



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년07월05일  
(11) 등록번호 10-1152500  
(24) 등록일자 2012년05월25일

- (51) 국제특허분류(Int. C1.)  
*C08G 63/91* (2006.01) *C08F 10/00* (2006.01)  
*A61K 47/48* (2006.01) *C08F 8/00* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2006-7000278
- (22) 출원일자(국제) 2004년07월12일  
심사청구일자 2009년06월18일
- (85) 번역문제출일자 2006년01월05일
- (65) 공개번호 10-2006-0054286
- (43) 공개일자 2006년05월22일
- (86) 국제출원번호 PCT/GB2004/002994
- (87) 국제공개번호 WO 2005/007197  
국제공개일자 2005년01월27일
- (30) 우선권주장  
0316294.8 2003년07월11일 영국(GB)
- (56) 선행기술조사문헌  
WO1995025764 A1\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
**폴리테릭스 리미티드**  
영국, 런던 엔더블유1 0티유, 캠던, 로얄 컬리지  
스트리트 2, 더 런던 바이오테크놀로지 이노베이  
션 센터
- (72) 발명자  
**고드윈, 안토니, 로버트**  
영국, 런던 이11 3비지, 레이톤스톤, 612 하이  
로드, 21 실크스코트  
**페돈, 엘리사**  
영국, 런던 이11 3비지, 레이톤스톤, 612 하이  
로드, 21 실크스코트  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
**서경민, 서만규**

전체 청구항 수 : 총 10 항

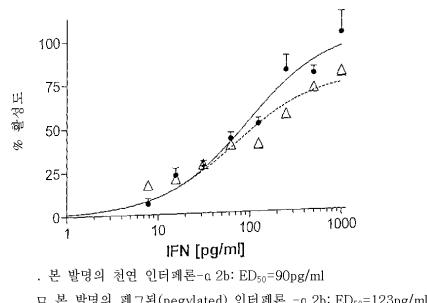
심사관 : 김장강

(54) 발명의 명칭 접합된 생물학적 분자 및 그의 제조방법

### (57) 요약

일반식 I의 새로운 생물학적 활성 화합물, 여기서 X 및 X' 중 하나는 폴리머를 나타내고, 다른 것은 수소 원자를 나타내며; 각각의 Q는 독립적으로 연결기(linking group)를 나타내며; W는 전자 끄는 모이어티(electron-withdrawing moiety) 또는 전자 끄는 모이어티의 환원에 의해 제조가능한 모이어티; 또는 만약 X'가 폴리머를 나타낸다면, X-Q-W는 함께 전자끄는기를 나타내며; 그리고 또한, 만약 X가 폴리머를 나타내면, X' 및 전자끄는기 W는 인접 원자와 함께 환을 형성하며; Z<sup>1</sup> 및 Z<sup>2</sup> 각각은 독립적으로 생물학적 분자로부터 유도된 기를 나타내며, 각각은 친핵성 모이어티를 통해 A 및 B에 연결되며; 또는 Z<sup>1</sup> 및 Z<sup>2</sup>는 함께 두 개의 친핵성 모이어티들을 통해 A 및 B에 연결된 생물학적 분자로부터 유도된 하나의 기를 나타내며; A는 C<sub>1-5</sub> 알킬렌 또는 알케닐렌 사슬이며; 그리고 B는 하나의 결합이거나 C<sub>1-4</sub> 알킬렌 또는 알케닐렌 사슬이며; 상기 분자의 친핵기, 바람직하게는 이황화 브릿지를 통해 적당한 폴리머를 적당한 생물학적 활성 분자에 접합시켜 형성된다.

대 표 도 - 도4



(72) 발명자

최지원

영국, 런던 에스더블유7 4알유, 4 그렌빌 플레이  
스, 플랫 4

샤우나크, 써닐

영국, 허트포드쉬어 에스쥐13 7이이, 허트포드,  
117 웨어 로드

**브로크하니, 스테판, 제임스**

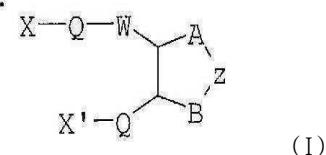
영국, 허트포드쉬어 에이엘7 1큐엔, 웨윈 가든 시  
티, 15 웨슬리우드

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

일반식 I의 화합물.



(여기서 X 및 X' 중 하나는 폴리알킬렌 글리콜(polyalkylene glycol), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 폴리아크릴레이트(polyacrylate), 폴리옥사졸린(polyoxazoline), 폴리비닐알콜(polyvinylalcohol), 폴리아크릴아미드(polyacrylamide) 또는 폴리메타크릴아미드(polymethacrylamide), HPMA 코폴리머, 폴리에스테르, 폴리아세탈, 폴리(오르소에스테르), 폴리카보네이트, 폴리(이미노 카보네이트), 폴리아미드, 디비닐에테르-말레산 무수물 또는 스티렌-말레산 무수물의 코폴리머, 폴리사카라이드, 또는 폴리글루탐산이고, 다른 하나는 수소이고,

각각의 Q는 독립적으로 연결기(linking group)를 나타내며;

W는 케토기 CO, 에스테르기 -O-CO- 또는 술폰기(sulphone) -SO<sub>2</sub>- 또는 그 기의 환원에 의해 얻어진 기, 또는 X-Q-W-가 함께 시아노기를 나타내고,

Z는 2 개의 티올기를 통해 A 및 B에 연결된 단백질로부터 유도된 하나의 기이고, 상기 2개의 티올기는 상기 단백질의 이황화 브릿지로부터 유도된 것이고,

A는 C<sub>1~5</sub> 알킬렌 또는 알케닐렌 사슬이며; 그리고

B는 하나의 결합이거나 C<sub>1~4</sub> 알킬렌 또는 알케닐렌 사슬이다.)

### 청구항 2

삭제

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 폴리머가 폴리에틸렌 글리콜인 것을 특징으로 하는 일반식 I의 화합물.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 각 연결기(linking group) Q가 독립적으로 직접 결합(direct bond), 알킬렌기, 또는 선택적으로-치환된 아릴 또는 헤테로아릴기이며, 그중 어떤 것은 산소원자, 황 원자, -NR기(여기서 R은 알킬 또는 아릴기임), 케토기, -O-CO-기 및 -CO-O-기로부터 선택된 하나 이상의 모이어티가 말단기가 되거나 중간기가 될 수 있는 것을 특징으로 하는 일반식 I의 화합물.

### 청구항 5

삭제

### 청구항 6

삭제

### 청구항 7

삭제

### 청구항 8

## 작제

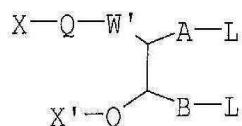
## 청구항 9

제1항에 있어서, 상기 티울기가 이황화 브럿지의 부분적 환원에 의해 생성된 것을 특징으로 하는 일반식 I의 화합물.

## 청구항 10

(i) 다음 일반식 II의 화합물 또는 (ii) 다음 일반식 III의 화합물을 일반식  $Z(Nu)_2$ 의 화합물과 반응시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 제1항, 제3항, 제4항 및 제9항 중 어느 하나의 화합물의 제조방법.

(여기서 Z는 2 개의 티울기를 통해 A 및 B에 연결된 단백질로부터 유도된 하나의 기이고, 상기 2개의 티울기는 상기 단백질의 이황화 브릿지로부터 유도된 것이고,



(II)

X 및 X' 중 하나는 폴리알킬렌 글리콜(polyalkylene glycol), 폴리비닐파롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 폴리아크릴레이트(polyacrylate), 폴리옥사졸린(polyoxazoline), 폴리비닐알콜(polyvinylalcohol), 폴리아크릴아미드(polyacrylamide) 또는 폴리메타크릴아미드(polymethacrylamide), HPMA 코폴리머, 폴리에스테르, 폴리아세탈, 폴리(오르소에스테르), 폴리카보네이트, 폴리(이미노 카보네이트), 폴리아미드, 디비닐에테르-말레산무수물 또는 스티렌-말레산 무수물의 코폴리머, 폴리사카라이드, 또는 폴리글루탐산이고, 다른 하나는 수소이고,

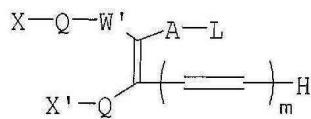
Q는 연결기(linking group)를 나타내며;

W'는 케토기 CO, 에스테르기  $-O-CO-$  또는 숀폰기(sulphone)  $-SO_2-$ , 또는 그 기의 환원에 의해 얻어진 기, 또는 X-Q-W-가 함께 시아노기이고

A는  $C_{1-5}$  알킬렌 또는 알케닐렌 사슬을 나타내며;

B는 하나의 결합 또는  $C_{1-4}$  알킬렌 또는 알케닐렌 사슬; 및

각 L은 독립적으로 이탈기(leaving group)를 나타내며;



(III)

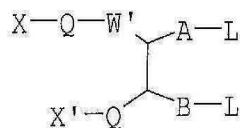
여기서  $X$ ,  $X'$ ,  $Q$ ,  $W'$ ,  $A$  및  $L$ 이 일반 화학식 II에 주어진 것과 같은 의미를 가지며, 또한 만약  $X$ 가 폴리머를 나타내면  $X'$  및  $W'$ 는 인접 원자와 함께 환을 형성할 수 있으며,  $m$ 은 정수 1~4를 나타낸다.)

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 이탈기 L은  $-SR$ ,  $SO_2R$ ,  $-OSO_2R$ ,  $-N^+R_3$ ,  $-N^+HR_2$ ,  $-N^+H_2R$ , 할로겐, 또는  $-O\emptyset$ 를 나타내며, 여기서 R은 알킬기 또는 아릴기이며,  $\emptyset$ 는 적어도 하나의 전자끄는 치환체를 포함하는 치환된 아릴기인 것을 특징으로 제1항, 제3항, 제4항 및 제9항 중 어느 한 화합물의 제조방법.

청구항 12

## 일반식 II의 화합물.



(II)

(여기서 X 및 X' 중 하나는 폴리알킬렌 글리콜(polyalkylene glycol), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 폴리아크릴레이트(polyacrylate), 폴리옥사졸린(polyoxazoline), 폴리비닐알콜(polyvinylalcohol), 폴리아크릴아미드(polyacrylamide) 또는 폴리메타크릴아미드(polymethacrylamide), HPMA 코폴리머, 폴리에스테르, 폴리아세탈, 폴리(오르소에스테르), 폴리카보네이트, 폴리(이미노 카보네이트), 폴리아미드, 디비닐에테르-말레산 무수물 또는 스티렌-말레산 무수물의 코폴리머, 폴리사카라이드, 또는 폴리글루탐산이고, 다른 하나는 수소이고,

Q는 연결기(linking group)를 나타내며;

W'는 케토기 CO, 에스테르기 -O-CO- 또는 술폰기(sulphone) -SO<sub>2</sub>- 또는 그 기의 환원에 의해 얻어진 기, 또는 X-Q-W-가 함께 시아노기이고

A는 C<sub>1-5</sub> 알킬렌 또는 알케닐렌 사슬을 나타내며;

B는 하나의 결합 또는 C<sub>1-4</sub> 알킬렌 또는 알케닐렌 사슬; 및

각 L은 독립적으로 이탈기(leaving group)를 나타낸다).

### 청구항 13

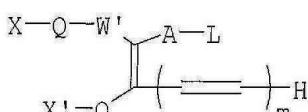
제1항, 제3항, 제4항 및 제9항 중 어느 하나의 화합물로서 생리적으로 허용가능한 화합물과 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

### 청구항 14

약제적 용도를 위한 제1항, 제3항, 제4항 및 제9항 중 어느 하나의 화합물.

### 청구항 15

일반식 III의 화합물.



(III)

(여기서, X 및 X' 중 하나는 폴리알킬렌 글리콜(polyalkylene glycol), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 폴리아크릴레이트(polyacrylate), 폴리옥사졸린(polyoxazoline), 폴리비닐알콜(polyvinylalcohol), 폴리아크릴아미드(polyacrylamide) 또는 폴리메타크릴아미드(polymethacrylamide), HPMA 코폴리머, 폴리에스테르, 폴리아세탈, 폴리(오르소에스테르), 폴리카보네이트, 폴리(이미노 카보네이트), 폴리아미드, 디비닐에테르-말레산 무수물 또는 스티렌-말레산 무수물의 코폴리머, 폴리사카라이드, 또는 폴리글루탐산이고, 다른 하나는 수소이고,

Q는 연결기(linking group)를 나타내며;

W'는 케토기 CO, 에스테르기 -O-CO- 또는 술폰기(sulphone) -SO<sub>2</sub>- 또는 그 기의 환원에 의해 얻어진 기, 또는 X-Q-W-가 함께 시아노기이고

A는 C<sub>1-5</sub> 알킬렌 또는 알케닐렌 사슬을 나타내며;

B는 하나의 결합 또는 C<sub>1-4</sub> 알킬렌 또는 알케닐렌 사슬; 및

각 L은 독립적으로 이탈기(leaving group)를 나타내며,

X가 폴리머를 나타내면 X' 및 W'는 인접 원자와 함께 환을 형성할 수 있으며, m은 정수 1~4를 나타낸다).

## 명세서

### 기술분야

[0001]

본 발명은 접합된 생물학적 분자 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리머의 새로운 화학적으로 기능화된 유도체이다.

### 배경기술

[0002]

많은 치료적으로 활성인 분자들은 임상학적 의학적 용도에 있어서 효능을 나타내는데 필요한 특성을 갖고 있지 않다. 예를 들면, 치료적으로 활성인 단백질 및 폴리펩티드들은 현재 생약제학적 산업분야 및 유전공학 분야에서 밝혀지고 제조되고 있다. 현재 적어도 80의 단백질계 의약이 미국 내에서 판매되고 있고 적어도 350 개 이상의 단백질계 의약이 임상 추적(clinical trial) 중에 있음에도(Harrris J, chess R: Effect of Pegylation on pharmaceuticals. Nature Review Drug Discovery, 2003, 2, 214-221), 대부분 친연 단백질들은 좋은 의약을 만들 수 없다. 왜냐하면 환자들에게 투여하자마자 몇 가지 고유의 단점을 갖는다: (1) 단백질들은 혈액이나 조직 내에 존재하는 엔도- 또는 엑소펩티다제에 의해 소화된다, (2) 많은 단백질들은 어느 정도 면역원성이이며, 그리고 (3) 단백질들은 신장 여과에 의해 빠르게 배출될 수 있다. 시스템적으로 유독성이거나 최적의 생물학적 이용효능(bioavailability) 및 약동학(pharmacokinetics)이 결핍된 의약에서 활성적 치료제로 사용된 다른 분자들은 유효 용량(effective dose)이 독성에 의해 제한되므로 저분자량의 분자들을 포함한다. 그러한 분자들은 염증 및 암, 감염 및 자동면역 질환으로 인한 용태를 치료하기 위해 통상 사용된다.

[0003]

수용성, 합성 폴리머, 특히 폴리알킬렌 글리콜들은 단백질과 같은 치료적으로 활성인 분자들을 접합하기 위하여 사용된다. 이들 치료용 접합체들은 순환 시간을 연장하고, 제거율을 줄이고 시스템적 독성을 줄여서 약동학을 바람직하게 변경하고, 그리고 몇몇의 경우에 있어서는 증가된 임상 효능을 보이는 것으로 나타났다. 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol: PEG)을 단백질에 공유적으로 결합시키는 이 공정은 통상 "페그화(PEGylation)"으로 통상 알려진다. 그러나 많은 다른 폴리머들은 접합 폴리머로서 검사되어 왔다.

[0004]

접합을 위한 많은 폴리머 시약은 가수분해적으로 불안정한 화학적 기능성을 접합하는 단계를 포함한다. 가수분해적으로 불안정한 폴리머 접합 시약의 예로는 예를 들면, 폴리알킬렌 옥사이드-N-숙신이미드 카보네이트(polyaklyene oxide-N-succinimide carbonate)[자일립스카이(Zalipsky) 미국 특허 제5,122,614호]를 포함하는 활성 에스테르이다. 이들 시약들은 혈액 또는 플라즈마를 포함하는, 수용성 매체 내에서 상대적으로 짧은 반감기(half live)를 갖는다. 이것으로 인해 접합 폴리머 시약을 화학양론적으로 과잉 첨가할 필요가 생긴다. 단백질 접합을 위해 화학양론적으로 과잉 첨가가 필요한 것은 반응혼합물로부터 폴리머-단백질 접합체를 정제하는 데 많은 노력과 비용을 요하기 때문에 이 시약의 가수분해적 안정성은 중요하다. 게다가, 이들 가수분해적으로 불안정한 시약들은 단백질 내에서 아민 화학적 기능성, 특히 리신 잔기의 ε-아민과 우선적으로 반응하는 경향이 있다. 대부분의 중요한 단백질들은 하나 이상의 리신 잔기, 그리고 종종 많은 리신 잔기를 갖기 때문에, 접합은 단백질 상의 많은 잔기 사이트(site)들에서 일어나서 비특이적이다. 하나의 폴리머 분자에 접합된 단백질들을 분리하기 위하여 접합 반응 혼합물을 정제하는 것은 가능하지만, 합리적인 비용으로 단백질 상의 동일한 아민기에 접합된 모든 폴리머-단백질 접합체들을 분리하는 것은 불가능하다. 비특이적 접합은 종종 단백질 기능의 손상을 초래한다. 예를 들면 리신 잔기를 통해 항체 및 항체 단편과 무작위적 폴리(알킬렌 옥사이드)이 접합하면 목적 항원의 친화도(affinity), 항원항체결합력(avidity) 또는 특이성을 감소시킬 수 있는 변형된 항체(또는 변형된 항체 단편들)가 된다. 추가적으로, 아민 특이적 폴리머 접합 시약들은 접합 반응 조건을 요구하는데, 이는 단백질상의 아민이 확실히 양성자화되지 않은 것을 선택하여야 하는 것이다. 이들 조건들은 중성보다 높은 pH 매체(8~10)을 요구하며, 이것으로 아민 모이어티들은 폴리머 접합 시약과 반응하기에 충분할 정도로 반응적이 된다. 높은 pH 조건들은 종종 단백질들을 구조적으로 변경 및 변성시키므로 해롭다. 이들 공정은 단백질 기능의 손상을 일으키는 결과가 된다. 아민 특이적 폴리머 접합 시약들은 단백질 상의 접근 가능한 아민 사이트들에 결합하는 경향이 있다. 이들 시약들은 운동시약(kinetic reagent)라고 칭할 수 있다. 그들은 불안정하고 단백질상에서 가장 평가가능한(assessable) 아미노 친핵 사이트들과 반응을 한다. 아민 아실화(amine acylation)에 의해 접합하는 아민 특이적 폴리머 접합 시약들은, 비접합된 단백질의 생리적 조건하에서는 정상적으로 존재할, 단백질 상의 아미노산 잔기의 아민기의 양전하를 잃게 된다. 아민 특이적 폴리머 접합 시약들의 이러한 특징들은 때때로 단백질의 부분적 기능 손상을 가져온

다. 아민 특이적이며 종종 가수분해적으로 불안정한 단백질에 접합한 폴리머 내에 결합된 다른 접합 기능기들은 이소시아네이트(W094/04193) 및 카보네이트(W090/13540)를 포함한다.

[0005] 최적화된 효능과 용량의 일관성 보장을 위해 특히 관련된 것은 단백질 당 접합된 폴리머 분자의 수를 동일하게 하고 각 폴리머 분자를 특이적으로 그리고 공유적으로 각 단백질 분자 내의 동일한 아민산 잔기에 확실히 접합시키는 것이다. 단백질 분자를 따라 사이트에 비특이적 접합이 일어나면 접합 생성물이 분포되고 종종 비접합 단백질을 만들어서 복잡한 혼합물을 만들며, 이는 정제하기 어렵고 지루하며 비용이 고가이다.

[0006] 단백질에 대해 티올 특이적 폴리머 접합 시약은 접합 시약의 성향, 즉 단백질 접합과 경쟁적으로 일어나는 가수분해, 단백질의 다른 아미노산 잔기에서의 비특이적 폴리머의 접합, 및 높은 pH 접합 반응 조건을 요구하는 접합 시약의 성향을 제한하는 방향으로 개발되어 왔다. 티올 특이적 폴리머 접합 시약들은 중성에 가까운 pH에서 사용될 수 있으며, 여기서는 단백질의 아미노산 잔기 상의 아민 기능적 모이어티은 양자화되어서 폴리머 접합 시약과의 접합 반응에서 효과적으로 경쟁할 수 없다. 상기 언급된 아민 특이적 시약들보다 상대적으로 가수분해적으로 안정한 티올 특이적 폴리머 접합 시약은 화학양론적으로 과잉량을 더 적게 사용할 수 있어서 폴리머-단백질 접합체의 정제 비용을 줄일 수 있다. 티올기에 대해 광범위하게 선택적인 접합 기능적 모이어티들은 요도아세트아미드(iodoacetamide), 말레이미드(maleimide)(제92/16221), 비닐술폰(W095/13312 및 WO 95/34326), 비닐 피리딘(WO 88/05433), 및 아크릴레이트 및 메타크릴레이트 에스테르(WO 99/01469)를 포함한다. 이를 티올 선택적 접합 모이어트들은 폴리머 사이에 하나의 티오에테르 접합 결합을 생성한다.

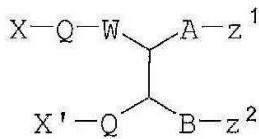
[0007] 대부분의 단백질들은 술프히드릴(sulphydral)이 재배열되어 손상된 단백질 기능을 가져오는 단백질 내 이황화 결합들을 생성시키는 반응들을 마구 섞기 때문에 이들 유리 술프히드릴을 갖지 않는다. 유리 술프히드릴을 갖는 단백질들에는 이들 술프히드릴은 종종 단백질 기능에 매우 중요하다. 단백질에서 전형적으로 술프히드릴 모이어티들의 수가 아미노 모이어티들의 수보다 작다(예를 들면 리신 또는 히스타민). 단백질에 대한 접합이 티올기에서 특이적으로 일어날 수 있고 단백질들이 유리 티올기를 전형적으로 갖고 있지 않기 때문에, PEG 부착을 위한 티올 사이트를 도입하기 위해 돌연변이유도에 의한 단백질의 사이트-특이적 변형을 하는 것을 예로 들 수 있다. 그러나 그러한 변형들은 비용이 매우 상승한다. 도입된 유리 술프히드릴은 단백질 뒤섞임 및 단백질 이합체화를 위한 가공 단백질에서 전에 언급한 것과 유사한 제한을 가질 수 있다. 또한 세균원으로부터 변형 단백질을 생성하고 돌연변이시키는 공정으로 인해 유리 술프히드릴은 예를 들면, 글루타티온과 이황화 결합을 하게 한다. 예를 들면, 인터루킨-2은, 예를 들면 돌연변이유도에 의해 변형되어 트레오닌 잔기를 시스테인과 치환하여 PEG의 부위 특이적 부착이 가능하게 된다[Goodson RJ, Katre NV; Bio/Technology (1990) 8, 343-346].

[0008] 선행기술에는 접합 인자들은 폴리머 형태학, 분자량 특성, 화학적 기능성의 면에서 치료학적으로 활성인 중요 분자들과 최적으로 결합되어야만 하는 것으로 알려져 있다. 상기 폴리머 단백질 접합체가 안전하고, 효과적인 의학적 용도를 위해 여러가지 많은 바람직하고 필요한 성질들이 있지만, 단백질의 활성 및 안정성에 있어서 폴리머 접합의 효과는 업무 수행에 있어 아주 중요하다. 접합의 위치와 양에 관련된 접합 변수들과 폴리머의 특성들은 생물학적 그리고 생리화학적 성질과 최적으로 서로 관련되어야만 한다.

### 발명의 상세한 설명

[0009] 우리는 그중에서도 단백질 내의 두 개의 시스테인 잔기로부터 유도된 두 개의 황 원자와 접합하여 새로운 티오에테르 접합체를 생성하는 데 사용될 수 있는 일련의 새로운 시약을 현재 발견하였다. 첫 번째 예로서 본 발명은 천연 단백질내에 자연적 이황화 브리지를 형성하는 두 개의 황원자를 접합시키고자 의도한 것이다. 이황화 결합은 의학적으로 관련 단백질, 특히 분비 단백질(secretory protein), 리소솜 단백질(lysosomal protein), 및 막 단백질의 외형질 영역(exoplasmic domains of membrane protein)에서 발견되었다. 상기 기술은 단백질에 대해 폴리머를 접합시키는 알려진 기술보다 우수한 장점을 제공한다.

[0010] 본 발명은 다음 일반식 I의 화합물을 제공한다.



(I)

[0011] 여기서 X 및 X'는 폴리머를 나타내고, 다른 것은 수소 원자를 나타낸다;

[0012] 각각의 Q는 독립적으로 연결기(linking group)를 나타내며;

[0013] W는 전자 끄는 모이어티(electron-withdrawing moiety) 또는 전자 끄는 모이어티의 환원에 의해 제조가능한 모이어티; 또는 만약 X'가 폴리머를 나타낸다면, X-Q-W는 함께 전자끄는기를 나타내며; 그리고 또한, 만약 X가 폴리머를 나타내면, X' 및 전자끄는기 W는 인접 원자와 함께 환을 형성하며;

[0014] Z<sup>1</sup> 및 Z<sup>2</sup> 각각은 독립적으로 생물학적 분자로부터 유도된 기를 나타내며, 각각은 친핵성 모이어티를 통해 A 및 B에 연결되며; 또는 Z<sup>1</sup> 및 Z<sup>2</sup>는 함께 두 개의 친핵성 모이어티들을 통해 A 및 B에 연결된 생물학적 분자로부터 유도된 하나의 기를 나타내며;

[0015] A는 C<sub>1~5</sub> 알킬렌 또는 알케닐렌 사슬이며; 그리고

[0016] B는 하나의 결합이거나 C<sub>1~4</sub> 알킬렌 또는 알케닐렌 사슬이다.

[0017] 폴리머 X 또는 X'는 예를 들면 폴리알킬렌 글리콜(polyalkylene glycol), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 폴리아크릴레이트(polyacrylate), 예를 들면 폴리아크릴록시모르포린(polyacryloylmorpholine), 폴리옥사졸린(polyoxazoline), 폴리비닐알콜(polyvinylalcohol), 폴리아크릴아미드(polyacrylamide) 또는 폴리메타크릴아미드(polymethacrylamide), 예를 들면 폴리카르복시메타크릴아미드, 또는 HPMA 코폴리머일 수 있다. 추가적으로 X 또는 X'는 효소 분해나 가수분해적 감쇄에 민감한 폴리머일 수 있다. 그러한 폴리머들은 예를 들면, 폴리에스테르, 폴리아세탈, 폴리(오르소에스테르), 폴리카보네이트, 폴리(이미노 카르보네이트), 및 폴리(아미노산)과 같은 폴리아미드를 포함한다. 폴리머 X 또는 X'는 호모폴리머, 무질서 코폴리머(random copolymer) 또는 블록 코폴리머(block copolymer)과 같이 구조적으로 정의된 코폴리머일 수 있다. 예를 들면 X 또는 X'는 두 개 이상의 알킬렌 옥사이드들로부터 유도되거나, 또는 폴리에스테르, 폴리아세탈, 폴리(오르소에스테르), 또는 폴리(아미노산) 중 하나와 폴리(알킬렌 옥사이드)으로부터 유도된 블록 코폴리머일 수 있다. 사용될 수 있는 폴리기능적 폴리머들은 디비닐에테르말레산 무수물(divinylether maleic anhydride) 및 스티렌-말레산 무수물의 코폴리머를 포함한다. 자연적으로 발생하는 폴리머들, 예를 들면 키틴, 덱스트란(dextran), 덱스트린(dextrin), 키토산(chitosan), 전분(starch), 셀룰로오스, 글리코겐, 폴리(살리실산)[poly(sialylic acid)] 및 그의 유도체와 같은 폴리사카리드가 사용될 수 있다. 사카리드와 같은 천연 모노머로부터 그리고 에틸렌 옥사이드 또는 메타크릴산과 같은 합성 모노머로부터 유도된 혼성 모노머(hybrid polymer)가 사용될 수 있는 것처럼, 폴리글루탐산과 같은 폴리머가 또한 사용될 수 있다.

[0018] 만약 폴리머가 폴리알킬렌 글리콜이라면, 이는 C<sub>2</sub> 및/또는 C<sub>3</sub> 유니트를 포함하는 것이 바람직하며, 특히 폴리에틸렌 글리콜이 바람직하다. 폴리머, 특히 폴리알킬렌 글리콜은 하나의 선형 사슬을 포함하거나, 작거나 큰 많은 사슬들로 이루어진 분지쇄 형태를 가질 수도 있다. 소위 플루로닉(Pluronic)들은 PEG 블록 코폴리머의 중요한 한 종류이다. 이들은 에틸렌 옥시드와 프로필렌 옥시드 블록들로부터 유도된다. 치환된 폴리알킬렌 글리콜, 예를 들면 메톡시폴리에틸렌 글리콜이 사용될 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 하나의 사슬 폴리에틸렌 글리콜이 적당한 기, 예를 들면 알콕시기, 예를 들면 메톡시, 아릴록시, 카르복시 또는 히드록시기에 의해 개시되며 상기 사슬의 다른 말단에서 연결기 Q에 연결된다.

[0019] 폴리머 X 또는 X'는 선택적으로 다른 바람직한 방법으로 유도되거나 기능화될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 목적인 접합을 위한 두 개 이상의 화학적 모이어티들을 갖는 폴리머들은 두 개 이상이 연결된 생활성적(bioactive) 분자들의 접합체들을 제조하는 데 사용될 수 있다. 반응기들은 폴리머 말단 또는 말단기에, 또는 펜던트 링커(pendant linker)를 통해 폴리머 사슬을 따라서 연결될 수 있다; 그러한 경우에, 상기 폴리머는 예를 들면 폴리아크릴아미드, 폴리메타크릴아미드, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 또는 말레산

무수물 코포릴며이다. 하나 이상의 생물학적 분자, 전형적으로 생물학적으로 활성 폴리펩티드 또는 약물을 포함하는 다중 결합 접합체들은 시너지 효과와 추가적인 장점으로 그 결과가 나타날 수 있다. 만약, 원한다면, 상기 폴리머는 종래 방법을 사용하여 고체 지지체에 결합될 수도 있다.

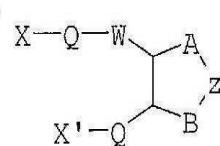
[0021] 폴리머의 최적 분자량은 물론 원하는 사용 목적에 따라 달라질 것이다. 바람직하게는 수평균분자량(number average molecular weight)은 500g/mole~약 75,000g/mole의 범위이다. 일반식 I의 화합물을 예를 들어 암, 감염 또는 자동면역 질환, 또는 의상에 의해 발생된 염증 치료에 사용하기 위하여, 순환시키고 세포 조직에 침투시키고자 할 때 2000-30,000g/mole의 저 분자량의 폴리머를 사용하는 것이 유리할 수 있다. 일반식 I의 화합물을 순환시키고자 할 때 더 높은 분자량의 폴리머, 예를 들면 20,000-75,000g/mole의 폴리머를 사용하는 것이 유리할 수 있다. 사용되는 상기 폴리머는 상기 접합체가 그의 의도하는 용도에 맞는 용매 매체에서 용해 가능하도록 선택되어야만 한다. 생물학적 사용을 위해, 특히 포유동물에 대해 임상 치료적 투여를 위한 진단 및 치료적 사용을 위해서는, 상기 접합체는 수용성 매체에서 용해가능할 것이다. 효소와 같은 많은 단백질들은 산업, 예를 들면 화학 반응들을 촉매화하는 산업에서 유용하다. 그러한 용도로 사용하고자 하는 접합체들에 대하여, 상기 접합체는 수용성 또는 유기 매체 중 어느 하나 또는 둘 다에서 용해가능할 필요가 있을 수 있다. 상기 폴리머는 생물학적 분자의 필요한 기능을 손상시키지 않아야 한다.

[0022] 연결기(linking group) Q는 예를 들면, 직접 결합(direct bond), 알킬렌기(바람직하게는 C<sub>1-10</sub> 알킬렌기), 또는 선택적으로-치환된 아릴 또는 헤테로아릴기이며, 그중 어떤 것은 하나 또는 그 이상의 산소원자, 황 원자, -NR기(여기서 R은 하기를 의미함), 케토기, -O-CO-기 및/또는 -CO-O-기가 말단기가 되거나 중간기가 될 수 있다. 적당한 아릴기는 폐닐 및 나프틸기를 포함하며, 적당한 헤테로아릴기는 피리딘, 피롤(pyrrole), 푸란(furan), 피란(pyran), 이미다졸, 피라졸(pyrazole), 옥사졸, 피리다진, 프리미딘(primidine) 및 푸린을 포함한다. 폴리머에 대한 연결은 가수분해적으로 불안정한 결합, 또는 불용성 결합(non-labile bond)에 의해 이루어질 수 있다.

[0023] 선택적으로 치환된 아릴 또는 헤테로아릴기에 존재할 수 있는 치환체들은 예를 들면 하나 이상의 같거나 다른 치환체로, -CN, -NO<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>R, -COH, CH<sub>2</sub>OH, -COR, -OR, -OCOR, -OCO<sub>2</sub>R, -SR, -SOR, SO<sub>2</sub>R, -NHCOR, -NRCOR, -NHCO<sub>2</sub>R, -NR'CO<sub>2</sub>R, -NO, -NHOH, -NR'OH, -C=N-NHCOR, -C=N-NR'COR, -N<sup>+</sup>R<sub>3</sub>, -N<sup>+</sup>H<sub>3</sub>, -N<sup>+</sup>HR<sub>2</sub>, -N<sup>+</sup>H<sub>2</sub>R, 할로겐, 예를 들면 불소 또는 염소, -C≡CR, -C≡CR<sub>2</sub> 및 -C=CHR을 포함하며, 여기서 R 또는 R'는 독립적으로 수소 원자, 알킬(바람직하게는 C<sub>1-6</sub> 알킬) 또는 아릴(바람직하게는 폐닐)기를 나타낸다. 전자 끄는 치환체가 존재하는 것이 더욱 바람직하다.

[0024] W는 예를 들면 케토 또는 알데히드기 CO, 에스테르기 -O-CO- 또는 숀폰기(sulphone) -SO<sub>2</sub>- 또는 그의 환원에 의해 얻어진 기, 예를 들면, CH.OH기, 에테르기 CH.OR기, 에스테르기 CH.O.C(O)R, 아민기 CH.NH<sub>2</sub>, CH.NHR 또는 CH.NR<sub>2</sub>, 또는 아미드 CH.NHC(O)R 또는 CH.N(C(O)R)<sub>2</sub>를 나타낸다. 만약 X-Q-W-가 함께 전자끄는기를 나타내면, 이기는 예를 들면 시아노기일 수 있다.

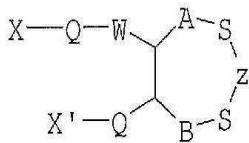
[0025] 본 명세서의 다음 부분에서, Z<sup>1</sup> 및 Z<sup>2</sup>는 공동으로 Z로 나타낼 수 있을 것이다. Z<sup>1</sup> 및 Z<sup>2</sup>가 함께 하나의 생물학적 분자를 나타내야만 하는 것이 본 발명의 바람직한 실시예이다:



[0026] Z는 원하는 생물학적 분자, 예를 들면 단백질로부터 유도될 수 있다. 상기 단백질은 예를 들면 폴리펩티드, 항체, 항체 단편, 효소, 사이토킨, 케모킨(chemokine) 또는 수용체일 수 있다. 통상 이황화 브릿지를 통해 원형화되는 속박(contrained) 또는 원형의 폴리펩티드, 및 항원결정인자(epitope)가 또한 사용될 수 있다. 적당한 생물학적 분자의 구체적인 예들은 하기에 제시된다.

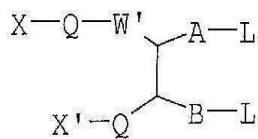
[0028] 상기 기능기 Z에 대하여 A 또는 B를 연결하는 바람직한 친핵성 모이어티는 티올기 또는 아민기로부터 유도된

다. 두 개의 티울기는 자연 또는 가공된 이황화(시스테인) 브릿지의 부분적 환원에 의해 생성될 수 있다. 여기서  $Z^1$  및  $Z^2$ 는 두 개의 티울기를 통해 A기 및 B기에 연결된 하나의 생물학적 분자를 형성하며, 화학식 I의 화합물은 다음 식을 갖는다:



[0029]

본 발명은 또한 일반식 I의 화합물의 제조방법을 제공하며, 이 방법은 (i) 다음 일반식 II의 화합물 또는 (ii) 다음 일반식 III의 화합물을 일반 화학식 IV의 화합물과 반응시키는 단계를 포함한다:



[0031]

(II)

[0032]

여기서 X 및 X' 중 하나는 폴리머를 나타내며 다른 것은 수소 원자를 나타내며;

[0033]

Q는 연결기(linking group)를 나타내며;

[0034]

W'는 전자끄는기, 예를 들면 케토기, 에스테르기  $-O-CO-$  또는 술톤기  $-SO_2-$ 를 나타내며; 만약 X'가 폴리머를 나타내면, X-Q-W는 함께 전자끄는기를 나타내며;

[0035]

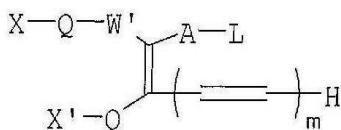
A는  $C_{1-5}$  알킬렌 또는 알케닐렌 사슬을 나타내며;

[0036]

B는 하나의 결합 또는  $C_{1-4}$  알킬렌 또는 알케닐렌 사슬; 및

[0037]

각 L은 독립적으로 이탈기(leaving group)를 나타내며;



[0038]

(III)

여기서 X, X', Q, W', A 및 L이 일반 화학식 II에 주어진 것과 같은 의미를 가지며, 또한 만약 X가 폴리머를 나타내면 X' 및 전자끄는기 W'는 인접 원자와 함께 환을 형성할 수 있으며, m은 정수 1~4를 나타내며;

[0040]

$Z(Nu)_2$  (IV)

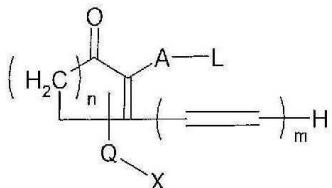
여기서 Z는 상술한 것과 같으며 각 Nu는 독립적으로 친핵기, 예를 들면 티올 또는 아민기를 나타낸다. 만약  $Z^1$  및  $Z^2$ 가 별도의 분자들이라면, 상기 반응은 연속적인 분자들  $Z^1Nu$  또는  $Z^2Nu$ 과의 연속적인 단계로 일어난다.

[0042]

상기 또는 각각의 이탈기 L은 예를 들면  $-SR$ ,  $SO_2R$ ,  $-OSO_2R$ ,  $-N^+R_3$ ,  $-N^+HR_2$ ,  $-N^+H_2R$ , 할로겐, 또는  $-O\emptyset$ 를 나타낸다.

내며, 여기서 R은 상술한 것과 같은 의미를 가지며, Ø는 치환된 아릴기, 특히 페닐기, 적어도 하나의 전지끄는 치환체, 예를 들면 -CN, -NO<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>R, -COH, CH<sub>2</sub>OH, -COR, -OR, -OCOR, -OCO<sub>2</sub>R, -SR, -SOR, SO<sub>2</sub>R, -NHCOR, -NRCOR, -NHCO<sub>2</sub>R, -NR'CO<sub>2</sub>R, -NO, -NHOH, -NR'OH, -C=N-NHCOR, -C=N-NR'COR, -N<sup>+</sup>R<sub>3</sub>, -N<sup>+</sup>H<sub>3</sub>, -N<sup>+</sup>HR<sub>2</sub>, -N<sup>+</sup>H<sub>2</sub>R, 할로겐, 특히 염소 또는 특히 불소, -C≡CR, -C=CR<sub>2</sub> 및 -C=CHR을 포함하며, 여기서 R 또는 R'는 상술한 것과 같은 의미를 갖는다.

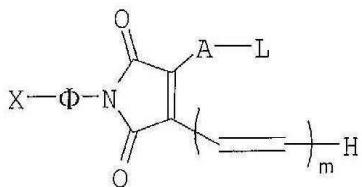
[0043] W' 및 X'가 함께 링을 형성하는 전형적인 구조들은



(IIIa)

[0044]

여기서 n은 1~4의 정수이며, 그리고



(IIIb)

[0046]

를 포함한다.

[0048]

각 Nu가 티올인 일반식 (IV)의 화합물은 시스테인 연결,



[0049]

즉 (V) 을 포함하는 단백질의 부분적인 환원에 의해 제조될 수 있다.

[0050]

본 발명에 따른 방법은 단백질내 두 개의 시스테인 아미노산으로부터 유도된 이황화 결합을 부분적으로 환원시키고 그 위치에서 상기 환원된 생성물을 화학식 II 또는 III의 화합물과 반응시킴으로서 적당히 수행할 수 있다. 이황화물은 예를 들면, 디티오프레이티올(dithiothreitol), 메르캅토에탄올(mercaptoethanol) 또는 트리스-카르복시에틸포스핀으로 종래 방법을 사용하여 환원될 수 있다. 상기 방법은 용매나 모든 반응물들이 용해 가능한 용매 혼합물에서 수행될 수 있다. 친핵기를 포함하는 생물학적 분자는(예를 들면 단백질)은 일반식 II 또는 III의 화합물과 수용성 반응 매체 내에서 직접 반응할 수 있다. 이 반응 매체는 또한 친핵기의 pH 요구도에 따라 완충될 수 있다. 반응을 위한 최적 pH는 일반적으로 약 5.5 및 약 8의 사이, 예를 들면 약 7.4, 바람직하게는 약 6.0-6.5이다. 3~37°C 사이의 반응 온도가 일반적으로 적당하며; 만약 이들 공정이 일어날 수 있는 온도에서 접합 반응이 일어나면 단백질 또는 다른 생물학적 분자들은 기능을 손상할 정도로 분해하거나 변성될 수 있다. 유기 매체(예를 들면 THF, 에틸아세테이트, 아세톤)에서 수행된 반응들은 전형적으로 예를 들면 0°C 이하에서 실온까지의 온도에서 수행된다.

[0051]

단백질은 하나 또는 다수의 이황화 브릿지를 포함할 수 있다. 단백질 내 하나 또는 다수의 이황화 브릿지를 환원시켜 유리 설프히드랄 모이어티(free sulfhydryl moiety)를 생성할 수 있다. 이황화물 환원의 정도 및 사용된 폴리머 접합시약의 화학양론에 따라, 상기 단백질에 폴리머 분자들을 하나 또는 다수 접합시킬 수 있다. 만약 이황화물의 총 수보다 적은 수를 환원시키고자 한다면, 다른 반응 조건을 사용하거나 또는 변성제를 첨가하여 부분적으로 환원시킬 수 있는 것처럼, 고정된 환원제를 사용할 수도 있다.

[0052] 선택적으로 티울기의 원료는 시스테인으로부터 유도되거나 이황화 브릿지로부터 본래 유도된 것이 아닌 티울일 수 있다. 만약 티울기의 원료가 이황화브릿지라면, 이는 사슬간 또는 사슬내일 수도 있다.

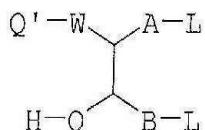
[0053] 생물학적 분자는 많은 선행 기술의 시약들과 달리, 화학양론적 당량(stoichiometric equivalent) 또는 약간 과량의 시약을 사용하여 본 발명의 시약과 효과적으로 접합할 수 있다. 그러나 본 발명의 시약들은 단백질들을 용매화하기 위해 사용된 수용성 매체와 경쟁적으로 반응하지 않기 때문에, 과량의 화학양론적 양의 시약을 사용하여 접합반응을 수행하는 것이 가능하다. 과량의 시약은 단백질의 일상적인 정제과정 동안 이온 교환 크로마토그래피에 의해 용이하게 제거될 수 있다.

[0054] 화학식 II 및 III의 화합물들은 새롭고, 따라서 본 발명은 이들 화합물 그 자체를 또한 제공한다. 이들 새로운 시약들은 접합기술에 있어서, 획기적인 돌파구를 제공하며, 상기 폴리머 상의 상기 화학 기능적 모이어티는 교차-기능화되고, 잠재적으로 교차-접합되며, 두 개의 친핵체들, 특히 단백질 내 천연 이황화 결합으로부터 유도된 두 개의 티울에 대해 선택적인 비스-알킬화 모이어티(bis-alkylating moiety)를 포함한다.

[0055] 본 발명에 따른 방법의 중간 생성물은 일반식 I의 화합물이며, 여기서 W는 전자끄는기이다. 그러한 화합물들은 그들 스스로 유용성을 가지며; 본 발명의 제조방법이 적당한 조건들하에서 가역적이기 때문에, 추가적으로 W가 전자끄는 모이어티인 화학식 I의 화합물들은 유리 단백질 방출이 요구되는 응용분야, 예를 들면 직접적인 임상 분야에서 유용하다. 전자끄는 모이어티 W는 그러나 환원되어 상기 단백질의 방출을 막는 모이어티를 제공할 수 있으며, 그러한 화합물들은 또한 임상, 산업 및 진단 응용분야에서 유용할 것이다.

[0056] 그러므로, 예를 들면, 케토기를 포함하는 모이어티 W는 환원되어 CH(OH)기를 포함하는 모이어티 W가 될 수 있으며; 에테르기 CH.OR가 히드록시기와 에테르화제(therifying agent)의 반응으로 얻어질 수 있으며; 에스테르기 CH.O.C(O)R이 히드록시기와 아실화제(acylating agent)의 반응으로 얻어질 수 있으며; 아민기 CH.NH<sub>2</sub>, CH.NHR 또는 CH.NR<sub>2</sub>는 케톤 또는 알데히드로부터 환원적 아민노화(amination)에 의해 제조될 수 있으며; 또는 아미드 CH.NHC(O)R 또는 CH.N(C(O)R)<sub>2</sub>는 아민의 아실화에 의해 형성될 수 있다. 시아노기인 X-Q-W기는 환원되어 아민기가 될 수 있다.

[0057] X가 폴리머인 일반식 II의 화합물은 일반식 VI의 화합물을 일반식 VII의 폴리머와 반응시켜 제조될 수 있으며,



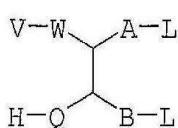
(VI)

[0058] 여기서, Q', W, A, B 및 L은 상술한 것과 같은 의미를 가지며,

[0059] X-V (VII)

[0060] 여기서, X는 폴리머; Q' 및 V는 VI 및 VII의 화합물이 함께 반응하여 화학식 II의 원하는 화합물을 생성할 수 있도록 선택된다.

[0062] 선택적으로, 다음 화학식 VIII의 화합물은



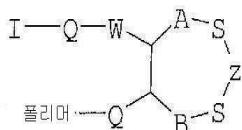
(VIII)

[0064] 다음 일반식 IX의 폴리머와 반응할 수 있다.

[0065] X-Q' (IX)

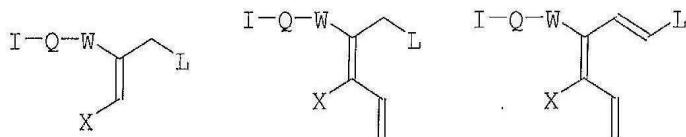
[0066] 일반식 III의 화합물은 일반식II의 화합물로부터 염기 중재 제거반응(base mediated elimination)에 하나의 이탈기 L을 제거하여 제조될 수 있다.

[0067] 일반식 I의 화합물은 생체내(in vivo)에서 화합물을 추적할 수 있도록 이미지화제(imaging agent), 예를 들면 방사능 뉴클레오티드(radio nucleotide)를 포함할 수 있다. 적절하게 방사능 뉴클레오티드 또는 이미지화제 I는 W기를 통해 결합되어, 예를 들면 하기 타입의 화합물을 생성할 수 있으며,



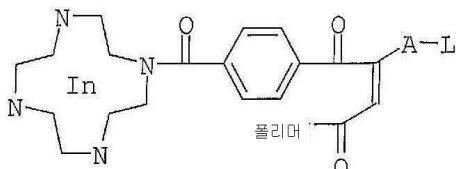
[0068]

[0069] 이것은 예를 들면 하기 타입의 시약들



[0070]

[0071] 예를 들면



[0072]

[0073] 의 시약으로부터 제조될 수 있다.

[0074] 일반식 I의 화합물들은 수많은 분야에서 응용될 수 있다. 그들은 예를 들면 환자에 대한 직접적인 임상적 응용분야에 사용될 수 있으며, 따라서, 본 발명은 또한 일반화학식 I의 화합물과 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 치료용으로 사용하기 위한 일반식 I의 화합물과, 일반식 I의 화합물 또는 본 발명에 따른 약제학적 조성물 또는 화학식 I의 화합물의 약제학적으로 효과적인 양을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 환자 치료하는 방법을 제공한다. 어떤 원하는 약제학적 효과, 예를 들면 외상치료, 효소대체치료(enzyme replacement), 독소 제거(toxin removal), 항염증치료(anti-inflammatory), 항감염치료, 면역조절(immunomodulatory), 예방접종(vaccination) 또는 항암치료등은 생물학적 분자를 적당히 선택하여 얻을 수 있다.

[0075]

일반 화학식 I의 화합물은 비임상적 분야에서 사용될 수 있다. 예를 들면, 효소와 같이 생리적으로 활성인 화합물은 유기 용매에서 반응을 촉매할 수 있으며, 일반식 I의 화합물들은 그러한 분야에서 사용될 수 있다. 게다가, 일반식 I의 화합물들은 진단 도구들로 사용될 수 있다.

[0076]

필요한 응용분야에 따라 본 발명에서 유용성을 가질 수 있는 몇 가지 특이적 생물학적 분자들을 다음에 제공한다. 효소들은 탄수화물-특이적 효소(carbohydrate-specific enzyme), 단백질 분해 효소(proteolytic enzyme) 등을 포함한다. 산업(유기계 반응들)과 일반적으로 생물학적 분야 및 특히 치료분야에서 모두에서 관심있는 효소들은 미국 특허 제 4,179,337호에 개시된 산화환원효소(oxidoreductase), 전이효소(transferase),

가수분해효소(hydrolase), 분해효소(lyase), 이성질화효소(isomerase) 및 연결효소(ligase)를 포함한다. 관심 있는 구체적인 효소들은 아스파라기나아제(asparaginase), 아르기나아제(arginase), 아데노신 디아미나제(adenosine deaminase), 수퍼옥시드 디스뮤타제(superoxide dismutase), 카탈라아제(catalase), 키모트립신(chymotrypsin), 리파아제(lipase), 요산분해효소(uricase), 빌리루빈 옥시다아제(bilirubin oxidase), 글루코오스 옥시다아제, 글루쿠로니다아제(glucuronidase), 갈락토시다아제(galactosidase), 글루코세르브로시다아제(glucocerbrosidase), 글루쿠로니다아제, 글루타미나아제(glutaminase)를 포함한다.

[0077] 본 발명의 일반식 I의 화합물에 사용된 생물학적으로 활성인 분자들은 예를 들면 팩터 8, 인슐린, ACTH, 글루카곤(glucagon), 성장억제호르몬(somatostatin), 성장호르몬(somatotropin), 티모신(thymosin), 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone), 색소성 호르몬(pigmentary hormone), 소마토메딘(somatomedin), 에리트로포이에틴(erythropoietin), 황체형성호르몬(luteinizing hormone), 시상하부유리인자(hypothalamic releasing factor), 항이뇨호르몬(antidiuretic hormone), 프로락틴(prolactin), 인터루킨(interleukin), 인터페론(interferon), 세포군자극인자(colony stimulating factor), 혼모글로빈, 시토카인(cytokine), 항체, 용모생식샘 자극 호르몬(chorionic gonadotropin), 난포 자극 호르몬(follicle-stimulating hormone), 갑상선 자극 호르몬(thyroid stimulating hormone) 및 조직 플라스미노전 활성자(tissue plasminogen activator)를 포함한다.

[0078] 인터루킨, 인터페론 및 세포군 자극 인자와 같은 상기 단백질들 중 어떤 것들은 또한 비당화된 형태(non-glycosilated form), 통상 재조합 단백질 기술에 의해 제조된 결과로 존재한다. 비당화된 형태(non-glycosilated version)가 본 발명에 사용될 수 있다.

[0079] 예를 들면, 인터페론들에 대하여, 본 발명은 비-접합된 인터페론에 비하여 생물학적 활성도가 유지되는 접합체의 제조가 가능하게 한다. 가장 놀라운 결과는 알려진 접합 기술을 사용할 수 없다는 것이다.

[0080] 다른 중요 단백질들은 드레보그 등(Dregorg et al. Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst. (1990) 6 315 365)에 의해 개시된 알레르기항원(allergen) 단백질이 있으며, 이는 폴리(알킬렌 옥시드)와 같은 폴리머와 접합될 때 알레르기항원성(allergenicity)을 환원시켜 결과적으로 내성 유발인자(tolerance inducer)로 사용되기에 적당하다. 개시된 항원들 중에는 래그위드 항원 E(Ragweed antigen E), 꿀벌 독(honeybee venom), 졸진드기(mite) 알레르기항원 등이 있다.

[0081] 면역글로불린(immunoglobulin), 난알부민(ovalbumin), 리파아제, 글루코세르브로시다아제(glucocerebrosidase), 렉틴(lectin), 조직 플라즈미노겐 활성인자(tissue plasminogen activator) 및 당화된 인터루킨, 인터페론 및 세포군 자극인자와 같은 글리코폴리펩티드(glycopolypeptide)가 IgG, IgE, IgM, IgD 및 그의 단편과 같은 면역 글로불린이기 때문에 중요하다.

[0082] 진단 및 치료의 목적을 위하여 임상적 의약에 사용되는 항체 및 항체 단편들이 특히 중요하다. 상기 항체는 단독으로 사용되거나 방사선동위원소(radioisotope) 또는 세포독성(cytotoxic)/항감염성(antiinfective) 약품과 같은 또 다른 원자나 분자와 공유적으로 접합["부하"] 될 수 있다. 항원결정인자(epitope)를 예방접종에 사용하여 면역원성 폴리머-단백질 접합체 생산할 수 있다.

[0083] 본 발명의 제조방법의 주된 특징은  $\alpha$ -메틸렌 이탈기 및 이중결합이 미카엘 활성 모이어티(Michael activating moiety)로서 작용하는 전자끄는기능과 교차-접합되는 것이다. 만약 이탈기가 직접적인 치환보다 교차-기능적 시약으로 제거되는 경향이 있고 상기 전자끄는기가 미카엘 반응을 위한 적당한 활성 모이어티라면 일련의 미카엘 및 역-미카엘 반응에 의해 순차적인 분자간 비스-알킬화가 일어날 수 있다. 이탈 모이어티는 첫번째 알킬화가 일어나고 순차적이며 상호작용적인 미카엘 및 역-미카엘 반응들에 의해 비스-알킬화가 일어난 후에까지는 노출되지 않은 잡복 접합된 이중결합을 가리는 역할을 한다[J. Am. Chem. Soc. 1979, 101, 3098~3110 and J Am. Chem. Soc. 1988, 110, 5211~5212에 기술됨]. 상기 전자끄는기 및 상기 이탈기를 최선으로 선택하여서 비스알킬화가 순차적인 미카엘 및 역-미카엘 반응에 의해 일어날 수 있게 한다.

[0084] 이중결합에 또는 이탈기 및 전자끄는기 사이에 접합된 추가적인 다중 결합들을 갖는 교차-기능적 알킬화제를 제조하는 것이 또한 가능하다[J. Am. Chem. Soc. 1988, 110, 5211~5212에 기술됨]

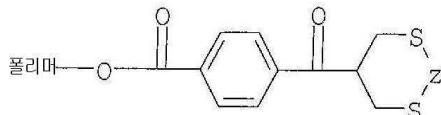
[0085] 상기 언급된 형태의 교차-기능화된 비스-알킬화 시약이 미카엘-역 미카엘 평형(Michael-retro Michael equilibria)에 의해 조절된 알킬화반응을 하기 때문에 그리고 3차 구조를 중요하게 유지하는 조절형태의 단백질 내의 하나 이상의 이황화 결합의 수를 부분적으로 감소시키는 것이 가능하기 때문에, 주어진 이황화 결합

의 시스테인들로부터 두 개의 설프히드랄을 가로질러서 비스-알킬화가 일어날 수 있그게 된다. 그러한 연속적인 반응들로 인하여 비스 알킬화제로 이황화 브릿지가 재아닐링(reannealling)되게 된다.

[0086] 화학식 I의 화합물을 제공하기 위하여 접합에 의해 형성된 티올 에테르 결합들은 일반적으로, 수용성 용액에서 가수분해적으로 안정하다. 이 시약들은 그 자체로 또한 가수분해적으로 안정하다. 이와 관련해서, 만약 생리적 pH 및 45°C까지의 온도에서 실질적인 감손이 없다면 가수분해적으로 안정한 화합물로 간주 된다. 8시간에 걸쳐 이러한 조건하에서 50% 이하의 감손이 있으면 약한 것으로 간주된다.

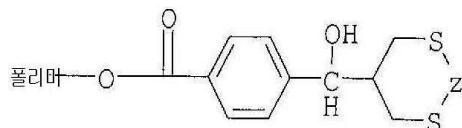
[0087] 본 발명은 말단 또는 폴리머의 주사슬을 따라 펜던트 사슬에 교차-기능화된 비스-알킬화 기능성을 갖는 폴리머 시약을 제조하는 것을 가능하게 한다는 것으로 평가될 것이다.

[0088] 본 발명에 따른 새로운 접합체들의 몇가지 예들로는 다음을 포함한다:



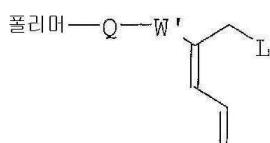
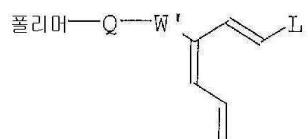
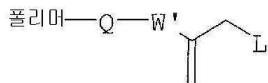
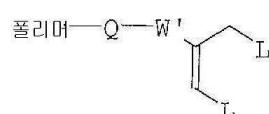
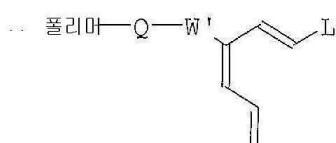
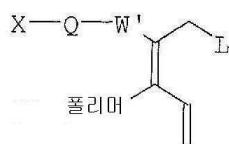
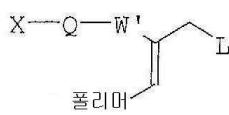
[0089]

[0090] 및



[0091]

[0092] 본 발명에 따른 새로운 시약들의 예를 다음을 포함한다:



[0093]

[0094] 다음 실시예들은 본 발명을 설명한다.

## 실시예

[0096] 실시예 1

[0097] 폴리미 접합 시약의 합성

[0098] **p-니트로-3-피페리디노프로프리오페논 히드로클로라이드(*p*-Nitro-3-piperidinopropiophenone hydrochloride):  $C_{14}H_{19}ClN_2O_3$**

[0099] 싱글넥 250ml 원형-바닥 플라스크에 *p*-니트로아세토페논(16.5g), 파라포름알데히드(4.5g), 피페리딘 히드로클로라이드(12.1g), 무수 에탄올(100mL) 및 자기 교반 막대기를 넣었다. 교반된 비균질의 혼합물을 염산(물의 37wt%, 1mL)를 첨가하였고 상기 용액을 가열하여 질소기류하에서 환류시켰다. 1~2 시간 후 파라포름알데히드(3.0g)을 더 첨가하였다. 상기 용액을 약 18시간 동안 환류시키고 이 기간 동안 파라포름알데히드(3.0g)를 더 첨가하였다. 상기 반응 용액을 더 이상 환류시켜도 해리되지 않아 침전된 결정 고체를 냉각시켰다. 상기 고체를 여과를 통해 분리하고 매우 뜨거운 메탄올을 사용하여 재결정하여 커다란 노란색 결정(10.9g)을 얻었다.

[0100]  $^1H$  NMR(DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.34~1.50(m, 1H), 1.64~1.79(m, 2H), 1.79~1.94(m, 4H), 2.89~3.05(m, 2H), 3.41(q, 2H), 3.51~3.54(m, 2H), 3.82(t, 2H), 8.26(s, 1H), 8.29(s, 1H), 8.41(s, 1H), 8.44(s, 1H)

[0101] 3-(2-히드록시에틸티올)-*p*-니트로프로피온페논:

[0102] 95%의 에탄올(200mL)내에서 교반된 *p*-니트로-3-피페리디노프로피오페논 히드로클로라이드(30g, 0.1mol)과 메르캅토에탄올(9.5g, 0.12mol)의 용액을 균질하게 될 때까지 천천히 가열하였다. 피페리딘(1.0mL)를 첨가하고 상기 반응 혼합물을 가열하여 2시간 동안 환류시켰다. 냉각한 후에 다량의 용매를 회전 증발(rotovaporate)시키고 에틸 아세테이트(200mL)를 첨가하고 상기 고체를 여과하였다. 상기 에틸아세테이트 용액을 10% 수용성 HCl, 5%  $NaHCO_3$  및 염수로 순차적으로 추출하고  $Na_2SO_4$ 로 건조하고 나서 에틸 아세테이트를 증발시켜 오일로 만들고 결정화하여 에틸아세테이트 에틸 에테르로 재결정화된 23.2g의 원하는 생성물을 얻었다.

[0103] 2,2-비스(*p*-톨릴티올메틸)-*p*-니트로아세토페논:[2,2-Bis(*p*-tolylthiomethyl)-*p*-nitroracetophenone]:  $C_{24}H_{23}NO_3S_2$

[0104] 100mL의 싱글넥 원형-바닥 플라스크에 *p*-니트로-3-피페리디노프로피오페논 히드로클로라이드(10.0g), 4-메틸 벤젠티올(8.2g), 포름알데히드(37% w/w 수용액, 10mL, 과량), 메탄올(40mL) 및 자기 교반 막대기를 넣었다. 교반된 비균질의 혼합물을 노란색 균질의 용액이 형성될 때 까지 가열하였다(50~60°C에서 2분). 다섯방울의 피페리딘을 첨가하고 상기 반응 용액을 가열하여 환류시켰다. 15분 내에 상기 반응은 어떤 흰색/노란색 고체의 존재로 인하여 비균질의 혼합물이 되고 2시간 후에 상기 고체는 진한 오렌지색이 되었다. 이 시간 후 환류를 멈추고 반응물을 실온까지 냉각시켰다. 상기 반응 혼합물을 추가적인 포름알데히드(37% w/w 수용액, 10mL, 과량)를 다시 첨가하면서 환류조건하에서 가열하였다. 약 30분의 환류후 오렌지색 오일이 가시화되었으며 고체는 없었다. 교반을 멈추었을 때 상기 오일이 플라스크 바닥으로 가라앉았다. 7시간의 추가적인 환류후, 상기 혼합물을 냉각시켜, 침전된 오일이 결정화되었다. 상기 결정 고체를 분리하고 서너 방울의 아세톤을 첨가한 매우 뜨거운 메탄올로 재결정화하여 정제하여 노란색 결정(10.0g)을 수득하였다.

[0105]  $^1H$  NMR(DMSO- $d_6$ )  $\delta$  2.31(s, 6H), 3.31~3.33(m, 4H), 3.97(quintet, 1H), 7.14(q, 8H), 7.80(d, 2H), 8.24(d, 2H).

[0106] 2,2-비스(*p*-톨릴суلف닐메틸)-*p*-니트로아세토페논:[2,2-Bis(*p*-tolysulfonylmethyl)-*p*-nitroracetophenone]:  $C_{24}H_{23}NO_7S_2$

[0107] 250mL의 원형-바닥 플라스크에 2,2-비스(*p*-톨릴티올메틸)-*p*-니트로아세톤(2.5g) 및 옥손(onxone)(18.4g)의 부

유액(suspension)과 메탄올:물의 비가 1:1인 용액을 넣고 16시간 동안 교반하였다. 얻어진 흰색 고형 부유액에 클로로포름(100mL)을 첨가하고 얻어진 유기상을 별도의 깔대기를 사용하여 분리하여 수용상 내에 희색의 고형 부유액을 남겨놓았다. 균질의 용액이 형성될 때까지 수용성 상에 물을 추가하고, 이후 클로로포름(100mL)으로 다시 세척하였다. 상기 유기상들을 모우고, 염수(50mL x 2)로 세척하고, 마그네슘 설페이트로 건조한 후 용매를 제거하면 진공 건조후에 오프-화이트(off-white)색의 조 고체 생성물(2.5g)을 얻었다. 상기 생성물을 아세톤으로 재결정하여 흰색의 결정을 얻었다.

[0108]  $^1\text{H}$  NMR(CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.43-3.62(m, 4H), 4.44(quintet, 1H), 7.35(d, 4H), 7.68(d, 4H), ; 7.88(d, 2H), 8.22(d, 2H); C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>7</sub>S<sub>2</sub>(발견함)의 분석 계산값: C, 57.47(57.27); H, 4.62(4.74); N 2.79(2.58); MS(FAB) m/z 502([M+1]<sup>+</sup>).

[0109] 2-(2-히드록시에틸су阜닐메틸)-p-니트로-2(z), 4-펜타-디에노페논[2-2(Hydroxyethylsulfonylmethyl)-p-nitro-2(z)]:

[0110] 온도계와 적하 깔대기를 장착한 아르곤으로 깨끗이 제거된 불꽃 건조된 등근바닥 플라스크에 3-(2-히드록시에틸티올)-p-니트로프로피온페논(0.5g, 2.0mmol) 및 무수 테트라히드로푸란(50.0mL)을 첨가하였다. 상기 용액을 교반하고 드라이 아이스-아세톤 중탕기(dry ice-acetone bath)로 냉각한 후, TiCl<sub>4</sub>(0.23mL, 2.1mmol)을 주사기로 첨가하였다. 상기 아이스 중탕기를 제거하고 상기 용액을 실온까지 데우고 나서, 상기 용액을 -40°C로 냉각하고 디이소프로필에틸 아민(1.1mL)을 주사기로 첨가하였다. 상기 냉탕기를 제거하고 상기 반응 혼합물을 -15°C~0°C로 데우면 적색으로 바뀐다. 상기 반응 혼합물을 25°C를 3~5분 이상의 기간동안 데우고 무수 테트라히드로푸란(20mL)의 아크릴레인(acrolein)(0.14g, 2.1mmol)의 용액을 30~40분 이상의 기간에 걸쳐 적하 깔대기로 첨가하였다. 상기 발열반응은 반응 혼합물의 온도를 30~40°C로 증가시키며 알데히드 첨가후 에틸아세테이트(75mL)를 첨가하기 전에 20분 더 용액을 교반하였다. 얇은 층 크로마토그래피를 사용하여 개시 3-(2-히드록시에틸티올)-p-니트로프로피온페논의 소멸과 목적의 2-(2-히드록시에틸티오메틸)-p-니트로-2(Z), 4-펜타디에노페논(R<sub>f</sub>~0.38~0.45)의 형성을 확인하기 위하여 사용하였다. 작은 생성물(E-아이소머)은 0.29~0.34 범위의 더 낮은 R<sub>f</sub>에서 관찰할 수 있었다. 상기 에틸아세테이트 반응 혼합물을 10%의 수용성 HCl 및 염수로 추출하였다. 상기 수용성층을 모우고 에틸아세테이트로 두번 추출한 후 모든 에틸아세테이트 분류를 모우고 10% 수용성 HCl, 5% 수용성 NaHCO<sub>3</sub> 및 염수를 가지고 두 번 세척하고, 나서 고형 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시켰다. 상기 에틸아세트세이트를 회전 증발시켜 조생성물 2-(2-히드록시에틸티오메틸)-p-니트로-2(Z), 4-펜타-디에노페논을 오일로서 얻었고, 바로 산화되어 2,2-비스[(p-톨릴су阜닐메틸)]-p-니트로아세토페논을 합성하여 2-(2-히드록시에틸су阜닐메틸)-p-니트로-2(Z), 4-펜타디에노페논을 고체로서 얻었으며 컬럼 크로마토그래피로 정제하거나 에틸 아세테이트 또는 메탄올로 재결정하고 나서 본 명세서에서 기술한 것처럼 아미노 말단의 폴리(에틸렌 글리콜)에 공유적으로 결합하였다.

[0111] 상기 연속적인 반응을 많은 알데히드를 가지고 수행하였으며, 이러한 알데히드로는 아세트알데히드, 메타크롤레인(methacrolein), 에타크롤레인 부트리알데히드(butyraldehyde), 크로톤알데히드(crotonaldehyde), 2,4-펜타디에니알(2,4-pentadienyal), 소르브알데히드(sorbaldehyde), 톨루알데히드(tolualdehyde), 계피알데히드(cinnamaldehyde), 메틸-계피알데히드, 클로로-계피알데히드, 5-페닐-2,4 펜타디에날 및 7-페닐-2,4, 6-헵타트리에날을 포함한다. 이 연속적인 반응들은 많은 아릴 케토 유도체로 수행하였으며, 이들 아릴 케토 유도체는 3-(p-톨릴티오메틸)-m-니트로아세토페논, 3-(2-히드록시에틸티오)-m-니트로프로피온페논, 3-(에틸티오메틸)-m-니트로프로피온페논, 3-(디메틸아미노에틸티오)-m-니트로프로피온페논, 3-(2-히드록시에틸티오)-3-페닐프로피온페논, 3(2-히드록시에틸티올)-5-페닐-4(E)-펜테노페논(pentenophenone), 3(에틸티오메틸-o-니트로프로피온페논), 3-(에틸티오)-프로피온페논, 3-(2-히드록시에틸су阜닐)프로피온페논, 2-(3-(히드록시에틸티오)-1-프로페닐)-m-2(E)-4-펜타디에노페논을 포함한다. 이 일련의 반응들은 또한 지방족 케토 유도체들로 수행하였으며, 상기 지방족 케토 유도체들은 4-(에틸티오)-2-부타논, 4-(p-톨릴티오)-2-부타논, 4-(4-니트로페닐티오)-2-부타논, 4-(2-히드록시에틸티오)-2-부타논 및 메틸-3-(2-히드록시에틸티올)-프로파노에이트(propanoate)를 포함한다. 이들 선구 물질들을 위한 상기 언급된 반응들의 최종 생성물들은 명세서에 기재된 바와 같이 폴리(에틸렌 글리콜)에 공유적으로 결합될 수 있다.

[0112] 2,2-비스[(p-톨릴슬포닐)메틸]-p-아미노아세토페논 히드로클로라이드  $C_{24}H_{26}ClNO_5S$

[0113] 100mL 원형바닥플라스크에 2,2-비스[(p-톨릴슬포닐)메틸]-p-니트로아세토페논(2g), 에탄올(25mL), 염산(물의 37w%, 8mL) 및 자기 교반 막대를 넣었다. 얻어진 비균질의 혼합물에 염화 주석(II) 이수화물(tin(II)chloride dihydrate)을 첨가하고 그 혼합물을 45°C 오일 중탕기에서 2시간 동안 가열하였다. 이후 물을 상기 균질의 노란색 용액에 첨가하였고 상기 균질의 노란색 용액은 만약 물을 더 첨가하면 침전이 일어날 것 같은 점으로 형성되었다. 균질의 용액을 실온으로 냉각하여 노란색 화합물 결정/침전을 얻었으며, 이것을 진공하에서 분리하였다. 분리된 생성물을 이후 아세톤 및 메탄올의 가열된 혼합물로 혼합하였다(약 90:10 v/v). 불용성 고체를 진공하에서 여과하여 분리하고 진공 오븐에서 일정 질량으로 건조하였다(1.4g).

[0114]  $^1H$  NMR(DMSO- $d_6$ )  $\delta$  2.50(s, 6H), 3.57-3.73(겹침 m's, 5H), 6.27(s, 2H), 6.39(d, 2H), 6.96(d, 2H), 7.47(d, 4H), 7.55(d, 4H).

[0115] 2,2-비스[(p-톨릴슬포닐)메틸]-p-아미노아세토페논을  $\alpha$ -메톡시- $\omega$ -아미노 폴리(에틸렌 글리콜)에 결합

[0116] 적하 깔대기 및 질소 라인이 장착된 원넥(one neck) 100mL 원형바닥 플라스크를 트리포스진(triphosgene)(23mg), 2,2-비스[(p-톨릴슬포닐)메틸]-p-아미노아세토페논 히드로클로라이드(125mg), 무수 톨루엔(2.5mL)으로 채우고 질소 대기하에서 자기 교반 막대로 교반하였다. 적하 깔대기를 별로로 무수 트리에틸아민(68 $\mu$ l) 무수 톨루엔(2.5mL)로 채웠다. 아세톤/드라이-아이스 중탕기를 원형 바닥 플라스크 밑에 놓고 그 내용물을 냉각하였다. 상기 트리에틸아민 용액을 5~10분간 교반하면서 트리포스진 용액에 방울방울 첨가하였다. 플라스크 및 드라이-아이스 중탕기를 몇 시간동안 실온까지 데우고 한번 실온에 도달하면 반응 혼합물을 약 2시간 더 교반하였으며, 계속 질소 대기를 유지하였다. 무수 톨루엔의 0-(2-아미노에틸)-0'-메틸폴리(에틸렌글리콜)2,000(490mg) 및 무수 트리에틸아민(68 $\mu$ l) 용액을 실온에서 반응 혼합물에 적하하였다. 얻어진 혼합물을 실온에서 밤새(약 총 20시간) 교반하였다. 상기 반응 혼합물을 대기에 노출시키고 비흡착 코튼을(non-absorbent cotton wool) 조각을 갖는 5mL 일회용 주사기를 필터로 하여 중력에 의해 여과시켰다. 균질의 용리액을 100mL의 별도의 깔대기에 옮기고 탈이온수(30mL 그리고 나서 10mL)로 두번 세척하였다. 상기 수용성 상들을 모우고 디에틸에테르(약 25mL)로 세척하였다. 상기 수용성 상을 냉동-건조하여 오프화이트 고형 생성물(160mg)을 얻었다. 생성물들은 디에틸에테르 및 톨루엔상에서도 또한 발견되었다.

[0117]  $^1H$  NMR(CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  2.5(s), 3.39(s), 3.41-3.53(겹침 m's), 3.53-3.76(m), 3.82(t), 4.17(quintet), 7.35-7.39(m, 1.39), 7.46(d), 7.68(d).

[0118] 실시예 2

[0119] 폴리머 접합시약의 합성

[0120] p-카르복시-3-페페리디노프로프리오페논 히드로클로라이드

[0121] 250mL의 싱글-넥 원형-바닥 플라스크에 p-아세틸벤조산(10g)과 피페리딘 히드로클로라이드(7.4g), 100mL의 무수 에탄올을 첨가하고 자기 교반 막대로 교반하였다. 상기 교반된 비균질의 혼합물에 진한 염산(1mL)을 첨가하고 상기 용액을 가열하여 질소하에서 환류시켰다. 파라포름알데히드(3.7g)를 상기 플라스크에 첨가하고 약 1.5시간 동안 계속 환류시켰다. 형성된 균질의 용액에 파라포름알데히드(3.7g)을 더 첨가하였다. 약 6시간 동안 가열을 계속하였으며 그 시간동안 파라포름알데히드(3.7g)를 더 첨가하였다. 상기 반응 용액을 실온까지 냉각하고 1 주일간 방치하였다. 냉각된 반응 혼합물을 여과하여 회색 고체를 분리하였다. 매우 뜨거운 메탄올에 해리한 후 고체를 한번 결정화하였다. 여과하여 불용성 생성물(1.96g)을 분리하고 여과물에서 2차 조 생성물(0.88g)을 결정화하였다. 두 개의 생성물들은 진공 내 건조 후의 얇은 층 크로마토그래피와 적외선 분광기에 의해 동일한 것으로 판명되었으므로 서로 모아서 연속적인 반응에 사용되었다.

[0122] ATR-FT-IR 1704, 1691, 1235, 760.

[0123] 4-[2,2-비스[(p-톨릴티오)메틸]아세틸]벤조산:  $C_{25}H_{24}O_3S_2$ 

50mL의 싱글넥 원형 바닥 플라스크에 *p*-카르복시-3-피페리디노프로피오페논 히드로클로라이드(2.5g), 4-메틸 벤젠에티올(2.1g) 포름알데히드(37% w/w 수용액, 2.5mL), 에탄올(10mL), 자기 교반 막대 및 피페리딘(약 10방울)을 첨가하였다. 응축기를 상기 플라스크에 장착하고 상기 반응 용액을 가열하여 환류시켰다. 메탄올(5mL)을 이후 첨가하였다. 약 2시간 후, 포름알데히드(2.5mL)을 추가로 첨가하고 2시간을 계속 더 가열하였다. 상기 반응 플라스크를 실온까지 냉각하고 그후에 상기 반응 용액을 디에틸 에테르(약 150mL)로 희석하였다. 얻어진 유기상을 물(1N 염산을 사용하여 pH 2-3까지 산성화됨: 50mL x 2), 물(50mL) 및 염수(75mL)로 세척하고 황산마그네슘으로 건조하였다. 회전 증발기로 휘발성 물질을 제거하고 여과하여 고체의 잔사를 얻었다. 상기 고체를 메탄올을 주성분으로 한 아세톤과 혼합물을 최소 부피로하여 가열하면서 해리시켰다. 균질의 용액을 냉각기에 밤새 안치하여, 오프화이트 결정을 얻었으며, 진공하에서 여과에 의해 분리하고 프레쉬 아세톤을 가지고 세척한 후 진공 오븐에서 일정 질량(2.5g)이 되도록 건조하였다:

[0125]  $^1H$  NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 2.38(s, 6H), 3.16-3.31(m, 4H), 3.85(quintet, 1H), 7.15(d, 4H), 7.18(d, 4H), 7.64(d, 2H), 8.07(d, 2H);  $C_{25}H_{24}O_3S_2$ (발견됨)에 대해 계산된 분석값: C, 68.78(68.84); H, 5.54(5.77).

[0126] 4-[2,2-비스[(p-톨릴슬포닐)메틸]아세틸]벤조산  $C_{25}H_{24}O_7S_2$ 

250mL의 원형 바닥 플라스크에 4-[2,2-비스[(p-톨릴티오)메틸]아세틸]벤조산(2g)과 옥손(16.9g)의 부유액을 1:1 v/v의 메탄올:물(100mL)과 함께 16시간 동안 교반하였다. 이것으로 흰색 고형 부유액을 얻었으며, 여기에 클로로포름(100mL)을 첨가하고 얻어진 유기상을 별도의 깔대기를 사용하여 분리하여 수용상과 함께 흰색 고형 부유액을 남겨놓았다. 비균질의 수용상에 균질하게 될 때까지 추가적 물(약 170mL)을 첨가하고 나서 상기 수용상을 클로로포름(75mL)으로 세척하였다. 상기 유기상을 모아서, 물(50mL x 2, 1N 염산 몇 방울로 산성화됨) 및 염수(50mL)로 세척하였다. 상기 유기상을 황산마그네슘으로 건조하고, 여과하고 회전 증발기로 용매를 제거하여 오프화이트 조 고형 생성물(2.2g)을 얻었다. 매우 뜨거운 에틸 아세테이트, 아세톤 및 헥산으로 재결정하여 추가 정제를 하여 0.6g의 생성물을 얻었다.

[0128]  $^1H$  NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 2.51(s, 6H), 3.49-3.72(m, 4H), 4.44(quintet, 1H), 7.40(d, 4H), 7.73-7.78(m, 6H), 8.13(d, 2H);  $C_{25}H_{24}O_7S_2$ (발견됨)에 대해 계산된 분석값: C, 59.98(59.88); H, 4.83(4.78).

[0129] 4-[2,2-비스[(p-톨릴슬포닐)메틸]아세틸]벤조산을  $\alpha$ -메톡시- $\omega$ -아미노 PEG(2000g/mol)에 결합

[0130] 원-넥 50mL 슬렌크 플라스크(schlenk flask)를 4-[2,2-비스[(p-톨릴슬포닐)-메틸]아세틸]벤조산(100mg) 및 자기 교반 막대로 채웠다. 상기 플라스크를 밀봉하였고 약 15분 동안 고진공을 적용하였다. 아르곤 대기를 상기 플라스크에 유입하였고 티오닐 클로라이드(1mL)를 교반하면서 주사기로 첨가하였다. 얻어진 혼합물을 50°C에서 2시간 동안 가열하였다. 휘발성 액체를 진공상태에서 제거하여 노란색 기포를 얻었다. 아르곤 기체를 다시 상기 플라스크에 도입하고 무수 디클로로메탄(5mL)을 주사기로 첨가하여 균질의 용액을 얻었다.

[0131] 휘발성 액체를 진공에서 다시 제거하였다. 상기 용매 첨가/제거 공정을 흰색의 잔사가 남을 때 까지 반복하였다. 무수 디클로로메탄(5mL)을 다시 슬렌크 플라스크에 첨가하여 균질의 용액을 얻었다. 별도의 사이막(septum)과 자기 교반 막대를 장착한 25mL 원형 바닥 플라스크에 0-(2-아미노에틸)-0'-메틸폴리(에틸렌글리콜)(2,000g/mol)(0.2g), 및 무수 트리에틸아민(30 $\mu$ L)를 아르곤 대기 하에서 무수 디클로로메탄(5mL)에 해리시켰다. 비스[(p-메틸)아세틸]벤조산을 포함하는 상기 반응 용액을 폴리(에틸렌 글리콜)용액을 포함하는 상기 플라스크에 방울방울 주입하면 바로, 흰색 기체로 전환되었다. 얻어진 용액을 실온에서 밤새 교반하고 트리에틸아민(28 $\mu$ L 추가)을 추가하였다. 추가 1시간 후, 상기 반응 용액을 빠르게 교반된 디에틸에테르에 유리 피펫으로 방울방울 적하하였다. 침전을 얻기 위하여 헥산을 상기 디에틸에테르 용액에 첨가할 필요가 있으며 상기 플라스크를 아이스팅기에 놓았다. 얻어진 침전물을 원심분리로 분리하고 일정 중량까지 건조하여 오프화이트 고체 생성물(230mg)을 얻었다. 게다가 디클로로메탄에 상기 생성물을 1차적으로 해리시키고 차갑게 교반된 디에틸 에테르 용액에 첨가하였다.

[0132]  $^1\text{H}$  NMR(CDC<sub>3</sub>)  $\delta$  2.51(s), 3.40(s), 3.60–3.75(m), 3.84(t), 4.36(quintet), 7.39(d), 7.68(d), 7.71(d), 7.85(d).

[0133] 4-[2,2-비스[(p-톨릴슬포닐)메틸]아세틸]벤조산을  $\alpha$ -메톡시- $\omega$ -아미노 PEG(20,000g/mol)에 결합

[0134] 원-넥 50mL 슬렌크 플라스크(schlenk flask)를 4-[2,2-비스[(p-톨릴슬포닐)-메틸]아세틸]벤조산(100mg) 및 자가 교반 막대로 채웠다. 상기 플라스크를 밀봉하였고 약 15분 동안 고진공을 적용하였다. 아르곤 대기를 상기 플라스크에 유입하였고 티오닐 클로라이드(1mL)를 교반하면서 주사기로 첨가하였다. 얻어진 혼합물을 50°C에서 2시간 동안 가열하였다. 휘발성 액체를 진공상태에서 제거하여 노란색 기포를 얻었다. 아르곤 기체를 다시 상기 플라스크에 도입하고 무수 디클로로메탄(5mL)을 주사기로 첨가하여 균질의 용액을 얻었다. 휘발성 액체를 진공 내에서 다시 제거하였다. 상기 용매 첨가-제거 공정을 반복하여 흰색의 잔사가 남을 때까지 계속하였다. 마침내 무수 디클로로메탄(5mL)을 아르곤 기체하에서 상기 플라스크에 첨가하여 균질의 용액을 형성하였다.

[0135] 별도의 50mL 슬렌크 플라스크, 0-(2-아미노에틸)-0'-메틸폴리(에틸렌 글리콜)(20,000g/mol)(0.5g)을 4mL의 무수 툴루엔에 아르곤 대기하에서 해리시키고 상기 용액을 증발시켜 진공내에서 건조시켰다. 얻어진 흰색의 잔사를 진공에서 3시간 유지하고 아르곤 대기 내에서 무수 디클로로메탄(5mL)에 해리시켰다.

[0136] 교반되고 아이스-물 중탕기에서 냉각된 상기 폴리(에틸렌 글리콜)용액에 상기 비스[(p-톨릴슬포닐)-메틸]아세틸]벤조산의 반응 용액을 느리게 방울방울 적하하였다. 완전히 첨가한 후에 건조된 트리에틸아민 40 $\mu\text{l}$ 을 상기 얻어진 용액에 느리게 방울로 첨가하였다. 트리에틸아민을 첨가하였을 때 상기 얻어진 용액을 밤새 교반하였고 실온까지 데웠다.

[0137] 상기 반응 용액을 0.45 $\mu\text{m}$  필터를 통해 여과하고 휘발성 액체들을 용리액으로부터 제거하여 연노란/오렌지 잔사를 얻었으며, 따뜻한 아세톤(10mL)에 재해리하였다. 상기 균질의 용액을 포함하는 플라스크를 아이스-물 중탕기 넣고 교반시 침전이 발생하였다. 상기 흰색의 침전물을 번호 3의 소결된 유리 깔대기로 분리하고 냉각된 프레쉬 아세톤(약 30mL)으로 세척하였다. 상기 분리된 고체를 진공하에서 건조하여 0.4g의 흰색 고체를 얻었다.

[0138]  $^1\text{H}$  NMR(CDC<sub>3</sub>)  $\delta$  2.42(s), 3.31(s), 3.40–3.75(m), 4.27(m), 7.30(d), 7.59(d), 7.63(d), 7.75(d)

[0139] 상기  $\alpha$ -메톡시- $\omega$ -4-[2,2-비스[(p-톨릴슬포닐)-메틸]아세틸]벤즈아미드 폴리(에틸렌 글리콜) 접합시약(20,000g/mol)(0.4g)을 10mL의 아르곤 배출 처리된 아세톤니트릴:물(24:1 v/v, 2mg 히드로퀴논)의 혼합물에 해리시키고 상기 용액을 0.45 $\mu\text{m}$  PP필터를 통해 여과시켰다. 상기 용리액을 아르곤 기체하에서 원형-바닥 플라스크에 넣고 트리에틸아민(50 $\mu\text{l}$ )을 교반하면서 첨가하였다. 상기 플라스크를 30°C의 오일 중탕기에 넣고 20시간 동안 교반하고 그 시간 후 상기 플라스크를 실온으로 냉각하고 상기 휘발성 액체들을 진공내에서 제거하였다. 상기 얻어진 잔사를 따뜻한 아세톤(10mL)에 해리시키고 한번 균질하게 되면 상기 용액을 아이스-물 중탕기에 넣고 상기 용액을 교반하는 동안 침전이 일어났다. 상기 흰색 침전들은 번호 3의 소결된 유리 깔대기로 분리하고 차가운 프레쉬 아세톤으로 세척하였다(약 30mL) 상기 분리된 고체를 진공하에서 건조하여 0.3g의 흰색 고체를 얻었다.

[0140]  $^1\text{H}$  NMR(CDC<sub>3</sub>)  $\delta$  2.35(s), 3.31(s), 3.39–3.78(m), 4.28(m), 5.84(s), 6.22(s), 7.26(d), 7.65(d), 7.72(d), 7.81(d)

[0141] 실시예 3

[0142] 4-메틸벤젠티올 및  $\alpha$ -메톡시- $\omega$ -4-[2,2-비스[(p-톨릴슬포닐)메틸]아세틸]벤즈아미드 폴리(에틸렌 글리콜)의 반응

[0143] 상기 폴리머 접합 시약,  $\alpha$ -메톡시- $\omega$ -4-[2,2-비스[(p-톨릴슬포닐)메틸]아세틸]벤즈아미드 폴리(에틸렌 글리콜)(2000g/mol)(30mg, 12.1  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) 및 4-메틸벤젠티올(3mg, 24.2mmol, 2 eq.)를 중수소 클로로포름(약

0.75mL)에 해리시켰다. 상기 균질의 용액에 트리에틸아민( $1.7\mu\text{l}$ ,  $12.1\mu\text{mol}$ , 1 eq.)를 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 교반하고 H-NMR 스펙트럼을 얻었다. 상기 얻어진 스펙트럼으로 상기 폴리머 접합시약에 4-메틸 벤젠티올의 첨가가 일어났음을 확인하였다. 유사한 반응을 프로판 트리올로 수행하였다.

[0144] 실시예 4

리보뉴클레아제 A에 폴리머 접합(Polymer conjugation to Ribonuclease A)

15mL의 원심분리기 투브 내의 리보뉴클레아제 A(30mg)에 3mL의 8M 수용성 우레아 용액을, 이어서 메르캅토에탄올( $60\mu\text{l}$ )을 첨가하였다. 얻어진 용액의 pH를 10% 수용성 메틸아민 용액을 사용하여 pH 8.5로 조정하였다. 상기 반응 용액을 질소를 가지고 약 30분 동안 거품을 일으켰다. 질소로 계속 배출하면서 상기 투브를 37°C에서 5시간 동안 가열하였다. 상기 반응 용액을 아이스-염 물 중탕기에서 냉각하고 10mL의 아르곤 배출 처리한 냉각된 1N HCl:무수에탄올(1:39 v/v)을 상기 반응액에 첨가하였다. 침전이 일어나고 상기 침전을 원심분리로 분리하고 10mL 씩 HCl:무수에탄올 혼합물로 3번 세척하고 질소 배출처리된 차가운 디에틸 에테르(2 x 10mL)로 두 번 세척하였다. 각각의 세척후에 상기 침전물들을 원심분리로 분리하였다. 상기 세척된 침전물을 질소 배출처리된 탈이온수에 해리시키고 냉동 건조하여 거조된 고체를 얻었다. 리보뉴클레아제 A의 부분적 환원을 확인하고 엘맨 시험(Ellman's Test)을 사용하여 양을 측정하여 단백질 분자당 5.9의 유리 티올을 얻었다.

[0147] 에펜도르프(eppendorf)에서 부분적으로 환원된 리보뉴클레아제 A(10.9mg)를 아르곤 배출처리된 pH 8 암모니아 용액( $500\mu\text{l}$ )에 해리시켰다. 별도의 에펜도르프에 상기 폴리머 접합시약, 폴리(에틸렌)글리콜로부터 유도된  $\alpha$ -메톡시- $\omega$ -4-[2,2-비스[(p-톨릴술포닐)메틸]아세틸]벤즈아미드를 암모니아 용액( $250\mu\text{l}$ )에 또한 해리시키고 얻어진 용액을 상기 리보뉴클레아제 A 용액에 첨가하였다. 상기 PEG 에펜도르프를  $250\mu\text{l}$ 의 프레쉬 암모니아 용액으로 세척하고 이것을 또한 주 반응 에펜도르프에 첨가하였다. 상기 반응 에펜도르프를 아르곤 기체하에서 밀폐하고 37°C에서 약 24시간 동안 가열하고 실온까지 냉각하였다. 상기 냉각된 반응 용액을 소듐 도데실 셀酹아이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)로 분석하였다. 상기 SDS-PAGE 실험은 페그(pegylated) 4-[2,2-비스[(p-톨릴술포닐)메틸]아세틸]-벤조산과 리보뉴클레아제 A과의 반응과 일치하였다.

[0148] 실시예 5

**생쥐 IgG 항체 Fab 단편에 폴리머 접합**

0.15M 소듐 클로라이드 및 0.005M EDTA를 포함하는 아르곤으로 배출 처리된 0.02M 소듐 포스페이트 pH 6의 완충액 내의 생쥐 IgG 항체 Fab 단편(Abcam Cat. No. AB6668)의  $0.4\text{mg/mL}$  용액  $240\mu\text{l}$ 에 1mM 셀레노시스타민(selenocystamine) 디히드로클로라이드의 아르곤 배출처리된 수용액  $4\mu\text{l}$ 와, 이어서 아르곤으로 배출처리된 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 히드로클로라이드(TCEP)  $12\mu\text{l}$ 를 실온에서 첨가하였다. 상기 얻어진 용액을 바로 몇 초 동안 보르텍스(vortex)시키고 실온에서 6분간 방치하였다. 환원된 Fab 단편을 포함하는 2 개의  $5\mu\text{l}$  샘플 용액을 이후 분석을 위해 제거하고 남아있는 용액을 아이스-물 중탕기에서 4분 동안 방치하였다. 아이스-물 중탕기로 냉각된, 폴리(에틸렌 글리콜)(20,000 g/mol)( $1.6\mu\text{l}$ ,  $50\text{mg/mL}$ , 0.15M 소듐 클로라이드, 0.005M EDTA 및 0.23mM 히드로퀴논을 포함하는 아르곤 배출처리된 0.02M 소듐포스페이트 pH 6 완충액)으로부터 유도된  $\alpha$ -메톡시- $\omega$ -4-[2,2-비스[(p-톨릴술포닐)메틸]아세틸]벤즈아미드를 바로 상기 Fab 용액에 첨가하였다; 상기 용액을 몇 초동안 보르텍스시키고 아이스-물 중탕기로 되돌려 놓았다.  $1.6\mu\text{l}$ 의 접합 시약 용액을 아날로그 방법으로 2분마다 첨가하여 총  $6.4\mu\text{l}$ 가 첨가되게 하였다. 모두 첨가한 후 상기 반응 용액을 냉장고( $< 5^\circ\text{C}$ )에 2시간 동안 넣었다. 반응용액의 샘플을 SDS PAGE에 의한 분석을 위해 제거하였다.

[0151] 상기 반응 혼합물을 SEC-HPLC( $100\mu\text{l}$  주입, 12-24 mL 컬럼, 아머삼 바이오사이언스(Amersham biosciences); 용리액: 20mM Na 포스페이트, 0.15 M NaCl pH 7.0; 10분동안 0.25mL/분의 속도로 등용매용리(isocratic elution); UV 검출, 210nm)로 분석하였고, Fab-폴리(에틸렌 글리콜) 접합체가 나타났으며, 이는 동등한 대조 반응 혼합물에서는 존재하지 않았다. SEC-HPLC 크로마토그래피로부터 분리된 분획물을 SDS PAGE로 분석하여 모노 폴리(에틸렌 글리콜) 접합체를 얻었다.

[0152] 실시예 6

[0153] 아스파라기나아제에 폴리머 접합(Polymer conjugation to asparaginase)

pH 6.5(시그마)에서 아스파라기나아제의 5mg/ml 용액의 샘플 100 $\mu$ l를 20mM 포스페이트 완충액 900 $\mu$ l(pH 6 및 또한 0.15M NaCl 및 5mM EDTA를 포함)로 희석하였다. DL-디티오레이톨(dithioreitol)(DTT, 15.4mg)를 첨가하고 얻어진 용액을 실온에서 방치하였다. 2시간 동안 방치한 후 상기 용액을, 20mM 포스페이트 완충액(pH 6 및 또한 0.15M NaCl 및 5mM EDTA를 포함)으로 평형된 PH-10 컬럼(Sephadex® G-25M, Pharmacia Biotech)로 정제하였다. 상기 컬럼을 1 ml의 프레쉬 완충액으로 용리하였다. 환원된 단백질을 포함하는 두 개의 분획물을 280nm의 UV 분광기를 사용하여 동정하였다. 이들 분획물을 원심분리형 필터 장치(MWCO 3,000; 마이크론)을 사용하여 약 270 $\mu$ l의 부피로 농축하고 pH 6의 프레쉬 포스페이트 완충액으로 1 ml(추가적으로 0.23mM 히드로퀴논을 포함)가 되게 희석하였다. 2개의 5 $\mu$ l 샘플들을 추후 SDS PAGE 분석을 위해 제거하였다. 별도로, 폴리(에틸렌 글리콜)(20,000g/mol)로부터 유도된  $\alpha$ -메톡시- $\omega$ -4-[2,2-비스[(p-톨릴술포닐)메틸]아세틸]벤즈아미드의 접합 시약 용액 50mg/ml을 동일한 포스페이트 완충액에서 만들고 단백질 용액을 더하여 아이스-물 중탕기에 5분 동안 넣었다. 상기 단백질 용액에 58 $\mu$ l의 접합 시약 용액을 첨가하고 몇 초간의 보르텍스 후에 상기 반응용액을 냉장고(< 5°C)에 넣었다. 상기 대조 반응을 비활원된 아스파라기나아제를 사용하는 것을 제외하고는 동일한 조건과 크기로 수행하였다. 아스파라기나아제에 대한 폴리(에틸렌 글리콜)의 성공적인 접합은 2 시간 후 상기 반응 용액으로부터 얻은 샘플로 SDS PAGE(4-12% Bis-Tris Gel with colloidal blue staining)를 수행하여 확인하였다. 아스파라기나아제를 DTT로 반응시키지 않은 대조 반응으로부터 얻은 샘플에 대해 SDS PAGE를 수행한 것은 접합 벤드가 관찰되지 않았다.

[0155] 실시예 7

[0156] 인터페론에 폴리머 접합

완충용액 (소듐 포스페이트 0.02M; NaCl 0.15M; EDTA 0.005M; 아르곤 배출처리된 탈이온수내 pH 6.0) 150 $\mu$ l으로 희석된, 인터페론  $\alpha$ -2b(샨타 바이오테크니스: Shantha Biotechnics)(1mg/ml) 100 $\mu$ l 용액을 셀레노시스타민(아르곤으로 배출처리된 탈이온수 내 1mM, 2 당량) 및 TCEP(아르곤 배출처리된 탈이온수 내 1mM, 5 당량)을 첨가하여 부분적으로 환원시켰다. 상기 단백질 용액을 4°C까지 냉각하였다. 폴리(에틸렌 글리콜)(20,000g/mol)로부터 유도된 상기 접합시약  $\alpha$ -메톡시- $\omega$ -4-[2,2-비스[(p-톨릴술포닐)메틸]아세틸]벤즈아미드를 완충액(50mg/ml)에 해리시키고, 4°C로 냉각시키고 상기 단백질 용액에 16 $\mu$ l를 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 보르텍스시키고 4°C에서 2시간 동안 배양하였다. 상기 반응 혼합물의 비이온성 성분들을 양이온 교환 크로마토그라피(Hitrap SP FF 1ml 컬럼, 아머삼 바이오사이언스)로 두 개의 완충제를 사용하여 제거하였다: (A) 25mM Na 아세테이트 pH 4.0 및 (B) 25mM Na 아세테이트 + 0.7M NaCl pH 4.0. 상기 컬럼을 완충제 A(5.0ml), 그리고 나서 완충제 B(5.0ml)를 사용하여 세척(1ml/min)하고, 완충제 A(10ml) 10ml로 평형시켰다. 상기 접합체를 상기 컬럼(200 $\mu$ l)에 넣고 이어서 완충제 A(500 $\mu$ l)를 넣고 부하된 분획물을 모았다. 상기 컬럼을 5ml의 완충제 A로 세척하고 분획액(fraction)을 모았다. 상기 샘플을 상기 컬럼으로부터 완충제 B(10ml)로 용리하고 분획물을 모았다. 분광기(UV, 280nm)를 사용하여 단백질을 포함한 분획물을 결정하고 이들 분획물을 크기별 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)(100 $\mu$ l 주입, 수퍼로즈 12-24ml 컬럼, 아머삼 바이오사이언스; 용액: 20mM Na 포스페이트, 0.15M NaCl pH 7.0; 등용매 용액을 100분 동안 0.25ml/min의 속도로; UV 검출, 210nm) 법으로 분리된 분획물로 정제하였다. 이들 정제 조건은 천연 인터페론으로부터 폴리(에틸렌 글리콜) 인터페론 접합체를 분리하기 위한 기선 분해능(base line resolution)을 제공하였다. 상기 폴리(에틸렌글리콜) 접합체의 상기 접합 반응 및 정제는 SDS-PAGE로 확인하였다; 12% 비스-트리스 겔(실버퀘스트 실버 스테이닝(SilverQuest Silver Staining); 콜로이드성 블루 스테이닝 및 과염산 0.1M/BaCl<sub>2</sub> 5% 및 I<sub>2</sub> 0.1M 스테이닝). 아르곤 배출처리된 물의 소듐 포스페이트 0.02M, NaCl 0.15M, EDTA 0.005M, pH 6.0의 60 $\mu$ l에 인터페론(1mg/ml) 40 $\mu$ l의 용액을 폴리(에틸렌 글리콜)(20,000g/mol)로부터 유도된 상기 접합 시약  $\alpha$ -메톡시- $\omega$ -4-[2,2-비스[(p-톨릴술포닐)메틸]아세틸]벤즈아미드와 혼합시키고, 4°C로 냉각하고 상기 단백질 용액에 16 $\mu$ l을 첨가하였을 때 접합은 발견되지 않았다. 상기 반응 혼합물을 보르텍스시키고 4°C에서 2시간 동안 배양시켰다.

상기 폴리(에틸렌 글리콜) 인터페론 접합체의 각각의 정제된 분획물의 농도를 효소 면역 측정법으로 결정하였다. 동일한 측정법을 사용하여 접합된 천연 인터페론과 인터페론의 국제 표준 NIBSC(UK) 샘플의 농도를 결정하였다. 앞서 언급한 인터페론의 모든 형태에 대해 얻어진 재생산가능하고 정확한 표준 곡선은 도 1에 도시

된다. A549(인간 폐 섬유모세포(fibroblast)) 세포들을 96-웰 플랫 베텀(96-well flat bottom) 조직 배양 판에 15,000 세포/웰(well)로 평판 배양하였다. NIBSC(UK)부터의 인터페론, 접합된 천연 인터페론 및 폴리(에틸렌 글리콜) 인터페론 접합체를 별도로 3개의 세포들에 첨가하고 상기 플레이트를 37°C에서(5% CO<sub>2</sub>) 24시간 동안 배양하였다. 다음날, EMCV(뇌심근염바이러스: encephalomyocarditis virus)의 작업 용액을 -80°C로 저장된 보존 바이러스로부터 EMEM/2% FCS으로 준비하였다. 상기 인터페론 또는 상기 폴리(에틸렌글리콜) 인터페론 접합체를 포함하는 매체를 제거하고 EMCV를 포함하는 매체로 대체하였다. 상기 조직 배양 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 배양하고 그 후 상기 바이러스를 제거하였다. 100μl의 DMEM/100% FCS 매체를 첨가하고 상기 플레이트를 27°C에서 16~24시간 동안 배양하였다. 16시간 계속하면, 상기 플레이트는 일정하게 세포 죽음이 시작할 때를 확인할 수 있도록 판독되었다. 상기 매체를 흡출(aspirate)하고 상기 세포를 100μl의 포스페이트 완충용액으로 세척하였다. 이후 50μl의 메틸 바이올렛 용액[즉, 메틸 바이올렛(4% 포름알데히드, 0.05% 메틸 바이올렛 2B(시크마-알드리히)]을 실온에서 30분 동안 첨가하였다. 상기 플레이트를 100μl의 물로 세척하고 공기중에서 건조하였다. 분광 광도 흡광도(spectrophotometric absorbance)를 플레이트 판독기를 사용하여 570nm에서 결정하였다. 도 2는 접합을 위해 사용된 인터페론이 국제 표준 NIBSC(UK) 인터페론의 등가 활동도(equivalent activity)를 갖는다는 것을 확인시킨다. 도 3은 접합을 위해 사용된 천연 인터페론이 폴리(에틸렌 글리콜) 접합 시약에 노출한 것을 제외하고는 모든 화학적 및 정제 과정에 적용된 후에도 등가의 생물학적 활성도를 유지하였다는 것을 확인한다. 도 4는 접합을 위해 사용된 천연 인터페론 및 정제된 폴리(에틸렌 글리콜) 인터페론 접합체가 등가의 생물학적 활성도를 유지했다는 것을 확인시킨다.

[0159] 인터페론-α 2b로 2'5'-올리고아데닐레이트 합성효소(2'5'-oligoadenylate synthetase: 2,5'-OAS) 및 단백질 키나아제 R(PRKR) mRNA의 도입을 결정하였다. 정제된 폴리(에틸렌 글리콜) 인터페론 접합체 및 천연 인터페론-α 2b의 샘플을 평가하였다. 2,000,000 MOLT 4 세포/웰을 37°C에서 24시간 동안 효소 면역 측정법을 사용하여 측정된 각 인터페론 샘플 5000pg를 가지고, 24 웰 조직 배양 플레이트에서 배양시켰다. 총 RNA를 추출(RNA II 분리 장치, Macheray-Nagel)하고 200ng를 역전사시켜 최종 부피가 20μl가 되게 하였다(시그마, AMV 역전사 장치). 샘플들을 물로 4의 1ml로 각각 희석시키고 각각의 샘플 2μl를 20μl 실시간 PCR 정량 혼합기(Sigma SybrGreen ReadyMix)로 증폭시켰다. 사용된 프라이머(primer)는 다음과 같다:

[0160] 2'5'-OAS 정(forward) GGC TAT AAA CCT AAC CCC CAA ATC

[0161] 2'5'-OAS 역(reverse) AGC TTC CCA AGC TTC TTC TTA CAA

[0162] PKR 정 ACT CTT TAG TGA CCA GCA CAC TCG

[0163] PRKR 역 TTT AAA ATC CAT GCC AAA CCT CTT

[0164] 2',5'-OAS 증폭을 위해, 94°C에서 5분간 효소 활성을 시키고, 94°C에서 5 초간 변성, 60°C에서 2초간 아닐(anneal)시키고, 72°C에서 8초간 확대(extension)시키는 단계를 48회 하였다. PRKR 증폭을 위해서는 샘플들을 94°C에서 5분간 활성시키고, 94°C에서 5 초간 변성, 59°C에서 2초간 아닐시키고, 72°C에서 8초간 확대(extension)시키는 단계를 48회 하였다. 상기 생성물들의 용융 곡선 분석을 증폭의 마지막에 수행하였다. 유도된 mRNA의 정량을 다음 식을 사용하여 대조 미처리 세포들에 대해 상대적으로 구하였다.

[0165] 상대적인 증가값 = 2<sup>-(Ct 샘플 - Ct 대조군)</sup>

[0166] 여기서 Ct는 문턱 교차값(threshold cross-over value)이다.

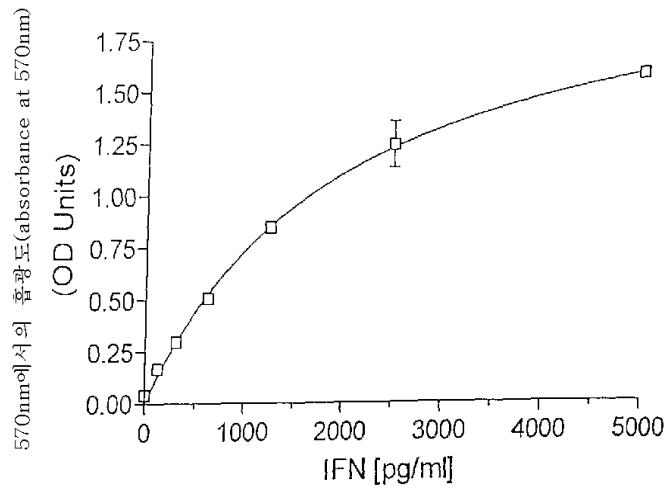
[0167] 도 5, 여기서 도 5(a)는 인터페론-유도성 2'5'-올리고아데닐레이트 합성효소(2'5'-OAS) 유전자의 실시간 정량 RT-PCR(두 단계) 분석을 나타내며, 도 5(b)는 인터페론 유도성 단백질 키나아제 R(PRKR) 유전자의 실시간 정량적 RT-PCR(두 단계) 분석을 나타낸다. 상기 결과들은 폴리(에틸렌 글리콜) 인터페론-α 2b 접합체가 2'5'-올리고아데닐레이트 합성효소(2'5'-OAS 및 단백질 키나아제 R(PRKR))을 자극하여 천연 페그되지 않은 인터페론-α 2b에 유사한 수준으로까지 mRNA를 합성한다.

### 도면의 간단한 설명

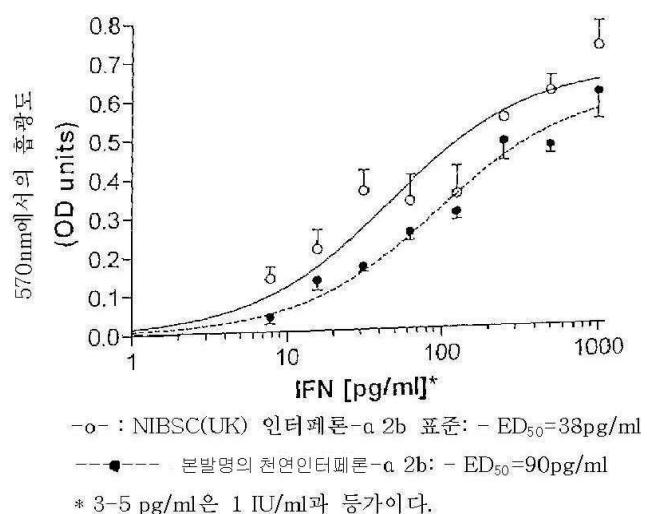
[0095] 도 1 내지 도 5는 실시예 7로부터 얻어진 결과를 나타낸다.

### 도면

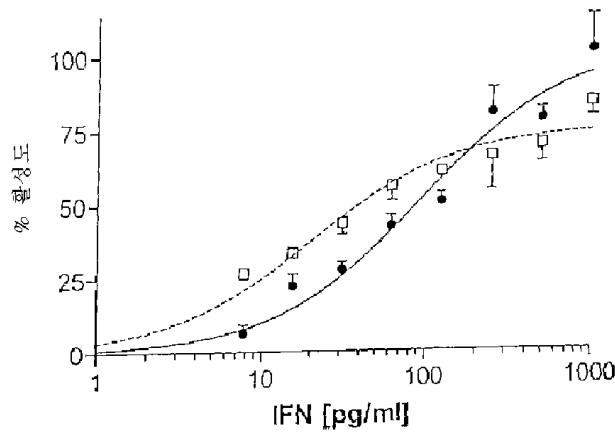
## 도면1



## 도면2



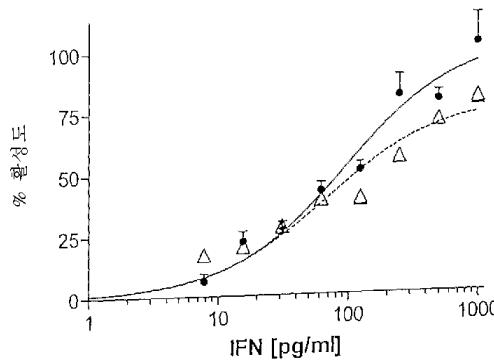
## 도면3



■ 본 발명의 천연 인터페론-α 2b: - ED<sub>50</sub>=90pg/ml

□ 본 발명의 화학적으로 처리되었지만 페그되지 않은(unpegylated) 천연 인터페론-α 2b:- ED<sub>50</sub>=40pg/ml

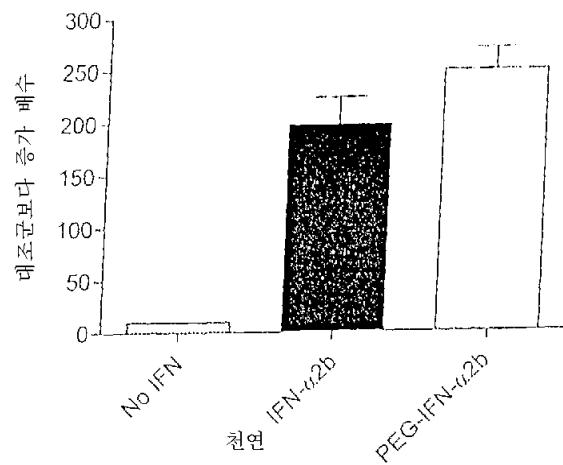
## 도면4



■ 본 발명의 천연 인터페론-α 2b: ED<sub>50</sub>=90pg/ml

□ 본 발명의 페그된(pegylated) 인터페론-α 2b: ED<sub>50</sub>=123pg/ml

도면5a



도면5b

