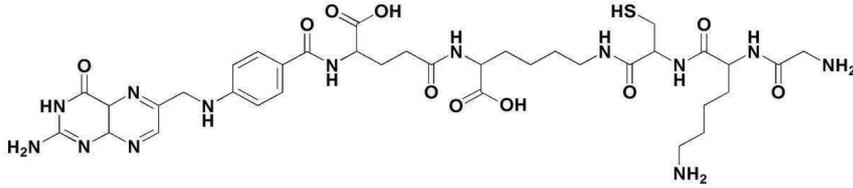
[화학식 e]



[화학식 f]



[화학식 g]



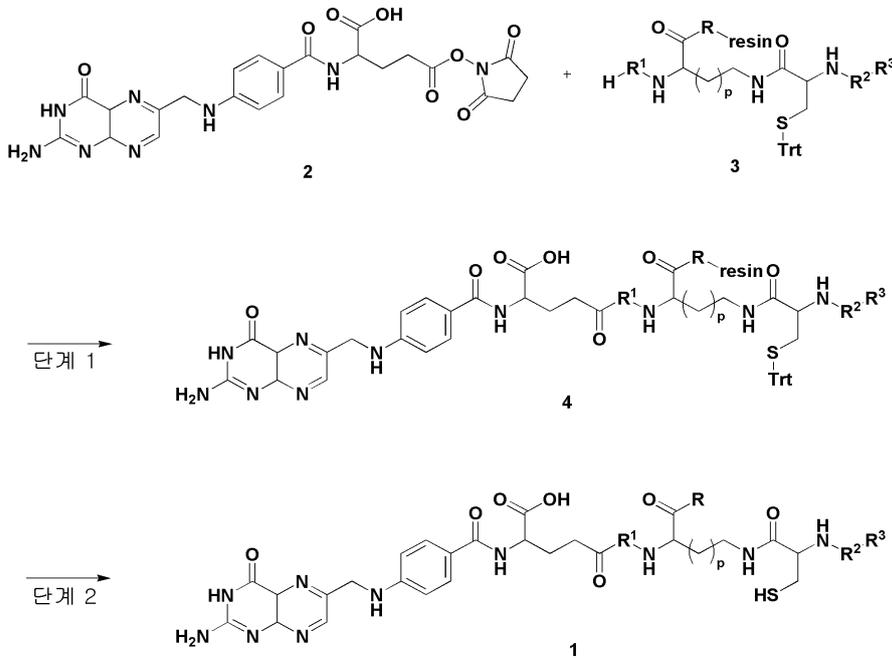
청구항 3

하기 반응식 1에 나타낸 바와 같이,

화학식 2의 폴릭산 유도체와 화학식 3의 화합물을 반응시켜 화학식 4의 폴레이트 유도체를 제조하는 단계(단계 1); 및

상기 단계 1에서 제조된 화학식 4의 폴레이트 유도체의 수지(resin)를 산 조건에서 제거하여 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계(단계 2)를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 제1항의 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체의 제조방법:

[반응식 1]



(상기 반응식 1에서,

상기 R, R¹, R², R³ 및 p는 제1항의 화학식 1에서 정의한 바와 같고;

resin은 왕 레진(Wang resin) 또는 메리필드 레진(Merrifield resin)이고; 및 Trt는 트리틸기이다).

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 화학식 3으로 표시되는 화합물은, 하기 반응식 2에 나타낸 바와 같이,

Alloc 보호기로 보호화된 라이신과 Fmoc 보호기로 보호화된 시스테인을 반응시켜 화학식 5로 표시되는 화합물을

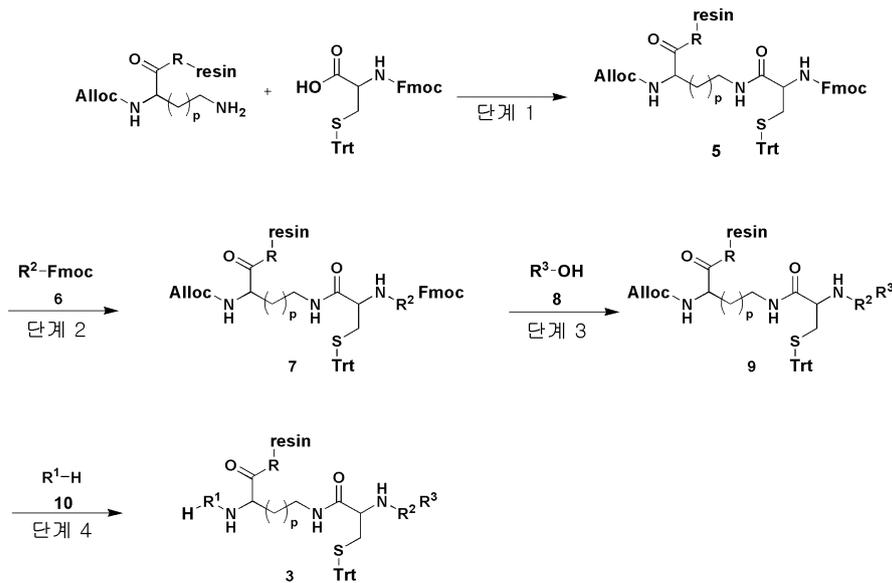
제조하는 단계(단계 1);

상기 단계 1에서 제조된 화학식 5의 화합물과 화학식 6으로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 7로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 2);

상기 단계 2에서 제조된 화학식 7의 화합물과 화학식 8로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 9로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 3); 및

상기 단계 3에서 제조된 화학식 9의 화합물과 화학식 10으로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 3으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 4)를 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법:

[반응식 2]



(상기 반응식 2에서,

상기 R, R¹, R², R³ 및 p는 제1항의 화학식 1에서 정의한 바와 같고;

resin은 왕 레진(Wang resin) 또는 메리필드 레진(Merrifield resin)이고;

Alloc은 알릴카바메이트이고;

Fmoc는 플루오레닐메틸옥시카보닐기이고; 및

Trt는 트리틸기이다).

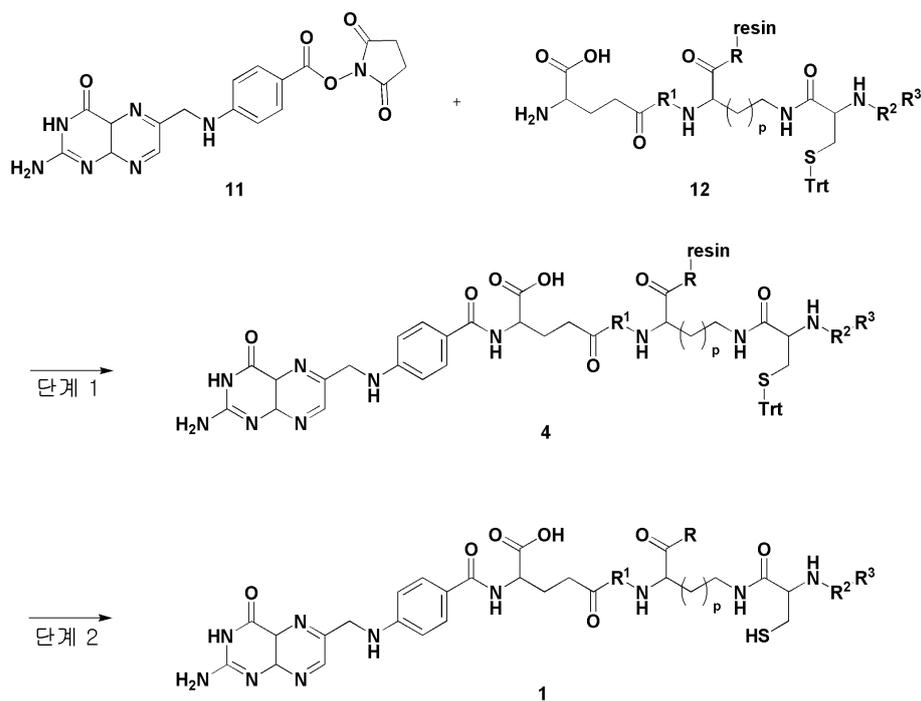
청구항 5

하기 반응식 3에 나타낸 바와 같이,

화학식 11의 프테로산 유도체와 화학식 12의 화합물을 반응시켜 화학식 4의 폴레이트 유도체를 제조하는 단계 (단계 1); 및

상기 단계 1에서 제조된 화학식 4의 폴레이트 유도체의 수지(resin)를 산 조건에서 제거하여 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계(단계 2)를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 제1항의 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체의 제조방법:

[반응식 3]



(상기 반응식 3에서,

상기 R, R¹, R², R³ 및 p는 제1항의 화학식 1에서 정의한 바와 같고;

resin은 왕 레진(Wang resin) 또는 메리필드 레진(Merrifield resin)이고; 및 Trt는 트리틸기이다).

청구항 6

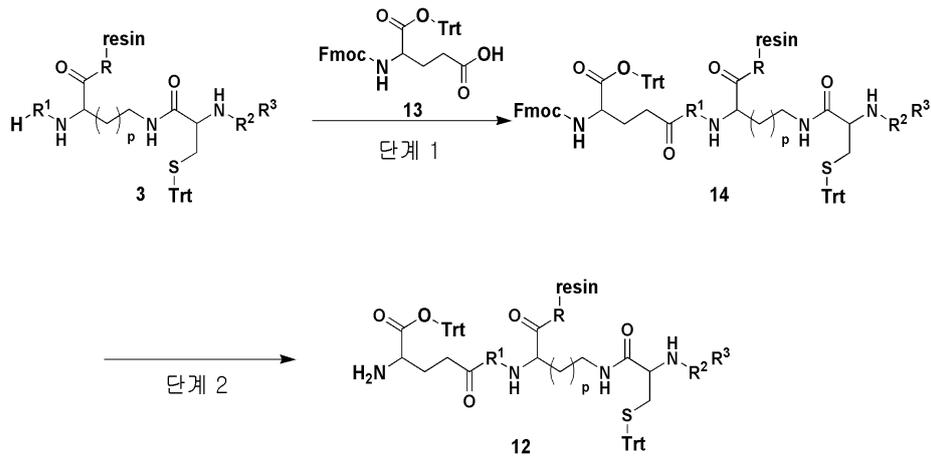
제5항에 있어서,

상기 화학식 12로 표시되는 화합물은 하기 반응식 4에 나타난 바와 같이,

화학식 3으로 표시되는 화합물과 화학식 13으로 표시되는 글루탐산을 결합반응시켜 화학식 14로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 1); 및

상기 단계 1에서 제조된 화학식 14의 화합물을 탈보호화하여 화학식 12로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 2)를 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법:

[반응식 4]



(상기 반응식 4에서,

상기 R, R¹, R², R³ 및 p는 제1항의 화학식 1에서 정의한 바와 같고;

resin은 왕 레진(Wang resin) 또는 메리필드 레진(Merrifield resin)이고;

Fmoc는 플루오레닐메틸옥시카보닐기이고; 및

Trt는 트리틸기이다).

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항의 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체에 테크네튬(^{99m}Tc)의 방사성 동위원소가 표시된 착화물.

청구항 9

삭제

청구항 10

제1항의 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체에 리간드 교환반응 키트를 사용하여 트렌스킬레이션 시키는 것을 특징으로 하는 테크네튬(^{99m}Tc)의 방사성 동위원소가 표시된 착화물의 제조방법.

청구항 11

제1항의 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체에 테크네튬(^{99m}Tc)의 방사성 동위원소가 표시된 착화물을 유효성분으로 함유하는 난소암 또는 자궁내막 중앙 진단용 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

제1항의 N_3S_1 형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체와 테크네튬(^{99m}Tc)의 방사성 동위원소가 표지된 착화물을 유효성분으로 함유하는 난소암 또는 자궁내막 종양 진단용 영상화장치에 사용되는 방사성 의약품.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 N_3S_1 형의 새로운 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체, 이의 제조방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 암 진단 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 폴레이트(Folate)는 RFC(Reduced Folate Carrier) 또는 폴레이트 수용체에 의한 엔도사이토시스(endocytosis)에 따라 세포 내로 유입되며, 일반적으로 α -폴레이트 수용체(α -Folate receptor, α -FR)는 난소(ovarian), 자궁내막(endometrial), 가슴(breast), 폐(lung), 신장(renal), 결장(colorectal), 비인두(nasopharyngeal) 및 결장 암(colon cancer) 등을 포함한 다양한 종양에서 과발현되고, 정상세포의 경우에는 비타민을 저장하고 이용하는 장기인 신장(Kidney), 폐(lung) 등의 일부에만 국한되어 존재하고 있다.

[0003] 폴레이트가 가장 많이 발현되는 종양으로는 난소암(ovarian carcinoma) 및 자궁내막 종양(endometrial carcinoma)이 있고, 이는 암 환자의 90% 이상에서 발현되는 것으로 알려져 있다. 이에, 종양에 과발현되어있는 α -폴레이트 수용체(α -FR)를 표적화하여 약물을 효과적으로 암세포에 전달하고 암을 영상화하기 위한 다양한 시도들이 이루어져 왔다.

[0004] α -폴레이트 수용체(α -FR)는 높은 친화력을 가진 막결합성 종양관련 항원으로 잘 알려져 있으며, 분자량 38 내지 40 kDa의 막 글리코프로테인과 결합된 글리코실포스파티딜이노시톨(glycosylphosphatidylinositol, GPI)로써, α -폴레이트 수용체(α -FR)는 폴릭산과 높은 친화력을 가지고 결합하는데 폴레이트 수용체의 α -아형(isoform)의 경우, 폴릭산과의 해리상수(K_d)가 약 0.1 nM로 매우 낮고, 환원된 형태의 폴레이트인 5-메틸테트라하이드로폴레이트 등의 유도체의 해리상수보다는 약 10배 가량 낮은 특성을 보인다.

[0005] 한편, 폴레이트 수용체와 높은 친화성을 갖는 화합물인 폴릭산은 γ -카르복실기를 통하여 다른 분자에 공유결합으로 결합되었을 때 수용체 결합 특성을 유지할 수 있다.

[0006] 최근, 진단용 방사성 동위원소가 표지된 폴레이트 유도체인 Tc-99m-EC20 및 In-111-DTPA-Folate를 이용하여 신장 세포 양성 α -폴레이트 수용체(α -FR positive renal cell) 및 난소암(ovarian carcinoma)의 비침습적 영상 진단제가 성공적으로 임상 I 및 II상을 종료하였다.

[0007] 종양을 선택적으로 표적화할 수 있는 비침습적 영상화 방법은 영상을 취득함에 따라 원발 병소를 찾거나 수술중에 종양을 정확히 확인할 수 있고, 전이된 병소를 찾아내어 병기를 정확히 결정할 수 있으며, 또한 치료 후 반응을 관찰하고 재발 병소를 찾을 수 있다.

[0008] 따라서, 방사성 동위원소를 이용하여 종양을 비침습적 방법으로 표적화하여 선택적으로 진단하거나 치료할 수 있게 된다면 그 가치는 더욱 커질 것이다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 α -폴레이트 수용체(α -FR)에 효과적으로 표적화되어 종양을 효과적으로 표적화하고, 비침습적인 방법으로 α -폴레이트 수용체 양성 종양을 진단하고 치료하기 위한 물질을 합성하고자 연구하던 중, 폴레이트 유도체를 합성하고 여기에 진단 및 치료용 방사성 동위원소를 표지할 수 있는 아미노산으로 구성된 N_3S_1

형태의 킬레이터(chelator)를 도입함으로써 양성 α-폴레이트 수용체(α-FR) 특성을 갖는 종양을 효과적으로 진단하고 치료할 수 있는 후보물질을 개발하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

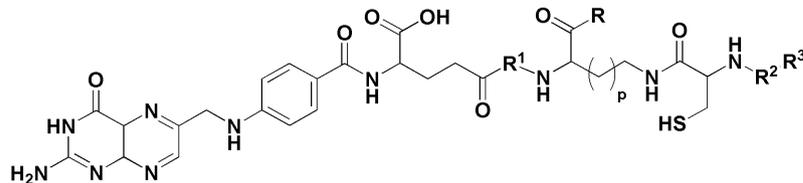
해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 아미노산으로 구성된 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공하는데 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체와 방사성 동위원소의 착화물을 제공하는데 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체와 방사성 동위원소의 착화물 유효성분으로 함유하는 암 진단 및 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체와 방사성 동위원소의 착화물 형성을 위한 키트를 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0016] [화학식 1]



- [0017]
- [0018] (상기 화학식에서, 상기 R, R¹, R², R³ 및 p는 본 명세서에서 정의한 바와 같다.)
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 제조방법을 제공한다.
- [0020] 나아가, 본 발명은 상기 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체와 방사성 동위원소의 착화물을 제공한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체와 방사성 동위원소의 착화물 유효성분으로 함유하는 암 진단 및 치료용 조성물을 제공한다.
- [0022] 나아가, 본 발명은 상기 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체와 방사성 동위원소의 착화물 형성을 위한 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0023]

본 발명에 의한 N_3S_1 형의 새로운 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 난소암 등의 α -폴레이트 수용체 (α -FR)가 발현되어 있는 종양에 수용체 결합을 이용하여 세포 내로 유입이 유용하다. 따라서, 상기 폴레이트 유도체에 테크네튬, 레늄 등의 방사성 동위원소를 표지하여 종양의 영상화 및 동위원소가 방출하는 방사선을 이용한 종양의 진단 및 치료에 유용하게 사용될 수 있으므로 다양한 방사성 의약품 표지에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024]

도 1은 본 발명의 실시예 1에서 N_3S_1 형의 새로운 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체인 PKCK-fo1 화합물의 LC/MS 결과를 나타낸 도면이다.

도 2는 본 발명의 실시예 8에 의한 ^{99m}Tc 를 표지한 상기 PKCK-fo1-OH 착화물의 HPLC 결과를 나타낸 도면이다.

도 3은 본 발명의 실시예 8에 의한 ^{99m}Tc 를 표지한 상기 PKCK-fo1-OH 착화물과 세럼을 24시간 배양한 후의 HPLC 결과를 나타낸 도면이다.

도 4는 본 발명의 실험예 1에 의한 폴레이트 수용체 양성 KB 종양세포에서의 ^{99m}Tc 가 표지된 PKCK-fo1-OH 착화물의 세포 결합력 및 내재화율을 나타낸 도면이다.

도 5는 본 발명의 실험예 3에 의한 ^{99m}Tc 가 표지된 PKCK-fo1-OH 착화물(185 Mbq, 5 mCi)의 체내 주사 3시간 후 KB 종양을 건넌 누드 쥐의 SPECT 이미지를 나타낸 도면이다.

도 6은 본 발명의 실험예 3에 의한 ^{99m}Tc 가 표지된 상기 PKCK-fo1-OH 착화물(185 Mbq, 5 mCi) 및 폴레이트 0.25 μ mol을 추가로 주사시킨 후 KB 종양을 건넌 누드 쥐의 SPECT 이미지를 나타낸 도면이다.

도 7은 본 발명의 실험예 3에 의한 ^{99m}Tc 가 표지된 상기 PKCK-fo1-OH 착화물의 체내 주사 18시간 후의 종양 및 신장 각각의 SPECT/CT의 3D 이미지를 나타낸 도면이다.

도 8은 본 발명의 실험예 3에 의한 KB 이종이식에 ^{99m}Tc -PKCK-fo1-OH 착화물을 주입한 후 1시간 후의 이미지를 나타낸 도면이다.

도 9는 본 발명의 실험예 3에 의한 폴레이트를 블라킹(blocking)하고 ^{99m}Tc -PKCK-fo1-OH 착화물을 주입한 후 1시간 후의 이미지를 나타낸 도면이다.

도 10은 본 발명의 실험예 3에 의한 KB 이종이식에 ^{99m}Tc -PKCK-fo1-OH 착화물을 주입한 후 3시간 후의 이미지를 나타낸 도면이다.

도 11은 본 발명의 실험예 3에 의한 폴레이트를 블라킹(blocking)하고 ^{99m}Tc -PKCK-fo1-OH 착화물을 주입한 후 3시간 후의 이미지를 나타낸 도면이다.

도 12는 본 발명의 실험예 3에 의한 KB 이종이식에 ^{99m}Tc -PKCK-fo1-OH 착화물을 주입한 후 18시간 후의 이미지를 나타낸 도면이다.

도 13은 본 발명의 실험예 3에 의한 폴레이트를 블라킹(blocking)하고 ^{99m}Tc -PKCK-fo1-OH 착화물을 주입한 후 18시간 후의 이미지를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

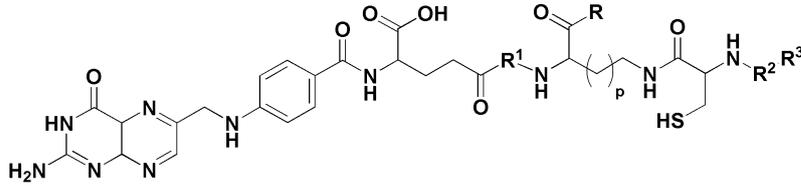
[0025]

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0026]

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 N_3S_1 형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체를 제공한다.

화학식 1



[0027]

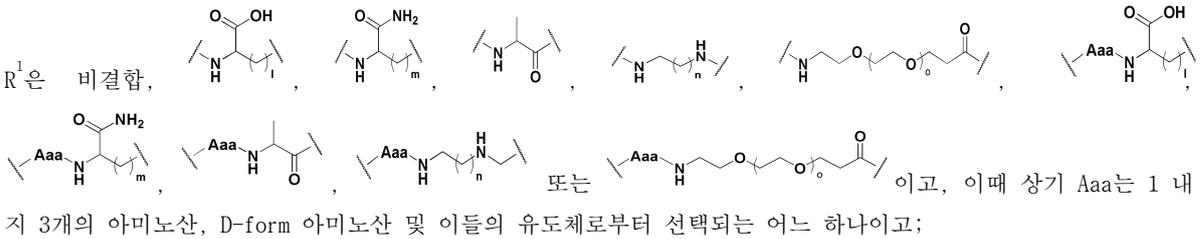
[0028]

상기 화학식 1에서,

[0029]

R은 하이드록시 또는 아민이고;

[0030]



[0031]

l은 1 내지 10의 정수이고;

[0032]

m은 1 내지 10의 정수이고;

[0033]

n은 1 내지 10의 정수이고;

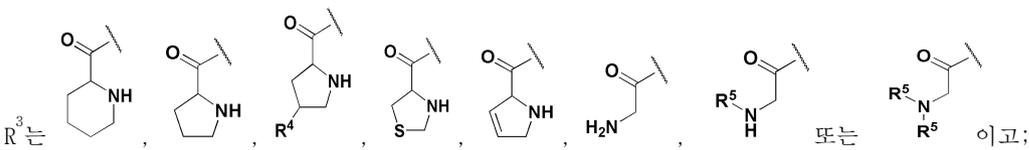
[0034]

o는 1 내지 20의 정수이고;

[0035]

R²는 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파탁산, 시스틴, 글루탐산, 글루타민, 글라이신, 히스티딘, 이소류신, 루신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산이고;

[0036]



[0037]

R⁴는 할로젠, 하이드록시, 아민이고;

[0038]

R⁵는 C₁ 내지 C₄의 알킬이고; 및

[0039]

p는 1 내지 10의 정수이다.

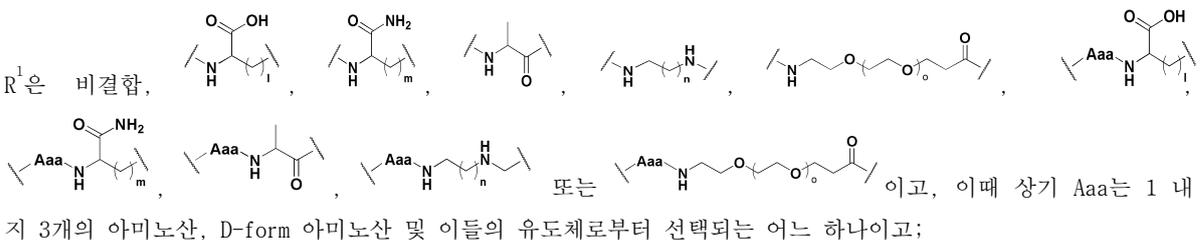
[0040]

바람직하게는,

[0041]

상기 R은 하이드록시 또는 아민이고;

[0042]



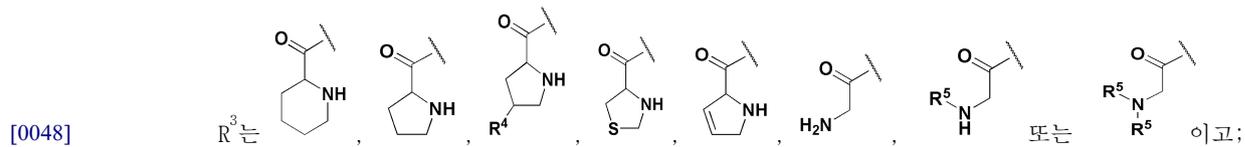
[0043] l은 1 내지 4의 정수이고;

[0044] m은 1 내지 4의 정수이고;

[0045] n은 1 내지 6의 정수이고;

[0046] o는 1 내지 10의 정수이고;

[0047] R²는 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파틱산, 시스틴, 글루타믹산, 글루타민, 글라이신, 히스티딘, 이소루신, 루신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산이고;



[0049] R⁴는 플루오로, 하이드록시, 아민이고;

[0050] R⁵는 메틸 또는 에틸이고; 및

[0051] p는 1 내지 4의 정수이다.

[0052] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 N₃S₁형의 새로운 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가 염이 유용하다. 약학적으로 허용가능한 염이란 표현은 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 화학식 1의 염기 화합물의 이로운 효능을 떨어뜨리지 않는 화학식 1의 염기 화합물의 어떠한 유기 또는 무기 부가염을 의미한다. 이들 염은 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 질산, 황산, 과염소산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 젖산, 말레산, 푸마린산, 글루콘산, 메탄설폰산, 글리콘산, 숙신산, 타타르산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산, 옥살산, (D) 또는 (L) 말산, 말레산, 메테인설폰산, 에테인설폰산, 4-톨루엔설폰산, 살리실산, 시트르산, 벤조산 또는 말론산 등을 사용할 수 있다. 또한, 이들 염은 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등) 및 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염 등) 등을 포함한다. 예를 들면, 산 부가염으로는 아세테이트, 아스파테이트, 벤즈에이트, 베실레이트, 바이카보네이트/카보네이트, 바이설페이트/설페이트, 보레이트, 캄실레이트, 시트레이트, 에디실레이트, 에실레이트, 포메이트, 푸마레이트, 글루셉테이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 헥사플루오로포스페이트, 하이벤제이트, 하이드로클로라이드/클로라이드, 하이드로브로마이드/브로마이드, 하이드로요오디드/요오디드, 이세티오네이트, 락테이트, 말레이트, 말리에이트, 말로네이트, 메실레이트, 메틸설페이트, 나프틸레이트, 2-나프실레이트, 니코티네이트, 나이트레이트, 오로테이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 포스페이트/수소 포스페이트/이수소 포스페이트, 사카레이트, 스테아레이트, 석시네이트, 타르트레이트, 토실레이트, 트리플루오로아세테이트, 알루미늄, 알기닌, 벤자틴, 갈슘, 콜린, 디에틸아민, 디올아민, 글라이신, 라이신, 마그네슘, 메글루민, 올아민, 칼륨, 나트륨, 트로메타민, 아연염 등이 포함될 수 있으며, 이들 중 하이드로클로라이드 또는 트리플루오로아세테이트가 바람직하다.

[0053] 또한, 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 N₃S₁형의 새로운 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체는 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 이성질체, 수화물 및 용매화물을 모두 포함한다.

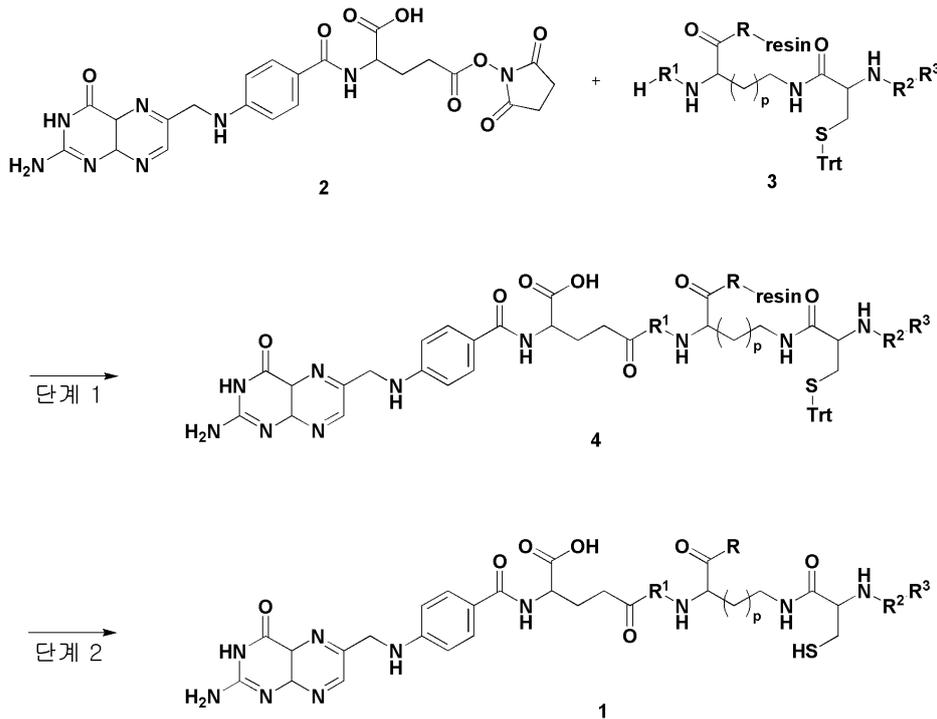
[0054] 본 발명에 따른 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있으며, 예를 들면 화학식 1의 화합물을 수혼화성 유기용매, 예를 들면 아세톤, 메탄올, 에탄올, 또는 아세트니트릴 등에 녹이고 과량의 유기산을 가하거나 무기산의 산 수용액의 가한 후 침전시키거나 결정화시켜서 제조할 수 있다. 이어서 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조시켜서 부가염을 얻거나 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.

[0055] 또한, 본 발명은 하기 반응식 1에 나타낸 바와 같이,

[0056] 화학식 2의 폴릭산 유도체와 화학식 3의 화합물을 반응시켜 화학식 4의 폴레이트 유도체를 제조하는 단계(단계 1); 및

[0057] 상기 단계 1에서 제조된 화학식 4의 폴레이트 유도체의 고체상 지지체인 수지(resin)를 산 조건에서 제거하여 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계(단계 2)를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체의 제조방법을 제공한다.

[0058] [반응식 1]



[0059]

[0060] (상기 반응식 1에서,

[0061] 상기 R, R¹, R², R³ 및 p는 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같고; resin은 고체상 지지체이고; 및 Trt는 트리틸기이다.)

[0062] 이하, 상기 제조방법을 단계별로 상세히 설명한다.

[0063] 먼저, 본 발명에 따른 상기 단계 1은 폴릭산 유도체와 화학식 3의 화합물을 결합반응시키는 단계으로, 보다 구체적으로는 폴릭산 유도체의 벤조에스테르기와 화학식 3의 화합물의 말단 아민과 결합반응을 시켜, 화학식 4로 표시되는 화합물을 제조하는 단계이다.

[0064] 이때, 결합반응은 다이이소프로필에틸아민 또는 트리에틸아민과 함께 아미드 결합시약으로 벤조트리아졸-1-일-옥시-트리스(다이메틸아미노)-포스포니움 헥사플루오로포스페이트(Py-BOP), 0-벤조트리아졸-N,N,N',N'-테트라메틸-유로니움-헥사플루오로-포스페이트(HBTU), 2-(7-아자-1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸유로니움 헥사플루오로포스페이트(HATU), 히드록시벤조트리아졸(HOBt), 디사이클로헥실카르보디이미드(DCC), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDC), 또는 카르보닐디이미다졸(CDI)을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 히드록시벤조트리아졸(HOBt) 및/또는 0-벤조트리아졸-N,N,N',N'-테트라메틸-유로니움-헥사플루오로-포스페이트(HBTU)를 사용할 수 있다.

[0065] 또한, 사용 가능한 유기용매로는 반응에 악영향을 미치지 않는 메탄올, 다이메틸포름아마이드(DMF), 다이메틸설폭사이드(DMSO), 테트라하이드로퓨란, 다이클로로메탄, 톨루엔 등을 이용하여 반응을 수행할 수 있고, 바람직하게는 다이메틸설폭사이드(DMSO) 또는 다이메틸포름아마이드(DMF)를 사용할 수 있다.

[0066] 다음으로, 본 발명에 따른 상기 단계 2는 단계 1에서 제조된 화학식 4의 화합물의 고체상 지지체인 레진 및 보호기를 제거하는 단계이다.

[0067] 이때, 상기 레진을 제거하기 위하여 TFA(Trifluoroacetic acid), TIS, EDT, 티오아니솔(Thioanisole) 및 물을 혼합하여 사용하는 것이 바람직하며, 효과적인 레진의 제거를 위하여 TFA, TIS, EDT, 티오아니솔 및 물의 첨가 비율을 TFA : TIS : EDT : 티오아니솔 : 물 = 90-92 : 2.0-2.5 : 2.0-2.5 : 2.0-2.5 : 2.0-2.5로 혼합하여 사용하는 것이 더욱 바람직하다.

[0068] 나아가, 본 발명은 하기 반응식 2에 나타난 바와 같이,

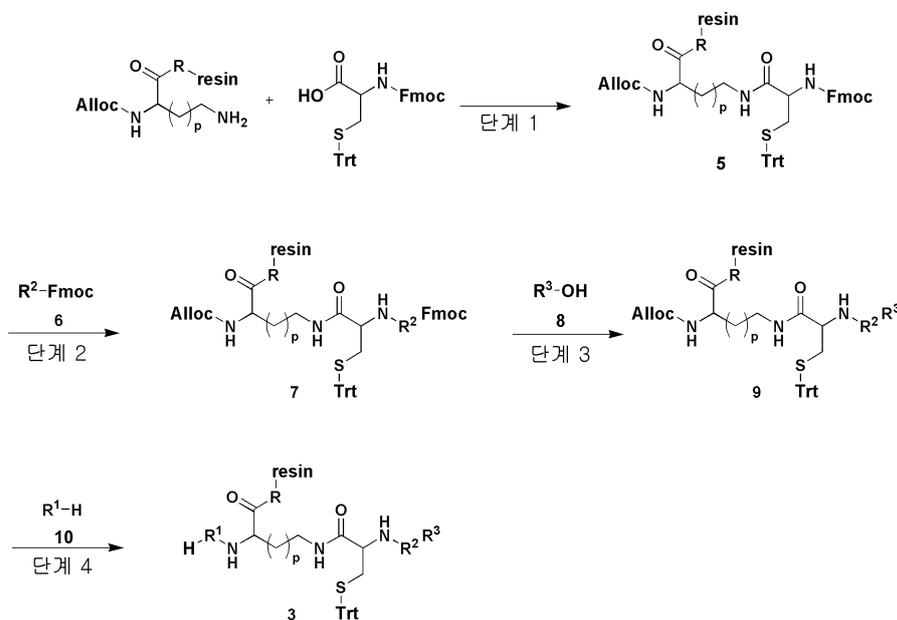
[0069] Alloc 보호기로 보호화된 라이신과 Fmoc 보호기로 보호화된 시스테인을 반응시켜 화학식 5로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 1);

[0070] 상기 단계 1에서 제조된 화학식 5의 화합물과 화학식 6으로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 7로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 2);

[0071] 상기 단계 2에서 제조된 화학식 7의 화합물과 화학식 8로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 9로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 3); 및

[0072] 상기 단계 3에서 제조된 화학식 9의 화합물과 화학식 10으로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 3으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 4)를 포함하여 이루어지는 상기 반응식 1의 화학식 3으로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다.

[0073] [반응식 2]



[0074] (상기 반응식 2에서,
[0075]

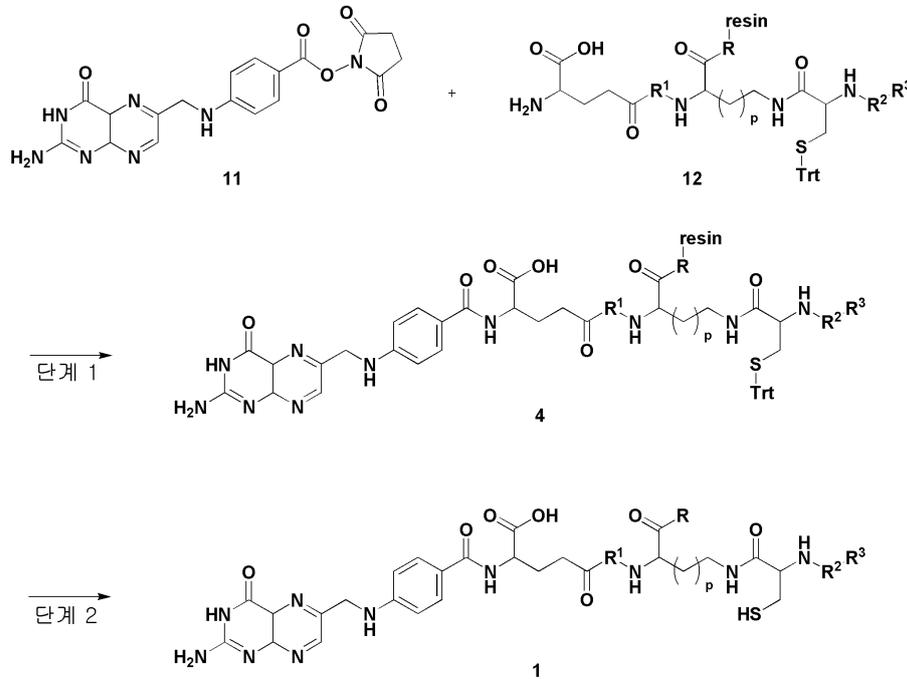
[0076] 상기 R, R¹, R², R³ 및 p는 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같고; resin은 고체상 지지체이고; Alloc은 알릴카바메이트이고; Fmoc는 플루오레닐메틸옥시카보닐기이고; 및 Trt는 트리틸기이다.)

- [0077] 이하, 상기 제조방법을 각 단계별로 상세히 설명한다.
- [0078] 먼저, 본 발명에 따른 상기 단계 1은 Alloc 보호기로 보호화된 라이신과 Fmoc 보호기로 보호화된 시스테인을 반응시켜 화학식 5로 표시되는 화합물을 제조하는 단계로서, 보다 구체적으로는 말단 아민이 Alloc 보호기로 보호화된 라이신의 다른 말단 아민과, 말단 아민은 Fmoc 보호기로, 싸이올은 트리틸(Trt) 보호기로 보호화된 시스테인의 카르복실산을 결합반응시켜 화학식 5의 화합물을 제조하는 단계이다.
- [0079] 이때, 결합반응은 다이이소프로필에틸아민 또는 트리에틸아민과 함께 아마이드 결합시약으로 벤조트리아졸-1-일-옥시-트리스(다이메틸아미노)-포스포니움 헥사플루오로포스페이트(Py-BOP), 0-벤조트리아졸-N,N,N',N'-테트라메틸-유로니움-헥사플루오로-포스페이트(HBTU), 2-(7-아자-1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸유로니움 헥사플루오로포스페이트(HATU), 히드록시벤조트리아졸(HOBT), 디사이클로헥실카르보디이미드(DCC), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDC), 또는 카르보닐디이미다졸(CDI)을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 히드록시벤조트리아졸(HOBT) 및/또는 0-벤조트리아졸-N,N,N',N'-테트라메틸-유로니움-헥사플루오로-포스페이트(HBTU)를 사용할 수 있다.
- [0080] 또한, 사용 가능한 유기용매로는 반응에 악영향을 미치지 않는 메탄올, 다이메틸포름아마이드, 다이메틸설폭사이드, 테트라하이드로퓨란, 다이클로로메탄, 톨루엔 등을 이용하여 반응을 수행할 수 있고, 바람직하게는 다이메틸설폭사이드 또는 다이메틸포름아마이드를 사용할 수 있다.
- [0081] 다음으로, 본 발명에 따른 상기 단계 2는 단계 1에서 제조된 화학식 5의 화합물과 화학식 6의 화합물을 반응시켜 화학식 7로 표시되는 화합물을 제조하는 단계로서, 보다 구체적으로는 상기 단계 1에서 제조된 화학식 5로 표시되는 화합물의 보호화된 말단 아민의 Fmoc 보호기를 제거한 다음, 비보호화된 말단 아민을 화학식 6의 화합물과 결합반응시켜 화학식 7의 화합물을 제조하는 단계이다.
- [0082] 이때, 상기 단계 2에서 화학식 5의 Fmoc 보호기를 제거하는 방법은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법을 사용할 수 있다.
- [0083] 또한, 본 반응의 조건은 상기 단계 1에서 상술한 바와 같다.
- [0084] 다음으로, 본 발명에 따른 상기 단계 3은 단계 2에서 제조된 화학식 7의 화합물과 화학식 8로 표시되는 화합물과 반응시켜 화학식 9로 표시되는 화합물을 제조하는 단계로서, 보다 구체적으로는 상기 단계 2에서 제조된 화학식 7로 표시되는 화합물의 보호화된 말단 아민의 Fmoc 보호기를 제거한 후, 비보호화된 말단 아민을 Fmoc 보호기로 보호화된 화학식 8로 표시되는 화합물과 결합반응시켜 화학식 9의 화합물을 제조하는 단계이다.
- [0085] 이때, 상기 단계에서 화학식 7의 Fmoc 보호기를 제거하는 방법은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법을 사용할 수 있다.
- [0086] 또한, 본 반응의 조건은 상기 단계 1에서 상술한 바와 같다.
- [0087] 다음으로, 본 발명에 따른 상기 단계 4는 단계 3에서 제조된 화학식 9의 화합물과 화학식 10으로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 3으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계로서, 보다 구체적으로는 상기 단계 3에서 제조된 화학식 9로 표시되는 화합물의 보호화된 말단 아민의 Alloc 보호기를 제거한 후, 비보호화된 말단 아민과 화학식 10의 화합물을 결합반응시켜 화학식 3으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계이다.
- [0088] 이때, 상기 단계에서는 화학식 9의 Alloc 보호기를 제거하는 방법은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법을 사용할 수 있다.
- [0089] 또한, 본 반응의 조건은 상기 단계 1에서 상술한 바와 같다.
- [0090] 또한, 본 발명은 하기 반응식 3에 나타낸 바와 같이,
- [0091] 화학식 11의 프테로산 유도체와 화학식 12의 화합물을 반응시켜 화학식 4의 플레이트 유도체를 제조하는 단계

(단계 1); 및

[0092] 상기 단계 1에서 제조된 화학식 4의 폴레이트 유도체의 고체상 지지체인 수지(resin)를 산 조건에서 제거하여 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계(단계 2)를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 N₃S₁형의 신규한 길레이터가 접합된 폴레이트 유도체의 제조방법을 제공한다.

[0093] [반응식 3]



[0094]

[0095] (상기 반응식 3에서,

[0096] 상기 R, R¹, R², R³ 및 p는 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같고; resin은 고체상 지지체이고; 및 Trt는 트리틸기이다.)

[0097] 이하, 상기 제조방법을 단계별로 상세히 설명한다.

[0098] 먼저, 본 발명에 따른 상기 단계 1은 화학식 11로 표시되는 폴릭산 유도체와 화학식 12로 표시되는 화합물을 결합반응시키는 단계로, 보다 구체적으로는 화학식 11의 폴릭산 유도체의 벤조에스터기와 화학식 12의 화합물의 말단 아민과 결합반응을 시켜, 화학식 4로 표시되는 화합물을 제조하는 단계이다.

[0099] 이때, 결합반응은 다이이소프로필에틸아민 또는 트리에틸아민과 함께 amid 결합시약으로 벤조트리아졸-1-일-옥시-트리스(다이메틸아미노)-포스포니움 헥사플루오로포스페이트(Py-BOP), 0-벤조트리아졸-N,N,N',N'-테트라메틸-유로니움-헥사플루오로-포스페이트(HBTU), 2-(7-아자-1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸유로니움 헥사플루오로포스페이트(HATU), 히드록시벤조트리아졸(HOBt), 디사이클로헥실카르보디이미드(DCC), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDC), 또는 카르보닐디이미다졸(CDI)을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 히드록시벤조트리아졸(HOBt) 및/또는 0-벤조트리아졸-N,N,N',N'-테트라메틸-유로니움-헥사플루오로-포스페이트(HBTU)를 사용할 수 있다.

[0100] 또한, 사용 가능한 유기용매로는 반응에 악영향을 미치지 않는 메탄올, 다이메틸포름아마이드, 다이메틸설폭사이드, 테트라하이드로퓨란, 다이클로로메탄, 톨루엔 등을 이용하여 반응을 수행할 수 있고, 바람직하게는 다이메틸설폭사이드 또는 다이메틸포름아마이드를 사용할 수 있다.

[0101] 다음으로, 본 발명에 따른 상기 단계 2는 단계 1에서 제조된 화학식 4의 화합물의 고체상 지지체인 레진 및 보호기를 제거하는 단계이다.

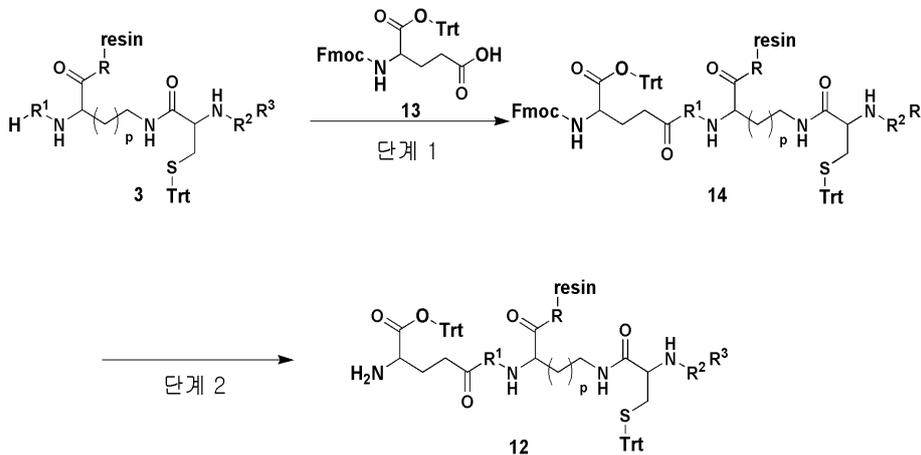
[0102] 이때, 상기 레진을 제거하기 위하여 TFA(Trifluoroacetic acid), TIS, EDT, 티오아니솔(Thioanisole) 및 물을 혼합하여 사용하는 것이 바람직하며, 효과적인 레진의 제거를 위하여 TFA, TIS, EDT, 티오아니솔 및 물의 첨가 비율을 TFA : TIS : EDT : 티오아니솔 : 물 = 90-92 : 2.0-2.5 : 2.0-2.5 : 2.0-2.5 : 2.0-2.5로 혼합하여 사용하는 것이 더욱 바람직하다.

[0103] 나아가, 본 발명은 하기 반응식 4에 나타난 바와 같이,

[0104] 화학식 3으로 표시되는 화합물과 화학식 13으로 표시되는 글루탐산을 결합반응시켜 화학식 14로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 1); 및

[0105] 상기 단계 1에서 제조된 화학식 14의 화합물을 탈보호화하여 화학식 12로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 2)를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 플레이트 유도체의 제조방법을 제공한다.

[0106] [반응식 4]



[0107]

[0108] (상기 반응식 4에서,

[0109] 상기 R, R¹, R², R³ 및 p는 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같고; resin은 고체상 지지체이고; Fmoc는 플루오레닐메틸옥시카보닐기이고; 및 Trt는 트리틸기이다.)

[0110] 이하, 상기 제조방법을 각 단계별로 상세히 설명한다.

[0111] 먼저, 본 발명에 따른 상기 단계 1은 화학식 3으로 표시되는 화합물과 화학식 13으로 표시되는 글루탐산을 결합반응시켜 화학식 14로 표시되는 화합물을 제조하는 단계로서, 보다 구체적으로는 화학식 3으로 표시되는 화합물의 말단 R¹과 화학식 13의 글루탐산의 카르복실산과 결합반응하여 화학식 14의 화합물을 제조하는 단계이다.

[0112] 이때, 결합반응은 다이이소프로필에틸아민 또는 트리에틸아민과 함께 amid 결합시약으로 벤조트리아졸-1-일-옥시-트리스(다이메틸아미노)-포스포늄 헥사플루오로포스페이트(Py-BOP), 0-벤조트리아졸-N,N,N',N'-테트라메틸-유로니움-헥사플루오로-포스페이트(HBTU), 2-(7-아자-1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸유로니움 헥사플루오로포스페이트(HATU), 히드록시벤조트리아졸(HOBT), 디사이클로헥실카르보디이미드(DCC), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDC), 또는 카르보닐디이미다졸(CDI)을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 히드록시벤조트리아졸(HOBT) 및/또는 0-벤조트리아졸-N,N,N',N'-테트라메틸-유로니움-헥사플루오로-포스페이트(HBTU)를 사용할 수 있다.

[0113] 또한, 사용 가능한 유기용매로는 반응에 악영향을 미치지 않는 메탄올, 다이메틸포름아마이드, 다이메틸설폭사이드, 테트라하이드로퓨란, 다이클로로메탄, 톨루엔 등을 이용하여 반응을 수행할 수 있고, 바람직하게는 다이메틸설폭사이드 또는 다이메틸포름아마이드를 사용할 수 있다.

[0114] 다음으로, 본 발명에 따른 상기 단계 2는 단계 1에서 제조된 화학식 5의 화합물과 화학식 6의 화합물을 반응시켜 화학식 7로 표시되는 화합물을 제조하는 단계로서, 보다 구체적으로는 상기 단계 1에서 제조된 화학식 5로 표시되는 화합물의 보호화된 말단 아민의 Fmoc 보호기를 제거한 다음, 비보호화된 말단 아민을 화학식 6의 화합물과 결합반응시켜 화학식 7의 화합물을 제조하는 단계이다.

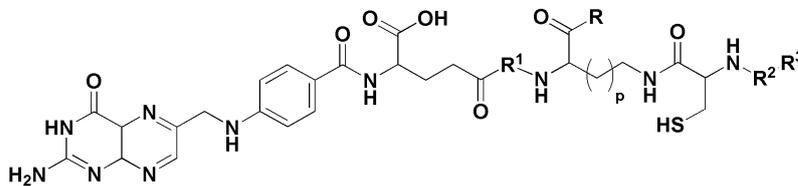
[0115] 다음으로, 본 발명에 따른 상기 단계 2는 단계 1에서 제조된 화학식 14로 표시되는 화합물을 탈보호화하여 화학식 12로 표시되는 화합물을 제조하는 단계로서, 보다 구체적으로는 단계 1에서 제조된 화학식 14로 표시되는 화합물의 보호화된 말단 아민의 보호기를 탈보호화하는 단계이다.

[0116] 이때, 상기 단계에서는 화학식 5의 Fmoc 보호기를 제거하는 방법은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법을 사용할 수 있다.

[0117] 본 발명에 따른 플레이트 유도체의 제조방법에 있어서, 상기 고체상 지지체인 레진(resin)은 플레이트 유도체에 도입되는 아미노산의 카르복실산 그룹과 결합하여 사용하는 것으로, 바람직하게는, 왕 레진(Wang resin) 또는 메리필드 레진(Merrifield resin, MBHA)을 사용할 수 있다.

[0118] 이때, 왕 레진(Wang resin)을 사용할 경우, 레진의 탈착하면 하기 화학식 1의 R기는 하이드록시기가 도입되며, 메리필드 레진(Merrifield resin, MBHA resin)을 사용할 경우, 레진을 탈착하면 아민기가 도입된다.

[0119] [화학식 1]



[0120] (상기 화학식 1에서, R, R¹, R², R³ 및 p는 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같다).

[0122] 또한, 본 발명은 방사성 동위원소가 표시된 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 플레이트 착화물을 제공한다.

[0123] 본 발명에 따른 방사성 동위원소가 표시된 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 플레이트 착화물에 있어서, 상기 방사성 동위원소는 생체 내에 존재시 MRI, CT, 감마카메라 등으로 검출될 수 있는 성질을 가지는 금속 및 전이 금속 이온 및 방사선을 방출하는 방사성 동위원소를 포함한다. 예를 들면, 스칸듐-47(Sc-47), 구리-64(Cu-64), 갈륨-67(Ga-67), 갈륨-68(Ga-68), 이트륨-86(Y-86), 이트륨-90(Y-90), 테크네튬-99m(Tc-99m), 인듐-111(In-111), 프롬튬-149(Pm-149), 사마륨-153(Sm-153), 디스프로슘-165(Dy-165), 홀뮴-166(Ho-166), 어븀-169(Er-169), 루테튬-177(Lu-177), 레늄-186(Re-186), 레늄-188(Re-188) 및 비스무트-212(Bi-212)로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는 테크네튬-99m(Tc-99m), 레늄-186(Re-186) 또는 레늄-188(Re-188)을 사용할 수 있다.

[0124] 나아가, 본 발명은 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 플레이트 유도체에 방사성 동위원소가 표시된 착화물의 제조방법을 제공한다.

[0125] 상기 방사성 동위원소의 표지는 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 플레이트 유도체에 글루코헵토네이트(GH,

Glucoheptonate), 글루코네이트(Gluconate), EDTA, 타르타르산(Tartrate), 피로포스페이트(Pyrophosphate) 등을 리간드 교환반응 키트로 활용하여 트랜스킬레이션시켜 수행될 수 있다.

[0126] 제조된 N_3S_1 형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체에 방사성 동위원소가 표시된 착화물은 1 nmol 농도 수준에서도 정제과정 없이 98% 이상의 높은 수율로 제조될 수 있다(실시예 8 참조).

[0127] 또한, 본 발명은 상기 N_3S_1 형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체와 방사성 동위원소의 착화물을 유효 성분으로 함유하는 암 진단 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0128] 이렇게 제조된 N_3S_1 형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체는 방사 화학적 순도 98% 이상 및 표지 효율이 37 GBq/ μ mol로 매우 높고(도 2 참조), 생체의 안정성이 96% 이상으로 좋으며(도 3 참조), 세포 친화력 및 내재화율의 경우 시간의존적으로 높아지므로(도 4 참조) 의료영상장비를 이용한 암 진단 또는 방사성 동위원소가 방출하는 에너지를 이용한 암의 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

[0129] 본 발명의 조성물을 의약품으로 사용하는 경우, 상기 방사성 동위원소가 표시된 N_3S_1 형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 착화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 임상투여시에 제제화되어 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0130] 상기 화학식 1로 표시되는 유도체에 방사성 동위원소를 표시하여 제조된 착화물을 유효 성분으로 하는 약학적 조성물은 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사를 주입하는 방법에 의한다.

[0131] 이때, 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여, 상기 방사성 동위원소가 표시된 N_3S_1 형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 착화물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 안정제 또는 완충제와 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알 단위 투여형으로 제조할 수 있다. 상기 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제, 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다.

[0132] 상기 방사성 동위원소가 표시된 N_3S_1 형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 착화물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 바람직하게는 0.01 내지 200 mg/kg/일의 양으로 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격을 1일 수회, 바람직하게는 1일 1회 내지 3회로 분할하여 경구 또는 비경구적 경로를 통해 투여할 수 있다.

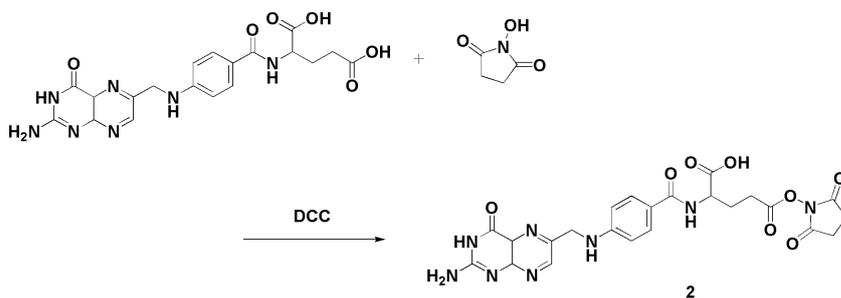
[0133] 나아가, 본 발명은 상기 N_3S_1 형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체와 방사성 동위원소의 착화물 형성을 위한 키트를 제공한다. 구체적으로 상기 키트는 비발열성 멸균 형태의 테크네튬 또는 레늄 표지 방사성 의약품 제조용 키트이고, 상기 N_3S_1 형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체에 방사성 동위원소 착화합물을 이용한 테크네튬 또는 레늄 표지를 편리하게 하기 위하여 미리 N_3S_1 형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 유도체와 적당한 완충용액을 액체 상태로 첨가하여 약학적으로 바람직한 멸균 바이알에 분주하여 밀봉한 채 사용하거나 냉장, 냉동 또는 냉동 건조시켜 보관한 후 필요시에 사용할 수 있다.

[0134] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의하여 상세하게 설명한다.

[0135] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0136] <제조예 1> 폴릭산 유도체의 제조

[0137] [반응식 5]

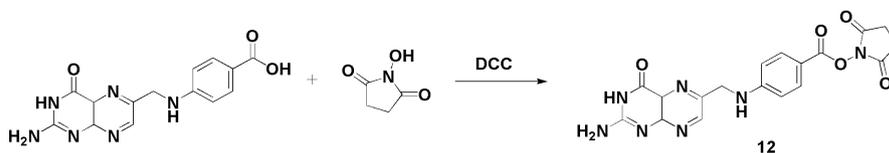


[0138]

[0139] 화학식 2로 표시되는 폴릭산 유도체는 상기 반응식 5에 나타난 바와 같이, 유기합성 분야에서 통용되는 일반적인 방법으로 합성하거나, 상업적으로 시판되는 것을 사용할 수 있다.

[0140] <제조예 2> 프테로산 유도체의 제조

[0141] [반응식 6]



[0142]

[0143] 화학식 12로 표시되는 프테로산 유도체는 상기 반응식 6에 나타난 바와 같이, 유기합성 분야에서 통용되는 일반적인 방법으로 합성하거나, 상업적으로 시판되는 것을 사용할 수 있다.

[0144] <제조예 3> P(Boc)-K(Boc)-C(Trt)-K-왕 레진(Wang resin)의 제조

[0145] 왕 레진(Wang resin)을 다이메틸포름아마이드(DMF)로 세척한 후, 1.0M 히드록시벤조트리아졸 용액(HOBt, 다이메틸포름아마이드 용액)으로 세척하였다. 이후, Alloc-Lys(Fmoc)-OH(1 mmol), 히드록시벤조트리아졸(3 mmol), 0-벤조트리아졸-N,N,N',N'-테트라메틸-유로니움-헥사플루오로-포스페이트(HBTU, 3 mmol), 다이이소프로필에틸아민(6 mmol)과 함께 다이메틸포름아마이드에 용해시킨 다음, 2시간 동안 교반하였다. 그 후, 레진을 다이메틸포름아마이드, 다이클로로메탄, 다이메틸포름아마이드 순으로 세척한 다음, 20% 피페리딘이 포함된 다이메틸포름아마이드 용액에 용해시키고, 10분간 교반하였다. 교반이 끝난 후, 다이메틸포름아마이드로 세척하였다. 다음으로, 상기 레진에 Fmoc-Cys(Trt)-OH(3 mmol), 히드록시벤조트리아졸(HOBt, 3 mmol), 0-벤조트리아졸-N,N,N',N'-테트라메틸-유로니움-헥사플루오로-포스페이트(HBTU, 3 mmol), 다이이소프로필에틸아민(6 mmol)과 함께 다이메틸포름아마이드에 용해시키고, 3시간 동안 교반하였다. 그 후, 차례로 Fmoc 보호기로 말단 아민이 포화화된 Lys(Boc)-OH, Pro(Boc)-OH를 순서대로 첨가하여 반응을 수행하였다. 각 과정이 완료되면, 다이클로로메탄에 테트라키스(트라이페닐포스핀)팔라듐(0)과 1,3-다이메틸바비튜릭산을 함께 첨가하여 2시간 동안 교반하고, 세척한 다음, 별도의 정제없이 목적화합물을 얻었다.

[0146] <제조예 4> P(Boc)-K(Boc)-C(Trt)-K-E(Trt)-왕 레진(Wang resin)의 제조

[0147] 상기 제조예 3에서 제조된 P(Boc)-K(Boc)-C(Trt)-K-왕 레진(Wang resin)을 다이메틸포름아마이드에 용해시킨 다음, Fmoc-Glu(Trt)-OH(3 mmol), 히드록시벤조트리아졸(HOBt, 3 mmol), 0-벤조트리아졸-N,N,N',N'-테트라메틸-유로니움-헥사플루오로-포스페이트(HBTU, 3 mmol), 다이이소프로필에틸아민(6 mmol)을 첨가하고, 3시간 동안 교반하였다. 그 후, 반응물을 다이메틸포름아마이드, 다이클로로메탄, 다이메틸포름아마이드 순으로 세척하고, 별도의 정제없이 목적화합물을 얻었다.

[0148] <제조예 5> P(Boc)-K(Boc)-C(Trt)-K-E(Trt)-E(Trt)-왕 레진(Wang resin)의 제조

[0149] P(Boc)-K(Boc)-C(Trt)-K-왕 레진(Wang resin) 대신에 제조예 4에서 제조된 P(Boc)-K(Boc)-C(Trt)-K-E(Trt)-왕 레진(Wang resin)을 사용하는 것을 제외하고는, 상기 제조예 4와 동일한 방법으로 수행하여 목적화합물을 얻었다.

[0150] <제조예 6> P(Boc)-(FITC)K(Boc)-C(Trt)-K-E(Trt)-왕 레진(Wang resin)의 제조

[0151] 단계 1: P(Boc)-K(FITC)-C(Trt)-K-왕 레진(Wang resin)의 제조

[0152] Alloc-Lys(Fmoc)-OH 대신에 Fmoc-Lys(Mtt)-OH를 사용하되, Fmoc-Lys(Mtt)-OH의 Mtt 보호기를 제거한 후 FITC를 도입한 Fmoc-Lys(FITC)-OH를 사용하는 것을 제외하고는 상기 제조예 3과 동일한 방법으로 수행하여 목적화합물을 얻었다.

[0153] 단계 2: P(Boc)-(FITC)K(Boc)-C(Trt)-K-E(Trt)-왕 레진(Wang resin)의 제조

[0154] 상기 단계 1에서 제조된 P(Boc)-K(FITC)-C(Trt)-K-왕 레진(Wang resin)을 다이메틸포르아마이드에 용해시킨 다음, Fmoc-Glu(Trt)-OH(3 mmol), 히드록시벤조트리아졸(HOBt, 3 mmol), O-벤조트리아졸-N,N,N',N'-테트라메틸-유로니움-헥사플루오로-포스페이트(HBTU, 3 mmol), 다이이소프로필에틸아민(6 mmol)을 첨가하고, 3시간 동안 교반하였다. 그 후, 반응물을 다이메틸포르아마이드, 다이클로로메탄, 다이메틸포르아마이드 순으로 세척하여 별도의 정제없이 목적화합물을 얻었다.

[0155] <제조예 7> P(Boc)-S(t-Bu)-C(Trt)-K-(Beta-A)-E(Trt)-왕 레진(Wang resin)의 제조

[0156] 왕(Wang) 레진을 다이메틸포르아마이드(DMF)로 세척한 후, 1.0M 히드록시벤조트리아졸 용액(HOBt, 다이메틸포르아마이드 용액)으로 세척하였다. 이후, Alloc-Lys(Fmoc)-OH(1 mmol), 히드록시벤조트리아졸(3 mmol), O-벤조트리아졸-N,N,N',N'-테트라메틸-유로니움-헥사플루오로-포스페이트(HBTU, 3 mmol), 다이이소프로필에틸아민(6 mmol)과 함께 다이메틸포르아마이드에 용해시킨 다음, 2시간 동안 교반하였다. 그 후, 레진을 다이메틸포르아마이드, 다이클로로메탄, 다이메틸포르아마이드 순으로 세척한 다음, 20% 피페리딘이 포함된 다이메틸포르아마이드 용액에 용해시키고, 10분간 교반하였다. 교반이 끝난 후, 다이메틸포르아마이드로 세척하였다. 다음으로, 상기 레진에 Fmoc-(Beta-Ala)-OH(6 mmol), 히드록시벤조트리아졸(3 mmol), O-벤조트리아졸-N,N,N',N'-테트라메틸-유로니움-헥사플루오로-포스페이트(HBTU, 3 mmol), 다이이소프로필에틸아민(6 mmol)과 함께 다이메틸포르아마이드에 용해시킨 다음, 3시간 동안 교반하였다. 그 후, 차례로 Fmoc 보호기로 말단 아민이 포화화된 Cys(Trt)-OH, Ser(t-Bu)-OH, Pro(Boc)-OH를 순서대로 첨가하여 반응을 수행하였다. 각 과정이 완료되면, 다이클로로메탄에 테트라키스(트라이페닐포스핀)팔라듐(0)과 1,3-다이메틸바비튜릭산을 함께 첨가하여 2시간 동안 교반하고, 세척한 다음, 별도의 정제없이 목적화합물을 얻었다.

[0157] <제조예 8> P(Boc)-D(t-Bu)-C(Trt)-K-(miniPEG)-E(Trt)-MBHA 레진(MBHA resin)의 제조

[0158] MBHA 레진을 다이메틸포르아마이드(DMF)로 세척한 후, 1.0M 히드록시벤조트리아졸 용액(HOBt, 다이메틸포르아마이드 용액)으로 세척하였다. 이후, Alloc-Lys(Fmoc)-OH(1 mmol), 히드록시벤조트리아졸(HOBt, 3 mmol), O-벤조트리아졸-N,N,N',N'-테트라메틸-유로니움-헥사플루오로-포스페이트(HBTU, 3 mmol), 다이이소프로필에틸아민(6 mmol)과 함께 다이메틸포르아마이드에 용해시킨 다음, 2시간 동안 교반하였다. 그 후, 레진을 다이메틸포르아마이드, 다이클로로메탄, 다이메틸포르아마이드 순으로 세척한 다음, 20% 피페리딘이 포함된 다이메틸포르아마이드 용액에 용해시키고, 10분간 교반하였다. 교반이 끝난 후, 다이메틸포르아마이드로 세척하였다. 다음으로, 상기 레진에 Fmoc-miniPEG-OH(3 mmol), 히드록시벤조트리아졸(3 mmol), O-벤조트리아졸-N,N,N',N'-테트라메틸-유로니움-헥사플루오로-포스페이트(HBTU, 3 mmol), 다이이소프로필에틸아민(6 mmol)과 함께 다이메틸포르아마이드에 용해시킨 다음, 3시간 동안 교반하였다. 그 후, 차례로 Fmoc 보호기로 말단 아민이 포화화된 Cys(Trt)-OH, Asp(t-Bu)-OH, Pro(Boc)-OH를 순서대로 첨가하여 반응을 수행하였다. 각 과정이 완료되면, 다이클로로메탄에 테트라키스(트라이페닐포스핀)팔라듐(0)과 1,3-다이메틸바비튜릭산을 함께 첨가하여 2시간 동안 교반하고, 세척한 다음, 별도의 정제없이 목적화합물을 얻었다.

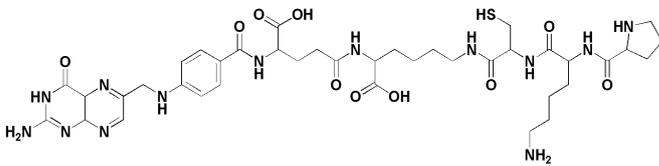
[0159] <제조예 9> P(Boc)-K(Boc)-C(Trt)-K-MBHA 레진(MBHA resin)의 제조

[0160] 왕 레진(Wang resin) 대신에 MBHA 레진(MBHA resin)을 사용하는 것을 제외하고는 상기 제조예 3과 동일한 방법으로 수행하여 목적화합물을 얻었다.

[0161] <제조예 10> P(Boc)-K(Boc)-C(Trt)-K-E(Trt)-MBHA 레진(MBHA resin)의 제조

[0162] P(Boc)-K(Boc)-C(Trt)-K-왕 레진(Wang resin) 대신에 제조예 9에서 제조된 P(Boc)-K(Boc)-C(Trt)-K-MBHA 레진(MBHA resin)을 사용하는 것을 제외하고는 상기 제조예 4와 동일한 방법으로 수행하여 목적화합물을 얻었다.

[0163] <실시예 1> PKCK-Fol-OH의 제조-1



[0164] 단계 1: P(Boc)-K(Boc)-C(Trt)-K-왕 레진(Wang resin)-Fol의 제조

[0166] 상기 제조예 1에서 제조된 플레이트 유도체(1 mmol) 또는 플레이트(1 mmol)를 다이메틸설폭사이드(20 ml)에 용해시킨 후, 상기 제조예 3에서 제조된 P(Boc)-K(Boc)-C(Trt)-K-왕 레진(Wang resin)(0.3 mmol), 히드록시벤조트리아졸(HOBt, 1 mmol), O-벤조트리아졸-N,N,N',N'-테트라메틸-유로늄-헥사플루오로-포스페이트(HBTU, 1 mmol), 다이이소프로필에틸아민(1 mmol)을 첨가하여 상온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 종료 후, 반응생성물을 다이메틸포름아마이드, 다이클로로메탄, 다이메틸포름아마이드 순으로 세척하여, 별도의 정제없이 목적화합물을 얻었다.

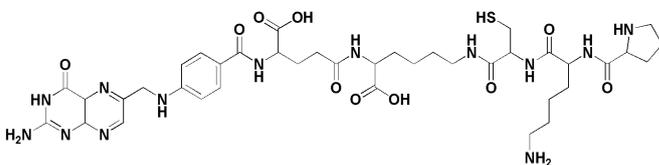
[0167] 단계 2: PKCK-Fol-OH의 제조

[0168] 상기 단계 1에서 제조된 P(Boc)-K(Boc)-C(Trt)-K-왕 레진(Wang resin)-Fol을 TFA : TIS : EDT : 티오아니솔(Thioanisole) : 물 = 90 : 2.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5의 혼합용액(20 ml)에 용해시킨 다음, 상온에서 2시간 동안 교반하였다. 상기 혼합물을 고성능 액체크로마토그래피(HPLC, SHIMASU prominence HPLC)를 이용하여 정제하였다. 이때, 상기 고성능 액체크로마토그래피는 시세이도-팩 18C 컬럼(Shiseido capcell-pak 18C column)을 사용하였으며, 이동상은 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA)을 함유한 물(A) 및 0.1%의 TFA를 함유한 아세트나이트릴(B)로 구성되었다. 상기 농도구배는 A용매 100%부터 90%까지 2분 동안 흘린 후, 90%부터 60%까지 10분 동안 흘리고, 60%부터 30%까지 2분, 30% 3분 및 30%부터 100%까지 3분간 1 ml/min의 유속으로 흘려주었다.

[0169] 얻어진 혼합 용액을 5 °C 다이에틸에테르를 과량 처리하여 침전물을 생성시켰다. 이렇게 얻어진 침전물을 원심 분리하여, 트리플루오로아세트산을 제거하고 침전물을 얻었다. 이 과정을 2번 추가 반복하여 고형화된 PKCK-Fol-OH를 얻었다.

[0170] Mass(m/z) : 측정값: 898 (계산값: 898.02).

[0171] <실시예 2> PKCK-Fol-OH의 제조-2



[0172] - 23 -

[0173] 단계 1: P(Boc)-K(Boc)-C(Trt)-K-E(Trt)-왕 레진(Wang resin)-프테로산의 제조

[0174] 상기 제조예 2에서 제조된 프테로산 유도체(0.15 mmol) 또는 프테로산(0.15 mmol)을 다이메틸설폭사이드(20 ml)에 용해시킨 후, 상기 제조예 4에서 제조된 P(Boc)-K(Boc)-C(Trt)-K-E(Trt)-왕 레진(Wang resin)(0.05 mmol), 히드록시벤조트리아졸(HOBt, 0.15 mmol), 0-벤조트리아졸-N,N,N',N'-테트라메틸-유로니움-헥사플루오로포스페이트(HBTU, 0.15 mmol), 다이이소프로필에틸아민(0.15 mmol)을 첨가하여 상온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 종료 후, resin을 다이메틸포름아마이드, 다이클로로메탄, 다이메틸포름아마이드 순으로 세척하여, 별도의 정제없이 목적화합물을 얻었다.

[0175] 단계 2: PKCK-Fo1-OH의 제조

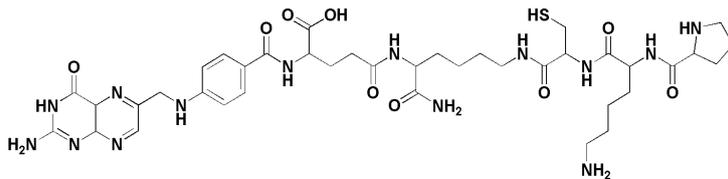
[0176] 상기 단계 1에서 제조된 P(Boc)-K(Boc)-C(Trt)-K-E(Trt)-왕 레진(Wang resin)-프테로산을 TFA : TIS : EDT : 티오아니솔(Thioanisole) : 물 = 90 : 2.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5의 혼합용액(20 ml)에 용해시킨 다음, 상온에서 2시간 동안 교반하였다. 상기 혼합물을 고성능 액체크로마토그래피(HPLC, SHIMASU prominence HPLC)를 이용하여 정제하였다. 이때, 상기 고성능 액체크로마토그래피는 시세이도-팩 18C 컬럼(Shiseido capcell-pak 18C column)을 사용하였으며, 이동상은 0.1% 트리플루오르아세트산(TFA)을 함유한 물(A) 및 0.1%의 TFA를 함유한 아세트나이트릴(B)로 구성되었다. 상기 농도구배는 A용매 100%부터 90%까지 2분 동안 흘린 후, 90%부터 60%까지 10분 동안 흘리고, 60%부터 30%까지 2분, 30% 3분 및 30%부터 100%까지 3분간 1 ml/min의 유속으로 흘려주었다.

[0177] 얻어진 혼합 용액을 5 °C 다이에틸에테르를 과량 처리하여 침전물을 생성시켰다. 이렇게 얻어진 침전물을 원심분리하여, TFA를 제거하고 침전물을 얻었다. 이 과정을 2번 추가 반복하여 고형화된 PKCK-Fo1-OH를 얻었다.

[0178] Mass(m/z) : 측정값: 898 (계산값: 898.02).

[0179] 이동상은 0.1% 트리플루오르아세트산(TFA)을 함유한 물(A) 및 0.1%의 TFA를 함유한 아세트나이트릴로 구성되었다. 상기 농도구배는 A용매 100%부터 90%까지 2분 동안 흘린 후, 90%부터 60%까지 10분 동안 흘리고, 60%부터 30%까지 2분, 30% 3분 및 30%부터 100%까지 3분간 1 ml/min의 유속으로 흘려주었다.

[0180] <실시예 3> PKCK-Fo1-NH₂의 제조

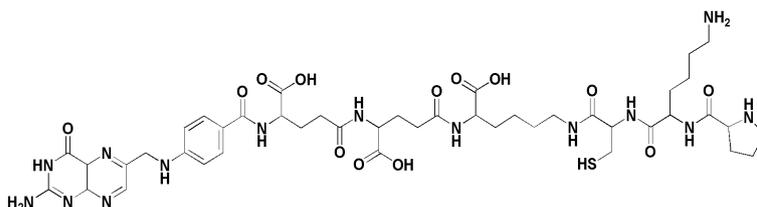


[0181]

[0182] 제조예 3에서 제조된 P(Boc)-K(Boc)-C(Trt)-K-왕 레진(Wang resin) 대신에 제조예 9에서 제조된 P(Boc)-K(Boc)-C(Trt)-K-MBHA 레진(MBHA resin)을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하여 목적화합물을 얻었다.

[0183] Mass(m/z) : 측정값: 911 (계산값: 911.06).

[0184] <실시예 4> PKCK-E-Fo1-OH의 제조

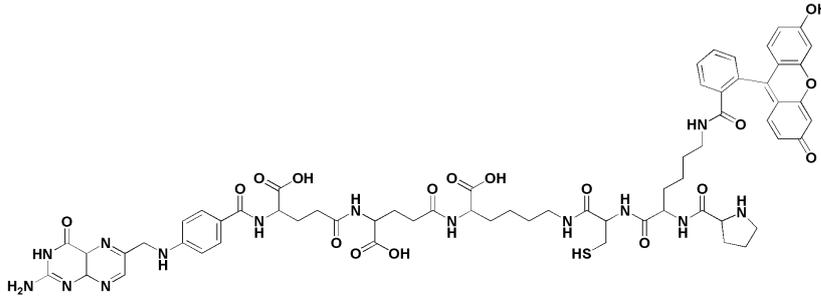


[0185]

[0186] 제조예 3에서 제조된 P(Boc)-K(Boc)-C(Trt)-K-왕 레진(Wang resin) 대신에 제조예 4에서 제조된 P(Boc)-K(Boc)-C(Trt)-K-E(Trt)-왕 레진(Wang resin)을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 수행하여 목적화합물을 얻었다.

[0187] Mass(m/z) : 측정값: 1025 (계산값: 1027.13).

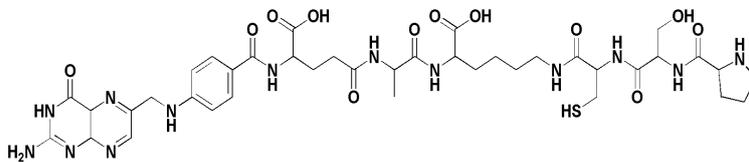
[0188] <실시예 5> PK(FITC)CK-E-Fol-OH의 제조



[0189] 제조예 3에서 제조된 P(Boc)-K(Boc)-C(Trt)-K-왕 레진(Wang resin) 대신에 제조예 6에서 제조된 P(Boc)-(FITC)K(Boc)-C(Trt)-K-E(Trt)-왕 레진(Wang resin)을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하여 목적화합물을 얻었다.

[0191] Mass(m/z) : 측정값: 1415 (계산값: 1416.51).

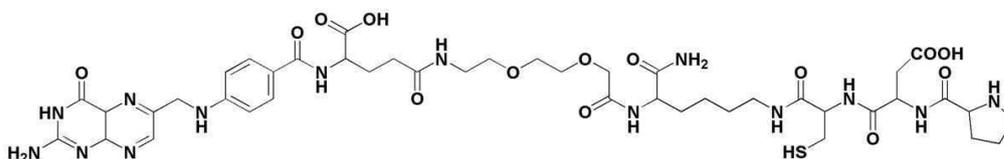
[0192] <실시예 6> PSCK-(Beta-A)-Fol-OH의 제조



[0193] 제조예 4에서 제조된 P(Boc)-K(Boc)-C(Trt)-K-E(Trt)-왕 레진(Wang resin) 대신에 제조예 7에서 제조된 P(Boc)-S(t-Bu)-C(Trt)-K(Beta-A)-E(Trt)-왕 레진(Wang resin)을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 수행하여 목적화합물을 얻었다.

[0195] Mass(m/z) : 측정값: 927 (계산값: 927).

[0196] <실시예 7> PDCK-(miniPEG)-Fol-NH₂의 제조

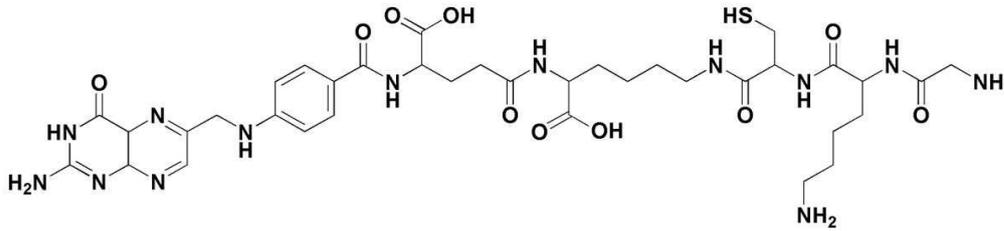


[0197] 제조예 4에서 제조된 P(Boc)-K(Boc)-C(Trt)-K-E(Trt)-왕 레진(Wang resin) 대신에 제조예 8에서 제조된 P(Boc)-D(t-Bu)-C(Trt)-K-(miniPEG)-E(Trt)-MBHA 레진(MBHA resin)을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 수행하여 목적화합물을 얻었다.

[0199] Mass(m/z) : 측정값: 1043 (계산값: 1042).

[0200]

<실시예 8> GKCK-Fol-OH의 제조



[0201]

[0202]

제조예 4에서 제조된 P(Boc)-K(Boc)-C(Trt)-K-E(Trt)-왕 레진(Wang resin) 대신에 Gly(Boc)-K(Boc)-C(Trt)-K-E(Trt)-MBHA 레진(MBHA resin)을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 수행하여 목적화합물을 얻었다.

[0203]

Mass(m/z) : 측정값: 857 (계산값: 857.95).

[0204]

<실시예 9> GKC-Dea-Fol-OH의 제조

[0205]

제조예 4에서 제조된 P(Boc)-K(Boc)-C(Trt)-K-E(Trt)-왕 레진(Wang resin) 대신에 G(Alloc)-K(Boc)-C(Trt)-Dea(Fmoc)-왕 레진(Wang resin)을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 수행하여 목적화합물을 얻었다(여기서, 상기 Dea는 에틸렌다이아민(Ethylenediamine)이다).

[0206]

Mass(m/z) : 측정값: 811 (계산값: 811.92).

[0207]

<실시예 10> PKCK-Fol-OH의 ^{99m}Tc 표지

[0208]

상기 실시예 1에서 제조한 화합물에 ^{99m}Tc를 표지하였다. 20 mg의 글루코헵토네이트(GH) 및 0.45 mg의 스테노스클로라이드(SnCl₂)를 포함하는 GH 키트바이알을 370 MBq를 포함하여 이루어진 제네레이터(generator) 400 μl의 소듐 ^{99m}Tc 퍼테크네이트(Na ^{99m}TcO₄)에 녹이고 상온에서 10분간 반응시켜 ^{99m}Tc-GH를 제조하였다. 상기 반응 용액은 콜로이드 형성되는 양을 체크하기 위한 이동상으로서 살린(saline) 또는 MEK를 포함하는 실리카겔 스트립의 ITLC로 분석하였다. 이동상으로 살린을 사용하는 경우, ^{99m}TcO₄⁻ 및 ^{99m}Tc-GH는 Rf 1.0으로 이동하였고 콜로이드는 Rf 0.0에 남아있었다. 또한, 이동상으로 MEK를 사용하는 경우 ^{99m}TcO₄⁻는 Rf 1.0으로 이동하였고, ^{99m}Tc-GH 및 콜로이드는 Rf 0.0에 각각 남아있었다. 실시예 1에서 제조한 화합물인 PKCK-fol-OH 리간드는 증류수에 녹여 10⁻³ M의 농도로 제조하였다(10⁻⁶ mol/ml). 상기 바이알(370 MBq, 10mCi)의 ^{99m}Tc-GH의 부분표본 100 μl는 50 mM의 소듐 아세테이트 버퍼(pH 5.5) 400 μl에 담긴 다양한 농도의 PKCK-fol 리간드(10⁻⁷ mol, 10⁻⁸ mol 및 10⁻⁹ mol)를 가하여 20 분간 상온에서 유지하였다. 상기 화합물의 방사 화학적 순도(RCP) 및 표지효율은 Waters 2695 pump, UV 검출기(Waters 2487), RI 검출기(In/US γ-detector system), 및 농도구배 이동상 흐름 속도가 1.0 ml/min인 X-terra C-18 컬럼(5 μm, 4.6 x 250 mm)이 장착된 Waters HPLC 시스템인 RP-HPLC로 측정하였다. 이동상은 0.1% 트리플루오르아세트산(TFA)을 함유한 물(A) 및 0.1%의 TFA를 함유한 아세트나이트릴(B)로 구성되었다. 상기 농도구배는 A용매 100%부터 90%까지 2분 동안 흘린 후, 90%부터 60%까지 10분 동안 흘리고, 60%부터 30%까지 2분, 30% 3분 및 30%부터 100%까지 3분간 흘려주었다. RP-HPLC에 의해 정제된 착화물을 얻었으며, 제조된 착화물의 화학적 순도를 측정하여 도 2 및 도 3에 나타내었다.

[0209]

도 2 및 도 3에 나타난 바와 같이, 상기 방사성 동위원소가 표지된 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 플레이트 착화물의 방사 화학적 순도(RCP)는 98% 이상으로 나타났고, 표지효율은 37 GBq/umol로 측정되었으며 체류시간(retention time)은 10.1분으로 측정되었다. 또한, 상기 착화물의 살린 및 세럼에서의 생체 외 안정성은 37 °C에서 24시간 후 측정하였을 때, 96% 이상의 높은 안정성을 보임을 확인할 수 있었다.

[0210]

<실시예 11> PKDK-E-Fol-OH의 ^{99m}Tc 표지

[0211]

상기 실시예 10에서 ^{99m}Tc를 실시예 1에서 제조된 PKCK-Fol-OH에 표지하는 대신에 실시예 4에서 제조된 PKDK-E-Fol-OH에 표지하는 것을 제외하고는 상기 실시예 10과 동일한 방법으로 수행하여 착화합물을 얻었다. 얻어진 착화합물은 방사화학적 순도는 98% 이상으로 체류시간(retention time)은 10.4분으로 측정되었다.

[0212]

<실시예 12> GKC-Dea-Fol-OH의 ^{99m}Tc 표지

[0213]

상기 실시예 10에서 ^{99m}Tc를 실시예 1에서 제조된 PKCK-Fol-OH에 표지하는 대신에 실시예 9에서 제조된 GKC-Dea-Fol-OH에 표지하는 것을 제외하고는 상기 실시예 10과 동일한 방법으로 수행하여 착화합물을 얻었다. 얻어진 착화합물은 방사화학적 순도는 98% 이상으로 체류시간(retention time)은 10.0분으로 측정되었다.

[0214]

<실험예 1> 세포 흡수 및 플레이트 수용체 결합 친화력 측정

[0215]

본 발명에 따른 표지된 플레이트 착화물의 세포 흡수 및 플레이트 수용체의 결합 친화력을 평가하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0216]

플레이트 수용체가 과발현된 플레이트 수용체 양성 KB 종양세포 75(인간 경구 표피 암종) T-플라스크 안에서 37 °C 및 10% 열-비활성 태아 소 혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 폴릭산이 없는 RPMI 1640 배지(FFRPMI)를 가지는 5%의 CO₂ 하에서 80% 내지 90% 까지 용합하였다. 약 8 x 10⁵개의 세포는 생체 외 세포 흡수 및 결합 친화력 측정을 위하여 12 웰-플레이트에서 24시간 동안 키웠다. 세포는 차가운 PBS 버퍼로 두 번 씻어내고 850 μl의 FBS가 없는 신선한 FFRPMI와 함께 37 °C에서 30분간 미리 배양하였다. 상기 실시예 1에서 제조된 PKCK-fol-OH 화합물을 이용하여 제조된 ^{99m}Tc가 표지된 착화물(18.5 kBq) 용액을 가하고 상기 웰 플레이트는 37 °C에서 10, 30, 60, 120 및 180 분 동안 시간 의존적인 세포 흡수 분석을 위하여 배양하였다. 또한, 블럭화 실험(Blocking experiments)은 착화물을 가하기 전 30분 동안 과량의 차가운 폴릭산(100 μM)과 함께 미리 배양된 세포를 이용하여 수행하였다. 배양 후, 상기 웰 플레이트는 차가운 PBS로 두 번 씻어내었다.

[0217]

그 후, 상기 세포는 막에 부착되어있는 방사성 리간드를 제거하기 위하여 산 워시버퍼(acid wash buffer)(50 mM 글라이신-염산 버퍼, pH 2.4)로 씻어내었고, 상기 상청액은 방사능의 막에 부착되어 있는 부분을 측정하기 위하여 모았다. 세포는 1N NaOH에 용해시키고, γ-카운터를 가지는 방사능의 내재화 부분의 이동 및 측정하였다. 막 결합 부분 및 내재화 부분의 방사능은 세포 흡수의 합에 의해 계산할 수 있다. 상기 세포 흡수 데이터는 % 세포 흡수(세포 흡수/전체 추가된 활성)로 표현되어진다. 각 데이터는 세 개의 웰의 평균값으로 표현된다. 상기 PKCK 펩타이드와 플레이트의 결합력은 상대 결합 분석법을 이용하여 계산되었다. 상기 화합물에 ^{99m}Tc가 표지된 착화물은 상기 분석법에 방사성 리간드를 사용하여 측정하였다. 세포는 트립신과 함께 거두어들였고, PBS 버퍼로 씻어내었다. 8 x 10⁵개의 세포는 12-웰 플레이트에 키웠다. ^{99m}Tc이 표지된 PKCK-fol-OH 착화물(37 kBq) 및 1 ml의 FFRPMI에 담긴 PKCK-fol-OH 및 표지되지 않은 플레이트의 적당한 희석물을 37 °C에서 1시간 동안 배양한 후, 배양은 상청액의 제거 및 FFRPMI로 빠르게 씻어내는 과정에 의하여 중단되었다. 그 후, 상기 세포는 γ-카운터를 가지는 방사능을 측정하기 위하여 모았다. 플레이트 및 PKCK-fol-OH 화합물의 IC₅₀값은 GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하는 비선형 퇴보에 의해 계산되어 각각 20 nM, 160 nM의 값을 나타내었다. 또한, 각 점은 세 번의 평균값을 계산하여, 도 4에 나타내었다.

[0218]

도 4에 나타난 바와 같이, 방사성 플레이트의 세포 친화력 및 내재화율은 시간 의존적으로 증가함을 확인할 수 있다.

[0219]

따라서, 본 발명에 따른 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 플레이트 유도체는 방사성 동위원소와 착화물을 안

정적으로 형성할 뿐만 아니라, 형성된 착화물의 세포 친화력 및 내재화율이 우수하므로, 이를 이용한 암 진단 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

[0220] <실험예 2> KB 이중이식 모델에서 ^{99m}Tc가 표지된 PKCK-fol-OH 착화물의 체내 분포

[0221] 본 발명에 따른 ^{99m}Tc가 표지된 PKCK-fol-OH 착화물의 종양 및 체내 장기에 대한 흡수도를 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0222] 동물실험은 10⁻⁸ mol/ml 및 370 MBq의 활성의 ^{99m}Tc 표지된 PKCK-fol-OH 착화물 모액을 사용하였다. 주사 용액은 모액을 묽혀 원하는 부피 활성인 3.7 MBq/ml을 얻었다. 상기 ^{99m}Tc-PKCK-fol-OH의 체내 분포 실험은 KB-관련 암컷 누드 쥐(한국의 OrientBio에서 제공받음)로 수행하였다. 상기 쥐는 2주 동안 플레이트 농도를 최소화시켜 플레이트가 부족한 설치류 차우(Harlan laboratories, Inc., USA)를 유지하였다. 종양이 2-3주 동안 자란 후, 상기 쥐에게 370 kBq(10 uCi)/100 μl를 체내 주입시켰다. 30분, 1시간, 3시간 및 24시간째, 상기 동물은 사망하였다.

[0223] 하기 표 1에 주사 후 30분, 1시간, 3시간 및 24시간째의 체내 분포 측정 결과를 나타내었다.

표 1

장기	^{99m} Tc-PKCK-gamma Glu-folate			
	30분	1시간	3시간	24시간
혈액	0.64 ± 0.26	0.36 ± 0.06	0.18 ± 0.05	0.06 ± 0.02
간	7.21 ± 1.58	5.42 ± 1.85	2.83 ± 0.60	1.09 ± 0.07
신장	76.47 ± 5.04	77.19 ± 5.43	41.48 ± 12.08	7.49 ± 1.90
비장	0.47 ± 0.13	0.36 ± 0.03	0.30 ± 0.07	0.10 ± 0.03
심장	2.25 ± 0.47	1.73 ± 0.27	1.03 ± 0.32	0.10 ± 0.06
소장(Sm Int)	0.93 ± 0.54	0.43 ± 0.05	0.27 ± 0.12	0.10 ± 0.05
대장(Lg Int)	2.43 ± 1.38	3.43 ± 0.73	1.48 ± 0.64	1.38 ± 0.86
폐	1.70 ± 0.35	1.45 ± 0.33	0.63 ± 0.26	0.12 ± 0.06
위	1.92 ± 0.26	1.20 ± 0.05	0.55 ± 0.16	0.13 ± 0.04
종양	2.60 ± 0.53	2.96 ± 0.51	2.24 ± 0.27	0.91 ± 0.28
종양/혈액	4.38 ± 0.92	8.35 ± 1.12	13.17 ± 2.78	15.15 ± 4.36
종양/신장	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.12 ± 0.02
종양/간	0.38 ± 0.14	0.58 ± 0.17	0.82 ± 0.20	0.83 ± 0.24

[0225] 상기 표 1에 나타낸 바와 같이, 방사성 동위원소가 표지된 PKCK-fol-OH 착화물은 30분에 0.64 ± 0.26 %ID/g 및 3시간에 0.18 ± 0.05 %ID/g의 흡수율을 가지는 혈액과 비교하였을 때, 30분에 2.60 ± 0.53%ID/g 및 3시간에 2.24 ± 0.27 %ID/g의 높은 종양 흡수율을 가지는 것으로 나타났다. 또한, 높은 종양 흡수율로 인하여 상기 종양/혈액의 비율은 30분에 4.35 ± 0.92에서 3시간에 13.17 ± 2.78%ID/g으로 높게 나타나는 것을 알 수 있다. 한편, 신장에서의 높은 방사능은 누드 쥐 관련 KB 종양 이중이식에서 발견되었다(1시간 및 3시간에서 각각 77.19 ± 5.43 %ID/g 및 41.48 ± 12.08 %ID/g). 또한, 간에서의 흡수는 1시간에 5.42 ± 1.85 %ID/g 및 3시간에 2.83 ± 0.60 %ID/g으로 확인되었다. 그 외 다른 폐, 심장, 위 및 장 등의 장기에서는 낮은 수치의 흡수율을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0226] 따라서, 본 발명에 따른 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 플레이트 유도체는 방사성 동위원소와 표시하여 안정적으로 착화물을 형성하며, 형성된 착화물은 혈액을 포함한 폐, 심장, 위 등의 각종 장기에서 흡수율이 낮으면서 종양에 대한 높은 흡수율을 가지므로, 이를 이용한 암 진단 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

[0227]

<실험예 3> 생체 내 SPECT 이미징

[0228]

본 발명에 따른 방사성 동위원소가 표지된 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 착화물의 진단을 위한 SPECT 이미징 효과를 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0229]

생체 내 SPECT 이미징을 위하여, 상기 실험예 2에서의 쥐를 폴레이트가 부족한 설치류 차우에서 2주간 보관되었다. 보관하는 동안, 상기 쥐에게 185 MBq(5mCi)/100 μ l만큼을 체내 주사시켰다. 블라킹(Blocking) 실험은 방사성 폴레이트 주사 이전에 폴릭산(100 μ g/100 μ l)을 5분간 주사시켰다. 평면 감마(gamma) 카메라 이미징은 주사 후 5분, 1시간 및 4시간에서의 쥐를 촬영하였다. 3D 이미지의 SPECT 및 CT 데이터는 18시간 후의 소프트웨어에 의하여 촬영되었으며, 그 결과를 도 5 내지 도 13에 나타내었다.

[0230]

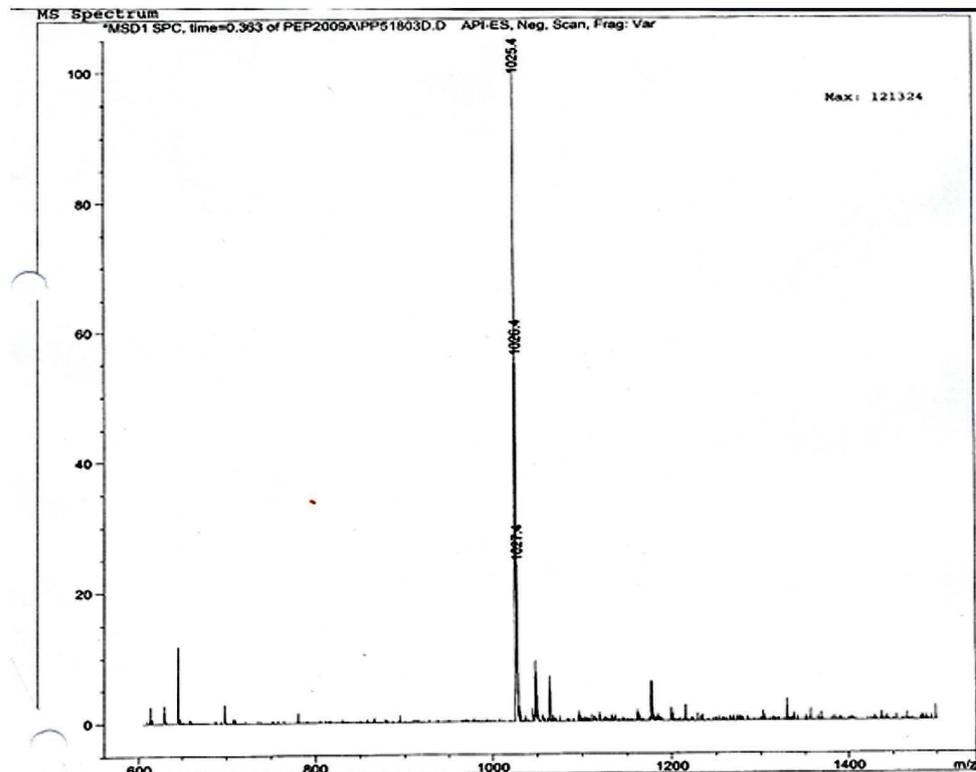
도 5 내지 도 13에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 방사성 동위원소가 표지된 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 착화물은 생체 내에서 안정적으로 SPECT 이미징 되는 것을 알 수 있다.

[0231]

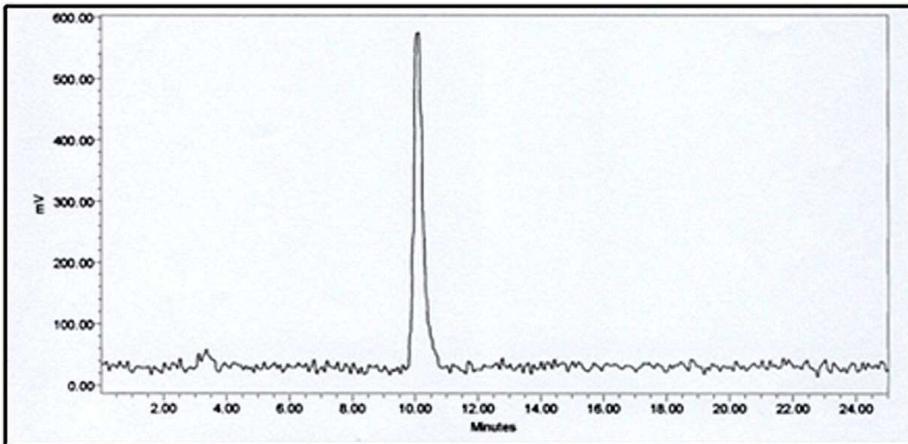
따라서, 본 발명에 따른 방사성 동위원소가 표지된 N₃S₁형의 신규한 킬레이터가 접합된 폴레이트 착화물은 생체 내에서 안정적으로 흡수되어, SPECT 등의 의료영상장비에 이미징되는 효과가 우수하므로, 이를 이용한 암 진단 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

도면

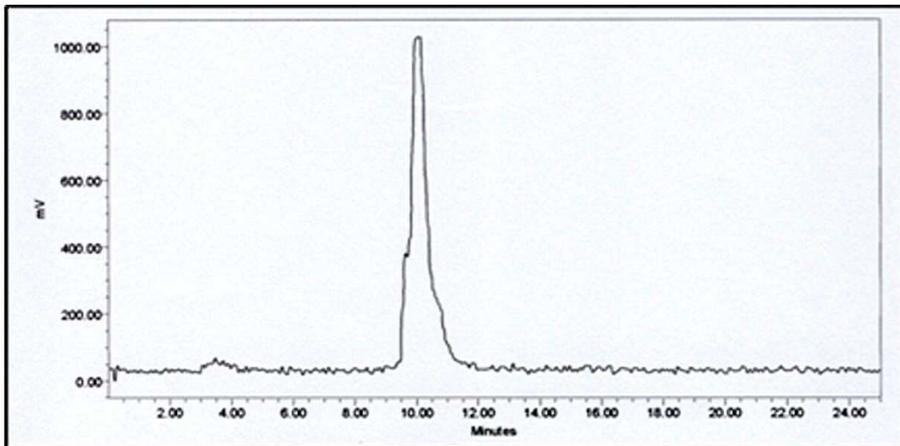
도면1



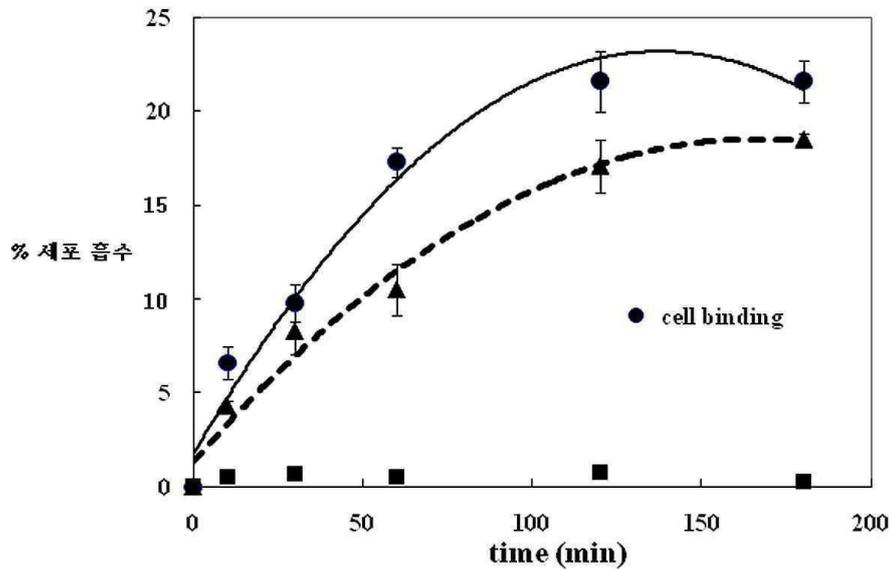
도면2



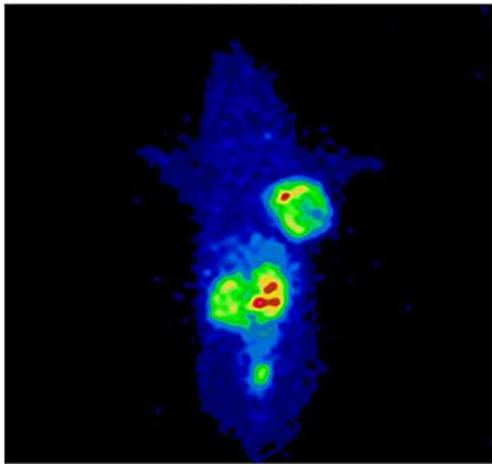
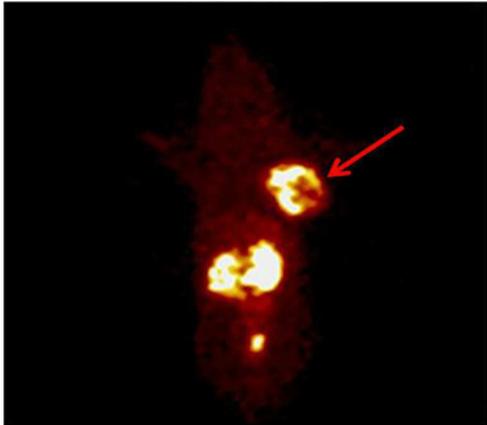
도면3



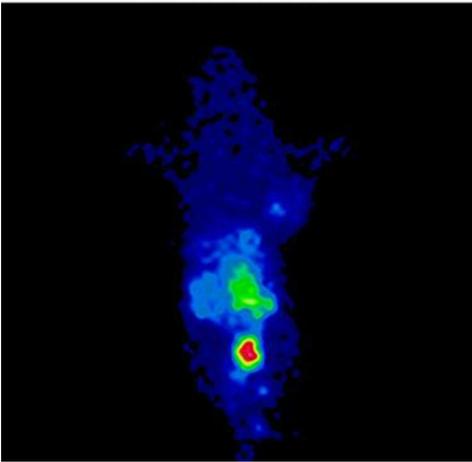
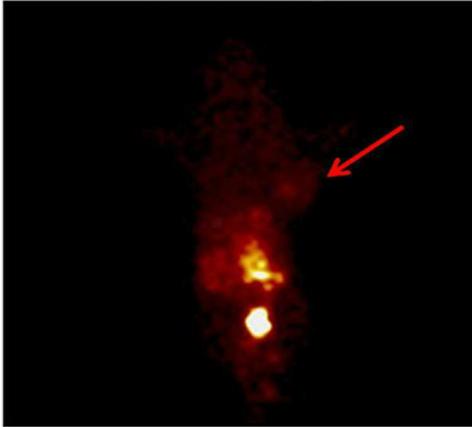
도면4



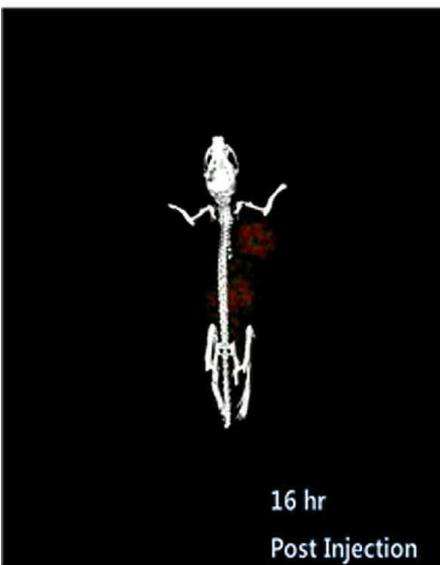
도면5



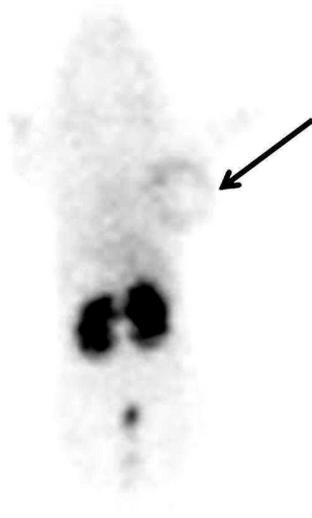
도면6



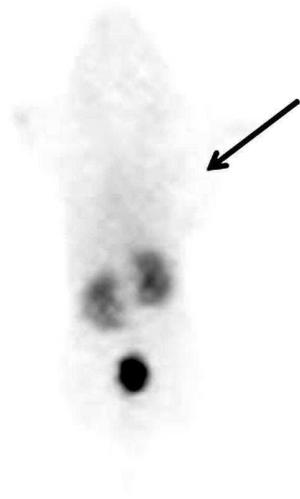
도면7



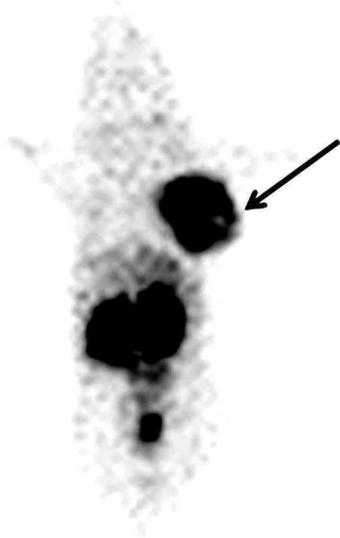
도면8



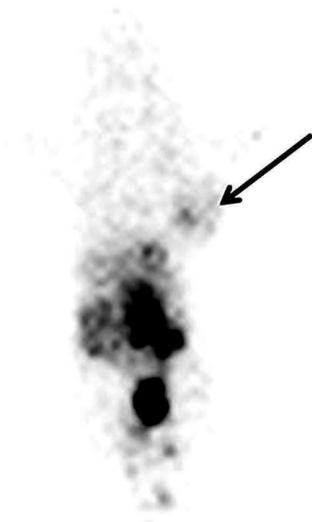
도면9



도면10



도면11



도면12



도면13

