



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년09월22일
 (11) 등록번호 10-1658206
 (24) 등록일자 2016년09월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C07K 7/06 (2006.01) A61K 38/02 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2014-0072533
 (22) 출원일자 2014년06월16일
 심사청구일자 2014년06월16일
 (65) 공개번호 10-2015-0143995
 (43) 공개일자 2015년12월24일
 (56) 선행기술조사문헌
 US05021556 A*
 Varasteh Z. et al, Bioconjugate Chem.
 24:pp.1144-1153 (2013. 6.12.).*
 Smith C. J. et al, Nuclear Medicine and
 Biology 30:pp.101-109 (2003.).*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 한국원자력연구원
 대전광역시 유성구 대덕대로989번길 111(덕진동)
 (72) 발명자
 임재청
 세종특별자치시 보듬2로 43 (도담동, 현대힐스테
 이트) 609-1102
 조은하
 대전광역시 서구 신갈마로 173 (갈마동) 301호
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 특허법인 플러스

전체 청구항 수 : 총 6 항

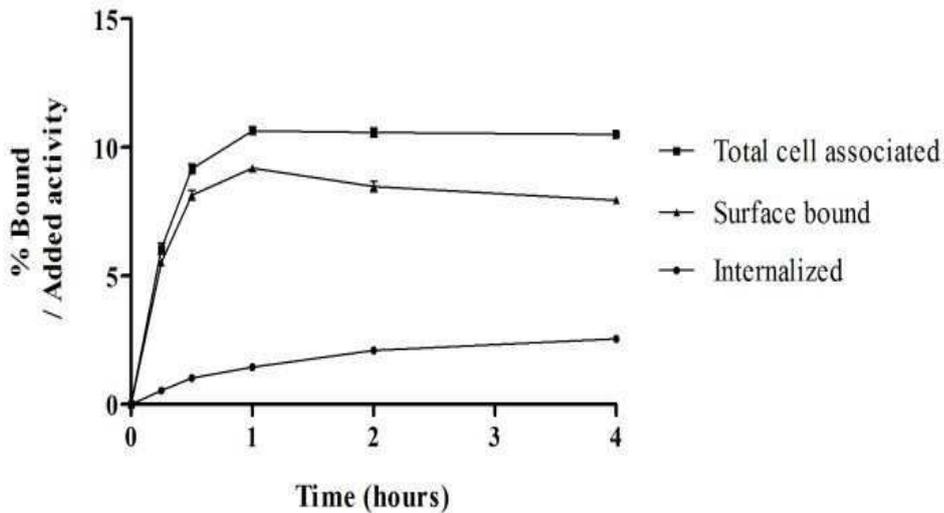
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 전립선암의 진단 및 치료를 위한 가스트린유리펩티드수용체 길항서열 기반의 신규한 붐베신 유도체 화합물

(57) 요약

본 발명의 목적은 전립선 관련 질환의 효과적인 진단 및 치료방법을 개발하기 위해 종양세포에 과다발현하는 표적물질을 선택적으로 표적화할 수 있는 붐베신 유도체에 방사성동위원소를 표지하여 전립선암의 진단 및 치료에 유용하게 사용할 수 있는 신규한 화합물을 제공하고자 한다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

김진주

대전광역시 서구 대덕대로 246 (둔산동) 넥서스밸리 B-1414

최상무

대전광역시 유성구 진잠로149번길 24 (교촌동, 제이파크) 108-1002

이소영

대전광역시 유성구 은구비남로 55 (지족동, 열매마을7단지) 705-1101

박을재

대전광역시 서구 도안북로 136 (도안동, 파렌하이트아파트) 111-404

남성수

대전광역시 유성구 신성남로115번길 25 (신성동) 해피하우스 B05

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 525140-14

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 주요사업

연구과제명 연구로 동위원소 활용 융합기술개발 및 생산기술 선진화 사업

기 여 율 1/1

주관기관 한국원자력연구원

연구기간 2014.01.01 ~ 2014.12.31

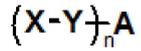
명세서

청구범위

청구항 1

하기의 화학식으로 표시되는 붐베신 유도체 화합물.

[화학식 1]



[상기 화학식1에서,

n은 1 내지 3의 정수이고,

X는 금속 킬레이터이고,

Y는 스페이서이로 Ala-(SO₃H)-Aminooctanonic acid이고

A은 하기 서열로 나타내는 붐베신 유사체 길항제이다.

A: Gln-Trp-Ala-Val-N-methyl-Gly-His-Statine-Leu-NH₂

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 X는 하나 이상의 방사성 핵종 금속을 포함하는 금속 킬레이터이며, 상기 금속 킬레이터가 3가 금속에 대한 금속 킬레이터 및 그의 유사체인 붐베신 유도체 화합물.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 3가 금속에 대한 금속 킬레이터가 DOTA- 계 킬레이터 및 그의 유사체인 붐베신 유도체 화합물.

청구항 4

제 2항에 있어서,

상기 방사성 핵종 금속은 방사성 요법을 위한 것이며, ¹⁷⁶Yb, ¹¹¹In, ¹⁶⁹Gd, ¹⁷⁷Lu, ¹⁰⁵Rh, ¹¹¹Ag, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²⁹I 및 ¹⁶⁶Ho를 포함하는 군에서 선택되는 것인 붐베신 유도체 화합물.

청구항 5

삭제

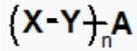
청구항 6

삭제

청구항 7

하기의 화학식으로 표시되는 봄베신 유도체 화합물의 제조방법.

[화학식 1]



(상기 화학식1에서, n은 1 내지 3의 정수이고, X는 금속 킬레이터이고, Y는 스페이서로 Ala-(SO₃H)-Amino-octanoic acid이고, A은 하기 서열로 나타내는 봄베신 유사체 길항제이다. A: Gln-Trp-Ala-Val-N-methyl-Gly-His-Statine-Leu-NH₂)

청구항 8

제1항에 따른 화합물을 포함하는 전립선 관련 질환의 진단용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 전립선암의 진단 및 치료를 위한 가스트린유리펩티드수용체 (Gastrin-releasing peptide receptor, GRP-R) 길항서열 기반의 신규한 봄베신 유도체 화합물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 우리나라 사람이 걸리는 가장 흔한 암 중 하나인 전립선암은 성인 남성에게 매우 치명적인 질병이다. 발병 초기에 발견되는 경우에는 전립선적출 혹은 국소방사선치료를 이용하여 치료가 용이하지만, 일단 전이가 된 경우에는 치료성공율이 현저하게 낮아지기 때문에 조기 발견 및 효과적인 치료법이 요구된다.

[0003] 기존의 항암치료 종류로는 화학적 항암치료, 외과적 수술요법이 가장 보편적으로 행해지는 치료법이다. 화학적 항암치료는 정상세포에 미치는 부작용이 크며 치료 기간이 길어 환자의 삶과 질이 떨어지는 문제가 있다. 또한 기존의 외과적 수술요법은 나이가 많은 환자들에게는 적용하는 것이 쉽지 않고, 그 예후가 매우 낮다. 이에 따라 최근에는 종양세포를 특이적으로 진단하고 나아가 종양세포만을 선택적으로 치료할 수 있는 표적치료기술이 각광을 받고 있으며 많은 연구들이 진행되고 있다. 특히, 방사성동위원소를 사용한 표적 방사성 치료기술은 화학적 항암치료에 비하여 부작용이 매우 낮고, 치료기간이 짧아 노인이나 말기암 환자에게도 적용이 가능한 장점이 있다.

[0004] 전립선암의 경우, 암세포막에 특이적으로 과다발현되어 있는 수용체인 GRP-R([가스트린방출펩티드 수용체, Gastrin-releasing peptide receptor], BB2, BRS-2)을 이용한 표적화가 가능하다. 때문에 GRP-R를 선택적으로 표적할 수 있는 bombesin 유도체를 이용한 표적치료기술에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다(177Lu-AMBA: Synthesis and Characterization of a Selective 177Lu-Labeled GRP-R Agonist for Systemic Radiotherapy of Prostate Cancer, J Nucl Med 2006; 47:11441152). 하지만, 이러한 표적기술은 표적 효율이 우수하여 보다 정확한 질환 진단 뿐만 아니라, 높은 치료효과를 갖는 것이 매우 중요하다. 이에 본 연구진은 종양에 대하여 표적 효율이 종래의 기술과 비교하여 보다 우수한 표적 방사성치료기술의 개발의 필요성을 느껴 위와 같은 전립선암에 대하여 표적 효율이 우수한 표적물질을 이용하여 높은 특이성으로 인해 표적 효율이 보다 우수하며, 나아가 효과적인 전립선암의 치료효능을 갖는 방사성치료기술의 개발에 대한 본 발명을 완성하게 되었다.

[0005] 특히, GRP-R의 길항자(antagonist) 역할을 하는 bombesin 유도체에 방사성동위원소를 접합시킴으로써 전립선암의 진단 및 치료가 가능하다. 이러한 표적치료기술은 표적하는 종양부위에 많이 집적될수록 정확한 암 진단율이 높아질 뿐만 아니라, 높은 치료효과를 기대할 수 있으며, 정상조직에의 집적이 적음으로써 부작용이 낮은 치료제로의 응용할 수 있는 가능성이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) Sandra B. (2014) 177 lutetium-labeled bombesin analogs for radiotherapy. U.S. Patent No. 988629

발명의 내용

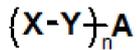
해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 전립선 관련 질환의 효과적인 진단 및 치료방법을 개발하기 위해 종양세포에 과다발현하는 표적물질을 선택적으로 표적화할 수 있는 붐베신 유도체에 방사성동위원소를 표지하여 전립선암의 진단 및 치료에 유용하게 사용할 수 있는 신규한 화합물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 하기의 화학식으로 표시되는 붐베신 유도체 화합물을 제공한다.

[0009] [화학식 1]



[0010]

[0011] [상기 화학식 1에서,

[0012] n은 1 내지 3의 정수이고,

[0013] X는 금속 킬레이터이고,

[0014] Y는 스페이서이고,

[0015] A은 하기 서열로 나타내는 붐베신 유사체 길항제이다.

[0016] A: Gln-Trp-Ala-Val-N-methyl-Gly-His-Statine-Leu-NH₂

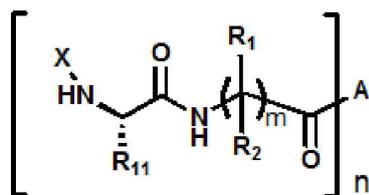
[0017] 본 발명은 상기 X는 하나 이상의 방사성 핵종 금속을 포함하는 금속 킬레이터이며, 상기 금속 킬레이터가 3가 금속에 대한 금속 킬레이터 및 그의 유사체인 붐베신 유도체 화합물을 제공한다.

[0018] 본 발명은 상기 3가 금속에 대한 금속 킬레이터가 DOTA-계 킬레이터 및 그의 유사체인 붐베신 유도체 화합물을 제공한다.

[0019] 본 발명은 상기 방사성 핵종 금속은 방사성 요법을 위한 것이며, ¹⁷⁶Yb, ¹¹¹In, ¹⁶⁹Gd, ¹⁷⁷Lu, ¹⁰⁵Rh, ¹¹¹Ag, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²⁹I 및 ¹⁶⁶Ho를 포함하는 군에서 선택되는 것인 붐베신 유도체 화합물을 제공한다.

[0020] 본 발명은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 붐베신 유도체 화합물을 제공한다.

[0021] [화학식 2]

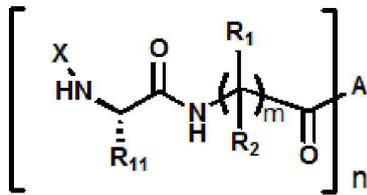


[0022]

[0023] [상기 화학식 2에서,

[0024] n은 1 내지 5의 정수이며,

- [0025] m은 1 내지 10의 정수이며,
- [0026] R₁ 및 R₂는 서로 독립적으로 수소 또는 (C1-C5)알킬이고,
- [0027] R₁₁은 서로 독립적으로 수소, 할로젠원자, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미노기, 히드라진, 카르복실기나 이의 염, 술폰산기나 이의 염, 인산이나 이의 염이고,
- [0028] X는 금속 킬레이터이고,
- [0029] A은 하기 서열로 나타내는 bombesin 유사체 길항제이다.
- [0030] A: Gln-Trp-Ala-Val-N-methyl-Gly-His-Statine-Leu-NH₂
- [0031] 본 발명은 상기 스페이스 Y는 Ala-(SO₃H)-Aminooctanoic acid 인 bombesin 유도체 화합물을 제공한다.
- [0032] 하기 화학식 2의 화합물로 합성하는 단계를 포함하는 bombesin 유도체 화합물의 제조방법을 제공한다.
- [0033] [화학식 2]



- [0034]
- [0035] [상기 화학식 2에서,
- [0036] n은 1 내지 10의 정수이며,
- [0037] R₁ 및 R₂는 서로 독립적으로 수소 또는 (C1-C5)알킬이고,
- [0038] R₁₁은 서로 독립적으로 수소, 할로젠원자, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미노기, 히드라진, 카르복실기나 이의 염, 술폰산기나 이의 염, 인산이나 이의 염이고,
- [0039] X는 금속 킬레이터이고,
- [0040] A은 하기 서열로 나타내는 bombesin 유사체 길항제이다.
- [0041] A: Gln-Trp-Ala-Val-N-methyl-Gly-His-Statine-Leu-NH₂
- [0042] 본 발명은 상기 bombesin 유도체 화합물을 포함하는 전립선 관련 질환의 진단 및 치료용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0043] 본 발명은 GRP-R이 과발현되어 있는 전립선암을 효율적으로 선택적으로 표적화할 수 있는 bombesin 유도체에 관한 것으로, 상기 bombesin 유도체를 이용함으로써 종양 표적효율이 높을수록 더욱 정확한 진단효과와 더불어 더욱 높은 치료효과를 기대할 수 있다.
- [0044] 또한, 본 발명에서 제공하는 물질은 유사한 작용 기전을 갖는 종래의 bombesin 유도체에 비하여 종양 표적효율이 매우 우수함을 가지는 장점을 가지고 있으며, 베타 및 감마에너지를 방출하는 방사성동위원소 177-Lu의 특성에 의하여 매우 정확한 영상 진단 및 치료가 가능하다.
- [0045] 따라서 본 발명에서 제공하는 물질은 GRP-R을 과다발현하는 전립선암의 진단 및 치료에 보다 유용하게 사용될 수 있다.
- [0046]

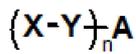
도면의 간단한 설명

- [0047] 도 1은 177Lu-DOTA-sBBNA의 제조의 순도를 나타내는 결과이다.
- 도 2는 인간 전립선암 PC-3 세포에서 125I-[Tyr⁴]-bombesin와의 경쟁 분석평가 곡선을 나타낸 결과이다.
- 도 3은 인간 전립선암 PC-3 세포에서 177Lu-DOTA-sBBNA의 안정성 결과를 나타낸 결과이다.
- 도 4은 인간 전립선암 PC-3 세포에서 177Lu-DOTA-sBBNA의 세포내 유입 결과를 나타낸 결과이다.
- 도 5는 인간 전립선암 PC-3를 이식한 중앙마우스모델에서 177Lu-DOTA-sBBNA의 체내(in vivo) 분포 양상을 나타낸 결과이다.
- 도 6는 177Lu-DOTA-sBBNA과 유사 작용기전을 갖는 비교물질과의 체내(in vivo) 전립선암 표적효율을 비교한 결과이다.

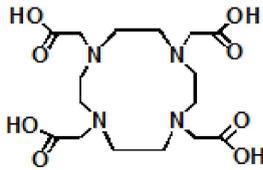
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0048] 본 발명은 전립선암에서 과다발현하는 GRP-R을 표적할 수 있는 붐베신 유도체 화합물을 제공한다.
- [0049] 본 발명은 신규한 붐베신 유도체 화합물은 하기 화학식 1로 표시한다.

[0050] [화학식 1]



- [0051]
- [0052] [상기 화학식1에서,
- [0053] n은 1 내지 3의 정수이고,
- [0054] X는 금속 킬레이터이고,
- [0055] Y는 스페이서이고,
- [0056] A은 하기 서열로 나타내는 붐베신 유사체 길항제이다.
- [0057] A: Gln-Trp-Ala-Val-N-methyl-Gly-His-Statine-Leu-NH2
- [0058] 본 발명의 일 구체예에서, 전립선암을 영상 진단 및 방사성치료에 사용하기 위한 신규하고 개선된 화합물을 제공한다.
- [0059] 상기 화학식 1에서 n=1인 것이 가장 좋다.
- [0060] 상기 화합물은 금속 킬레이터를 포함할 수 있다. 상기 화합물은 링커 또는 스페이서 기에 의해 붐베신 유사체 길항자 서열을 가진 GRP-R 표적화 펩티드에 화학적으로 유용한 금속 이온 도는 방사성핵종을 킬레이팅하여 합성할 수 있는 광학 표지 부분을 포함한다.
- [0061] 상기 금속 킬레이터는 금속 원자와의 착체를 형성하는 분자를 말하며, 이때 상기 착체는 생리학적 조건하에서 안정한 것이다. 보다 구체적으로는, 상기 금속 킬레이터는 방사성핵종 금속에 합성되어 생리학적으로 안정하고 스페이서와의 접합을 위해 적어도 하나 이상의 반응성 관능기를 가지는 분자일 수 있다. 또한, 금속 킬레이터는 스페이서와의 결합하기 위해 금속 킬레이터와 스페이서 사이에 단일 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0062] 상기 금속 킬레이터는 하나 이상의 방사성 핵종 금속을 포함하는 금속 킬레이터이며, 상기 금속 킬레이터가 3가 금속에 대한 금속 킬레이터 및 그의 유사체일 수 있다.
- [0063] 바람직하게는 상기 3가 금속에 대한 금속 킬레이터가 DOTA-계 킬레이터 및 그의 유사체일 수 있다. 본 발명의 화합물에 사용된 가장 바람직한 킬레이터는 하기 화학식 4로 표시되는 금속 킬레이터이다.
- [0064] [화학식 4]



[0065]

[0066]

상기 금속 킬레이터는 하나 이상의 방사성 핵종 금속을 포함할 수 있으며, 영상 진단 및 방사성치료를 위한 바람직한 방사성 핵종 금속으로는 ⁶⁴Cu, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ¹¹¹In, ¹⁰⁵Rh, ¹⁷⁶Yb, ¹⁶⁹Gd, ¹⁷⁷Lu, ¹¹¹Ag, ¹²⁵I, ¹²⁹I 및 ¹⁶⁶Ho 를 포함한다. 상기 방사성 핵종 금속의 선택은 진단 또는 치료 응용에 따라 결정될 수 있으며, ¹⁷⁷Lu 이 특히 바람직하다.

[0067]

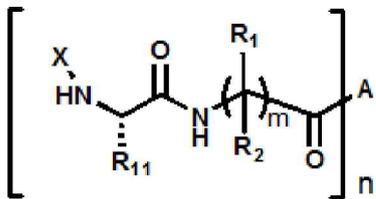
본 발명에 따른 붐베신 유도체 화합물은 금속 방사성 핵종이 합성된 광학 표지자를 붐베신 유사체 길항제 서열을 가진 GRP-R 표적화 펩티드에 연결시킬 수 있는 새롭게 개선된 스페이서를 포함한다.

[0068]

본 발명의 스페이서는 하기 화학식 2로 표시된다.

[0069]

[화학식 2]



[0070]

[상기 화학식 2에서,

[0071]

n은 1 내지 10의 정수이며,

[0072]

R₁ 및 R₂는 서로 독립적으로 수소 또는 (C1-C5)알킬이고,

[0073]

R₁₁은 서로 독립적으로 수소, 할로젠원자, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미노기, 히드라진, 카르복실기나 이의 염, 술폰산기나 이의 염, 인산이나 이의 염이고,

[0074]

X는 금속 킬레이터이고,

[0075]

A은 하기 서열로 나타내는 붐베신 유사체 길항제이다.

[0076]

A: Gln-Trp-Ala-Val-N-methyl-Gly-His-Statine-Leu-NH₂]

[0077]

상기 스페이서는 금속 방사성 핵종을 포함하는 금속 킬레이터와 붐베신 유사체 길항제 서열을 가진 GRP-R 표적화 펩티드를 연결하는 역할로 사용될 수 있다.

[0078]

본 발명은 일 실시예에 따라 상기 스페이서의 N-말단에 금속 킬레이터가 연결되고, 상기 스페이서의 C-말단에 본 발명의 붐베신 유사체 길항제 서열을 가진 GRP-R 표적화 펩티드를 연결할 수 있다.

[0079]

본 발명에 사용되는 스페이서는 바람직하게는 하나 이상의 아미노산을 포함하는 스페이서 일 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 일 구체예로는 스페이서는 적어도 하나 이상의 아미노산을 함유할 수 있으며, 아미노산에 술폰산기가 첨가된 형태일 수 있다. 예를 들어, 상기 아미노산은 Ala인 것이 가장 바람직하다.

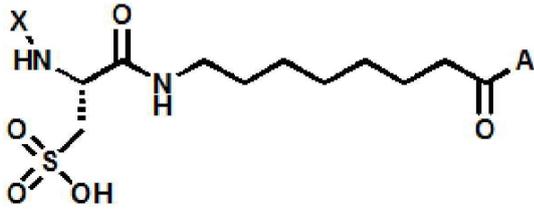
[0080]

본 발명의 화합물에 사용된 가장 바람직한 스페이서로는 Ala-(SO₃H)-Aminooctanoci acid일 수 있으며, 하기 화학식 3로 표시될 수 있다.

[0081]

[화학식 3]

[0082]



[0083]

[0084]

본 발명에 따른 봄베신 유도체 화합물은 GRP-R 표적화 펩티드인 봄베신 유사체 작용제 서열(상기 화학식 1 $(X-Y)_nA$ 에서 A를 의미한다)을 포함한다.

[0085]

상기 GRP-R는 가스트린 분비나 췌장효소분비의 촉진작용과 세포증식작용 등의 생리활성이 있는 펩티드의 일종인 가스트린방출펩티드(GRP)의 수용체로써 전립선암세포막에서 특이적으로 과다발현하는 것으로 알려진 펩티드로써, GRP-R을 전립선암의 표적 펩타이드로 활용할 수 있다.

[0086]

상기 GRP-R 표적화 펩티드로써 봄베신 유사체 길항제는 GRP-R 길항자(antiagonist)로서 역할을 한다. 봄베신 유사체 길항제는 암 세포막에서 과다 발현하는 GRP-R과 높은 친화도를 갖는 결합을 하여 작용제와는 반대작용을 하는 것으로써, 작용제 효과를 길항하면서 작용제의 세포 내로의 내재화를 유도하지 않고, 생체 내의 신호전달을 수행하지 않으면서 봄베신 유사체 작용제보다 동등하거나 더 우수한 GRP-R을 표적화할 수 있는 길항 특성을 가질 수 있다.

[0087]

상기 봄베신 유사체 길항제는 전립선암의 GRP-R을 표적화하기 위한 봄베신 유도물질로서 몇 개의 아미노산의 결합으로 이루어진 것일 수 있다. 본 발명에 가장 바람직하게는 Gln-Trp-Ala-Val-N-methyl-Gly-His-Statine-Leu-NH₂서열을 갖는다.

[0088]

또한, 이들의 유사체가 하나 또는 몇 개의 아미노산이 치환 또는 결손 또는 첨가를 포함하는 변형함으로써 수행될 수 있으며, 이는 GRP-R의 길항자(antiagonist)로서 생물학적 기능을 보전하는 범위 내에서 이루어질 수 있다.

[0089]

따라서, 본 발명의 일 구체예에서, 상기 봄베신 유사체 길항제는 GRP-R의 길항자(antiagonist)로서 봄베신 유사체 또는 그들의 유도체에 방사성동위원소를 접합시킴으로써 전립선암을 진단 및 치료하는 데 사용가능하다.

[0090]

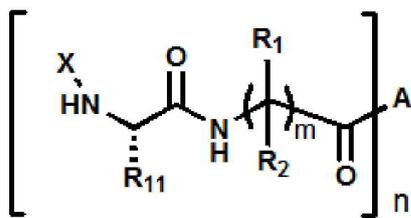
본 발명의 또 다른 양태로는 하기 화학식 1로 표시되는 봄베신 유도체 화합물의 제조방법을 제공하는 것으로,

[0091]

하기 화학식 2의 화합물로 합성하는 단계를 포함하는 봄베신 유도체 화합물의 제조방법을 포함한다.

[0092]

[화학식 2]



[0093]

[상기 화학식 2에서,

[0094]

n은 1 내지 5의 정수이며,

[0095]

m은 1 내지 10의 정수이며,

[0096]

R₁ 및 R₂는 서로 독립적으로 수소 또는 (C1-C5)알킬이고,

[0097]

R₁₁은 서로 독립적으로 수소, 할로겐원자, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미노기, 히드라진, 카르복실기나 이의 염, 술폰산기나 이의 염, 인산이나 이의 염이고,

[0098]

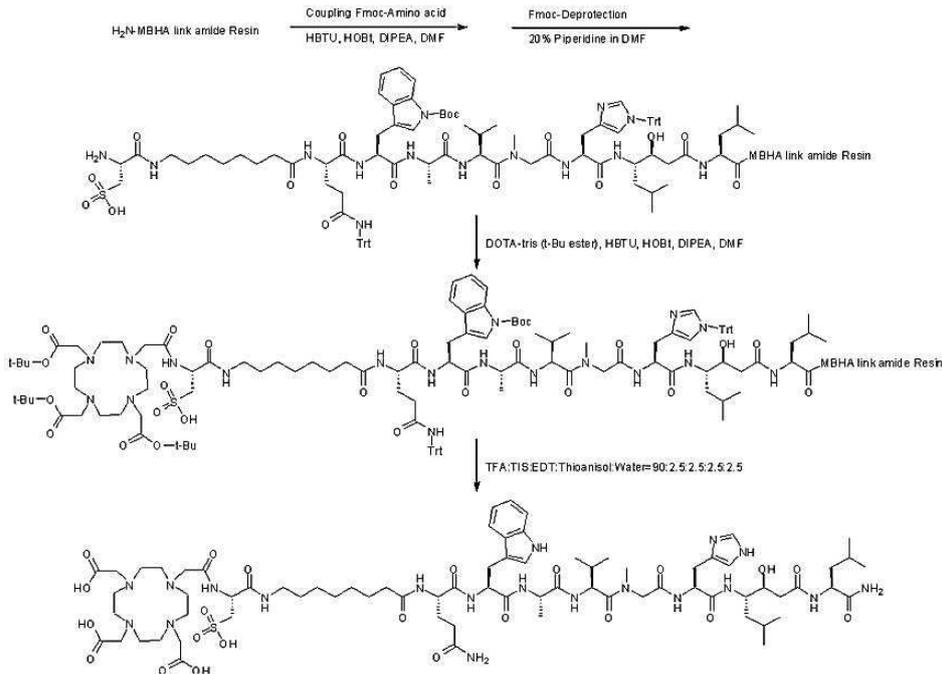
X는 금속 킬레이터이고,

[0099]

A은 하기 서열로 나타내는 봄베신 유사체 길항제이다.

[0100]

- [0101] A: Gln-Trp-Ala-Val-N-methyl-Gly-His-Statine-Leu-NH2]
- [0102] 본 발명의 붐베신 유도체 화합물의 제조방법은 고체상 합성법에 의해 가장 편리하게 제조될 수 있으며, 구체적으로는 일반적으로 펩티드 결합의 업계에서 일반적으로 확립되어 널리 사용되고 있는 고상 펩티드 합성법에 의해 제조될 수 있다. 고상 펩티드 합성은 아미노산 잔기를 불용성 지지체 또는 폴리스티렌에 연결되어 성장하는 펩티드 사슬에 단계적 첨가를 포함한다. 펩티드의 C-말단 잔기는 먼저 N-보호제, t-부틸옥시카르보닐기(Boc) 또는 플루오페닐메톡시카르보닐기(Fmoc)로 보호된다. 아미노 보호기는 Boc의 경우에는 TFA이고, Fmoc의 경우에는 피페리딘으로 제거되고 다음은 아미노산 잔기(N-보호된 형태)가 커플링제, 예를 들어, HBTU와 함께 첨가된다.
- [0103] 상기 화학식 1에서 n=1인 것이 가장 좋다.
- [0104] 스페이서는 이 후에 붐베신 유사체 길항제의 Gln 잔기의 아미노기와 스페이서의 관능기와 반응시킴으로써 커플링되어 접합을 형성할 수 있다.
- [0105] 스페이서가 결합된 붐베신 유사체 길항제에 방사성 핵종이 포함된 금속 킬레이터와 반응시켜 화학식 2로 표시되는 붐베신 유도체 화합물을 최종적으로 제조할 수 있다. 상기 반응은 공지된 킬레이트화 반응에 의해 수행될 수 있으며, 이러한 킬레이트화 반응을 통해 방사성 핵종을 포함하는 킬레이터를 붐베신 유사체 길항제에 표지화할 수 있으며, 최종적으로 붐베신 유도체 화합물(이하, '177Lu-DOTA-sBBNA' 이라 한다.)을 제조할 수 있다.
- [0106] 본 발명은 상기 붐베신 유도체 화합물을 포함하는 전립선 관련 질환의 진단 및 치료용 조성물을 제공한다.
- [0107] 본 발명은 상기 제조방법에 의해 개선된 붐베신 유도체 화합물을 제공함으로써 진단 또는 치료적으로 유용한 방사성 영상진단 및 방사성치료 등의 표적치료기술 분야에서 암세포막에서 GRP-R을 과다발현하는 전립선암의 진단 및 치료에 사용될 수 있다. 본 발명에 따라 제조된 개선된 붐베신 유도체 화합물을 이용한 표적치료기술의 응용은 표적하는 종양부위에 많이 집적되기 때문에 더욱 높은 치료효과를 기대할 수 있으며, 반면에 정상조직에는 집적이 적어 치료 시에 부작용이 낮아질 수 있는 개선된 능력을 가진다. 또한 표적하는 종양부위에 많이 집적되는 것은 병변을 진단할 때에도 작은 크기의 종양에서도 많이 부위에 집적할 수 있어 보다 정확하게 암 병변을 영상학적으로 진단을 할 수 있다. 뿐만 아니라, 본 발명의 붐베신 유도체 화합물은 GRP-R의 길항자로서 역할을 하기 때문에 앞서 상술한 바와 같이, GRP-R 펩티드와 높은 친화도를 가지고 결합을 하여 세포에 흡수될 수도 있다. 이와 같이 상기 붐베신 유도체 화합물은 생체 내의 종양에 결합하여 흡수하기 때문에 GRP-R을 과다발현하는 전립선암 종양을 표적화하여 이를 영상학적으로 진단해내는 데 매우 효과적인 능력을 발휘할 수 있다.
- [0108] 상기 붐베신 유도체 화합물의 표적치료 응용은 암을 진단 및 치료하는 데 있어서 상기 화합물에 화학적 요법을 함께 이용할 화학치료제를 같이 사용되는 약제를 의미할 수 있다.
- [0109] 암을 진단 및 치료하는데 사용 가능한 화학치료제는 진단제와 치료제로서의 역할을 모두 할 수 있는 것을 말한다. 상기 화학치료제는 이 분야에서 사용하고 있는 항암제를 사용할 수 있다. 더욱 좋게는 암 종의 항원에 결합할 수 있는 단일클론항체를 이용하여 진단 및 치료에 응용할 수 있다.
- [0110] 본 발명은 상기 치료제에 더불어, 암 치료제로서 당업계에서 널리 알려진 부형제, 희석제, 안정화제 및 담체를 함유하는 조성물의 일부로서 환자에게 투여될 수 있다.
- [0111] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의거하여 좀 더 상세히 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 실시예로 한정하지는 않는다.
- [0112] [실시예 1] 붐베신 유도체 화합물(DOTA-sBBNA)의 합성.
- [0113] 본 발명의 붐베신 유도체 화합물(DOTA-sBBNA)은 하기의 반응식과 같이 고상 합성법(solid phase synthesis)을 이용하여 제조하였다.
- [0114] [실시예 1] 붐베신 유도체 화합물(DOTA-sBBNA)의 합성.
- [0115] 본 발명의 붐베신 유도체 화합물(DOTA-sBBNA)은 하기의 반응식과 같이 고상 합성법(solid phase synthesis)을 이용하여 제조하였다.



[0116]

[0117] [실시예 2] ^{177}Lu -DOTA-sBBNA의 제조

[0118] DOTA-sBBNA은 ^{177}Lu 과 98 % 이상의 높은 순도로 표지가 가능하며 그 결과는 도 1에 나타내었다.

[0119] [실시예 3] 전립선암에 대한 체외(*in vitro*) 표적효율.

[0120] 3-1. 세포배양

[0121] 실시예 1과 2에 따라 제조된 DOTA-sBBNA 및 ^{177}Lu -DOTA-sBBNA의 전립선암세포에 대한 체외 표적효율을 확인하기 위해 인간 전립선암세포주 PC-3 세포를 이용하였다. 인간 전립선암세포주인 PC-3 세포는 한국세포주은행에서 구입하였다. 세포배양은 PC-3 cell을 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 10% FBS(Fetal bovine serum)이 첨가된 RPMI 1640에 배양하였다.

[0122] 상기 세포는 세포배양용 1회용 플라스크에서 배양하고 실험 시에는 실험방법에 따라 96-well 또는 12-well cell culture plate에 배양하여 사용하였다.

[0123] 3-2. ^{177}Lu -DOTA-sBBNA 의 PBS 및 혈청 내 안정성 평가

[0124] 실시예 2에 따라 제조된 ^{177}Lu -DOTA-sBBNA의 생체 내에서 안정성 평가를 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 37°C의 PBS(phosphate buffer saline) 및 인간 혈청(serum)에 실시예 2에 따라 제조된 ^{177}Lu -DOTA-sBBNA을 48시간 동안 보관하였을 때, ^{177}Lu -DOTA-sBBNA의 분해정도를 확인하였다. 그 결과, PBS 및 인간혈청에 48시간동안 보관하여도 분해가 되지 않는 우수한 안정성을 지니는 것을 확인하였다(도 2). 체내에서 분해된 ^{177}Lu 는 골수에 침착되어 각종 부작용의 원인이 될 수 있기 때문에, 이 결과와 같이 ^{177}Lu -DOTA-sBBNA의 체내에서의 높은 안정성은 전립선암의 진단 및 치료에 유용하게 사용할 수 있음을 의미한다.

[0125] 3-3. DOTA-sBBNA 의 전립선암세포에 대한 체외(*in vitro*) 표적 효율

[0126] 인간 전립선암세포인 PC-3 세포에서 10⁻⁶ - 10⁻¹² M 농도의 DOTA-sBBNA를 각각 20,000 CPM의 ¹²⁵I-[Tyr4]-bombesin과 공-배양하여 경쟁반응시켰다. cell plate를 1시간 동안 37°C에서 배양한 후, 반응 용액을 회수하였

다. 세포를 PBS로 세척한 후, 1N NaOH로 회수하고 각 용액의 방사능량을 감마카운터를 이용하여 측정하였다. 125I-[Tyr⁴]-bombesin와의 경쟁 결합 곡선은 도 3에 나타내었으며, 그 결과로 보아 IC₅₀ 값은 6.96 nM으로 GRP-R에 대하여 나노몰수준의 우수한 표적효율을 보인다. 그 결과는 도 3에 나타내었다.

[0127] 또한, PC-3 세포에서 실시예 2에 따라 제조된 0.01 - 100 nM의 177Lu-DOTA-sBBNA를 각각 반응시켰다. cell plate를 2시간 동안 37°C에서 배양한 후, 반응 용액을 회수하였다. 세포를 PBS로 세척한 후, 1N NaOH로 회수하고 각 용액의 방사능량을 감마카운터를 이용하여 측정하였다. 측정된 수치를 GraphPad Prism5 통계프로그램을 이용하여 분석한 결과, 해리상수 (Kd) 값 또한 1.88 nM 수준으로 GRP-R에 대하여 나노몰수준의 우수한 표적효율을 보인다.

[0128] [실시예 4] 177Lu-DOTA-sBBNA의 세포 내 유입 특성

[0129] 실시예 2에 따라 제조된 177Lu-DOTA-sBBNA에 대한 PC-3 세포 내의 유입 특성을 확인 위한 실험을 수행하였다. 인간 전립선암세포인 PC-3 세포에서 25,000 CPM의 177Lu-DOTA-sBBNA를 37°C에서 반응시키고, 15분, 30분, 60분, 120분 후에 각각 반응 용액을 회수하였다. 세포를 PBS로 세척한 후, pH2.5 아세트산 용액으로 세포막에 붙은 방사능을 회수하였다. 1N NaOH 용액으로 세포내에 유입된 방사능을 회수하고, 각 용액의 방사능량은 감마 카운터를 이용하여 측정하였다.

[0130] 그 결과는 도4에 나타내었으며, 177Lu-DOTA-sBBNA은 PC-3 세포에서 4시간 이내 약 25%가 세포내로 유입되어 방사성동위원소가 세포내에 머무를 수 있게 한다. 이는 GRP-R의 길항자(Antagonist)를 표적화 기전으로 하는 유사한 기전의 종래 물질들에 비하여 높은 수준의 세포내 유입량이며, 이에 따라 전립선암의 진단 및 치료에 유용하다.

[0131] [실시예 5] 177Lu-DOTA-sBBNA의 전립선암에 대한 체내(*in vivo*) 표적효율

[0132] 177Lu-DOTA-sBBNA의 체내 표적효율을 평가하기 위하여 Balb/c 누드마우스(나라바이오텍)에 인간 전립선암세포인 PC-3 세포를 이식한 종양마우스모델에서 체내분포를 평가하였다. 7주령의 수컷 Balb/c 누드마우스의 오른쪽 상단 어깨부위에 1 × 10⁷ 개의 PC-3 세포를 피하 주사한 후, 3주간 종양을 자라게 하여 종양마우스모델을 제작하였다. 종양마우스모델의 꼬리정맥을 이용하여 370 KBq의 177Lu-DOTA-sBBNA를 정맥주사하였다. 주사한지 1.5시간 후에 실험동물을 안락사한 후, 종양을 비롯한 혈액, 간, 신장, 비장, 심장, 대장, 소장, 폐, 위, 췌장 등을 적출하여 장기무게를 측정하고 각 장기의 방사능량을 측정하였다. 177Lu-DOTA-sBBNA의 각 장기별 흡수량은 단위 무게당 흡수량/투여용량 (%ID/g)으로 표시하였다. 수용체 특이적인 흡수임을 확인하기 위하여, 10⁻⁸ mole의 DOTA-sBBNA를 함께 투여한 그룹을 추가하였다.

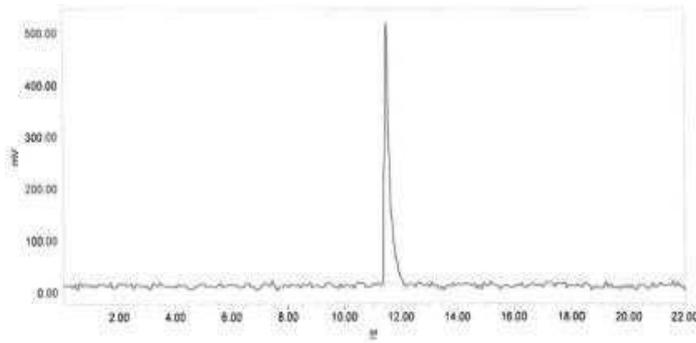
[0133] 정맥 주사 후 1.5시간째에 12.91 ± 3.43 % ID/g의 높은 효율로 전립선암세포를 표적하는 것을 확인하였다. 그 결과는 도5에 나타내었다.

[0134] [실시예 6] 유사 작용기전 비교물질과의 체내(*in vivo*) 전립선암 표적효율 비교

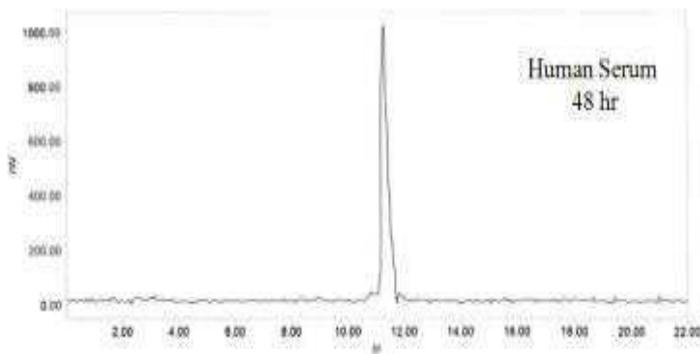
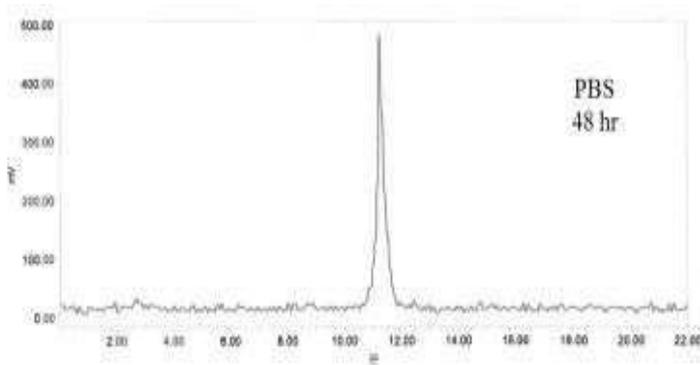
[0135] 실시예 2에 따라 제조된 GRP-R의 길항자(Antagonist)인 bombesin 유도체를 활용하는 봄베신 유도체 화합물(177Lu-DOTA-sBBNA)과 유사한 전립선암 표적화 기전을 가지는 물질로써, 본원의 참고문헌에 포함된 Plus One, 7(9);e44046 의 '177Lu-DOTA-4-amino 1-carboxymethyl-piperidine-D Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂'(비교물질, Sandra B. (2014) 177 luteium-labeled bombesin analogs for radiotherapy. U.S. Patent No. 988629, formula 1 참고)는 그 우수한 표적효율이 인정되어 최근 유럽 및 미국 등에서 특허출원이 완료된 물질이다. 상기 비교물질과 비교하였을 때, 비교물질보다 상기 실시예 2에 따른 177Lu-DOTA-sBBNA이 2~3배 높은 전립선암 표적효율을 보이며, 혈액 내에서 더욱 빠르게 제거되는 현저한 우수성을 가짐을 알 수 있다. 따라서, 상기 177Lu-DOTA-sBBNA가 하기 도 6의 결과와 같이, 비교물질에 비해 봄베신 유도체 화합물로서 개선된 효과를 보이는 것을 입증하였다.

도면

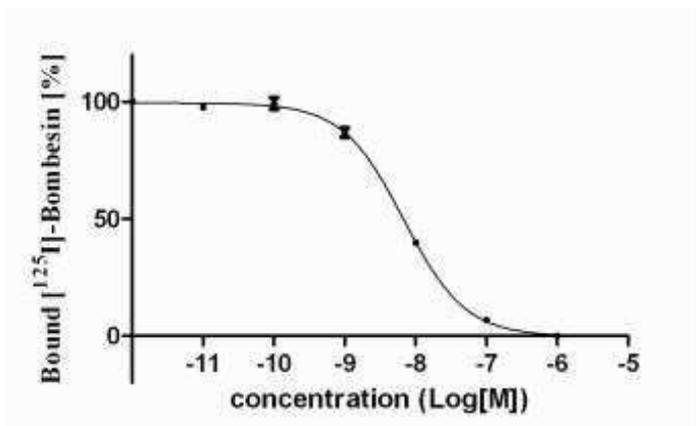
도면1



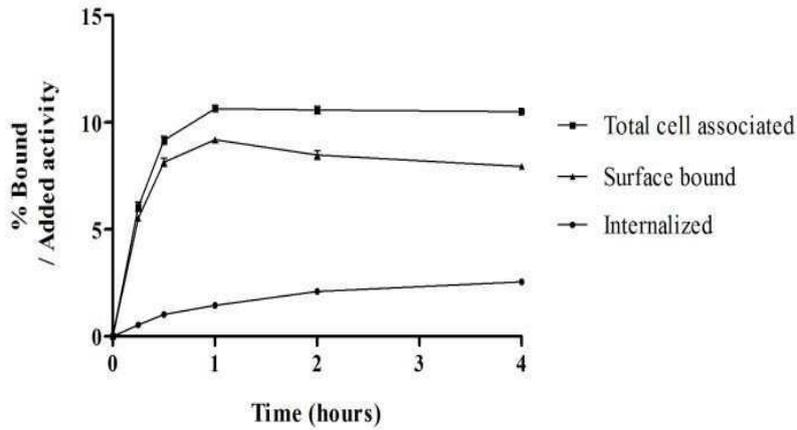
도면2



도면3



도면4



도면5

Organ	1.5 h ^b p.i.	1.5 h p.i.	24 h p.i.
Blood	0.02 ± 0.02	0.10 ± 0.03	0.02 ± 0.01
Liver	1.05 ± 0.07	1.37 ± 0.43	0.08 ± 0.01
Kidney	1.65 ± 0.15	1.41 ± 0.08	0.63 ± 0.05
Spleen	0.56 ± 0.47	0.45 ± 0.30	0.05 ± 0.06
Heart	0.02 ± 0.04	0.03 ± 0.02	0.01 ± 0.01
Pancreas	0.45 ± 0.11	31.48 ± 5.83	0.37 ± 0.09
Small Intestine	11.62 ± 0.22	11.04 ± 2.65	0.45 ± 0.23
Large Intestine	2.14 ± 1.99	1.56 ± 0.21	1.71 ± 0.55
Lung	0.13 ± 0.05	0.13 ± 0.03	0.04 ± 0.03
Stomach	1.34 ± 0.65	2.84 ± 0.31	0.25 ± 0.20
Tumor	0.97 ± 0.36	12.91 ± 3.43	4.88 ± 0.87

^aResults are expressed as % ID/g ± SD (n=3).
^bBlockade study: animals received 50 μg of the peptide coinjected with the radiolabeled peptide.

도면6

Tumor (%ID/g)	비교물질(비교예1)	5.60 ± 1.66 (1 h p.i.)
	177Lu-DOTA-sBMA(실시예2)	12.91 ± 3.43 (1.5 h p.i.)
Tumor/Blood	비교물질(비교예1)	18.06 (1 h p.i.)
	177Lu-DOTA-sBMA(실시예2)	126.02 (1.5 h p.i.)