



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. C07F 15/00 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2007년06월14일 10-0729015 2007년06월08일
---	-------------------------------------	--

(21) 출원번호	10-2002-7008709	(65) 공개번호	10-2002-0082208
(22) 출원일자	2002년07월04일	(43) 공개일자	2002년10월30일
심사청구일자	2005년12월30일		
번역문 제출일자	2002년07월04일		
(86) 국제출원번호	PCT/US2001/000284	(87) 국제공개번호	WO 2001/49696
국제출원일자	2001년01월04일	국제공개일자	2001년07월12일

(81) 지정국

국내특허 : 아랍에미리트, 안티구와바부다, 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 벨리제, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 도미니카, 알제리, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 모로코, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 모잠비크, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 탄자니아, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 남아프리카,

AP ARIPO특허 : 가나, 감비아, 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 시에라리온, 스와질랜드, 우간다, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 기니 비사우, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장 60/174,435 2000년01월04일 미국(US)

(73) 특허권자 어섹스 팔마큐티칼스 인코포레이티드
미국, 텍사스 75207-2107, 달라스, 스탬프스 프리웨이 2600, 스위트 176

(72) 발명자 스테워드, 도널드알.
미국, 텍사스 75062, 어빙, 아파트먼트 2069, 노스오'콘로어로드 4737

리스, 존알.
미국, 텍사스 75038, 어빙, 아파트먼트 3925, 메도우크리크 드라이브 808

세인트, 존, 존브이.
미국, 텍사스 76262, 로아노크, 리치스트리트 307

(74) 대리인 강명구
 강석용

(56) 선행기술조사문헌
Inorganic Chemistry, 1990, 29(25), 5125-5129. Inorganica Chimica Acta, 1989, 161(1), 113-123.
Anti-cancer Drug Design, 1990, 5(4), 371-378. EP 00284197 A
JP 02-056421 A JP 02-067217 A
US 04946954 B EP 00281412 A

심사관 : 김동석

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) N,O-아미도말로네이트 백금 착화합물

(57) 요약

본 발명은 정제된 백금 착화합물에 관하는데, 여기서 백금은 아미도말로네이트의 단일 N,O-또는 O,O-킬레이트를 형성하게 된다. 상기 킬레이트 및 이의 제약학적으로 수용가능한 제형은 암의 치료에 유용하다. 백금 킬레이트는 하나 또는 복수의 작용기와 추가적으로 연결시킬 수 있는데, 이런 작용기는 수용성을 증가시키고 및/또는 킬레이트의 종양표적화를 지원한다. 종양 표적화 성분의 예에는 중합체(여기서, 하나 또는 복수의 백금 킬레이트는 체내에서 절단될 수 있는 링커를 통하여 중합체 골격에 부착되고) 및 종양 조직 및/또는 종양 맥관 구조에서 농축되거나 상향조절되는 수용체에 높은 친화성을 가진 분자가 포함된다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

삭제

청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

삭제

청구항 5.

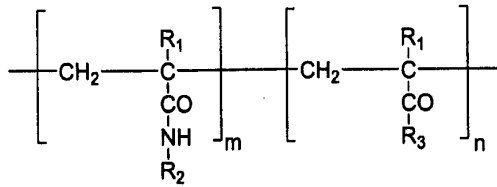
삭제

청구항 6.

삭제

청구항 7.

다음의 N-알킬 아크릴아미드 코폴리머로 구성된 폴리머-백금 복합체로 구성된 조성물.



이때, $m=0$ 이고 $n=100$ 이거나 또는 $m:n$ 은 0.1-99.9이며;

R_1 는 H 또는 CH_3 이고;

R_2 은 C_1 - C_6 알킬 또는 C_1 - C_6 하이드록시알킬기이고;

R_3 은 백금 화합물과 복합되는 올리고펩티드 측쇄이며,

이때 올리고펩티드 측쇄는 (i) 한쪽 단부가 폴리머에 부착되며, 다른 한쪽 단부가 N,O-아미도말로네이트 복합체를 통하여 백금 화합물에 부착되며, (ii) 백금 화합물을 형성할 수 있도록 생리학적 조건에서 절단되는 최소 한개 연결기(linkage)를 포함한다.

청구항 8.

삭제

청구항 9.

삭제

청구항 10.

삭제

청구항 11.

삭제

청구항 12.

삭제

청구항 13.

삭제

청구항 14.

삭제

청구항 15.

삭제

청구항 16.

삭제

청구항 17.

삭제

청구항 18.

삭제

청구항 19.

삭제

청구항 20.

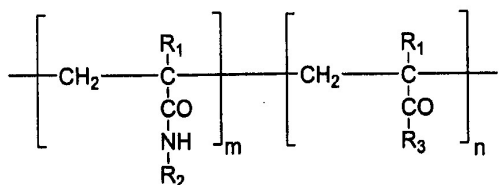
삭제

청구항 21.

삭제

청구항 22.

다음의 N-알킬 아크릴아미드 코폴리머로 구성된 폴리머-백금 복합체로 구성된 조성물.



이때, $m=0$ 이고 $n=100$ 이거나 또는 $m:n$ 은 0.1-99.9이며;

R_1 는 H 또는 CH_3 이고;

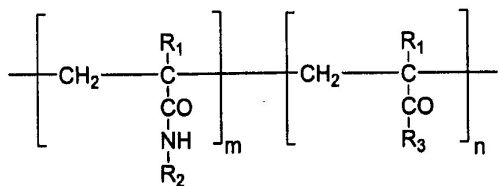
R_2 은 C_1 - C_6 알킬 또는 C_1 - C_6 하이드록시알킬기이고;

R_3 은 백금 화합물과 복합되는 올리고펩티드 측쇄이며,

이때 올리고펩티드 측쇄는 Gly-Phe-Leu-Gly 또는 Gly-Gly이고, (i) 올리고펩티드 측쇄는 한쪽 단부가 폴리머에 부착되며, 다른 한쪽 단부가 N,O-아미도말로네이트 복합체를 통하여 백금 화합물에 부착되며, (ii) 백금 화합물을 형성할 수 있도록 생리학적 조건에서 절단되는 최소 한개 연결기(linkage)를 포함한다.

청구항 23.

다음의 N-알킬 아크릴아미드 코폴리머로 구성된 폴리머-백금 복합체로 구성된 조성물.



이때, $m=0$ 이고 $n=100$ 이거나 또는 $m:n$ 은 0.1-99.9이며;

R_1 는 H 또는 CH_3 이고;

R_2 은 C_1-C_6 알킬 또는 하이드록시알킬기이고;

R_3 은 백금 화합물과 복합되는 올리고펩티드 측쇄이며,

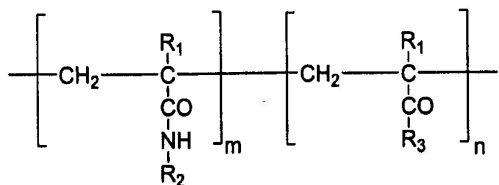
이때 올리고펩티드 측쇄는 $Gly-(W)_p-Gly$ 이며, 이때 p 는 0 내지 3이며, W 는 아미노산 또는 아미노산 복합체가 되며, 이때 올리고펩티드 측쇄는 (i)한쪽 단부가 폴리머에 부착되며, 다른 한쪽 단부가 N,O-아미도말로네이트 복합체를 통하여 백금 화합물에 부착되며, (ii) 백금 화합물을 형성할 수 있도록 생리학적 조건에서 절단되는 최소 한개 연결기(linkage)를 포함한다.

청구항 24.

삭제

청구항 25.

다음의 N-알킬 아크릴아미드 코폴리머로 구성된 폴리머-백금 복합체로 구성된 조성물.



이때, $m=0$ 이고 $n=100$ 이거나 또는 $m:n$ 은 0.1-99.9이며;

R_1 는 CH_3 이고;

R_2 은 2-하이드록시프로필이고;

R_3 은 백금 화합물과 복합되는 올리고펩티드 측쇄이며,

이때 올리고펩티드 측쇄는 $Gly-Phe-Leu-Gly-Ama$ 또는 $Gly-Gly-Ama$ 이고, 올리고펩티드 측쇄는 (i) 한 단부가 폴리머에 부착되며, 다른 한쪽 단부가 N,O-아미도말로네이트 복합체를 통하여 백금 화합물에 부착되며, (ii)백금 화합물을 형성할 수 있도록 생리학적 조건에서 절단되는 최소 한개 연결기(linkage)를 포함한다.

청구항 26.

삭제

청구항 27.

백금 화합물과 복합체를 형성하기 위한 올리고펩티드 측쇄를 가지는 N-알킬 아크릴아미드 코폴리머로 구성된 폴리머-백금 복합체로 구성된 조성물에 있어서,

이때 측쇄는 (i) $Gly-Phe-Leu-Gly$ 또는 $Gly-Gly$ 올리고펩티드로 구성되며, 이 펩티드의 한쪽 단부가 폴리머에 부착되며, 다른 한쪽 단부가 N,O-아미도말로네이트 복합체를 통하여 백금 화합물에 부착되며, (ii) 백금 화합물을 형성할 수 있도록 생리학적 조건에서 절단되는 최소 한개 연결기(linkage)를 포함하는 조성물.

청구항 28.

삭제

청구항 29.

삭제

청구항 30.

삭제

청구항 31.

백금 화합물과 복합체를 형성하기 위한 올리고펩티드 측쇄를 가지는 N-알킬 아크릴아미드 코폴리머로 구성된 폴리머-백금 복합체 조성물에 있어서,

이때 측쇄는 (i) Gly-(W)_p-Gly 올리고펩티드로 구성되며, p는 0 내지 3이며,

W는 아미노산 또는 아미노산 복합체가 되며, 이 펩티드는 다른 한쪽 단부가 N,O-아미도말로네이트 복합체를 통하여 백금 화합물에 부착되며, (ii) 백금 화합물을 형성할 수 있도록 생리학적 조건에서 절단되는 최소 한개 연결기(linkage)를 포함하는 조성물.

청구항 32.

백금 화합물과 복합체를 형성하기 위한 올리고펩티드 측쇄를 가지는 N-알킬 아크릴아미드 코폴리머로 구성된 폴리머-백금 복합체 조성물에 있어서,

이때 측쇄는 (i) Gly-Phe-Leu-Gly 또는 Gly-Gly-Ama 올리고펩티드로 구성되며, 이 펩티드의 한쪽 단부는 폴리머에 부착되며, 다른 한쪽 단부는 N,O-아미도말로네이트 복합체를 통하여 백금 화합물에 부착되며, (ii) 백금 화합물을 형성할 수 있도록 생리학적 조건에서 절단되는 최소 한개 연결기(linkage)를 포함하는 조성물.

청구항 33.

삭제

청구항 34.

삭제

청구항 35.

제7항, 제22항, 제23항, 제25항, 제27항, 제31항 또는 제32항중 어느 한 항에 있어서, 인체의 충실성 종양(solid tumor)을 치료하는 약물에 이용되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 36.

삭제

청구항 37.

삭제

명세서

기술분야

시스플라틴의 항-종양 활성의 개발이래로(Rosenburg et al, 1969)암 치료용 백금 착화합물의 용도에 관한 무수한 연구가 수행되었다. 백금 착화합물의 항-종양 활성도는 생체 내에서 활성 염소 리간드가 손실되어 종양 세포에서 인트라- 및 인터-스트랜드 DNA 가교결합을 형성할 수 있는 반응성 모노 또는 디-아쿠아 착화합물을 형성하기 때문이다. 이러한 가교결합으로 세포가 죽을 수 있다. 시스플라틴(cDDP 또는 시스-디아민디클로로백금(II))은 인체에 사용이 허용된 가장 널리 사용되는 백금 화합물이며, 고환, 난소, 머리 및 목을 포함한 고체 종양 치료에 사용되며 다른 작용제와 조합으로 편평상피 세포와 작은 폐세포 암종에 사용된다(Sur, et al., 1983).

그러나 독성 때문에 시스플라틴의 사용에 제약이 있다. 신장 독성과 신경 독성은 투약을 제한하는 전형적인 독성이다. 이 문제 때문에 많은 연구자는 치료 지수(독성에 견딜 수 있는 최대 투여량과 효능을 제공하는 투여량간의 비율)이 개선된 새로운 화합물을 발견하려는 바람으로 신규한 소 분자 백금 킬레이트를 만들어 시험하였다. 백금 킬레이트 구조의 변화는 백금 치료가 효과적인 종양 종류의 범위를 확장하거나 독성 프로파일을 변경한다. 종양을 죽이는데 불안정한 이탈기가 필요하지만 이러한 작용기는 분자의 독성에 기여할 수 있다. 영국 암 연구소에서 수행된 연구는 염소를 다른 이탈기로 대체함으로써 신경 독성이 낮은 화합물이 수득될 수 있음을 보여준다(Harrap, 1985). 이 연구는 2개의 배위결합된 염소이온이 1,1-시클로부탄디카르복시산의 킬레이트로 대체된 시스플라틴의 상동물인 카보플라틴을 발견하였다. 이러한 킬레이트기는 시스플라틴의 염소원자에 비해서 덜 불안정하다. 결과적으로 시스플라틴에 비해서 유사한 종양 살상 효과를 위해서 카보플라틴의 투여량이 더 많이 필요하지만 카보플라틴은 더 높은 치료 지수를 가지며 투여량 제한 독성은 신경 독성이라기보다는 골수억제이다.

옥살리플라틴은 유럽에서 인체에 사용이 허용된 또 다른 작은 백금 킬레이트이다. 이러한 백금 킬레이트는 시스플라틴의 비-반응성 (아민)리간드와 반응성 리간드에서 변화의 효과를 조사하는 연구 결과이다. 옥살리플라틴에서 배위결합된 암모니아 리간드는 트랜스-1R,2R-디아미노시클로헥산(DACH)킬레이트로 대체되며 반응성 염소 리간드는 옥살산 킬레이트로 대체된다. 옥살리플라틴(및 다른 DACH 백금화합물)은 NCI 인체 종양 스크린에서 시스플라틴 및 카보플라틴에 비해서 상이한 활성 스펙트럼을 가지며(Paull et al. 1989), 결장직장암 치료용으로 개발되었다. 옥살리플라틴의 투여량 제한 독성은 감각신경 통증이다.

잠재적 화학치료제로서 많은 다른 작은 백금 착화합물이 연구되었지만 기껏해야 효능 및 치료 지수에서 약간의 개선이 있었을 뿐이다. 이들 새로운 백금 킬레이트의 많은 수는 활성이 없거나 배합문제가 있으며(물에서 용해도가 낮거나 안정성이 나쁜),신경독성, 골수억제, 메스꺼움을 포함한 심한 독성 부작용을 유도한다. 승인된 백금 착화합물의 치료 지수를 향상시키려는 시도는 시스플라틴과 팔리타셀의 동시 투여와 같은 조합 치료(Posner et al, 2000); 리포솜에 가두는 것과 같은 배합 변화(Steerenberg et al, 1988)를 포함한다. 현재 승인된 백금 킬레이트에 비해서 치료 지수가 향상된 새로운 백금 착화합물이 필요하다. 이러한 킬레이트는 수용성이며 수성 환경에서 안정적이어야 하지만 종양 세포에서 충분히 반응적이어서 DNA를 가교결합 시키고 결국 종양 세포를 죽이는 화학종을 제공한다.

게다가 치료 지수의 향상은 백금 착화합물을 종양 세포에 향하게 함으로써 달성될 수 있다. 시스플라틴, 카보플라틴 및 옥살리플라틴과 같은 전통적인 소 분자 백금 착화합물은 종양 세포에 특이하게 향하지 않으며 정맥주사 후에 종양세포에 확산하는 만큼 용이하게 정상 세포에 확산한다. 또한 투여된 것은 빠르게 제거된다. 주사 3시간 후에 시스플라틴 플라스마 백금의 90%가 비가역적으로 단백질에 결합된다(Physican's. Desk Ref. 1997). 시스플라틴과 카보플라틴의 경우에 각각 투여량의 25% 및 65%가 12시간 이내에 신장분비 된다(DeVita et al. 1993). 백금 착화합물이 종양에 더욱 용이하게 전달되거나 정상세포보다 더 쉽게 종양 세포에 의해 취해진다면 치료 지수가 향상될 것이다.

문헌에 보고된 종양을 향하게 하는 한 가지 방법은 화학치료 화합물을 폴리머나 다른 거대분자 구조에 부착하는 것이다. 정맥주사 이후에 종양에서 폴리머 및 나노-입자의 농도는 정상 조직에서의 농도를 초과한다(Seymour 1992; Veronese et al. 1999). 선회된 종양 축적 기전은 "향상된 투과성 및 보유"("EPR")효과라 부른다(Seymour et al. 1995). 종양 내피 세포는 정상 내피 세포보다 투과성이 크므로 정상조직의 경우보다 폴리머 및 나노-입자는 종양의 내피 세포층을 더욱 용이하게 통과한다. 따라서 정맥주사 이후에 폴리머 및 나노-입자는 정상세포보다 쉽게 종양세포의 세포 외액에 들어갈 수 있다.

백금 착화합물의 구조에 대한 확증 없는 가설은 있을지라도 폴리머 백금 조합의 어떤 것도 폴리머에 백금의 착물화 성질이나 구조의 증거를 제공하지 못한다. 공지 실시예에서 백금이 폴리머에 여러 방법으로 결합하여 혼성 착화합물이 가능하다. 또한 착화합물 형성시 pH가 조절되지 않아 불활성이거나(히드록소 리간드)독성인(아쿠아 리간드)인 다른 백금 착화합물을 형성시킬 수 있다. 따라서 한 폴리머로부터 상이한 방출 속도로 백금이 방출될 수 있으며 백금 방출 속도는 배치마다 달라서(형성된 착화합물 혼합물이 배치마다 다를 수 있으므로)독성 및 효능에서 배치마다 상이함을 조절할 수 없다. 이러한

상이함은 암치료에 이들 조합의 사용을 허용할 수 없게 만든다. 선호되는 상황은 폴리머에 대한 백금의 착화를 잘 한정되고 조절되게 하여 종양에 백금 착화합물의 개선된 전달을 위해서 EPR효과를 활용할 때 암 치료에 이득이 되는 방출속도를 제공한다.

EPR효과를 활용한 수동 종양 표적화에 추가적으로 "활성"메카니즘을 활용하여 백금 착화합물을 종양에 향하게 할 수 있다. 이것은 정상 조직에 비해서 종양에서 상향 조절되는 수용체에 결합하는 부분에 백금 착화합물을 결합시켜 정상 조직에 비해서 종양조직에서 백금 수준을 향상시켜 달성될 수 있다. 이러한 상향 조절된 수용체는 공지이다(Heppler et al, 2000; Schlaeppli et al. 1999; Sudimack et al. 2000; Dubowchik et al. 1999; Weiner, 1999; Buolamwini, 1999). 타겟 작용제로는 모노클론 항체, 펩티드, 소마토스타틴 상동체, 엽산 유도체, 렉틴 및 폴리 음이온성 폴리사카라이드가 있다.

그러나 종양 조직에 백금의 전달을 증가시키기 위한 수용체-표적화 메카니즘 활용에 대한 보고된 실시예는 매우 적다. 모노클론 항체(McIntosh et al, 1997; Hata et al, 1992), 스테로이드(Gust et al, 1995; DiZio et al, 1992, Gibson, et al. 1990), 엽산(Vitols et al, 1987)과 조합된 백금의 연구가 있지만 임상에서 평가되지 않았다.

폴리머의 수동 표적화와 수용체-갈망하는 화합물의 능동 표적화의 조합이 가능하다. 이것은 HPMA폴리머 독소루비신 이 효소-절단 가능한 펩티드를 통해서 폴리머에 부착되고 간에서 고 농축되는 아시알로글리코프로테인 수용체에 강한 친화력을 갖는 탄수화물 갈락토오스와 조합되는 "PK2"로 예시된다(Julyan et al, 1999). 백금 착화합물로는 이러한 능동 및 수동 표적화의 조합 방법이 개발되지 않았다.

본 발명은 초기의 불안정한 O,O-아미도말로네이트 시스-디아민 백금(II)착화합물을 순수하고 분리 가능한 N,O-아미도말로네이트 시스-디아민 백금(II)착화합물로 재배열시킬 수 있다는 예기치 못한 발견에 기초한다. 반응성 시스-디아민 백금(II)화합종이 아미도말로네이트와 반응할 때 O,O-Pt 킬레이트가 초기에 형성된다. 이러한 반응에서 N,O-킬레이트는 형성되지 않거나 분리나 정제되지 않은 부산물로서 형성된다는 보고가 있었다. 여기서 순수한 N,O-아미도말로네이트 디아민 백금(II)이 분리될 수 있는 일반적인 조건이 발표된다. 게다가 이러한 킬레이트는 암 치료에 선호되는 생물학적 활성도와 개선된 치료 지수를 갖는다. 이러한 N,O-아미도말로네이트 킬레이트의 암 치료 성질은 지금까지 보고되지 않았다. 게다가 열역학적으로 덜 안정한 착화합물의 N,O-킬레이트로의 완전한 전환은 일정한 효능과 독성 프로파일로 제조될 수 있는 종양 치료용 소 분자 및 폴리머 화합물을 제공한다.

약품의 경우에 형태 및 순도의 정확한 측정이 필요하다. 본 발명 및 관련 분야에서 불순한 백금 착화합물은 정제될 경우 사라지는 생물학적 활성을 보이는 예가 있으므로 백금 착화합물의 정확한 성질을 알아내고 불순물을 식별하는 것이 중요하다(Talebian et al. 1991 Appleton et al. 2000).

본 발명의 경우 백금 착화합물의 정확한 성질을 식별하는 최상의 방법은 NMR 스펙트로스코피, 특히 ^{195}Pt NMR 및 ^{15}N NMR스펙트로스코피(Appleton 2000)이다. 이러한 기술을 써서 사전 분리할 필요가 없이 백금 착화합물의 형태가 결정된다. 이 작업을 위해서 ^{195}Pt NMR스펙트로스코피가 선호되는데, 그 이유는 충분한 감도를 제공하고 ^{15}N NMR스펙트로스코피의 경우 필요한 동위원소 농축이 불필요하기 때문이다. ^{195}Pt 핵은 스핀이 1/2이고 ^{13}C 핵의 20배 정도의 수용성을 가지며 15,000 ppm의 케미칼 쉬프트 범위에 걸쳐 공명을 보인다. 케미칼 쉬프트는 백금 리간드의 형태 및 모양에 민감하다. ^{195}Pt 은 $\geq 10\text{mM}$ 백금의 감도 한계를 갖는다. 시스-디아민 백금(II) 착화합물의 케미칼 쉬프트의 예는 시스플라틴의 경우 -2169ppm, 카보플라틴의 경우 -1723ppm, 디아쿠아의 경우 -1584 ppm, 모노아쿠아-모노클로로의 경우 -1841ppm, O,O-아미도말로네이트의 경우 -1732ppm, N,O-아미도말로네이트의 경우 -2156ppm, N-아세틸글리신의 N,O-킬레이트의 경우 -2020 ppm이다(Appleton 1990; Gibson 1990; Appleton 2000). DACH-Pt 착화합물은 더욱 높은 장에서 나타난다.

시스-디아민 백금(II)종과 자유 아민 함유 아미도말로네이트의 반응이 보고된다. Gandolfi(Gandolfi, et al. US4,614,811; Gandolfi, et al. 1987)는 시스-디아민 백금(II)종과 아미도말로네이트간의 착화합물의 항-종양성과 제조방법을 보고한다. 보고된 구조는 도2a에 도시된 대로 모두 O,O-킬레이트이다. O,O-Pt 킬레이트가 먼저 형성될지라도 pH=5에서 도2b에 도시된 N,O-아미도말로네이트 시스-디아민 백금(II)킬레이트로 이성질화 반응한다(Appleton et al. 1990 and Gibson et al. 1990). 게다가 pH가 너무 낮으면(<) 디카르복실화 반응이 일어나 N,O-글리신 착화합물이 제공된다. pH가 너무 높으면(>) 백금 에스테르의 가수분해가 일어날 수 있다. 순수한 N,O-아미도말로네이트 착화합물의 생물학적 활성에 대한 문헌은 없다. 그러나 잘 정제된 N,O-아스파테이트 시스-디아민 Pt(II) 착화합물의 보고서(Talebian 1991)는 세포 독성 활성이 있어도 적응을 보여준다.

도3에 도시된 것과 같은 아미도말로네이트의 시스-디아민 Pt(II) 착화합물의 경우에 US4,882,447에서 Tsujihara는 1,2-디아민시클로헥산 Pt(II)의 O,₂-아미도말로네이트 착화합물(DACH-Pt(II)) 제법과 생물학적 활성을 보고한다. O,₂-Pt 착물화를 입증하는 데이터는 없다. 일련의 아미도말로네이트 DACH-Pt(II)가 도3에 도시된 것과 유사한 O,₂-Pt 킬레이트로만 존재한다고 보고된다(Talebian et al. 1990). 폴리포스파젠 기초 아미도말로네이트는 O,₂-킬레이트로만 도시되므로 (Fig 3a) 유사한 글루타메이트 기초 물질이 동일한 양의 2가지 킬레이트를 보일지라도 확인시켜주는 스펙트럼 데이터가 없다. 그러나 일련의 스테로이드 기초 아미도말로네이트 디아민 Pt(II)착화합물(Fig 3, R=스테로이드)은 O,₂-Pt 및 N,O-Pt 아미도말로네이트 킬레이트(도3a 및 3b)인 것으로 도시되며 O,₂-이성질체가 다수이다(Gibson et al. 1990). 열이나 더 오랜 반응시간으로 N,O-킬레이트가 우세할 수 있지만 두 화학종의 분리가 발표되지 않았다. 그러나 이 발명은 아미도말로네이트 시스-디아민 Pt착화합물의 O,₂-Pt를 N,O-Pt로 전환시키는데 추가 성분이 필요함을 간파하였다.

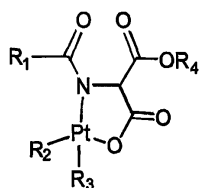
요약하면 아미도말로네이트의 시스-디아민 Pt(II)착화합물의 경우에

O,₂-Pt킬레이트는 빠르게 N,O-Pt킬레이트로 이성질화 반응한다. 그러나 아미도말로네이트의 시스-디아민 착화합물의 경우에 O,₂-Pt만이 발견되거나 두 킬레이트 혼합물에서 O,₂-Pt킬레이트가 우세하다. 아미도말로네이트의 순수한 N,O-킬레이트 제조방법에 대한 보고는 없다. 따라서 아미도말로네이트와 시스-디아민 Pt(II)착화합물의 N,O-킬레이트의 제법과 생물학적 활성도가 제시된다. 추가로 선택적인 O,₂-킬레이트 제조방법이 발표된다.

발명의 요약

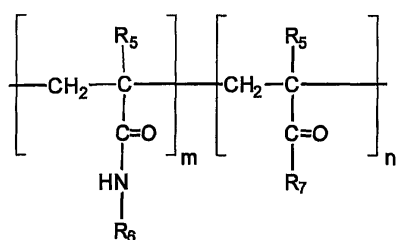
본 발명은 정제된 N,O-아미도말로네이트 백금 디아민 착화합물에 관계한다. 이러한 착화합물은 폴리머에 결합될 수 있으며 정제된 N,O-아미도말로네이트 디아민착화합물 유효량을 환자에 투여하는 단계를 포함한 백금 감응 종양 치료방법에 유용하다.

본 발명은 다음 시스-디아민 N,O-아미도말로네이트 백금을 포함한 종양 치료용 조성물에 관계한다:



여기서 R₁은 H, 알킬, 수용성 기, 종양에 화학종을 향하게 하는데 유용한 캐리어나 표적화 기이며; R₂ 및 R₃는 아민이고; R₄는 H 또는 양이온이고; 상기 화학종은 생체 내에서 항-종양 활성을 갖는다. 착화합물에서 양이온은 암모늄, 알칼리 또는 알칼리토금속이다. 선호되는 양이온은 나트륨이다.

어떤 경우에 N,O-아미도말로네이트 백금 디아민 착화합물은 위의 조성을 가질 수 있으며 R₁은 분자량이 1,5000 kDa이며 다음과 같은 N-알킬 메타크릴아미드의 합성 폴리머이다:



여기서 $m=0$ 이고 $n=100$ 이거나 $m:n$ 은 0,1-99.9이며; R_5 는 H 또는 CH_3 이고; R_6 은 C_1-C_6 히드록시알킬기이고 R_7 은 서열 $Gly-(W)_p-Gly$ 을 가지며 생리적 조건 하에서 절단될 수 있는 올리고펩티드 체이며 p 는 0-3이고 W 는 아미노산이나 이의 조합이고 C말단은 아미도말로네이트 기의 아미드이다.

N,O-아미도말로네이트 백금 착화합물에서 R_2 및 R_3 는 NH_3 이다. 이들은 특히 1,2-디아미노시클로헥산의 일차 아민기이다.

착화합물의 백금은 +2 또는 +4의 산화상태에 있다. R_1 은 H또는 알킬이지만 스테로이드, 염산, 염산 유도체 또는 타겟 폴레이트 수용체에 유용한 상동물이다.

폴리머 N,O-아미도말로네이트 백금 착화합물의 폴리머는 폴리글루탐산, 모노- 또는 폴리사카라이드 또는 폴리사카라이드의 측쇄이다.

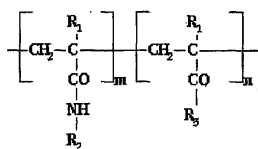
본 발명은 백금 디아민 화합물의 안정성을 향상시키는 방법에도 관계한다. 본 방법은 백금 화합물의 정제된 아미도말로네이트 착화합물을 형성하는 단계를 포함한다.

본 발명은 종양 자리에 축적되도록 설계되고 백금 화합물과 착물을 형성하기 위해서 폴리머를 따라 이격된 측쇄를 갖는 N-알킬 아크릴아미드 폴리머로 구성된 폴리머-백금 착화합물을 포함한 종양 치료용 조성물에 관계하며, 상기 측쇄는 (i)한 단부에서 폴리머에 부착되고 다른 단부에서 N,O-아미도말로네이트 착화합물을 통해 백금 화합물에 부착된 올리고펩티드로 구성되고 (ii)선택된 생리 조건 하에서 절단되도록 설계된 적어도 하나의 결합을 포함하여 생체 내에서 항-종양 활성을 갖는 백금 화합물을 생성한다.

이러한 N-알킬 아크릴아미드 폴리머는 1,000-5,000,000돌턴의 분자량을 갖는 호모폴리머가 선호된다. N-알킬 아크릴아미드 폴리머는 0.1-99.9의 $m:n$ 비율로 반복단위를 갖는 공중합체일 수 있다.

본 발명의 조성물은 올리고펩티드 측쇄를 갖는 N-알킬 아크릴아미드 반복단위를 포함할 수 있다. 올리고펩티드 측쇄는 백금 화합물을 부착할 수 있는 인접 기에서 종료될 수 있다.

본 발명의 조성물에서 유용한 폴리머는 다음 공중합체이다:



여기서 R_1 은 H 또는 CH_3 이고, R_2 는 2-히드록시프로필이고, R_3 는 Gly-Phe-Leu-Gly-Ama 또는 Gly-Gly-Ama이다. 치료용도에서 폴리머 백금 착화합물은 비경구 투여에 적합한 수성 매체에 용해된다.

본 발명의 중요한 측면은 백금 화합물로 고체 종양을 처리하는 방법으로서 백금 화합물과 착물을 형성하기 위해서 폴리머를 따라 이격된 측쇄를 갖는 N-알킬 아크릴아미드 폴리머로 구성된 폴리머-백금 착화합물을 제조하는 단계를 포함하며, 상기 측쇄는 (i)한 단부에서 폴리머에 부착되고 다른 단부에서 N,O-아미도말로네이트 착화합물을 통해 백금 화합물에 부착된 올리고펩티드로 구성되고 (ii)선택된 생리 조건 하에서 절단되도록 설계된 적어도 하나의 결합을 포함하여 생체 내에서 항-종양 활성을 갖는 백금 화합물을 생성하며; 유효량의 착화합물을 환자에게 비경구 투여하는 단계를 포함한다. 이러한 N-알킬 아크릴아미드 폴리머는 1,000-5,000,000돌턴의 분자량을 갖는 호모폴리머가 선호된다. 또 다른 경우에 N-알킬 아크릴아미드 폴리머는 1,000-5,000,000돌턴의 분자량을 갖는 공중합체이다. 공중합체는 0.1-99.9의 $m:n$ 비율로 반복단위를 가질 수 있다. 이러한 반복단위는 올리고펩티드 측쇄를 갖는 N-알킬 아크릴아미드 반복단위를 포함할 수 있으며 측쇄는 백금 화합물을 부착할 수 있는 인접 말단을 가진다. 올리고펩티드가 사용되는 경우에 $Gly-(W)_p-Gly$ 이 선호되고 p 는 0-3이고 W 는 아미노산이나 이의 조합이다. 한 구체예에서 올리고펩티드는 Gly-Phe-Leu 또는 Gly-Gly이다.

본 발명은 백금 디아민 화합물의 치료 지수 향상 방법을 제공하는데, 화합물이 종양 치료에 사용될 경우 환자에게 화합물 함유 용액을 비경구 투여하고, 투여 이전에 제1 반복단위 N-알킬아크릴아미드와 올리고펩티드 측쇄를 갖는 제2 반복단위로 구성된 공중합체와 백금 화합물로 착화합물을 형성하며, 상기 측쇄는 N,O-결합을 통해서 백금화합물과 착물을 형성하는 아미도말로네이트 말단기를 갖는다.

또 다른 측면에서 본 발명은 제1 반복단위 N-알킬아크릴아미드와 올리고펩티드 측쇄를 갖는 제2 반복단위로 구성된 공중합체와 백금 화합물로 착화합물을 형성하는 단계를 포함하는 백금 디아민 화합물의 안정성 향상방법을 제공하며, 상기 측쇄는 N,O-결합을 통해서 백금화합물과 착물을 형성하는 아미도말로네이트 말단기를 갖는다.

따라서 생체 내에서 향상된 항-종양성을 갖는 새로운 폴리머-백금 착화합물이 본 발명의 목적이다.

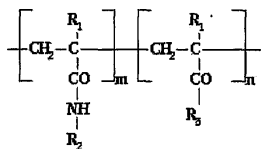
한 측면에서 본 발명은 종양 자리에 축적되도록 설계된 폴리머-백금 화합물을 포함한 종양 치료용 조성물에 관계하며, 상기 화합물은 골격에 백금 함유 측쇄가 부착된 합성 폴리머 골격으로 구성된다. 측쇄는 (i)한 단부에서 골격에 부착되고 다른 단부에서 백금 화합물에 부착된 생분해성 링커인 올리고펩티드로 구성된다. 링커는 선택된 생리 조건 하에서 절단되도록 설계된 적어도 하나의 결합을 포함하여 생체 내에서 항-종양 활성을 갖는 백금 화합물을 생성한다. 올리고펩티드는 아미노산 이외에 아미노말로네이트나 알파 아미노산 이외의 것을 포함할 수 있다.

한 구체예에서 합성 폴리머는 1,000-5,000,000돌턴의 분자량을 갖는 N-알킬 아크릴아미드 또는 메타크릴아미드(모두 n형 반복단위)호모폴리머이다.

다른 구체예에서 합성 폴리머는 1,000-5,000,000돌턴의 분자량을 가지며 0.1-99.9의 m:n비율로 반복단위를 갖는 공중합체이다.

반복단위는 N-알킬 아크릴아미드 또는 메타크릴아미드 단위와 백금 화합물을 부착할 수 있는 인접 말단기에서 종료하는 올리고펩티드 측쇄를 갖는 단위로 구성된다.

한 구체예에서 폴리머-백금 화합물의 폴리머는 다음 공중합체이다:



여기서 R₁은 H 또는 CH₃이고, R₂는 저급 알킬이나 저급 히드록시알킬이고, R₃는 올리고펩티드 측쇄이다. 올리고펩티드가 사용되는 경우에 Gly-(W)_p-Gly이 선호되고 p는 0-3이고 W는 아미노산이나 이의 조합이다. 한 구체예에서 펩티드는 Gly-Phe-Leu-Gly이고 백금 화합물에 부착하기 위한 카르복실, 디아민 또는 말로닐 부분에서 종료한다. Phe 또는 Leu은 특히 (L)아미노산이다. 또 다른 경우에 펩티드는 인접 카르복실 말단기에서 종결하는 Gly-Gly이다. D-아미노산 함유 올리고펩티드가 생분해성이 되는 정도 까지는 이들은 올리고펩티드의 전부나 일부일 수 있다.

선호되는 구체예에서 R은 CH₃, R₂는 2-히드록시프로필, R₃는 Gly-Phe-Leu-Gly-[X]이고 [X]는 디아민, 카르복시기 또는 말로닐 부분이다.

폴리머-백금 화합물은 비경구 투여에 적합한 매체에 용해된다.

또 다른 측면에서 본 발명은 환자의 고체 종양에 백금 화합물을 표적화하는 방법을 포함한다. 이 방법은 골격을 따라 이격된 측쇄를 갖는 합성 폴리머 골격으로 구성된 폴리머-백금 화합물 제조 단계를 포함한다. 측쇄는 (i)한 단부에서 골격에 부착되고 다른 단부에서 백금 화합물에 부착된 올리고펩티드로 구성되며 (ii)선택된 생리 조건 하에서 절단되도록 설계된 적어도 하나의 결합을 포함하여 생체 내에서 항-종양 활성을 갖는 백금 화합물을 생성한다.

또 다른 측면에서 본 발명은 백금 화합물의 치료 지수 향상 방법을 제공하는데, 화합물이 종양 치료에 사용될 경우 환자에게 화합물 함유 용액을 비경구 투여하고, 투여 이전에 제1 반복단위 N-알킬아크릴아미드와 올리고펩티드 측쇄를 갖는 제2 반복단위로 구성된 공중합체와 백금 화합물로 착화합물을 형성하며, 상기 측쇄는 백금화합물과 착물을 형성하는 인접 말단기에서 종료한다.

또 다른 측면에서 본 발명은 제1 반복단위 N-알킬아크릴아미드와 올리고펩티드 측쇄를 갖는 제2 반복단위로 구성된 공중합체와 백금 화합물로 착화합물을 형성하여 백금 화합물의 용해도나 안정성을 향상하는 방법을 포함하며, 상기 측쇄는 백금화합물과 착물을 형성하는 인접 말단기에서 종료한다. 폴리머-백금 착화합물은 생리 조건 하에서 비-착화합물 백금 화합물보다 용해도가 크며 안정적이다. 선호되는 백금 착화합물은 생분해성 결합에 연결된 아미도말로네이트 잔기의 O-를 통해서 폴리머에 결합된다.

화학치료제를 포함한 치료제의 폴리머 기초 전달은 상당한 관심을 받아왔다(Duncan et al (1999), Seymour). 대체적으로 잘 확립된 제약품은 생물학적으로 불활성인 폴리머에 화학결합 된다. 종양에서 이 기술은 증가된 투과성 및 보유(EPR)효과를 통해 종양 내에 세포 독성 작용제가 농축될 위험을 제공한다(Seymour, et al). ACCESS제약은 다양한 백금 폴리머 치료제에 권리를 갖는다. 이중 하나는 AP 5280으로 N-(2-히드록시프로필)메타크릴아미드(HPMA)와 Gly-Phe-Leu-Gly의 메타크릴아미드의 90:10공중합체와 시스-디아민Pt(II)의 아미도말로네이트 킬레이트이다. 최적화된 링커의 도입은 종양 프로테아제에 의한 절단을 통해서 폴리머로부터 백금 함유 부분을 방출할 수 있게 한다. 이러한 공중합체-링커-킬레이트 조합은 Duncan et al(1999)에 의해 제시된다.

AP 5280의 합성은 중간 poly(HPMA) GFLG-ONp에서 디에틸 아미도말로네이트를 p-니트로페놀로 치환하여 poly(HPMA)-GFLG-Ama-diEt를 형성함으로써 개시된다. 이후 감화되고 시스-(NH₃)₂Pt(H₂O)₂²⁺로 백금화 되어 poly(HPMA)-GFLG-Ama=Pt(NH₃)₂가 생성된다. 이후에 O,O-Pt 킬레이트가 N,O-Pt킬레이트로 재배열된다. 또한 HPMA와 MA-GFLG-Ama-diEt모노머로부터 (HPMA)-GFLG-Ama-diEt(Polymer Labs)를 제조한다. 다양한 양의 라디칼 사슬 전달제(p-니트로페놀)로 모노머를 중합하여 분자량이 조절된다. 이후 감화되고 백금화 되고 N,O-Pt킬레이트로 재배열된다. 저 분자량 불순물로부터 정제는 겔선-유동 여과로 수행되고 동결건조에 의해 최종 생성물이 분리된다. N,O-Pt킬레이트(>92%)의 확인 및 순도는 ¹⁹⁵Pt NMR(-2056ppm)로 확인되며 O,O-킬레이트(-1733ppm)로서 <8%Pt가 존재한다. 최종 생성물은 8.0±.5% Pt(wt/wt)을 함유하고 Mw=24.4kDa이다. 물에서 AP 5280는 <<1%의 백금을 폴리머-프리 백금 화학종으로 방출하며 37°C에서 24시간후 생리적 농도의 염소를 함유한 매체에 <2%의 백금을 방출한다. AP 5280의 효능이 B16F10쥐의 종양에 평가되는데 3mg/kg에서 시스플라틴의 활성과 동일한 20mg Pt/kg의 활성도를 보인다. 카보플라틴 보다 탁월한 활성도(45 or 60mg/kg)가 200mg Pt/kg(all doses IV, qd x 5)AP 5280 으로 달성된다. 도A는 AP 5280 공정을 보여준다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 중심 구체에는 특정 유형의 백금(II) 착화합물(예, 도 3b)의 정제되고 특성화된 조성물인데, 여기서 아미도말로네이트기는 아미도말로네이트의 아미드 질소 및 아미노말로네이트의 카르복실레이트중 임의 하나의 산소에 의해 백금에 킬레이트되고, 중심 백금에서 2개의 다른 가용 리간드 부위는 암민과 아민이다. 이런 착화합물은 암의 치료에서 화학요법적 약물로 유용하다.

본 발명의 중요한 측면에서, N,O-아미도말로네이트-디아민백금(II) 착화합물의 카르보닐아미드에 결합하는 R기(도 3b)는 H, 알킬기, 본 발명의 종을 안정화시키는데 유용한 작용기, 중합체, 본 발명의 착화합물과 중합체를 연결시키는데 유용한 작용기, 거대분자, 또는 N,O-아미도말로네이트-디아민백금(II) 착화합물이 종양을 향하도록 하는데 유용한 성분에 대한 링커일 수 있다.

본 발명에서 아미드 카르보닐의 R기가 H, 일차 알킬 또는 수용성 작용기인 경우가 바람직한데, 그 이유는 본 발명의 N,O-아미도말로네이트-디아민백금(II) 착화합물이 유리한 치료요법적 지수를 갖기 때문이다. 상기 실례는 본 발명의 N,O-킬레이트가 낮은 독성 및 우수한 시험관내 활성을 보유한다는 것을 보여주기 때문에, N,O-아미도말로네이트-디아민백금(II) 착화합물의 이런 단순한 소형 분자가 유용할 수 있다. 이들이 O,O-킬레이터 대응체가 생물학적 활성을 보유하고 있다는 것은 이미 공지되어 있는데, 본 발명은 O,O-Pt 아미도말로네이트 킬레이트가 생리 조건하에 N,O-Pt 킬레이트로 급

속하게 전환된다는 것을 보여준다. R기의 일부로 수용성 작용기를 통합함으로써, 좀더 유리한 제형 및 약량을 수득할 수 있다. 이런 수용성 작용기에는 탄수화물, 폴리에틸렌글리콜, 4차 아민(즉, 베타인) 및 당업자에게 공지된 다른 작용기가 포함되지만, 이들에 국한되지 않는다.

본 발명에서, 아마이드 카르보닐의 R기가 중합체인 경우가 바람직한데, 그 이유는 이런 중합체가 EPR 효과로 종양에 대한 표적화를 제공하고, 수용성을 증가시킬 수 있기 때문이다. 상기 중합체는 합성 또는 천연일 수 있다. 합성 중합체에는 폴리메틸아크릴아미드, 폴리아크릴산, 폴리메타아크릴산, 폴리에틸렌글리콜(직쇄 또는 분지쇄), 폴리아미노산을 비롯한 폴리아크릴아미드가 포함되지만, 이에 국한되지 않는다. 폴리아미노산에는 폴리글루타메이트, 폴리아스파테이트, 폴리리신이 포함된다. 이들 폴리아미노산에서 중합체 골격은 알파 아민과 알파 카르복실기의 아마이드 또는 측쇄의 카르복실이나 아민 기일 수 있다. 다른 것은 당업자에게 자명하다. 천연 중합체에는 알부민과 같은 단백질 및 헤파린, 콘드로이틴-6-설페이트, 히알루로네이트, 데르마탄 설페이트, 케라탄 설페이트, 키틴, 키토산등과 같은 폴리사카라이드가 포함된다. 다른 것은 당업자에게 자명하다. 각 중합체 가닥은 하나 또는 복수의 금속 킬레이트에 결합시킬 수 있다. 중합체와 아마이드말로네이트 기간의 결합은 중합체의 아민기와 아마이드말론산의 아민 사이를 가교하는 디카르복실산(예, 숙신산)을 이용하여 중합체의 카르복실기를 아마이드말로네이트로 치환함으로써, 또는 알킬 할라이드 치환체로 폴리사카라이드의 하이드록실기와 아마이드말로네이트 사이에 에테르를 형성함으로써 달성할 수 있다. 다른 가능성은 당업자에게 자명하다.

본 발명에서, 아마이드 카르보닐의 R기가 N,O-아미도말로네이트-디아민백금(II)을 종양으로 향하도록 하는데 유용한 작용기를 보유하는 경우가 바람직한데, 그 이유는 이는 본 발명에 따른 착화합물의 치료요법적 지수를 추가로 증가시키기 때문이다. 표적화 약물에는 단클론 항체, 펩티드, 스테로이드, 소마토스테틴 유사체, 엽산 유도체와 유사체, 렉틴, 다가음이온성 폴리사카라이드가 포함되지만, 이들에 국한되지 않는다. 본 발명의 특정 범위에서, 본 발명의 N,O-아미도말로네이트-디아민백금(II) 착화합물과 표적기 사이의 공유 결합이 만들어진다. 이후, 이런 표적화 착화합물을 환자에 투여하는 경우, 표적화 약물은 본 발명의 착화합물을 종양으로 안내하게 된다. 이는 종양사멸 효과를 증가시키고 본 발명에 따른 백금 착화합물의 전신 독성을 감소시킬 것으로 예상된다. 이런 표적화 착화합물의 한 예는 엽산염의 감마-카르복실레이트를 디에틸아미노말로네이트로 치환하여 엽산염-Ama-diEt 종을 산출함으로써 만들 수 있다. 이후, 이것은 실시예에 제시된 과정에 따라 엽산염-Ama=Pt(NH₃)₂N,O-Pt 킬레이트로 전환시킨다. 백금은 +2 또는 +4 산화상태로 존재할 수 있다.

적절한 구체예에서, 아마이드말로네이트의 아마이드 카르보닐기의 R기는 '폴리(HPMA)-GG-'이고, Ama기는 인접 G(글리신)에 부착된다. 좀더 적절한 구체예에서, 아마이드 카르보닐 R기는 25 kDa M_w의 '폴리(HPMA)-GFLG-'이다. 다른 적절한 구체예에서, 아마이드 카르보닐 R기는 '폴리(Glu-Ama)'이다.

본 발명에 따른 N,O-아미도말로네이트-디아민 백금(II) 종의 아민은 동일 또는 상이할 수 있다. 본 발명에서, 아민은 NH₃, 일차 아민, 이차 아민, 삼차 아민이다. 아민은 헤테로고리 및/또는 방향족일 수 있다. 도 3b는 R'이 알킬 또는 아릴기인 경우에 2가지 일차 아민과의 착화합물을 도시한다; R'이 H인 경우 이는 NH₃ 또는 아민이다. 2가지 아민은 상이한 성분 또는 단일 성분의 두 부분일 수 있다. 2차 아민과 삼차 아민 각각의 2개 또는 3개의 R기는 동일 또는 상이할 수 있는데, 여기에는 n-알킬, 분지된 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 이들의 조합 및 당업자에게 공지된 다른 유사한 작용기가 포함된다. 또한, 아민의 알킬기와 아민은 이들이 백금 착화합물과 호환성이라는 조건하에 다른 작용기를 보유할 수 있다. 이런 호환성 작용기에는 알코올, 에테르, 4차 아민, 할라이드, 알데히드, 케톤, 카르복실산 설폰산, 삼차 아마이드, 에스테르 및 당업자에게 공지된 다른 작용기가 포함된다. 비호환성 작용기에는 티올, 티오에테르등이 포함된다.

N,O-아미도말로네이트-디아민백금(II) 조성물의 특히 적절한 구체예는 2개의 아민이 각각 NH₃ 성분인 조성물이다. 다른 적절한 구체예는 2개의 아민이 1,2-디아미노사이클로헥산의 1차 아민인 조성물이다. 특히 바람직하게는 트랜스--1R,2R-디아미노사이클로헥산 입체이성질체이다(Noji, et al. 1981).

다른 중요한 구체예에서, 본 발명은 정제된 N,O-아미도말로네이트-디아민백금(II) 착화합물을 환자에 투여하여 백금 감소성 신생물을 치료하는데 사용한다. 약량은 IP, IV 또는 경우 투여하는데, 특히 IP와 IV 루트가 바람직하다. 이는 물, 등장액 또는 환자에 투여하기 적합한 다른 매체에 용해시킬 수 있다.

본 발명의 다른 중요한 측면은 본 발명에 따른 N,O-아미도말로네이트-디아민백금(II) 착화합물 및 관련된 착화합물의 순도와 성질을 측정하는 방법에 관한다. 제약학적 산물에 대한 이런 순도 및 성질 측정은 안전성과 효능을 담보하기 위하여 필요하다. 순도와 성질 측정의 중심은 ¹H와 ¹⁹⁵Pt 핵의 NMR 분광광도법이다. ¹H NMR 스펙트럼으로부터, 불순물을 함유하는 소량의 수소는 0.05%(wt/wt) 이하의 수준에서 확인할 수 있다. 착화합물의 성질 역시 ¹H NMR 분광광도법으로 부분

적으로 확인할 수 있다. 가령, 다수의 예는 폴리(HPMA)-GFLG-Ama= $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2$ 제형에 할당된 양성자 피크를 제시한다. 이에 더하여, O,O-와 N,O-Pt 킬레이트는 5ppm과 6ppm사이에 피크의 존재로 구분할 수 있다. 이런 피크는 O,O-킬레이트와 N,O-킬레이트에 대하여 각각 5.8ppm과 5.2ppm 근처인 것으로 생각된다. 백금 착화합물의 정확한 성질의 확인은 ^{195}Pt NMR 분광광도법에 의해 최적으로 측정되는데, 그 이유는 백금 공명의 화학적 전이가 이의 리간드 및 이들의 배열에 매우 민감하기 때문이다. 아미도말로네이트 시스-디아민백금(II)의 O,O-킬레이트와 N,O-Pt 킬레이트에 대한 공명은 각각 -1733과 -2055 ppm에서 나타나고, 유사체의 상응하는 공명은 각각 대략 -1850 내지 -1900과 -2350 내지 -2400 ppm에서 나타난다. 또한, 일치않는 다른 백금 종을 확인할 수 있다. 가령, 실시예3에서 폴리(HPMA)-GFLG-Ama= $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2$ 의 O,O-Pt 킬레이트의 스펙트럼은 2개의 다른 백금 피크의 존재를 보여준다.

다른 분석 기술은 순도와 성질 측면에서 NMR 스펙트럼을 보완한다. 원소 분석에서, 백금, 나트륨, 클로라이드, 포스페이트의 함량을 알 수 있다[실제 결과는 대략 9% Pt에서 예상치와 일치하지만 클로라이드와 포스페이트와는 일치하지 않는다. 나트륨에서 N,O-킬레이트는 1.0% Na의 예상 함량을 보유하는 것으로 밝혀졌다. O,O-킬레이트는 나트륨을 거의 함유하지 않는다]. Karl-Fisher 적정은 수분 측정에 이용하는데, 그 이유는 최종 산물이 빈번하게 동결건조되기 때문이다. 중합체와 분자량 분포의 크기는 분석 SEC로 측정한다. 유리된 소량의 분자 백금 종의 함량 및 생리조건(즉, PBS 37°C)에서 방출된 백금의 함량을 측정하는데, 그 이유는 자유 백금 종이 원하는 수준 이상의 독성을 초래할 수 있기 때문이다. 가령, 본원에 기술된 O,O-Pt 킬레이트는 N,O-킬레이트보다 훨씬 작은 백금 종을 방출한다. 따라서, O,O-Pt 킬레이트는 본 발명의 N,O-Pt 킬레이트보다 생체내에서 훨씬 독성이 강하다.

본 발명의 다른 측면에서, 본 발명의 백금 착화합물은 사람에게 투여하기 적합한 수준으로 정제하난. 전체 과정에서 중요 단계에 몇가지 멸균여과단계를 통합하고 멸균 환경을 이용할 때에는 주의해야 한다(도 5). 이는 본 발명의 멸균 최종 산물을 담보하는데 도움이 된다. 불순물 수준은 한외여과로 제약학적으로 수용가능한 수준으로 감소시킨다. 이는 클로라이드, 포스페이트, 한외여과가능한 백금에 대한 최종 산물의 분석으로 확인하였다. 몇몇 실험에서 보인 바와 같이, 이런 염과 소형 백금 종의 수준은 매우 낮고 필요한 순도 수준이내에 위치한다. 또한, TFF동안 정제는 인-함유 백금 및 클로라이드에 대한 투과액을 분석하여 확인한다.

본 발명의 특히 중요한 측면은 O,O-킬레이트에서 N,O-킬레이트로의 전환이 일어나고, 일어나지 않는 방법을 제시한다. 실험 D와 E의 결과 비교는 높은 온도 단독은 킬레이트 전환을 유발하지 않는다는 것을 보여주는데, 그 이유는 실험 D에서는 킬레이트 전환이 일어나지 않는 반면 실험 E에서는 N,O-킬레이트로의 완전한 전환이 일어났기 때문이다. 이들 2가지 반응물 모두 동일 시간동안 가열하였다. NaCl과 포스페이트 완충액과의 반응물에서만 킬레이트 전환이 나타났다. 이런 킬레이트 전환은 도 7에 도표로 도시한다. 상기 도면에서 볼 수 있는 바와 같이, PBS 37°C에서 16시간이후에도 O,O-Pt 킬레이트가 여전히 존재한다. 더 높은 온도 및/또는 좀더 긴 노출 시간을 적용하는 경우, O,O-Pt 킬레이트는 검출되지 않았다. 실험 E와 F에서 수득된 결과 비교는 온도가 높을수록 킬레이트 전환비율이 증가한다는 것을 보여주는데, 그 이유는 50°C 5시간에서는 전환이 완전히 이루어진 반면 37°C 16시간에서는 일부 O,O-킬레이트가 여전히 남아있었기 때문이다. 실험 F와 G는 pH가 중요하다는 것을 보여주는데, 그 이유는 유사한 이온력과 온도에서 37°C 16시간이후 높은 pH에서보다 좀더 낮은 pH에 노출된 물질이 좀더 많은 O,O-킬레이트를 함유하기 때문이다. 최종적으로, 실험 H는 작은 농도의 완충액의 작용만으로도 킬레이트 전환이 발생하도록 한다는 것을 보여준다.

본 발명의 다른 측면은 아미도말로네이트-디아민백금(II) 착화합물의 O,O-킬레이트에서 N,O-킬레이트로의 효과적인 전환을 위하여 최소 농도의 NaCl이 필요하다는 것을 보여준다. 도 10에 나타난 바와 같이, 킬레이트 전환은 더 높은 NaCl 농도에서는 진행되지 않는다(주의: 인산염이 킬레이트 전환에 영향을 줄 수 있고, 예비 킬레이트 전환을 달성하기 위하여 더 높은 농도의 인산염을 사용하는 점을 고려하여 10 mM 인산염 완충액을 사용하였다).

본 발명의 다른 중요한 측면은 NaCl과 인산염을 제외한 염이 킬레이트 전환을 실행시킬 수 있다는 것을 보여준다. 도 11은 니트레이트, 아세테이트, 요오드와 같은 다양한 음이온이 킬레이트 전환을 유도한다는 것을 보여준다. 백금에 대하여 우수하지만 불안정한 리간드인 요오드는 임의의 시간에 가장 높은 전환을 보이고, 반면 아세테이트는 가장 낮은 전환을 보인다. 흥미롭게도, 니트레이트(백금에 대하여 열등한 리간드)는 매우 효과적인 킬레이트 전환을 유도한다. 이들 결과는 유용한데, 그 이유는 Na가 다수의 유기용매에 녹아 비-수성 킬레이트 전환에서 킬레이트 전환을 달성할 수 있기 때문이다. 다른 한편, 높은 농도의 니트레이트는 다른 일치않는 리간드가 킬레이트될 수 있는 시스템에서 킬레이트 전환을 달성하는데 사용할 수 있다. 킬레이트 전환은 중탄산염에서도 부드럽게 진행된다. 다른 금속염, 브로미드, 셀페이트, 설포네이트등 역시 킬레이트 전환을 유도할 것으로 예상된다.

본 발명의 한 측면에서, 2+ 산화상태 대신에 4+ 산화상태 백금이 본 발명에 따른 착화합물의 핵심을 형성한다. 높은 산화도를 가진 본 발명에 따른 착화합물은 치환 불활성이기 때문에 유용할 수 있다. 따라서, 4+ 산화상태의 본 발명에 따른 착

화합물은 분자의 다른 부분 또는 원치않는 생물학적 표적과 반응할 수 있도록 제조할 수 있다. 이에 더하여, 4+ 산화상태의 백금 착화합물은 백금 화학약물의 경구 투여에 사용된다. 4+ 착화합물의 합성은 페록시드, 페라시드, 할라이드 및 당업자에게 공지된 다른 시약과의 산화반응으로 상응하는 2+ 착화합물로부터 실시한다.

도 10에 도시한 바와 같이, >123mM에서 10 NaCl 농도는 킬레이트 전환비율에 별다른 영향을 주지 않는다. 하지만, 60 mM NaCl에서 킬레이트 전환의 정도는 완전하지 않다. 이는 다른 이온, 특히 음이온이 킬레이트 전환비율에 일정한 역할을 수행한다는 것을 시사한다.

이들 결과는 25 kDa O,O-Pt 킬레이트(0.8-1.0 μ M Pt)와 25 kDa N,O-Pt 킬레이트(3.4 μ M Pt)에 대한 IC₅₀ 수치, 시스플라틴(0.5 μ M Pt)에 대한 IC₅₀ 수치, 카르보플라틴(2.4 μ M Pt)에 대한 IC₅₀ 수치가 동일 저-마이크로몰 농도 범위에 존재한다는 것을 시사한다. 이는 이들 약물 모두 시험관내 분석에서, B16F10 흑색종 세포의 증식을 저해하는 유사한 세포독성 잠재력을 보인다는 것을 예증한다. 상기 분석은 이런 세포독성 잠재력이 유지된다는 것을 추가로 예증하는데, 그 이유는 중합체의 분자량이 실질적으로 증가하고 45 kDa O,O-Pt 킬레이트(1.0 μ M)와 90 kDa O,O-Pt 킬레이트(0.9 μ M)의 IC₅₀ 수치가 모두 낮은 범위에 존재하기 때문이다. 따라서, 더 높은 분자량의 N,O-Pt 킬레이트 유사체는 이들의 높은 시험관내 세포독성을 계속 보유할 것으로 예상된다. 대조적으로, 상기 분석은 비-백금 고분자량 중합체의 세포독성이 매우 낮다는 것을 보여준다(대조군 수치와의 비교에서). 이들 데이터는 생체내 평가에 앞서 높은 세포독성 잠재력을 계속 보유하는 새로 합성된 유사체를 기계적으로 스크린하는 시험관내 시스템의 유용성을 뒷받침한다.

본 발명의 적절한 구체예에서, 분자량에서 광범위하게 분포하는 치환된 HPMA 케리어에 대한 백금의 결합은 대표적인 포유동물 종양 세포 시스템에서 통상적인 항종양 백금 약물이 보유하는 것과 동일한 또는 그 이상의 실질적인 세포독성을 이들 케리어에 공여한다(표 3). 대조적으로, 분자량에서 광범위하게 분포하는 치환된 HPMA 케리어는 이런 세포독성이 없을 수도 있다(표 3). 본 발명의 적절한 측면에서, 이런 세포독성은 광범위한 분자량을 보유하는 상기 치환된 HPMA 케리어에 부착된 O,O-,N,O-, DACH-결합된 백금 성분을 부분적으로 포함하는 다양한 백금 착화합물에 의해 공여된다.

본 발명의 적절한 구체예에서, 대표적인 O,O-Pt 킬레이트에서 적절한 N,O-Pt 킬레이트로의 전환은 상기 N,O-Pt 킬레이트에 내성의 현저한 증가를 공여하고, 따라서 현저하게 높은 약량의 치료요법적 항종양 백금 성분의 전신 투여를 가능하게 한다(표 4).

본 발명의 적절한 구체예에서, 통상적인 약물(3 mg/kg 시스플라틴)과 비교하여 현저하게 유리한 치료요법적 지수는 대표적인 백금 착화합물을 중합성 담체(17.5 mg Pt/kg로 투여되는 실질적으로 낮은 전신 독성의 N,O-Pt 착화합물)에 결합시켜 달성하는데, 여기서 양 치료 섭생은 식염수 대조군의 성장과 비하여 동일한 정도의 종양 성장 감소를 제공한다(도 12).

도 13에 도시된 결과는 본 발명의 적절한 측면을 예증하는데, 여기서 항종양 활성은 중합성 담체에 결합된 치료요법적 백금 착화합물에 기인하는 것으로 생각된다. 이런 실례는 대표적인 O,O-Pt 킬레이트의 활성이 식염수 대조군의 종양 성장에 비하여 종양 성장 저해를 결과한다는 것을 예증한다. 상기 O,O-Pt 킬레이트에 의해 제공되는 성장 저해는 통상적인 시스플라틴 요법에 비하여 현저하게 낮다. 도 12에서 예증한 바와 같이 N,O-Pt 킬레이트에 의해 제공되는 좀더 유리한 종양 성장 저해 활성에서 판단해 볼 때, O,O-Pt 킬레이트에 비하여 N,O-Pt 킬레이트의 활성이 예상치 못하게 높다는 것을 알 수 있다.

본 발명의 적절한 구체예에서, 통상적인 백금 약물(시스플라틴)에 비하여 종양 성장 저해 활성에서 강하고 예상치 못한 치료요법적 이점은 N,O-Pt 킬레이트에 의해 공여되는데, 이들 둘 모두 x 5 (qd x 5) 섭생의 일일 최대 허용 약량으로 투여하였다(도 14).

본 발명의 적절한 구체예에서, 상기 N,O-Pt 킬레이트는 전술한 실질적으로 상이한 B16 흑색종 모델(도 12-15)에 비하여 사람 각화성 세포 이종이식편(도 15)에 광범위하고 예상치 못한 범위의 종양 성장 저해 활성을 공여하는 것으로 밝혀졌다. 상기 대표적인 사람 이종이식편 모델에서, 상기 N,O-Pt 킬레이트는 등장성 글루코스 대조군의 종양 성장에 비하여 통상적인 백금 약물(카르보플라틴)에 의해 제공되는 강한 활성과 대등한 65 또는 400 mg Pt/kg의 활성을 제공한다. 본 발명의 다른 적절한 구체예에서, 65 mg Pt/kg 약량의 카르보플라틴 투여 또는 400 mg Pt/kg 약량의 N,O-Pt 킬레이트 투여에 기인한 독성에 비하여 실질적으로 적은 전신 독성이 65 mg Pt/kg 약량의 N,O-Pt 킬레이트에서 관찰된다.

용어의 정의

'정제된'은 $\geq 95\%$ 백금이 화학적 형태로 존재하고 다른 원치않는 물질, 예를 들면 시약, 백금을 제외한 금속 킬레이트, 부산물, 염, 유리 리간드 및/또는 분해 산물이 전체의 1%(wt/wt)이하이고, 임의의 이런 불순물이 0.5% 이하로 존재하는 임의의 착화합물을 의미한다. 암 치료의 목적으로 동물 또는 사람 개체에 투여되는 정제된 백금 착화합물은 승인된 제약학적 부형제 및 상기 정제된 백금 착화합물의 제약학적으로 수용가능한 제형을 제공하는데 일반적으로 안전하다고 간주되는 물질로 만들 수 있다.

치료요법적 효과량은 암을 감소시키는 양이다. 이는 1mg/kg 내지 1gm/kg일 것으로 예상된다.

아크릴아미드 중합체에는 폴리아크릴아미드와 폴리메타아크릴아미드가 포함된다.

'착화합물'는 중심 금속 원자가 리간드에 의해 둘러싸인 종을 의미한다.

킬레이트는 착화합물의 금속 원자와 고리를 형성하는 리간드를 의미한다.

'암민'은 NH_3 을 의미하고, 반면 '아민'은 지방족, 방향족 및/또는 헤테로고리에서 NH_2 , 일차 아민, 이차 아민, 삼차 아민을 포함한다.

'Ama'는 전후 관계에 따라 아미노말로네이트 또는 아미도말로네이트를 의미한다. '아미도말로네이트'는 2-아미노말론산의 아마이드를 의미한다. 이는 산 또는 염 형태로 존재할 수 있다.

종양에 대하여 본 발명의 착화합물을 '표적화시키는데 유용한' 작용기는 다른 조직보다 종양에 활성 약물을 좀더 많이 전달하는 작용기다. 이런 표적화에는 EPR 효과에 의해 달성되는 수동 표적화 및 항체, 렉틴, 엽산등에 대한 공액체에 의해 나타나는 활성 표적화가 포함된다.

'중합체-결합된 N,O-아미도말로네이트-디아민백금(II) 착화합물은 중합체에 공유결합되는 본 발명의 착화합물을 의미한다. 청구항 4의 '양이온'은 H^+ , 알칼리, 알칼리 토류, 암모늄 양이온을 의미한다. '아미노산'에는 천연과 합성 알파 아미노산 및 베타 알라닌, 4-아미노부틸산, 6-아미노카프록산, p-아미노벤조산등과 같은 아미노산이 포함된다.

'인접 단부'는 중합체 골격 인근에 결합하지 않는 올리고펩티드 링커의 단부를 의미한다.

엽산 유도체는 엽산 및 다른 관심있는 분자, 예를 들면 본 발명의 착화합물의 공액체다. 엽산염 유사체는 엽산염과 화학적으로 매우 유사한 부류, 예를 들면 메토티렉세이트, 아메토프테린, 프테린 카르복실레이트의 일부분이다.

'폴리사카라이드의 측쇄'는 아미도말로네이트를 형성하는데 유용한 작용기 또는 아미도말로네이트에 대한 링크의 일부를 의미한다. 아미도말로네이트에 부착하는데 사용되는 카르복실레이트, 아민, 하이드록시기는 당업자에게 자명하다. 하나 또는 복수의 백금 착화합물은 측쇄를 통하여 각 폴리사카라이드에 결합시킬 수 있다.

'폴리(Glu)-Ama-diEt'는 카르복실 측쇄의 일부(즉, 15%)만 Ama-diEt 작용기에 의해 치환되는 중합체를 의미한다. 유사하게, 폴리(Glu)-Ama= $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2$ 는 O,O- 또는 N,O-아미도말로네이트 백금 킬레이트를 의미하는데, 여기서 모든 또는 대부분의 Ama 작용기는 시스-디아민백금(II)에 통합된다.

'폴리(Glu-Ama-diEt)'는 모든 카르복실 측쇄가 Ama-diEt 작용기로 치환된 중합체를 의미한다. '폴리(Glu-Ama)= $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2$ '는 O,O- 또는 N,O-아미도말로네이트 백금 킬레이트를 의미하는데, 여기서 Ama 작용기의 일부(즉, 10%)만 시스-디아민백금(II) 종에 통합된다.

약어

Ama, 아미노말로네이트 또는 아미도말로네이트;

Ama-diEt 디에틸아미노말로네이트 또는 디에틸아미도말로네이트;

AP5280 폴리(HPMA)-GFLG-Ama=Pt(NH₃)₂N.O-킬레이트 25 kDa 물질;
DACH 디아미노사이클로헥산;
DCC 디사이클로헥실카르보디이미드;
DMAP N,N-디메틸아미노피리딘;
DMF 디메틸포름아미드;
EDC 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드;
FID 자유 유도 붕괴;
HOBt 하이드록시벤조트리아졸;
HPA (2-하이드록시프로필아민);
MA 메트아크로일;
MTD 최대 내성 약량;
N,O-Pt 아미도, 카르복시 킬레이트;
O,O-Pt 디카르복시 킬레이트;
ONp p-니트로페놀 에스테르;
폴리(HPMA)-GFLG HPMA 및 Gly-Phe-Leu-Gly 메트아크릴아미드의 공중합체
RCF 상대적 원심력
TFF 직류 여과;

재료 및 방법

I. 화학제품

시스플라틴, 피리딘, 에탄올, 에틸 아세테이트, 디에틸 에테르, 디에틸아민말로네이트 HCl 염, 디에틸 N-아세트아미도말로네이트, AgNO₃, NaOH, 1R,2R-디아민사이클로헥산, 폴리글루타메이트-Na염, KI, PBS 혼합물은 Sigma-Aldrich USA에서 제공한다. 용매는 HPLC 등급이고, 시약은 ACS 등급 또는 그 이상이다. 이온 교환 수지 AG501-X8(D)H⁺, HO-형, AG50W-X8 H⁺, Chelex 100 Biotech 등급은 Bio-Rad Laboratories에서 제공한다. 1급수는 a Milli-Q water system에서 제공한다. K₂PtCl₄는 All-Chemie Ltd., Mt Pleasant, SC에서 제공한다. 필터-에드 289 펌프는 Schleicher and Schuell에서 공급한다. 폴리(HPMA)-GFLG-ONp, poly(HPMA)-GFLG-Ama-diEt 45 kDa와 폴리(HPMA)-GFLG-Ama-diEt, 351 kDa는 Polymer Laboratories, Shropshire, UK에서 합성한다. 아미노산 분석 및 MALDI-TOF-MS는 Peptide Technologies Corp. Gaithersburg, MD에서 실시한다.

II 도구 및 장치

크기에 따라 0.2μm 멸균 여과는 25mm Whatman GD/XPVDF 시린지 필터, GP Express 막을 보유하는 Steritop 미디어 병 필터(Millipore), 또는 PVDF 막을 보유하는 Millipak 인라인 필터(Millipore)로 실시한다. 멸균 작업에 UV광이 달린 무균제조대를 사용한다. pH는 Beckman Phi-34pH 미터로 측정하는데, 겔 전극은 4와 10에서 눈금을 정한다. 동결건조된

고체에서 정전압은 정전용량 미터(SIMCO, Hatfield, PA)에 의해 가이드되는 Zerostat gun(Aldrich)으로 중화시킨다. 백금은 샘플에서 Jobin YvonJY24 분광계를 이용한 ICO-OES로 분석하고, 기준은 3% HNO_3 에서 30-60 ppm으로 희석한다. 물은 Aquastar C2000(EM Science)을 이용한 Karl Fisher 적정으로 결정한다. Na, Cl, P의 원소 분석은 Desert Analytics, Tucson, AZ로 실시한다. ^1H NMR 스펙트럼은 400 MHz Unity/Inova 시스템(Varian, Inc)에서 얻는다. ^{195}Pt NMR 스펙트럼은 300MHz Mercury 시스템(Varian)에서 얻는다. 동결건조는 Freezemobile 12EL(Virtus)에서 실시한다.

II. 퍼센트 O,O-와 N,O-킬레이트의 분취물 정제

반응 혼합물의 분취물에서 O,O-와 N,O-킬레이트의 퍼센트는 ^{195}Pt NMR 분광광도법만 실시되는 경우 100mg 또는 Pt%와 수분%를 측정하는 경우 200mg의 반응 혼합물(농도에 따라 4-15 ml)을 옮겨 측정한다. 분취물은 5 kDa Biomax 막을 보유하는 Centricon Plus20 원심분리 필터(Millipore)를 이용한 한외여과로 정제한다. 채워진 용기는 대략 <0.5ml가 남아있을 때까지 권고 RCF에서 회전시킨다. 분취물의 보고 시점은 첫 원심분리가 시작되는 시점이다. 여과액은 버리고, 농축액은 15-18ml 물로 희석하고, 샘플은 전술한 바와 같이 원심분리한다. 이는 한번 더 반복하고, 농축액은 동결건조시켜 분석용 샘플을 제공한다. 이런 기술은 아마도말로네이트기를 갖는 중합체를 함유하는 0.1-2g 반응물의 정제에도 사용한다.

III. PBS로부터 백금 방출

시간에 따라 방출되는 소형 백금 종의 퍼센트는 정확하게 칭량하고 15ml 인산염 완충 식염수(10mM 인산염, 123 mM Cl^-)에서 30mg 중합체 백금 공액체를 용해시키고 37°C 수조에서 배양시켜 측정한다. 지정된 시점에서, 2.0ml 분취물은 3 kDa 분자량 컷오프를 갖는 원심분리 필터(Centricon YM-3, Millipore)로 옮기고, >1.5ml 여과액이 모아질 때까지 회전시킨다. 이 시점의 여과액과 원용액은 ICP-OES로 백금에 대하여 분석한다. 이 시점에서 소형 Pt 종의 퍼센트는 다음의 공식으로 계산한다:(여과액에서 ppm pt/원액에서 ppm Pt) * 100.

IV. 크기 배제 크로마토그래피

N,O-Pt 킬레이트는 35°C 칼럼 오븐에 2개의 PLAquagel-OH Mixed 8 μm 칼럼(Polymer Labs)이 장착된 HPLC 장치 및 RI 검출기로 구성되는 SEC 시스템에서 분석한다. MeOH/ H_2O 와 10.0mM LiClO_4 의 35/36 혼합물로 구성되는 이동상은 1.0ml/min 유속으로 펌프한다. 각각의 분석에는 30분이 소요된다. 칼럼은 PEO/PEG 기준으로 눈금을 설정하고, 결과는 상호 유지 시간의 함수로 $\log(M_p)$ 의 4차 다항식에 적합시킨다. M_w 과 M_n 의 수치는 이동상에 용해된 100 μl 2mg/ml 샘플의 3회 측정의 평균을 나타낸다. O,O-Pt 킬레이트와 폴리(HPMA)-GFLG-Ama-diEt는 Mendichi et al. 1996의 방법에 따라 분석한다.

V. 직류 여과

2g이상 크기의 O,O-Pt와 N,O-Pt 중합체 킬레이트는 5kD 분자량 컷오프를 갖는 Biomax 폴리에테르설폰로 만들어진 0.05 -0.1 m² 면적의 막을 이용한 직류 여과(TFF)로 정제한다. 여과에 앞서, 시스템은 권고 유속에서 30-60분동안 0.1N NaOH를 펌프하여 청소한다. 부식물은 제거하고, 신선한 1급수(Milli-Q water)는 농축액과 투과액의 pH가 중화(pH<8)될 때까지 순환시킨다. 투과액 유속은 2.0 bar의 유입 압력과 0.35 bar 유출 압력에서 측정한다. 신선한 1급수(Milli-Q system)는 보충수로 사용한다.

VI. NMR 분광광도법

^{195}Pt NMR 스펙트럼은 Bancroft et al. 1990의 방법에 따라 5mm 튜브에서 93/7 $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 에 녹인 0.70ml 여과 용액으로부터 얻는다. 각 샘플(80-120mg)을 사용하여, 백금에서 대략 $\geq 50\text{mM}$ 용액을 얻는다. 각 샘플에 대하여 프로브를 조율한다. 90도의 펄스 폭, 5.12 msec의 입수시간, 100kHz의 스펙트럼 윈도우, 지연시간 없음을 이용한다. 전달장치는 -1896 ppm에서 O,O-와 N,O-킬레이트의 중간에 위치시킨다. 50,000 내지 250,000 과도전류(20-90분)는 일반적으로, >35/1의 충분한 s/n 비율을 얻는데 필요하다. 생성된 FID는 기저수준을 얻을 때까지 점진적으로 좌측으로 이동시키고, 100 Hz 라인 확장을 적용하고, 조작에 앞서 2048의 Fourier 필을 적용한다. 내부 영역을 설정하고, 스펙트럼의 기저수준은

VNMR 소프트웨어 v6.1에 의한 스펙트럼 피크 처리한다. 샘플은 -1624 ppm에서 95/5H₂O/D₂O에 녹인 K₂PtCl₄, 100mM HCl의 100 mM 샘플을 외적 참조한다. 이는 90도 펄스 폭과 T1를 측정하는데 사용한다. 90도 펄스, 2T1의 입수시간, 3T1의 지연시간, 128 과도전류는 'gestn' 커맨드에서 표준 샘플에 대하여 >30/1의 s/n을 제공한다.

¹⁹⁵PtNMR에 사용된 동일 샘플에 ¹³CNMR 스펙트럼이 필요하다. 0.50sec의 입수시간, 3.0sec의 지연시간, 대략 70도 펄스 폭, 5000-10000 과도전류가 이용되고 3.5Hz 확장이 적용된다. >100의 s/n이 일반적으로 얻어진다. 수용성 샘플은 67.19 ppm에서, 93/7/D₂O에 녹인 1,4-디옥산을 외적 참조한다. 다른 샘플은 용매 피크를 참조한다.

¹H NMR 스펙트럼은 TMS 또는 TMSP를 참조하고 표준 파라미터로 얻는다. HOD 시그널의 전포화(presaturation)

를 때때로 사용한다. 결합상수(J)는 Hertz로 표시한다.

실시예

실시예 1

폴리(HPMA)-GFLG-Ama-diEt(약 25kDa)의 제조

교반 막대를 담고있는 오븐에서 건조된 1ℓ 밀둥근 플라스크에 격막을 끼우고, 진공하에 냉각시킨다. 일단 냉각된 질소를 넣고, 격막을 제거한 후에, 디에틸아미노말로네이트 HCl염 29.79g(140.8mmol)을 첨가하였다. 격막을 다시 끼우고, 800 ml 무수 피리딘을 플라스크로 캐놀러를 통하여 넣는다. 용해 후에, 폴리(PHMA)-GFLG-ONp(화합물 I, 도 1A, 미국 특허 5,965,118) 50g의 1/3을 첨가한다. 거의 용해된 후에, 나머지 50g ONp-p고분자를 상기에서 설명하는 것과 같이 첨가한다. 이과정은 50g ONp-고분자가 모두 첨가될 때까지 반복한다.

반응 정도는 C18 컬럼, UV 감지기-316nm, pH=4.5/MeCN 이동상을 이용하여 자유 및 총 p-니트로페놀에 대해 HPLC 검사를 통하여 모니터한다. 염기 가수분해(pH=12, 5분간)한 후에, 자유 ONp 및 전체 ONp를 분석한다. 20-24시간 후에 (23℃에서 교반을 하면서), 반응이 완료되었다는 것을 알 수 있다(도면 6 참고).

반응 혼합물은 3시간 동안 수조에서 40-45 ℃로 가열시키고, 실온으로 냉각시킨 후에, 피리딘은 40 ℃ 이하의 온도에서 진공상태에서 제거한다. 잔류물은 절대 EtOH에서 용해시켜, 25%wt/vol 용액을 얻는다. 정제안된 생성물은 2.5ℓ 무수 EtOAc, 0.5ℓ 디에틸 에테르로 침전시킨다. 혼합물을 3~5시간 동안 교반시키고, 매체 유리질을 통하여 여과시킨다. 잔류물을 100ml이상의 에테르를 이용하여 3회 세척하고, 고무 드럼하에서 건조시켜, 얻은 황색 고체 59g을 얻는다. 이 고체는 500ml EtOH 및 3.1g AG 501-X8(D)EtOAc에 용해시킨다(Pinciroli, et al. 1997). 아미노산 분석(gly: HPA :leu :phe의 몰비는 3.1:7.1:1.0:1.2이다; ¹H NMR (D₂O)δ7.2-7.4 (br s, 5 ArH), 4.66(br s, 1, α-H-phe), 4.31(br s, 5, α-H-leu, & OCH₂CH₃), 4.1-3.8(tall s and shortm, ~13, -NHCH₂CH(OH)CH₃ and -NHCH₂CO₂-) 3.3-2.9(m, -NHCH₂CH(OH)CH₃ and phe-CH₂), 2.25-1.2(m, 고분자 기본구조의 -CH₂-, leu의 CH₂ & CH), 1.20(br s, ~31, -NHCH₂CH(OH)CH₃, -OCH₂CH₃), 0.99(s, 고분자 기본 구조의 CH₃), 0.93, 0.87 (sh and s, 6, leu-CH₃).

실시예 2

cis-디아민디아쿠아플라티늄(II) 디니트레이트의 제조

호일로 덮은 매체 병에 시스플라틴(8.996g, 29.98mmol), AgNO₃(9.959g, 58.62mmol), 5 % HNO₃ 3~5방울, 190ml 물을 넣고, 약 23℃에서 하룻밤동안 교반시키고, 3.5간 동안 60-65℃으로 가열하였다. 실온으로 냉각 후에, 혼합물을 0.22 μm 필터를 통하여 여과시켰다. pH는 약 2가 된다. Pt 및 Ag 분석(ICP-OES)에서 일반적으로 15,000-25,000ppm의 Pt와 4-14ppm의 Ag를 포함하는 것으로 나타났다. 각 조제물은 Pt에 대해 분석하고, 사용하기 전에 5분간 55℃로 가열시키고, 실온으로 냉각시킨다.

cis-디아민디아쿠아플라티늄(II) 디니트레이트의 di-¹⁵N 동위원소 고분자 제조에서는 -1582ppm에서 ¹⁹⁵PtNMR 트리플렛이 나타나는데, 이는 Apleton et al. 1989에서 보고한 -1580ppm의 값과 상당히 일치한다.

실시예 3

폴리(PHMA)-GFLG-Ama= $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2 \text{O}$, O-킬레이트의 제조

1. 폴리(HPMA)-GFLG-Ama-diEt의 가수분해

교반 막대를 포함하고 있는 1ℓ 매체 병에, 폴리(HPMA)-GFLG-Ama-diEt 45g(19.35 mmol Ama-diEt 잔류물)을 물 200 ml에 첨가하였다. 활발하게 교반시킨 후에, 135ml 물을 첨가하여, 12-13%(wt/v) 혼합물을 얻는다. 1~2시간 동안 용해시에, 27ml(54mmol) 2N NaOH를 첨가하여, pH를 12.5-12.7로 상승시킨다. pH는 이 범위에서 30분간 유지시키고, 45g AG 501-X8(D)IX 수지(H^+ , OH^-)를 첨가한다. pH가 $\text{H} < 7$ 인 경우에, 멸균 여과를 이용하여 수지를 제거한다. 여과물의 pH는 2N NaOH를 이용하여 7.6으로 상승시켜, 폴리(HPMA)-GFLG-Ama- $(\text{CO}_2^- \text{NA}^+)$ 용액을 제공한다.

2. 폴리(HPMA)-GFLG-Ama= $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2$, O,O-킬레이트 제조

실시예 3의 폴리(HPMA)-GFLG-Ama- $(\text{CO}_2^- \text{NA}^+)_2$ pH 7.6 용액에 실시예 2에 따라 준비한 $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} 2\text{NO}_3^-$ 590.9mM (22,940 ppm Pt) 용액 199ml을 일부 첨가하여, pH 5.0 ± 0.1 인 반응 혼합물을 얻는다. 하룻밤 동안 교반을 하면서 pH는 약 4.2로 떨어지고, 소량의 침전물이 형성된다. 16-18시간 후에, 17g Chelex 100 수지를 첨가하고, 1.5시간 동안 교반시킨다. 여과하기 전에 0.5g 필터 aid pulp를 첨가시켜 분산시킨다. 혼합물은 성긴 유리질을 통하여 여과시킨다. 약 125mg을 포함하는 여과물을 빼내어, 0.2um 막을 통하여 여과시키고, 원심분리성 한외여과를 이용하여 정제한다. 보유물을 동결건조시켜, 약 110mg을 얻는다. 또는 반응 혼합물을 실시예 4에서 설명하는 것과 같이 TFF를 이용하여 정제할 수 있다. ^1H NMR(D_2O) δ 7.6 및 7.55(br s, exchanges, NH), 7.4 and 7.3(br s, 5, ArH), 5.9 (brs, partially exchanges, 0.2, NH-Ama) 4.65(br s, 1, α -H-phe), 4.37(br s, 1, α -H-leu), 4.05(sh, NH_3 or CH_2 of gly), 4.1-3.8 (tall s and short m, ~ 13 , $-\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{NHCH}_2\text{CO}_2^-$) 3.35-2.9(br m, $-\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ and phe- CH_2), 2.25-1.2 (m, 고분자 기본 구조의 $-\text{CH}_2$, CH_2 & CH of leu), 1.20 and 1.19 (s, ~ 27 , $-\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$), 0.99 (s, 고분자 기본 구조의 CH_3 -), 0.9 (sh, 6, leu- CH_3); ^{13}C NMR (93/7 $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$) δ 180.1, 179.8, 179.6, 175.0, 174.2, 173.3, 171.5, 171.1, 170.7, 136.6, 129.8, 129.4, 127.8, 66.5, 66.3, 59.6, 55.6, 54.7, 53.0, 47.9, 46.0, 45.6, 43.1, 40.5, 37.8, 24.9, 23.1, 21.6; ^{195}Pt NMR(93/7 $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$) δ -1587, -1733, -2020, -2056 -지역 비율은 각각 1:38:1:4, 분석에 따르면 약 9% Pt, 5-10% 물, 0.02% Na를 포함하는 것을 알 수 있다.

실시예 4

폴리(HPMA)-GFLG-Ama= $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2$, N,O-킬레이트(AP5280)의 제조

1. O,O-킬레이트에서 N,O-킬레이트로 전환

실시예 3의 Chelex 100 수지로 여과시킨 후에, 약 1ℓ 여과물을 얻고, 용액은 5.85g(100mmol) NaCl, 16.35g(61mmol) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.93g(14mmol) NaH_2PO_4 를 첨가하여, NaCl에서 100mM, 인산염(pH=7.4)에서 75mM가 되도록 만든다. pH는 1N NaOH 또는 5% HNO_3 를 이용하여 7.4로 조정한다. 용액을 여과시키고, 동일한 농도의 완충액을 이용하여 멸균 0.22 μm 막을 통하여 씻어내어 멸균 매체 병으로 넣으면, 1.2ℓ 용액을 얻고, 0.22 μm 멤브레인 스쿠르 뚜껑으로 덮는다. 이 용액을 수조에서 37~38 $^\circ\text{C}$ 로 데워서, 22시간 동안 37 $^\circ\text{C}$ 의 오븐에 둔다. 이때, 한외여과에 의해 정제된 용액 방울의 ^{195}Pt NMR에서 플라티늄 킬레이트에서 N,O 킬레이트가 $\geq 95\%$ 이고, O,O-킬레이트가 $< 5\%$ 정도가 된다는 것을 알 수 있다.

2. N, O-킬레이트의 TFF 정제와 동결건조

상기에서 N,O-킬레이트 1.2ℓ를 방법 단락에서 설명하는 것과 같은 TFF를 이용하여 정제하였다. 보유물, 맑은 길은 적색 용액은 멸균 여과시키고, 동결건조시켜, 41.4g(92%)의 적갈색 고체를 얻는다; %Pt=7.9 \pm 0.15%, 5.6%, 1.07%Na,

<.05%P, 0.07%C1; ^1H NMR(D_2O) δ 7.4 and 7.3 (br s, 5, ArH), 5.23 (br s, partially exchanged, CH of Ama), 4.65 (br s, 1, α -H-phe), 4.37 (br s, 1, α -H-leu), 4.05 (sh, NH_3 or CH_2 of gly), 4.1-3.8 (tall s and short m, ~ 13 , - $\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, - NHCH_2CO_2 -) 3.35-2.9(m, - $\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ and phe- CH_2), 2.25-1.2 (m, 고분자 기본구조의 - CH_2 , leu의 CH_2 &CH), 1.20 and 1.19(s, ~ 27 , - $\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$), 0.99 (s, 고분자 기본구조의 CH_3), 0.93 and 0.87 (sh and s, 6, leu- CH_3); ^{13}C NMR (93/7 $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$) δ 186.5, 185.0, 180.1, 179.9, 179.6, 176.3, 175.2, 175.0, 174.6, 174.4, 174.0, 173.9, 173.2, 171.4, 171.0, 136.6, 129.8, 129.4, 127.8, 71.0, 66.5, 66.3, 55.6, 54.7, 52.8, 47.9, 46.0, 45.6, 41.8, 40.5, 37.9, 24.8, 23.1, 21.5, 20.9, 20.7, 18.7, 17.3; ^{195}Pt NMR (93/7 $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, 64.4MHz) δ -1733 (v br s, O, O- chelate), -2056 (s, N, O-chelate), O, O에 대한 N, O의 비율은 <5: >95이다; SEC M_p =24.5, M_w =24.3 kDa, M_n =15.7 kDa, and M_w/M_n =1.55; PBS 37°C에서 Pt 방출은 3시간 경에는 0.6%, 24시간 경에는 2.0%).

실시예 5

O,O-킬레이트의 형성

실시예 3의 플라티늄화 반응 동안에 주로 형성되는 O,O-Pt 킬레이트 형성에 대해 상기에서 설명하는 aliquote 정제과정 및 ^{195}Pt NMR 스펙트로스코피를 이용하여 연구하였다. 이와 같은 방식으로 연구된 한 연구에서 얻은 데이터 플롯을 도 8에 나타내었다. 지정한 바와 같이, 반응은 1시간경에 최대 90%의 O,O-킬레이트와 신속하게 진행된다. 반응이 진행되면, O,O-킬레이트의 양이 감소되고, N,O-킬레이트 양이 증가되어, 20시간 경에는 80% O,O-킬레이트와 20% N,O-킬레이트가 존재하게 된다. 따라서, O,O-킬레이트 물질이 필요할 경우에, TFF 정제(실시예 4)는 *cis*-디아민디아쿠아플라티늄(II) 양이온을 첨가한 후 1시간 후에는 시작해야 한다.

실시예 6

실시예 4의 조건하에서 O,O-킬레이트에서 N,O-Pt 킬레이트로의 전환의 시간적 경과

실시예 4에서 설명하는 것과 같은 킬레이트 전환 동안에, 다양한 시간 간격을 두고 한방울씩 취하여 바로 원심분리성 한외여과를 이용하여 정제하고, 동결건조하였다. 연속하여 새로 준비한 93/7 $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 에 용해시키고, ^{195}Pt NMR 스펙트로스코피 분석하였다. 각 시간대에 스펙트럼으로부터 피크 면적 비율을 얻고, 이를 % N,O-킬레이트로 변환시키고, 이를 도 9에서 보는 것과 같이 플롯팅하였다. 한 방울씩 빼낸 조성물은 적어도 24시간 동안은 안정한 상태를 유지하였다.

실시예 7

O,O-킬레이트의 선택적인 형성

아미도팔로네이트 기 당 *cis*-디아민디아쿠아플라티늄(II) 양이온을 다양하게 하여, 선택적으로 O,O-킬레이트를 준비하는 방법을 관찰하였다. 각 반응 A-C는 2.0g 폴리(HPMA)-GFLG-Ama-diEt로 시작하였다. Pt 당량 수를 제외하고는 실시예 3에서 설명하는 과정과 동일하게 진행되었다. 반응 혼합물은 동결건조시키고, 동일한 Sephadex G-10 컬럼(2.5 x 60cm)을 이용하여 SEC로 정제하였다. 표 1에서 볼 수 있는 것과 같이, 사용된 Pt가 1 당량보다 적을 경우에는 2당량이 이용된 경우보다 더 많은 비율의 O,O-킬레이트가 발견되었다.

[표 1]

Ama 기당 Pt 당량을 달리하였을 경우에 O,O-킬레이트 및 N,O 킬레이트 형성비율

반응	Eq Pt/Eq Ama	O,O-킬레이트비율	N,O킬레이트비율	%Pt	% H_2O
A	0.8	97	3	6.1	9.3
B	1.2	90	10	8.4	9.0
C	2.0	68	32	10.4	8.5

실시예 8

O,O-킬레이트에서 N,O-킬레이트로의 전환, pH, 온도 및 완충액의 효과

실시예 3에서 설명하는 조제물에서 분리, 정제(TFF 또는 SEC을 이용한) 주도적인 O,O 킬레이트를 실시예 4에서 이용된 온도, pH 및 완충액을 다양하게 하여 실험하였다. 전형적으로, 10mg/ml 폴리(HPMA)-GFLG-Ama=Pt(NH₃)₂ 대부분, O,O-Pt 킬레이트 농도가 이용되었다. 결과는 표 2에 나타내었다.

[표 2]

실시예 4의 O,O-킬레이트에서 N,O-킬레이트로의 전환 정도에 온도, pH, 및 완충액의 효과 연구

반응	시간	온도	완충액/pH	처리전 킬레이트 비율 %O,O-/%N,O	처리후 킬레이트 비율 %O,O-/%N,O-
D	5h	50℃	H ₂ O only/pH 6-7	78%/22%	~80%/~20%
E	5h	50℃	PBS _a /pH=7.4	78%/22%	0%/100%
F	16h	37℃	PBS/pH=7.4	85%/15%	<10%/>90%
G	16h	37℃	100mM citrate/ pH=5.5	85%/15%	16%/84%
H	1:05h	37℃	10mM phosphate/ pH=7.4	68%/14%	63%/37%

인산 완충염은 10mM 인산염, 100mM NaCl, 2,7mM KCL이다.

실시예 9

O,O-킬레이트에서 N,O-킬레이트로의 전환; Cl⁻ 농도의 효과

O,O-킬레이트에서 N,O-킬레이트 전환상에 다양한 염화 농도의 효과에 대해서 조사하였는데, 그 결과는 도 10에 나타내었다. 약 1g 의 폴리(HPMA)-GFLG-Ama=Pt(NH₃)₂, 주로 O,O-킬레이트 10mg/ml 농도를 10mM 인산염 완충액 (pH=7.4)에 용해시킨 다음, 37℃에 둔다. 1.05시간 후에 10mM Phos를 취하고, 용액의 나머지는 충분한 NaCl을 포함하는 네 개 용기에 분포시킨다(60mM, 123mM, 250mM, 500mM NaCl). 1.5시간 후에(2:35시간-10mM 인산염 완충액에 용해시킨 후), 방울은 원심분리성 한외여과를 이용하여 정제하고, N,O-킬레이트 비율은 ¹⁹⁵Pt NMR 스펙트로스코피를 이용하여 결정하였다.

실시예 10

PBS에서 O,O-킬레이트에서 N,O-킬레이트로의 전환: 다른 음이온의 효과

염화 음이온은 플라티늄(II)에 대해 매우 약하거나 매우 강한 리간드가 아니기 때문에 O,O-킬레이트에서 N,O-Pt 킬레이트 전환상에서 염화물보다 더 강하거나 더 약한 리간드의 효과에 대해 연구되어왔다. 실시예 9에서 이용된 동일한 O,O-킬레이트 10mM 인산염(pH=7.4)을 이용하여 용액(123mM/NaNO₃, NaOA, NaI)을 만든다. 이들 리간드 각각은 플라티늄(II) 종에 대해 매우 약한 리간드, 강한 리간드, 매우 강한 리간드가 된다(Appleton, et al. 1984).

실시예 11

폴리(HPMA)-GFLG-Ama=Pt=DACH, O,O-킬레이트 제조

1. *cis*-다이아쿠아-1R,2R-DACH 플라티늄(II)(*cis*-(H₂O)₂Pt-1R,2R-DACH) 제조

Gandolfi(Gandolfi, et al. 1987) 방법을 이용하여, *cis*-다이아쿠아-1R,2R DACH 플라티늄(II)를 제조한다. 3.65g (8.79mmol)K₂PtCl₄와 37ml 물을 담고있는 125ml Erlenmeyer 플라스크를 따뜻하게 하여, 적갈색 용액을 만든 후에 5.84g (35.2mmol)KI/6ml 물로 된 용액을 첨가하여 짙은 적색 용액을 만든다. 실온으로 냉각시, 0.962g 1R,2R-디아미노사이클로헥산을 첨가하면, 노란색 침전물이 바로 형성된다. 25℃에서 3시간동안 교반을 시킨 후에, 혼합물을 하룻밤동안 4℃에 방치한다. 침전물을 수득하고, 냉각수 또는 EtOH로 씻으면, 4.98g(97%)(*cis*-I₂Pt-1R,2R-DACH)를 얻는다. 그 다음, 1.00g(1.776mmol)(*cis*-I₂Pt-1R,2R-DACH, 0.5989g(3.472mmol)AgNO₃과 물 16ml을 빗을 차단시킨 용기에서 복합시켜, 실온에서 하룻밤동안 교반시키고, 그 다음 3.5시간동안 60-65℃에서 교반시킨다. 실온으로 냉각 시에, 여과를 이용하여, AgCl를 제거하고, 소량의 물을 이용하여 한 번 더 세척한다. 여과물을 ICP-OES로 분석하면, 여과물에는 13,500ppm의 Pt(69.1mM) *cis*-(H₂O)₂Pt-1R,2R-DACH를 포함하고 있다는 것을 확인할 수 있다.

2. 폴리(HPMA)-GFLG-Ama=Pt=DACH, O,O-킬레이트 제조

시발물질인 2.80g의 폴리(HPMA)-GFLG-Ama-diEt(1,232 mmol Ama-diEt기)를 가수분해하고, 중화시켜, 실시예 3에서 설명하고 있는 것과 같은 pH=7.6인 폴리(HPMA)-GFLG-Ama-(CO₂Na)₂용액을 제공한다. 이 용액에 수용액으로 위에서부터 1.48mmol의 *cis*-(H₂O)₂Pt-1R,2R-DACH 디니트레이트염을 첨가하고, 하룻밤동안 실온에서 교반시켰다. 반응 혼합물에는 0.1g의 filter aid pulp를 첨가한 후에 멸균 필터를 시키면 제거할 수 있는 침전물이 포함되어 있다. 그 다음, 반응의 1/3은 90분간 0.3g Chelex 수지로 처리하였고, 멸균 여과시킨 후에, 상기에서 설명하는 것과 같은 원심분리성 한외여과를 이용하여 정제하였다. 샘플을 동결건조시키면 적갈색 고체 0.71g을 얻을 수 있다; 8.7% Pt, 4.2% H₂O; ¹H NMR(D₂O, 400MHz) 7.7 and 7.6(br s, ~5, NH), 7.4 and 7.3(br s, 5, ArH), 5.86(s, 1.6), 4.65(br s, 1, αH-phe), 4.39(br s, 1, αH-leu), 4.1-3.8(br m, 4, -NHCH₂CO₂-) 3.95(br s, 9, NHCH₂CH(OH)CH₃), 3.35-2.9(m, 20, NHCH₂CH(OH)CH₃ and phe-CH₂), 2.6-2.3(br s, N-CH-DACH), 2.25-1.2m(m, -CH₂- 고분자 기본구조, CH₂ & CH of leu, and DACH), 1.45-0.8(br s and m, ~97, -NHCH₂CH(OH)CH₃, CH₃-고분자 기본구조, leu-CH₃, and DACH); ¹³C NMR(H₂O/D₂O 93/7) δ180.0, 175.2, 174.1, 173.3, 171.8, 170.7, 136.8, 129.9, 129.5, 128.6, 128.0, 66.5, 66.3, 63.4, 55.5, 54.7, 52.8, 47.9, 46.7, 46.0, 45.6, 43.5, 40.5, 37.4, 32.4, 24.8, 23.2, 21.5, 20.9, 20.8, 18.6, 17.6, and 17.2; ¹⁹⁵Pt NMR(H₂O/D₂O 9/7) δca. -1900(v br s, 겨우 인지할 수 있는 수준, O,O-Pt=DACH,-), 37℃ PBS에서의 Pt 유리; 3시간경에 6.0%, 24시간경에 10.9%.

실시예 12

폴리(HPMA)-GFLG-Ama=Pt=DACH, N,O-킬레이트 제조

실시예 11의 반응 혼합물중 나머지 2/3를 90분간 0.6g Chelex 수지와 교반시킨 후에 멸균 여과시킨다. 맑은 용액은 110mM NaCl, 85mM 인산염, pH=7.4에서 만들어진다. 이 용액을 22시간 동안 37-38℃에 유지시키고, 원심분리성 한외여과를 이용하여 정제하고, 동결건조시켜, 적갈색 고체 1.33g을 얻는다; 8.1% Pt, 7.1% H₂O; ¹H NMR(D₂O, 400MHz) 7.4 and 7.3(br s, 5, ArH), 5.17(s, 0.3), 4.65(br s, 1, αH-phe), 4.38(br s, 1, αH-leu), 4.1-3.8(br m, 4, -NHCH₂CO₂-) 3.95(br s, 9, -NHCH₂CH(OH)CH₃), 3.35-2.9(m, 20, NCH₂CH(OH)CH₃ and phe-CH₂), 2.6-2.2(br m, N-CH-DACH), 2.25-1.2(m, -CH₂-, 고분자 기본구조, CH₂, leu의 CH, and DACH), 1.45-0.8(br s and m, ~100, -NHCH₂CH(OH)CH₃, CH₃-, 고분자 기본구조, leu-CH₃, and DACH); ¹³C NMR(H₂O/D₂O 93/7) δ186.8, 185.3, 180.0, 175.1, 174.6, 174.1, 173.5, 171.5, 171.1, 136.7, 129.9, 129.5, 127.9, 70.2, 66.5, 66.3, 64.2, 63.3, 61.0, 55.6, 54.7, 52.9, 47.9, 56.7, 46.0, 45.6, 44.2, 43.3, 41.2, 40.5, 37.9, 32.7, 24.8, 24.6, 23.1, 21.5, 20.9, 20.7, 18.6, 17.3; ¹⁹⁵Pt NMR(H₂O/D₂O 93/7) δ-2293, -1900에서 피크가 없고, 다른 피크도 관찰되지 않음. 37℃ PBS에서의 Pt 유리; 3시간경에 2.0%, 24시간경에 2.1%.

실시예 13**폴리(글루타메이트)-Ama-diEt 제조**

Li(Li et al. 1998) 과정을 채택하여, 폴리글루타메이트의 자유 카르복실레이트의 약 15%를 치환시킨다. 폴리글루타메이트 0.5g(3.29mmol-CO₂ 기), 교반 막대를 포함하는 병에 104mg(0.493mmol) 디에틸아미도말로네이트 HCl 염 salt, 3mg DMAP, 10mL 무수 DMF(HPLC grade, >48 h over 4A sieves)를 건조박스상에서 첨가하고, 교반시켜, 탁한 혼합물을 만든다. 그 다음, 315mg(1.36mmol)DCC를 첨가하고, 병 입구에 격막을 끼워넣고, 2mL 1.0M HCl/에테드를 첨가한 다음, 혼합물은 실온에서 하룻밤동안 교반시킨다. 그 다음, 약 15mL CHCl₃를 첨가하고, 탁한 혼합물을 15분간 3850 RCF에서 원심분리시킨다. 상층액은 버리고, 백색 겔 물질은 30분간 2.5% NaHCO₃으로 교반을 시킨다. 상기에서 설명한 것과 같이 혼합물을 원심분리시키고, 상층액을 동결건조시켜, 1.91g 백색 고체를 제공하는데, 이 고체의 ¹H NMR에서 DMF, EtOH, DCC/DUC 존재하에서, 폴리글루타메이트, 디에틸아미도말로네이트, 디에틸아미노말로네이트 피크를 볼 수 있다 (피크 지역은 4.3ppm지역(glu의 α-CH, -OCH₂CH₃)과 2.4ppm지역(glu의 CH₂)이 1:1로 나타나는데, 폴리글루타메이트에서는 이 피크 지역이 각각 1:2로 나타난다). 이 물질을 물에 용해시켜, 원심분리성 한외여과를 시켜 정제하면, 216mg의 백색 고체를 얻을 수 있는데, 이 고체의 ¹H NMR 스펙트럼에서 DCC/DUC가 존재한다는 것을 알 수 있다. 또한, NaOD를 D₂O용액에 첨가하면, 폴리(glu)-Ama-diEt 당 0.67 mmol Ama-diEt에 반응하는 EtOH를 유리시킨다. 추가 정제과정없이 이 물질을 실시예 14에서 이용하였다.

실시예 14**폴리(글루타메이트)-Ama=Pt(NH₃)₂, O,O-킬레이트 및 N,O-킬레이트****1. 폴리(글루타메이트)Ama=Pt(NH₃)₂ O,O-킬레이트 제조**

교반 막대를 담고있는 20ml 바이알에 담긴 4ml 물에, 실시예 13에서 만든 폴리(glu)-Ama-diET 188mg(0.126mmol Ama-diEt 당량)을 첨가하였다. 일단 용해한 후에, pH를 20분동안 12.4-12.8로 상승시키고, 0.2g AG-50W-X8 H+ IX 수지를 첨가하였다. 2분 이내에, pH를 6으로 떨어뜨린다. 성긴 유리질을 통과키시는 여과를 실시하여 수지를 제거하고, 여과 물은 멸균 여과시킨다. 새로 만든 2N NaOH을 이용하여, 여과물의 pH를 7.1로 상승시키고, 실시예 2에서 준비한 cis-디아민디아쿠아플라티늄(II) 2NO₃⁻ 19,000ppm Pt 용액(0.126mmol) 1.3ml을 첨가하였다. 생성물은 35분간 교반시키고, 상기에서 설명하는 것과 같이 원심분리성 한외여과를 이용하여 정제시킨다. 18ml로 농축시킨 후에, 각 15ml 물로 3회 세척한 후에, 보유물은 동결건조시키면, 182mg 백색 고체가 생성되는데, 이의 ¹⁹⁵Pt NMR 스펙트럼에서는 1:4의 비율의 두 개 피크가 -1595ppm 과 -1732ppm에서 나타난다. -1732ppm에 있는 큰 피크는 cis-디아미네플라티늄(II)의 O,O-아미도말로네이트 킬레이트이다. 추가 정제를 시도하니, cis-디아민 Pt로 인하여, 글루타메이트 카르복실레이트의 가교결합에 의해 아마도 젤라틴성 물질이 형성되어, 이 물질은 실시예 4 및 관련 실시예의 킬레이트 전환 조건을 적용하였다.

2. 폴리(글루타메이트)-Ama=Pt(NH₃)₂ N,O-킬레이트 제조

상기 폴리(글루타메이트)-Ama=Pt(NH₃)₂ O,O-킬레이트는 실시예 4의 O,O-킬레이트에서 N,O-킬레이트로의 전환 조건 하, 110mM NaCl, 85mM 인산염 pH=7.4으로 만든 샘플을 이용하여 만들게 된다. 38℃에서 약 22시간 후에, 원심분리성 한외여과를 이용하여 정제하고, 보유물을 동결건조하면, 백색 고체 163mg을 얻는데, 이 고체에는 1.5% Pt(0.77mmol Pt/g polymer)를 포함한다, 0.035% P; 186.9, 183.6, 182.8, 182.1(p-glu), 180.0, 175.3, 174.2(p-glu), 173.6, 172.5, 171.0, 170.7, 155.7, 72.1, 63.6, 62.7, 60.4, 25.4, 54.2(p-glu), 53.5, 51.6, 34.2(p-glu), 32.1, 31.4, 30.8, 28.6(p-glu), 26.0, 25.2, 25.0; ¹⁹⁵Pt NMR(93/3 H₂O/D₂O) δ 1595(v br s, 22%, NH₃)₂Pt(RCO₂) and (RCO₂, H₂O and/or HO)) and -2053(br s, 78%, 아미도말로네이트의 N,O-킬레이트).

실시예 15**폴리(glu-AmadiEt)의 제조**

Danishfsky(Danishefsky et al. 1971)의 과정을 적용하여 폴리글루타메이트의 모든 카르복실기를 치환하였다. 폴리글루타메이트 0.5g(3.29mmol $-\text{CO}_2\text{Na}$)와 교반 막대를 담고있는 병에 1.39g(6.58mmol) 디에틸아미노말로네이트 HCl 염, 1.89g(9.862mmol) EDC, 0.503g(3.287mmol) HOBt, 20-25ml 무수 DMF(HPLC 등급, >48h over 4A sieves)를 건조 박스상에서 첨가하여 교반한 후에, 탁한 혼합물을 얻는다. 실온에서 하룻밤동안 교반 후에, 혼합물은 150ml 물에 부으면, 백색 고체 침전물을 얻을 수 있다(피크 지역은 4.3ppm지역(glu의 $\alpha\text{-CH}$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$)과 2.4ppm지역(glu의 CH_2)이 1:1로 나타나는데, 폴리글루타메이트에서는 이 피크 지역이 각각 1:2로 나타난다). 이 물질을 물에 용해시키고, 여과시켜 수득한 후에 물로 행군다. 3일간 진공상태에서 건조시킨 후에, 0.79g(84%) 고체 물질을 얻을 수 있다. ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.25(v br s, 1, NH-glu), 7.24(br s, 1, NH-Ama), 5.16(d, 1, $J=5.7$, CH-Ama), 4.22, 4.1(m and br s, OCH_2CH_3 and CH-gly) 2.65, 2.33, 2.18(br s, 4, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-glu}$), 1.26(br t, 6, OCH_2CH_3); ^{13}C NMR(CDCl_3) δ 175.9, 171.9, 166.5, 62.4, 56.8, 56.4, 32.5, 26.3, 1.39.

실시예 16

폴리(glu-Ama)=Pt(NH_3)₂, O,O-Pt 킬레이트 및 N,O-Pt 킬레이트의 제조

약 30ml의 EtOH 슬러리상태의 0.79g(2.75mmol Ama-diEt 기) 폴리(glu-AmadiEt)를 새로 준비한 40mM NaOH와 복합시켰다. pH는 12.3-12.6에서 유지시키고, 혼합물은 데워서 30분간 초음파분쇄시킨다. 혼합물은 약간 흐리게 된다. 18g H^+ IX 수지를 이용하여 pH를 7.26으로 낮추고, 살균 여과시키면 약한 황색을 띤 용액을 얻을 수 있다. 용적은 진공상태에서 약 30ml로 줄이고, cis-디아민디아쿠아플라티늄(II) 디니트레이트 18,400ppm Pt(0.39mmol) 용액 4.2ml를 첨가하여, pH=5.97 용액을 얻고, 이 용액은 5% HNO_3 을 이용하여 pH5.0으로 만든 후에, 실온에서 1시간 동안 교반시킨다.

1. 폴리(glu-Ama)=Pt(NH_3)₂, O,O-Pt 킬레이트

1시간동안 교반시킨 후에, 폴리(glu-Ama)=Pt(NH_3)₂ 반응 혼합물 샘플을 동결건조시키면, 백색 고체 90mg을 얻는데, 이의 ^1H NMR에서 에틸 에스테르의 67%만이 가수분해되었다는 것을 알 수 있다; 10.3% Pt; ^1H NMR(D_2O) δ 5.93(s, 0.1 exchanged, CH-ama), 4.4-4.1(m, 3.4, CH-glu, OCH_2CH_3 , and NH_3 ?), 2.46(br s, 2, CH_2CH_2), 2.07(br s, 2, CH_2CH_2), 1.25(br q, 2, OCH_2OCH_3); ^{13}C NMR($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 93/7) δ 175.1, 170.0, 174.8, 174.5, 173.8, 171.1, 171.0, 170.8, 170.5, 63.6, 60.7, 60.4, 60.0, 53.7, 31.9, 27.8, 14.0; ^{195}Pt NMR($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 93/7) δ -1734(O,O-Pt, 86%), -2034(N,O-Pt, 14%)

2. O,O-Pt 킬레이트에서 N,O-Pt 킬레이트로 전환 및 폴리(glu-Ama)=Pt(NH_3)₂, N,O-Pt 킬레이트 분리

나머지 32ml 폴리(glu-Ama)=Pt(NH_3)₂, O,O-Pt 킬레이트 용액은 207mg NaCl, 76mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 588mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가하여, NaCl, 85mM 인산염에서 110mM으로 만든다. pH는 7.4로 조정하고, 용액은 멸균 여과시키고, 16시간동안 42℃에서 배양시킨다. 용액은 약간 흐리게 되고, 다시 여과시킨 후에, 원심분리성 한외여과으로 정제하였다. 보유물을 동결건조시키면 얻은 황색을 띤 고체 600mg을 얻는다: 11.4% Pt, ^1H NMR(D_2O) δ 5.2(br s, 0.1 exchanged, CH-ama), 4.59(br s, 0.2), 4.4-4.1(m, 2.5, CH-glu, OCH_2CH_3), 4.00, 3.85(br s, 0.25), 2.47(br s, 2, CH_2CH_2), 2.06(br s, 2, CH_2CH_2), 1.25(br q, 2, OCH_2CH_3); ^{13}C NMR($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 93/7) δ 175.1, 174.8, 174.4, 173.7, 171.0, 170.8, 170.5, 63.5, 6.31, 62.7, 53.7, 32.2, 31.8, 27.9, 14.0; ^{195}Pt NMR($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 93/7) δ -1730(O,O-Pt, 8%), -2053(N,O-Pt, 92%).

실시예 17

N-아세타아미도말로네이트=Pt(NH_3)₂ O,O-킬레이트 및 N,O-킬레이트

20ml 바이알에서, 800mg(3.68mmol) N-아세타아미도말로네이트를 8ml 물, 2.0ml 2N NaOH와 함께 교반시킨다. 3분내에, 옅은 황색 용액, pH=12.6을 얻을 수 있다. 30분 후에, H⁺ IX수지를 첨가하고, pH는 7.0으로 떨어뜨린다. 수지를 여과에 의해 제거하고, pH는 7.5로 상승시키고, cis-디아민디아쿠아플라티늄(II) 디니트레이트 28,375ppm Pt(3.63mmol) 용액 25.3ml을 첨가하면 pH는 4.4로 떨어진다. 2N NaOH 2방울을 떨어뜨리면 백색 고체가 형성된다. 혼합물을 여과시키면, 샘플은 10%/D₂O로 만들어지고, 이를 ¹⁹⁵Pt NMR 스펙트로스코피를 이용하여 분석하였다. -1734ppm에서 오직 한 개의 피크만 나타난다.

이 여과물을 KI에서 100mM, KHCO₃에서 50mM로 만든 다음 멸균 살균한다. pH는 7.7-7.9가 된다. 18시간 동안 40℃에 둔다. 형성된 옅은지색 침전물은 여과를 시켜 제거하고, 진공하에서 여과물을 떼어낸다. 잔류물은 1시간 동안 20ml 아세톤으로 교반시킨다. 일부를 여과시켜, 7% D₂O로 만들고, ¹⁹⁵Pt NMR 스펙트로스코피를 이용하여 분석하였다. -2057ppm에서 오직 한 개의 피크만 나타났다.

실시예 18

폴리(HPMA)-GFLG-Ama-diEt(45kDa 및 350kDa) 준비

1. MA-GFLG-Ama-diEt 제조

약 25g의 MA-GFLG-ONp를 1.2당량의 디에틸아미노말로네이트 HCl 염, 3당량의 TEA, 1 당량의 HOBt DMF 용액으로 약 16시간 동안 50℃에서 처리하였다. DMF는 진공하에서 제거하고, 잔류물은 디에틸 에테르로 슬러리화시키고, 하룻밤 동안 4℃로 냉각시킨다. 여과시켜 생성물을 수득하고, 에테르로 행군 후에, 진공하에서 건조시켜, MA-GFLG-Ama-diEt을 얻는데, 이 물질 본성 및 순도는 ¹H NMR 스펙트로스코피 및 HPLC를 이용하여 확인하였다: ¹H NMR(DMSO-d₆) 8.74(d, 1, J=7.3, NH-Ama), 8.14(t, 1, J=5.9, CH₂-gly), 8.11(d, 1, J=8.2, αCH leu), 8.03(t, 1, J=8.2, CH₂ gly), 8.01(d, 1, J=8.2, NH-phe), 7.3-7.0(m, 5, ArH), 5.70(s, 1, =CH₂), 5.37(t, 1, J=1.6, =CH₂), 5.09(d, 1, J=7.3, CH-Ama-diEt), 4.53(m, 1, phe의 αCH), 4.32(m, 4, OCH₂CH₃), 3.9-3.7(m, 3, CH₂-gly), 3.63, 3.599dd, 1, J=16.3, 5.8), 3.1-3.0 and 2.83-2.73(m, 2, CH₂-phe), 2.51(m, 3, J=1.7, CH₃-C=CH₂), 1.59(m, 1, J=6.5, CH₂CH(CH₃)₂), 1.49(t, 2, J=7.5, CH₂CH(CH₃)₂), 1.216, 1.214(two t, 6, J=7.2, OCH₂CH₃), 0.88(d, 3, J=6.6, CH₂CH(CH₃)₂), 0.84(d, 3, J=6.5, CH₂CH(CH₃)₂).

2. 폴리(HPMA)-GFLG-Ama-diEt(약 45kD) 제조

응축기가 장치된 용기에 12.7wt% HPMA, MA-GFLG-Ama-diEt 단량체를 90/10 비율로 각각 채우고, 0.6wt% 순도의 AIBN, 10mol% p-니트로페놀(총 단량체의), 86wt% 아세톤도 채운다. 30분 이상 질소 기포를 이용하여, 혼합물로부터 가스를 빼고, 65시간동안 50℃에서 가열하였다. 고체 생성물, 폴리(HPMA)GFLG-Ama-diEt은 여과를 시켜 수득하고, 에테르로 행군다. 순수 EtOH을 이용하여(약 25%wt/vol) 다시 용해시키고, 그 다음 8배 용적의 EtOAc을 이용하여 침전시킨다. 생성된 고체는 여과를 이용하여 수득하고, 에테르로 씻은 다음, 진공하에서 건조시키면, 약 20g의 회색 고체 분말을 얻는다. 분말의 ¹H NMR 스펙트럼이 25kDa의 스펙트럼과 매우 유사하다는 것을 알 수 있다. Mw=44.5kDa, PDI=1.76, bimodal. 아미노산 분석(μmol/mg 고분자) gly: 2-하이드록시프로필아민: leu :phe는 각각 2.7:8.1:0.9:0.9이 된다.

MALDI-TOF-MS(NBA matrix) m/z M⁺ 40-45kDa, M⁺ 14-16kDa

3. 폴리(HPMA)-GFLG-Ama-diEt(약 350kD)의 제조

45kD 배치의 폴리(HPMA)-GFLG-Ama-diEt를 위한 과정을 반복하나 p-니트로페놀은 생략한다. 약 25g의 백색 분말을 얻을 수 있다. 이의 ¹H NMR 스펙트럼은 25kDa의 것과 매우 유사한데, 피크가 좀 더 넓다는 것이 차이가 있다. Mw=351 Kda, PDI=3.95, trimodal.

실시예 19

폴리(HPMA)-GFLG-Ama-Pt(NH₃)₂, N,O-킬레이트 45kDa

교반 막대를 포함하는 250 미디어 용기에 72ml 물, 폴리(HPMA)-GFLG-Ama-diEt의 15.5g(6.82mmol Ama-diEt-기)를 각각 첨가하였다. 일단 상당한 교반후에, 추가로 48ml 물을 첨가하고, 혼합물은 약 1시간 동안 교반시켜, 옅은 자색 용액을 얻는다. 이 용액에 12ml의 새로 만든 2M NaOH를 첨가하고, pH를 12.6으로 상승시킨다. pH는 30분간 12.4-12.8으로 유지시키고, 그 다음 15.4g의 혼합상 IX 수지(AG 501-X8(D)H⁺, -OH 형)을 첨가하였다. 3분 후에 pH를 5.0으로 떨어뜨리고, Steritop 150ml 멸균 필터를 이용하여 수지를 제거한다. 여과물의 pH는 새로 만든 2N NaOH를 이용하여 7.60으로 올리고, 새로 준비한 디아민-디아쿠아플라티늄(II) 용액 8.14mmol(64ml, 24,200 ppm Pt)을 일부 첨가하였다. 첨가한 후에, pH는 5.1이 되고, 하룻밤동안 교반시킨다. 이후에 pH는 4.42가 되고, 5.10g Chelex 100수지를 첨가하면, pH가 5.33으로 상승되고, 혼합물은 90분간 교반시킨다. 성긴 유리질을 통과시키는 여과를 이용하여 수지를 제거하면, 460ml 용액을 얻을 수 있다. 여과물은 2.96g NaCl, 1.08g NaH₂PO₄H₂O, 7.66g Na₂HPO₄ 7H₂O를 첨가하여, NaCl에서 110mM, 인산염에서 80mM으로 만든다. pH는 2N NaOH 및 5% HNO₃을 이용하여 7.4로 조정하고, Steritop 필터를 통하여 살균 여과시켜, 멸균된 미디어 병으로 넣고, 생물학적으로 안전한 후드내에서 멤브레인 캡을 씌운다. 20분간 39℃ 물에 방치한 후에, 37-38℃의 인큐베이트 오븐에 둔다.

22시간동안 37-38℃에서 용액을 TFF로 정제한다. 용액은 5% wt/vol으로 농축시키면, 7배 용적의 침투물을 수득할 수 있고, 침투물이 약간의 색을 띠게 될 때 보유물을 8-10%로 농축시킨다. 보유물은 Millipak 20 Filter를 통하여 멸균 여과시킨 후에, 멸균된 동결건조 플라스크로 이동시킨다. 동결건조후에, 11.2g(66%) 회색 고체를 얻을 수 있다: 8.89% Pt, 5.4% H₂O, 1.03% Na, 0.05% Cl, <0.005% P; ¹H NMR(D₂O)δ7.4 and 7.3(br s, 5, ArH), 5.23(br s, 부분적으로 교환된, CH of Ama), 4.66(br s, 1, α-H-phe), 4.37(br s, 1, α-H-leu), 4.05(sh, gly의 NH₃ or CH₂), 4.1-3.8(tall s and short m, ~13, -NHCH₂CH(OH)CH₃, -NHCH₂CO₂-) 3.35-2.9(m, 18, -NHCH₂CH(OH)CH₃, phe-CH₂), 2.25-1.2(m, -CH₂- of polymer backbone, CH₂ & CH of leu), 1.20, 1.19(s, ~27, -NHCH₂CH(OH)CH₃), 0.99(s, CH₃-고분자 기본구조), 0.93, 0.87(sh, s, 6, leu-CH₃); ¹³C NMR(H₂O/D₂O 93/7)δ186.7, 71.0, 모든 다른 피크는 실시예 4에서 보고된 내용과 같다; ¹⁹⁶Pt NMR(H₂O/D₂O 93/7)δ-2055(100%)

실시예 20폴리(HPMA)-GFLG-Ama=Pt(NH₃)₂, N,O-킬레이트 (>351 kDa이상)

교반 막대가 있는 500ml 미디어 병에, 120ml 물, 20g(8.80mmol Ama-diEt) 폴리(HPMA)-GFLG-Ama-diEt(351kDa)를 각각 첨가하였다. 일단 활발하게 교반을 한 후에, 100ml 물을 첨가한 다음, 모든 고분자가 용해될 때 까지 혼합물을 2시간 동안 교반시키면 무색 용액이 된다. pH 전극을 삽입시키고, 14ml의 새로 만든 2N NaOH를 첨가한다. pH를 12.74로 올리고, 30분간 pH를 12.4-12.8로 유지시킨다. 이후에, 19.9g 혼합상(H⁺, -OH형) IX 수지(AG501-X8(D))를 첨가시키면, 3분 이내에 pH가 6으로 떨어진다. 혼합물은 Steritop 병-뚜껑 필터를 통하여 멸균 여과시킨 다음 pH를 2N NaOH 및 5% HNO₃을 이용하여 7.63으로 조정한다. 일부에는 새로 준비한 디아민디아쿠아플라티늄(II) 용액의 24,200 ppm Pt 용액 (10.6mmol) 85.8ml을 첨가하여, pH를 5.02으로 만든다. 이 용액은 입자의 크기로 인하여 약간 탁하게 되는데, 실온에서 하룻밤 동안 교반시킨다. 이 과정동안에 pH는 4.25로 떨어지고, 6.77g Chelex 100를 첨가하였다. pH는 5.33로 상승되고, 90분간 교반시킨 후에, 0.2g filter aid pulp를 첨가하였다. 혼합물은 성긴 유리질을 통하여 멸균 여과시킨다. 용액, 725ml는 각각 4.661g(79.8mmol)NaCl, 12.24g(45.7mmol) Na₂HPO₄12H₂O, 1.703g(10.1mmol) NaH₂PO₄1H₂O를 첨가하여, NaCl에서 110mM, 인산염에서 85mM로 만든다. pH는 7.4로 조정하고, 그 다음 Steritop filter를 통과시켜, 1l 미디어 병에 넣는다. 이 병은 멤브레인 캡으로 봉하고, 20분간 40℃ 수조에 두고, 그 다음 37-38℃ 인큐베이트 오븐에 둔다. 약 22시간 후에, 내용물은 상기에서 설명하는 것과 같이 TFF를 이용하여 정제시킨다. NMR 스펙트로스코피는 약 50mg으로 실행하는데, 그 이유는 더 농축시킨 용액은 점성이 너무 크기 때문이다. 보유물을 동결건조시키면 19.9g 백색 고체를 얻을 수 있다; 7.95%Pt, 7.0% H₂O, 1.03% Na, 0.09% Cl, <0.05% P; ¹H NMR(D₂O)δ7.4, 7.3(br s, 5, ArH), 5.23(br s, 부분적으로 교환된, Amad의 CH), 4.65(br s, 1, α-H-phe), 4.38(br s, 1, α-H-leu), 4.05(sh, NH₃ or CH₂ of gly), 4.1-3.8 (tall s and short m, ~13, -NHCH₂CH(OH)CH₃, -NHCH₂CO₂-) 3.35-2.9(m, 18, -NHCH₂CH(OH)CH₃, phe-CH₂), 2.25-1.2(m, 고분자 기본구조의 -CH₂, leu의 CH₂ & CH), 1.20, 1.19(s, ~27, -NHCH₂CH(OH)CH₃), 0.99(s, 고분자 기

본 구조의 CH_3^- , 0.93, 0.87(sh and s, 6, leu- CH_3), ^{13}C NMR($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 93/7) δ 186.7, 71.0, 실시예 4에서 보고된 다른 모든 피크, ^{196}Pt NMR($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 93/7) δ -2055(100%); SEC trimodal, M_p =468kDa, 147kDa M_n =66.3kDa, PDI=13.8; Pt 방출: 3시간경에 0.68%, 24시간 경에 2.28%.

실시예 21

O, O-킬레이트와 N,O-킬레이트의 In vitro 활성

조직 배양물에서 활성의 특징; 다양한 O,O-Pt 킬레이트 유사체의 상대적인 세포 독성 활성은 B16F10 흑색종 세포 조직 배양물을 이용한 클로니-형성 검사를 이용하여 *in vitro*에서 평가하였다. 이와 같은 방법에서, 유사체의 활성은 시스플라틴 및 카르보플라틴의 활성과 비교하였다. N,O-Pt 킬레이트로의 전환 효과도 평가하였다. 간략하게 설명하면, 세포는 배양물 접시에 접종시켜, 부착되도록 한다. 배양물은 시험 물질의 원하는 농도를 포함하고 있는 배지상에서 7일간 배양시킨다. 고정시킨 후에, 50개 이상의 세포를 포함하는 세포 덩어리 수를 콜로니로 기록한다. 시험 물질의 각 농도에서 3회 반복 실시한다. 각 3회 반복 접시에 있는 평균 콜로니의 수를 기준(시험 물질이 없는) 배양 접시에 있는 콜로니 수로 나누면, 시험 물질의 각 농도에서 평균 생존 값을 얻을 수 있다. 각 시험 물질의 각각 IC_{50} (생장을 50% 저해시키는 농도)는 선형 회귀 분석을 이용하여, 50% 생존 점의 상하에 있는 데이터 값을 이용하여 얻을 수 있다.

【표 3】

아미도말로네이트의 O,O-Pt 킬레이트와 N,O-Pt 킬레이트의 콜로니 형성 검사에서 얻은 세포독성결과

킬레이트	IC_{50} 값 (μM)
기준	> 300
p(HPMA)-GFLG-Ama, 90kDa O,O-Na	> 100
p(HPMA)-GFLG-Ama=Pt(NH_3) ₂ , 25kDa N,O-Pt	3.4
p(HPMA)-GFLG-Ama=Pt(NH_3) ₂ , 25kDa N,O-Pt	0.8-1.1
p(HPMA)-GFLG-Ama=Pt(NH_3) ₂ , 45kDa N,O-Pt	1.0
p(HPMA)-GFLG-Ama=Pt(NH_3) ₂ , 90kDa N,O-Pt	0.9
p(HPMA)-GFLG-Ama, 45kDa, O,O-Na	> 100
p(HPMA)-GFLG-Ama=Pt-DACH, 25kDa O,O-Pt	1.0
p(HPMA)-GFLG-Ama=Pt-DACH, 25kDa N,O-Pt	< 4
시스플라틴	0.5
카르보플라틴	2.4

실시예 22

내성 및 최대 내성을 가지는 약량 연구

AP5280(폴리(HPMA)-GFLG-Ama=Pt(NH_3)₂)의 O,O-Pt 킬레이트에 대한 N,O-Pt 킬레이트를 비교하는 단일-약량 IV 연구에서는 쥐에서 최대 내성을 가진 약량(MTD)이 O,O-Pt 킬레이트의 경우에는 80-100mg/kg이고, N,O-Pt 킬레이트의 경우에는 400mg Pt/kg이 되어, 이는 고분자가 결합된 N,O-Pt에 안전성이 증가되었다는 것을 의미한다. 이와 같은 연구를 위해서는 MTD는 약물에 의해 유도되는 독성으로 인하여 생쥐의 죽음을 초래하지 않는 최대 약량으로 정의해야한다.

두가지 킬레이트의 다중 약량에 대한 내성은 표1에 나타내었는데, 내성은 양쪽 킬레이트중 어느 쪽이든 5일간 매일 제공된 B16 흑색종을 가지는 10마리 생쥐의 최대 평균 체중 감소량으로 나타내었다. 이들 데이터에는 O,O-Pt 킬레이트(17.5mg Pt/kg)와 동일한 약량에서 N,O-Pt 킬레이트가 독성이 결여되었다는 것을 나타내고, 실제 증가의 평균 체중 감소를 얻기 위해서는 N,O-Pt 킬레이트의 양이 더 많이 요구된다(>240mg Pt/kg).

[표 4]

폴리(HPMA)-GFLG-Ama= $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2$, O,O-Pt 킬레이트 및 N,O-Pt 킬레이트, 25kDa을 매일 5배 약량으로 제공한 후에 평균 체중 감소를 측정하여 나타난 AP5280의 내성

O,O-Pt 킬레이트		N,O-Pt 킬레이트	
약량 (mg Pt/kg)	체중감소비율	약량 (mg Pt/kg)	체중감소비율
7.5	-10.3	10	+5.6
20	-29.3	20	-2.5
		40	-4.8
		80	-7.7
		200	-19.9
		240	-26.0

실시예 23

s.c. B16 흑색종 모델에서 종양 성장 저해: N,O-Pt 킬레이트

폴리(HPMA)-GFLG-Ama= $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2$, N,O-Pt 킬레이트, 25kDa(N,O-Pt)의 종양 성장 저해를 시스플라틴과 기준 염에 의한 저해와 비교 평가를 암컷 C57BL/6 생쥐에서 실시하였다. N,O-Pt 킬레이트와 시스플라틴의 약량은 qd x 5 과정에서 각각 17.5mgPt/kg 및 3mg/kg이다. N,O-킬레이트 약량은 MTD 보다 조금 적은 양이고, 시스플라틴의 약량은 MTD와 비슷한 양이 된다. 치료 집단은 각 10마리 동물로 구성되는데, 우측 후미 옆구리에 s.c.로 10^6 B16F10 무린 흑색종 세포를 접종시켰다. 이식 후 6일째부터 light Methfurane 마취하에 측정 양각기를 이용하여 종양 크기를 매일 측정하기 시작한다. 생성된 종양의 양(mg)은 공식($W^2 \times L$)/2을 이용하여 계산하는데, 이때 W는 짧은 종양 직경을 나타내고, L은 긴 쪽의 길이(mm)를 나타낸다. 종양이 50mg 또는 그 이상이 되면 각 동물에서 치료를 개시하였다. 각 연구 동물은 개별적으로 실시하는데, 각 동물의 치료 첫날은 종양 크기가 약량 개시일에 상응하는 것으로 한다. 모든 테스트 화합물은 꼬리 정맥을 통하여 IV로 제공되는데, 약 0.2-0.3ml(체중 20g기준)을 투여하였다. 동물은 약량을 확립하기 위해 관찰하여 체중을 재고, 연구가 끝날 때까지 매일 지속한다. 결과는 도 12에 나타내었다.

실시예 24

s.c. B16 흑색종 모델에서 종양 성장 저해: O,O-Pt 킬레이트

폴리(HPMA)-GFLG-Ama= $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2$, O,O-Pt 킬레이트, 25kDa(O,O-Pt)의 종양 성장 저해를 시스플라틴과 기준 염에 의한 저해와 비교 평가를 암컷 C57BL/6 생쥐에서 실시하였다. O,O-Pt 킬레이트와 시스플라틴의 약량은 qd x 5 과정에서 각각 17.5mgPt/kg 및 3mg/kg이다. O,O-킬레이트 약량은 MTD와 비슷하고, 시스플라틴의 약량은 MTD와 비슷하다. 이 연구는 실시예 23에서 설명하는 것과 같이 실행하였고, 그 결과는 도면 13에 나타내었다.

실시예 25

s.c. B16 흑색종 모델에서 종양 성장 저해: N,O-Pt 킬레이트

폴리(HPMA)-GFLG-Ama= $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2$, N,O-Pt 킬레이트, 25kDa(N,O-Pt)의 종양 성장 저해를 카르보플라틴과 기준 염에 의한 저해와 비교 평가를 암컷 C57BL/6 생쥐에서 실시하였다. N,O-Pt 킬레이트와 시스플라틴의 약량은 qd x 5 과정에서 각각 200mgPt/kg 및 65mg/kg이다. N,O-킬레이트 약량은 카르보플라틴의 약량과 같은 MTD와 비슷한 양이 된다. 이 연구는 실시예 25에서 설명하는 것과 같이 실행하였고, 그 결과는 도면 14에 나타내었다.

실시예 26

s.c. 비늘성 세포 이형이식편 모델에서 종양 성장 저해: N,O-Pt 킬레이트

폴리(HPMA)-GFLG-Ama=Pt(NH₃)₂, N,O-Pt 킬레이트, 25kDa(N,O-Pt)의 종양 성장 저해와 카르보플라틴 및 운반체 기준(등장성 포도당)의 종양 성장 저해를 비교하였는데, 이 평가는 치료 집단을 7마리 BALB/c nu/nu 생쥐로 하여 평가하였다. 사람의 비늘성 종양 세포(UMSCC10b)를 4 부위(좌우 어깨, 좌우 옆구리)에 이식하였는데(부위당 10⁶세포), N,O-Pt 킬레이트와 카르보플라틴은 각각 400mgPt/kg 및 65mg/kg의 약량으로 이용되고, 단일 IP 주사로 제공된다. 이와 같은 N,O-킬레이트는 카르보플라틴의 약량이 되는 MTD와 비슷한 양이 된다. 종양이 집단 평균 50mg 정도가 되면, 모든 생쥐는 시험 과정에 따라 처리된다. 그 결과는 도 15에 나타내었다.

다음의 청구범위에서 정의되는 본 발명의 범위 및 영역을 벗어나지 않고 여기에서 설명하고 있는 일련의 방법 및 과정 또는 여기에서 설명하는 다양한 성분, 요소, 장치의 구성 및 작동에서 다양한 변화를 줄 수도 있다.

다음의 인용 문헌은 본 출원을 보충하기 위한 참고문헌으로 제공한다.

References

1. Appleton, T. G., Hall, J. R., Neale, D. W., and Thompson, C. S. M., "Reactions of the *cis*-Diamminediaquaplatinum(II) Cation with 2-Aminomalononic Acid and Its Homologues, Aspartic and Glutamic Acids. Rearrangements of Metastable Complexes with Carboxylate-Bound Ligands to N,O-Chelates and Formation of Di- and Trinuclear Complexes¹", *Inorg Chem*, 29, 3985-3990 (1990n385).
2. Bogdanov, Jr., A.A., *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 7:144-149 (1996).
3. Duncan, *et al.*, U.S. Patent No. 5,965,118 issued October 12, 1999 and assigned to Access Pharmaceuticals, Inc., Dallas, Texas.
4. Duncan, R., *et al.*, *Brit. J. Cancer* 55:165-174 (1987).
5. Duncan, R., *et al.*, *Anti-Cancer Drugs* 3:175-210 (1992).
6. Fiebig, H.H., *et al.*, *Proc. Am. Asso. for Cancer Res.* 37:297, Abstract No. 2021 (1996).
7. Filipová-Vopršálová, M., *et al.*, *J. Controlled Release* 17(89-98) (1991).
8. Freise, J., *et al.*, *Arch. Int. Pharmacodyn.* 258:180-192 (1982).
9. Fuji, K., *et al.*, *Proc. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 23:639-640 (1996).
10. Gandolfi, O., "Novel Organoplatinum(II) Complexes and Method for the Preparation Thereof, US Patent 4,614,811
11. Gandolfi, O., Apfelbaum, H. C., and Blum, J., "Aminomalonato(1,2-diaminocyclohexane)platinum(II): A Competitive Antitumor Compound Within a New Class of Neutral, Chemically Stable, Water Soluble, Functionalized Platinum(II) Complexes", *Inorganic Chimica Acta*, 135, 27-31 (1987).
12. Gianasi, E., Wasil, M., Evagorou, E. G., Kedde, A., Wilson, G., and Duncan, R., "HPMA copolymer platinates as novel antitumour agents: in vitro properties, pharmacokinetics and antitumour activity in vivo", *Eur J Cancer*, 35, 994-1002 (1999).

13. Gibson, D., Rosenfeld, A., Apfelbaum, H., and Blum, J., "Multinuclear (^{195}Pt , ^{15}N , ^{13}C) NMR Studies of the Reactions between *cis*-Diaminediaqua platinum(II) Complexes and Aminomalonate", *Inorg Chem*, 29, 5125-5129 (1990).
14. Han, M.J., *et al.*, *J. Bioact. and Biocompat. Polymers* 9:142 (1994).
15. Johnsson, A., and Cavallin-Ståhl, E., *Anti-Cancer Drugs* 7:70-77 (1996).
16. Neuse, E.W., *et al.*, *J. Inorganic and Organometallic Polymer* 5(3):195-207 (1995).
17. Prestayko, A.W., *CANCER AND CHEMO. VOL III* (Crooke, *et al.*, Eds.) Academic Press, NY, 133-154 (1981).
18. Schechter, B., *et al.*, *J. Controlled Release* 10:75-87 (1989).
19. Seymour, L.W., *et al.*, *J. of Biomed. Mat. Res.* 21:1341-1358 (1987).
20. Steerenberg, P.A., *et al.*, *International Journal of Pharmaceutics* 40:51-62 (1987).
21. Sur, B., *et al.*, *Oncology* 40:372-376 (1983).
22. Talebian, A., *et al.* (a), "Synthesis and Characterization of a Series of Water Soluble Amidomalonato-(1R,2R-Cyclohexanediamine)Platinum(II) Complexes", *J. Coord. Chem*, 22, 165-173 (1990).
23. Talebian, A., *et al.* (b), "Murine anti-tumor activity of new water soluble platinum (II) complexes with reduced toxicity", *Anti-Cancer Drug Design*, 5, 371-380 (1990).
24. Weiss, R.B., *et al.*, *Drugs* 46(3):360-377 (1993).
25. Bogdanov *et al.*, "Graft Co-Polymer Adducts of Platinum (II) Compounds", US patent 5,871,710.
26. Bancroft *et al.*, " ^{195}Pt NMR Kinetic and Mechanistic Studies of *cis*- and *trans*-Diamminedichloroplatinum(II) Binding to DNA", *J. Am Chem. Soc.* 112: 6860-6871 (1990).
27. Kopecek, *et al.* "Synthetic Polymeric Prodrugs", US patent 5,037,883.

28. Matsumura et al. "A new concept for macromolecular therapeutics in cancer therapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent SMANCS", *Cancer Res.* 46: 6378-6392 (1986).
29. Yoguchi, et al. " Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues, *Jpn. J. Cncer Res.* 89: 307-314 (1998).
30. Song, et al. "Synthesis and hydrolytic properties of polyphosphazene / (diamine) platinum / saccharide conjugates" *J. Controlled Release* 55: 161-170 (1998).
31. Sohn et al. "Synthesis and antitumor activity of novel polyphosphazene-(diamine)platinum(II) conjugates" *Inter. J. of Pharmaceutics* 153: 79-91 (1997).
32. Li, et al. "Complete Regression of Well-established Tumors Using a Novel Water-soluble Poly(L-Glutamic Acid)-Paclitaxel Conjugate" *Cancer Research* 58: 2404-2409 (1998).
33. Mendichi, R. et al. "Molecular Characterization of Polymeric Antitumor Drug Carriers by Size Exclusion Chromatography and Universal Calibration" *J. Liq. Chrom. and Rel Tech.* 19: 1591-1605 (1996).
34. Pinciroli, et al. "¹H NMR Characterization of Methacrylamide Polymer Conjugates with the Anti-Cancer Drug Doxorubicin" *Magn. Reson. Chem.* 35: 2-8 (1997).
35. Gandolfi et al. *Inorg. Chim Acta* 135: 27-31 (1987).
36. Appleton et al. "Reaction of cis-Diamminediaquaplatinum(II) cation with N-Acetylglycine" *Inorg. Chem.* 28: 815-819 (1989).
37. Danishefsky et al. "Conversion of Carboxyl Groups of Mucopolysaccharides into Amides of Amino Acid Esters" *Carbohydr. Res.* 16: 199-205 (1971).
38. Tsujihara et al, "Novel Organic Platinum Complex and Process for the Preparation Thereof" US patent 4,882,447.

39. Chao, et al. "Interaction of Cis Platinum(II) Compounds with Poly(l-glutamate). A Doubly Anchored Spin-Label and a Doubly Anchored Chromophore-Label' J. Am. Chem. Soc. 99: 8024-8032 (1977).
40. Criado, et al. "Structural Characterization, Kinetic Studies, and in Vitro Biological Activity of New cis-Diamminebis-cholyglycinate(O,O') Pt(II) and cis Diamminebis-ursodeoxycholate(O,O') Pt(II) Complexes" Bioconj. Chem. 11: 167-174 (2000).
41. Rosenberg et al. "Platinum Compounds: A New Class of Potent Antitumour Agents" Nature (London) 222: 385 (1969).
42. Sur et al. "Effect of liposomal Encapsulation of Cis-platinum diamminodichloride in the Treatment of Ehrlich Ascites Carcinoma" Oncology 40: 372-6 (1983).
43. Talebian, et al. "Aspartato(1,2-cyclohexanediamine)platinum(II) complexes: synthesis and characterization; effects of minor impurities on antitumor activity" Inorg. Chim. Acta 179: 281-287 (1991).
44. Gibson, D., Rosenfeld, "Multinuclear (^{195}Pt , ^{15}N , ^{13}C) NMR Studies of the Reactions between *cis*-Diamminediaquaplatinum(II) Complexes and Aminomalonate", *Inorg Chem*, 29: 5125-5129 (1990).
45. Harrap, "Preclinical Studies Identifying Carboplatin as a Viable Cisplatin Alternative" Cancer Treat. Rev. 21(Suppl. A): 21-33 (1985).
46. Posner et al, "The Role of Induction Chemotherapy in the Curative Treatment of Squamous Cell Cancer of the Head and Neck" Semin Oncol, 27(4 Suppl 8):13-24 (2000).
47. Steerenberg et al, "Liposomes as Drug Carrier System for Cis-diamminedichloroplatinum (II). II. Antitumor Activity in vivo, Induction of Drug Resistance, Nephrotoxicity and Pt Distribution" Cancer Chemother Pharmacol.21:299-307 (1988).

48. K.D. Paull et al, "Display and Analysis of Patterns of Differential Activity of Drugs against Human Tumor Cell Lines: Development of Mean Graph and COMPARE Algorithm" J.Natl.Cancer Inst. 81: 1088 (1989).
49. Physician's Desk Reference 51th ed, Medical Economics: Montvale, New Jersey, 1997
Devita et al. CANCER Principles & Practice of Oncology 4th ed, J. B. Lippincott Company: Philadelphia, PA 1993, p395.
50. Seymour, "Passive Tumor Targeting of Soluble Macromolecules and Drug Conjugates" Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 9(2):135-87 (1992).
51. Veronese et al. "Bioconjugation in Pharmaceutical Chemistry" Farmaco 54(8):497-516 (1999).
52. Seymour et al. "Influence of Molecular Weight on Passive Tumour Accumulation of a Soluble Macromolecular Drug Carrier" 31A: 766-770 (1995).
53. Seymour et al, "The Pharmacokinetics of Polymer-bound Adriamycin" Biochem Pharmacol. 39: 1125-31 (1990).
54. Pimm et al, "Gamma Scintigraphy of the Biodistribution of 123I-labelled N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide Copolymer-doxorubicin Conjugates in Mice with Transplanted Melanoma and Mammary Carcinoma" J Drug Target.3: 375-83 (1996).
55. Duncan et al, "Preclinical Toxicology of a Novel Polymeric Antitumour Agent: HPMA Copolymer-doxorubicin (PK1)" Hum Exp Toxicol. 17: 93-104 (1998).
56. Thomson et al, "Population pharmacokinetics in phase I drug development: a phase I study of PK1 in patients with solid tumours" Br J Cancer. 81: 99-107 (1999).
57. Minko et al, "Efficacy of the Chemotherapeutic Action of HPMA Copolymer-bound Doxorubicin in a Solid Tumor Model of Ovarian Carcinoma" Int J Cancer. 86: 108-17 (2000).

58. Fraier et al, " Determination of a new polymer-bound paclitaxel derivative (PNU 166945), free paclitaxel and 7-epipaclitaxel in dog plasma and urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography with UV detection" J Chromatogr A 797: 295-303 (1998) .
59. Caiolfà et al, "Polymer-bound Camptothecin: Initial Biodistribution and Antitumor Activity Studies "J Control Release. 65: 105-19 (2000).
60. Li et al, "Biodistribution of paclitaxel and poly(L-glutamic acid)-paclitaxel conjugate in mice with ovarian OCa-1 tumor" Cancer Chemother Pharmacol., 46: 416-22 (2000).
61. Conover et al, "Camptothecin Delivery Systems: enhanced efficacy and tumor accumulation of camptothecin following its conjugation to polyethylene glycol via a glycine linker" Cancer Chemother Pharmacol, 42: 407-14 (1998).
62. Duncan, "Drug-polymer conjugates: Potential for improved chemotherapy" Anti-Cancer Drugs, 3: 175-210 (1992).
63. Gianasi, et al. "HPMA Copolymer Platinates as Novel Antitumour Agents: In Vitro Properties, Pharmacokinetics and Antitumour Activity In Vivo" European J. Cancer 35: 994-1002 (1999).
64. Schechter et al, "Increased therapeutic efficacy of cis-platinum complexes of poly-L-glutamic acid against a murine carcinoma" Int J Cancer 1987 Mar 15;39(3):409-13.
65. Bogdanov, Jr. et al., "An adduct of cis-diamminedichloroplatinum(II) and poly(ethylene glycol)poly(L-lysine)-succinate: synthesis and cytotoxic properties" Bioconjug Chem. 1996 Jan-Feb;7(1):144-9.
66. Han, et al., "Synthesis and Antitumor Activity of Poly(Anion-Pt-complexes containing Alicyclic Amines as Ligands" J. Bioactive and Compatible Polymers 9: 142-151 (1994).
67. Johnsson et al. "A topographic study on the distribution of cisplatin in xenografted tumors on nude mice" Anti-Cancer Drugs 7: 70-77 (1996).

68. Fiebig, et al., "GB-21, a novel platinum polymer with antitumor activity in human renal and mammary xenografts" *Proc. American Association for Cancer Research*, 37:297 abs# 2021 (1996).
69. Filipova-Voprsalova et.al., "Biodistribution of trans-1,2-diaminocyclohexane-trimellito-platinum(II) attached to macromolecular carriers" *J. Controlled Release* 17:89-98 (1991).
70. Fuji et al, "Control of Pharmacokinetics and Nephrotoxicity of cis-DDP by Alginate" *Proc. Int. Symp. Controlled Rel. Bioact. Matr.*, 23: 639-40 (1996).
71. Neuse, et al. "cis-Diaminedichloroplatinum(II) complexes reversibly bound to water-soluble polyaspartamide carrier for chemotherapeutic applications. I. Platinum coordination to carrier-attached ethylenediamine ligands" *J. Inorg. Organomet Polym.*, 1(2): 147-165 (1995).
72. Schechter, et al., "Soluble polymers as carriers of cis-platinum" *J. Controlled Release* 10: 75-87 (1989).
73. Heppeler et al, "Receptor targeting for tumor localisation and therapy with radiopeptides" *Curr Med Chem* 2000 Sep;7(9):971-94.
74. Schlaeppli et al. "Targeting vascular endothelial growth factor (VEGF) for anti-tumor therapy, by anti-VEGF neutralizing monoclonal antibodies or by VEGF receptor tyrosine-kinase inhibitors" *Cancer Metastasis Rev.* 18: 473-81 (1999).
75. Sudimack et al. "Targeted drug delivery via the folate receptor" *Adv Drug Deliv Rev.* 41: 147-62 (2000).
76. Dubowchik et al. "Receptor-mediated and enzyme-dependent targeting of cytotoxic anticancer drugs" *Pharmacol Ther* 83:67-123 (1999).
77. Weiner, "An overview of monoclonal antibody therapy of cancer" *Semin Oncol* 26, Suppl 12: 41-50 (1999).
78. Buolamwini, "Novel anticancer drug discovery" *Curr Opin Chem Biol* 3:500-9 (1999).

79. McIntosh et al, "Pharmacokinetics and tissue distribution of cisplatin and conjugates of cisplatin with carboxymethyl dextran and A5B7 monoclonal antibody in CD1 mice" J Pharm Sci. 86: 1478-83 (1997).
80. Hata et al, "Immunotargeting chemotherapy for AFP-producing pediatric liver cancer using the conjugates of anti-AFP antibody and anti-tumor agents" J Pediatr Surg. 27: 724-7 (1992).
81. Gust et al, "Investigation of the configurational and conformational influences on the hormonal activity of 1,2-bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)ethylenediamines and of their platinum(II) complexes. 1. Synthesis, estradiol receptor affinity, and estrogenic activity of diastereomeric [N-alkyl- and N,N'-dialkyl-1,2-bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)ethylenediamine]dichloroplatinum(II) complexes" J Med Chem. 38: 2070-9 (1995).
82. DiZio et al, "Estrogen platinum-diamine complexes: preparation of a non-steroidal estrogen platinum-diamine complex labeled with platinum-191 and a study of its binding to the estrogen receptor in vitro and its tissue distribution in vivo" J Steroid Biochem Mol Biol 42:363-73 (1992).
83. Vitols et al, "Platinum-folate compounds: synthesis, properties and biological activity" Adv Enzyme Regul. 26: 17-27 (1987).
84. Julyan et al, "Preliminary clinical study of the distribution of HPMA copolymers bearing doxorubicin and galactosamine" J Control Release 57: 281-90 (1999).
85. Appleton et al. "Reactions of the *cis*-Diamminediaquaplatinum(II) Cation with 2-Aminomalonic Acid and Its Homologues, Aspartic and Glutamic Acids. Rearrangements of Metastable Complexes with Carboxylate-Bound Ligands to N,O-Chelates and Formation of Di- and Trinuclear Complexes", Inorg Chem, 29: 3985-3990 (1990).
86. Talebian, et al. "Synthesis and Characterization of a Series of Water Soluble Amidomalonato-(1R,2R-Cyclohexanediamine)Platinum(II) Complexes", J Coord. Chem, 22, 165-173 (1990).
87. Appleton et al. "The Chemistry of Cisplatin in Aqueous Solution" in Platinum-Based Drugs in Cancer Therapy, Kelland and Farrell eds, Humana Press Totowa, New Jersey, 2000.
88. Sohn, et al. "Synthesis and antitumor activity of novel polyphosphazene-(diamine)platinum(II) conjugates" Inter. J. Pharmaceutics 153: 79-91 (1997).

도면의 간단한 설명

도 1 은 시스플라틴, 카르보플라틴, 옥살리플라틴의 구조 및 아미노말로네이트-시스-디아민백금(II)의 O,O-와 N,O-Pt 킬레이트의 기본 구조를 도시한다(주의: 시스플라틴은 cDDP와 시스-디아민디클로로백금(II)으로도 알려져 있다).

도 2A 는 아미노말로네이트-시스-디아민백금(II)의 O,O-Pt 킬레이트의 구조를 도시한다.

도 2B 는 아미노말로네이트-시스-디아민백금(II)의 N,O-Pt 킬레이트의 구조를 도시한다. 도 3A 는 아미노말로네이트-시스-디아민백금(II)의 O,O-Pt 킬레이트의 구조를 도시한다.

도 3B는 아미노말로네이트-시스-디아민백금(II)의 N,O-Pt 킬레이트의 구조를 도시한다. 도 4는 폴리(HPMA)-GFLG-Y의 제형 및 구조를 도시하는데, 여기서 Y는 ONp 또는 Ama-diEt이다. Y가 ONp인 경우, 좀더 제한적인 다분산성의 저분자량 중합체가 만들어진다. ONp기 또는 부가된 p-니트로페놀이 없는 경우, 좀더 고분자량의 폴리(HPMA)중합체가 발견된다. 351 kDa 물질은 임의의 ONp 에스테르 및 임의의 부가된 p-니트로페닐이 없는 반응으로부터 산출된다. ONp 에스테르없이 p-니트로페놀이 중합반응에 첨가되는 경우, 좀더 제한적이고 좀더 균일한 분자량 분포를 갖는 좀더 작은 HPMA 중합체가 수득된다.

도 5는 폴리(HPMA)-GFLG-Ama=Pt(NH₃)₂N,O-킬레이트를 제조하는데 사용되는 반응식을 도시한다. 실시예에 제시된 바와 이들 동일 단계 및 조건은 아미노말로네이트-시스-디아민백금(II) 중의 다른 N,O-킬레이트의 제조에 적용할 수 있지만, 단 이들은 소형 분자이거나 또는 중합체에 부착되어야 한다.

도 6은 폴리(HPMA)-GFLG-Ama-diEt의 제조동안 p-니트로페놀의 방출을 도시한다. 이는 작은 분자로 치환 반응을 모니터링하는 한가지 방법을 도시한다.

도 7은 폴리(HPMA)-GFLG-Ama=Pt(NH₃)₂의 O,O-와 N,O-킬레이트의 구조 및 이들의 대응하는 ¹⁹⁵PtNMR 스펙트럼을 도시한다. 이들 스펙트럼은 킬레이트 전환 및 2가지 킬레이트의 피크 위치에서 차이를 지표로 도시한다. O,O-킬레이트의 스펙트럼은 대략 85% O,O-와 15% N,O-킬레이트의 구성을 보여준다. N,O-킬레이트의 스펙트럼은 대략 10% O,O-와 90% N,O-킬레이트의 구성을 보여준다. 더 높은 온도 또는 좀더 긴 반응시간을 사용하는 경우, O,O-킬레이트는 검출되지 않는다.

도 8은 도 5의 C 단계동안 O,O-와 N,O-킬레이트의 비율 곡선을 도시한다. 이는 O,O-킬레이트 형성이 1-2시간 이내에 완결된다는 것을 시사한다.

도 9는 75mM 인산염 pH=7.4, 100mM NaCl에서 시간에 따른 O,O-킬레이트에서 N,O-킬레이트로의 전환 곡선을 도시한다. 이는 이들 조건에서 100% 백금이 N,O-킬레이트로 존재한다는 것을 시사한다.

도 10은 O,O-킬레이트에서 N,O-킬레이트로의 전환에 대한 염화이온 농도의 효과를 도시한다. 60mM이상의 NaCl 농도에서 킬레이트 전환의 비율은 동일하다.

도 11은 O,O-킬레이트에서 N,O-킬레이트로의 전환에 대한 니트레이트, 아세테이트, 요오드의 효과를 도시한다. 이들 3가지 음이온은 상이한 비율로 킬레이트 전환에 영향을 준다.

도 12는 실시예 23의 B16 흑색종 종양 성장 저해 연구에 따른 곡선을 도시하는데, 여기서 식염수는 대조군이고, 시스플라틴은 이의 MTD에 근접하게 투여하고, 폴리(HPMA)-GFLG-Ama=Pt(NH₃)₂의 N,O-킬레이트는 MTD보다 훨씬 적게 투여한다.

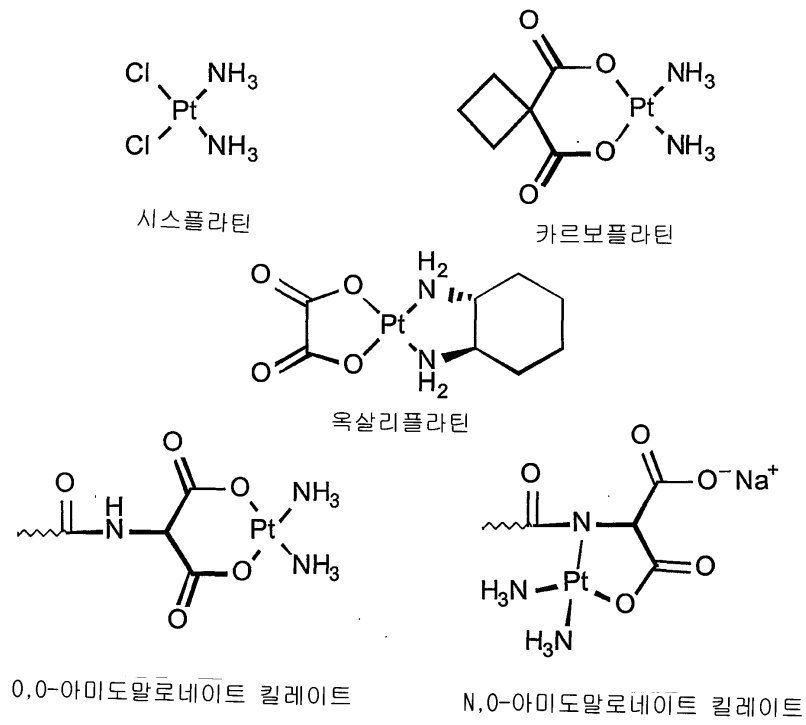
도 13은 실시예 24의 B16 흑색종 종양 성장 저해 연구에 따른 곡선을 도시하는데, 여기서 식염수는 대조군이고, 시스플라틴은 MTD에 근접한 수준으로 투여하고, 폴리(HPMA)-GFLG-Ama=Pt(NH₃)₂의 O,O-킬레이트는 MTD보다 훨씬 낮은 수준으로 투여한다.

도 14는 실시예 25의 B16 흑색종 종양 성장 저해 연구에 따른 곡선을 도시하는데, 여기서 식염수는 대조군이고, 카르보플라틴은 MTD에 근접한 수준으로 투여하고, 폴리(HPMA)-GFLG-Ama=Pt(NH₃)₂의 N,O-킬레이트는 MTD보다 훨씬 낮은 수준으로 투여한다.

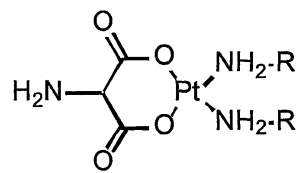
도 15는 실시예 26의 사람 이종이식편 종양 성장 저해 연구에 따른 곡선을 도시하는데, 여기서 등장성 글루코스는 대조군이고, 카르보플라틴은 MTD에 근접한 수준으로 투여하고, 폴리(HPMA)-GFLG-Ama=Pt(NH₃)₂의 N,O-킬레이트는 MTD보다 훨씬 낮은 수준으로 투여한다.

도면

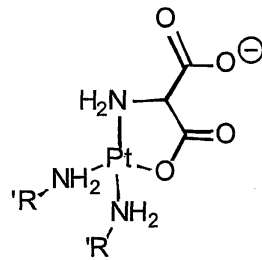
도면1



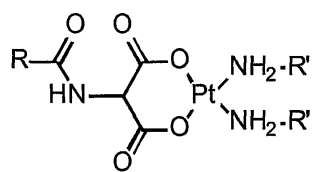
도면2a



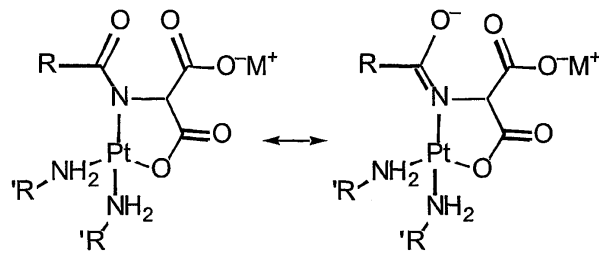
도면2b



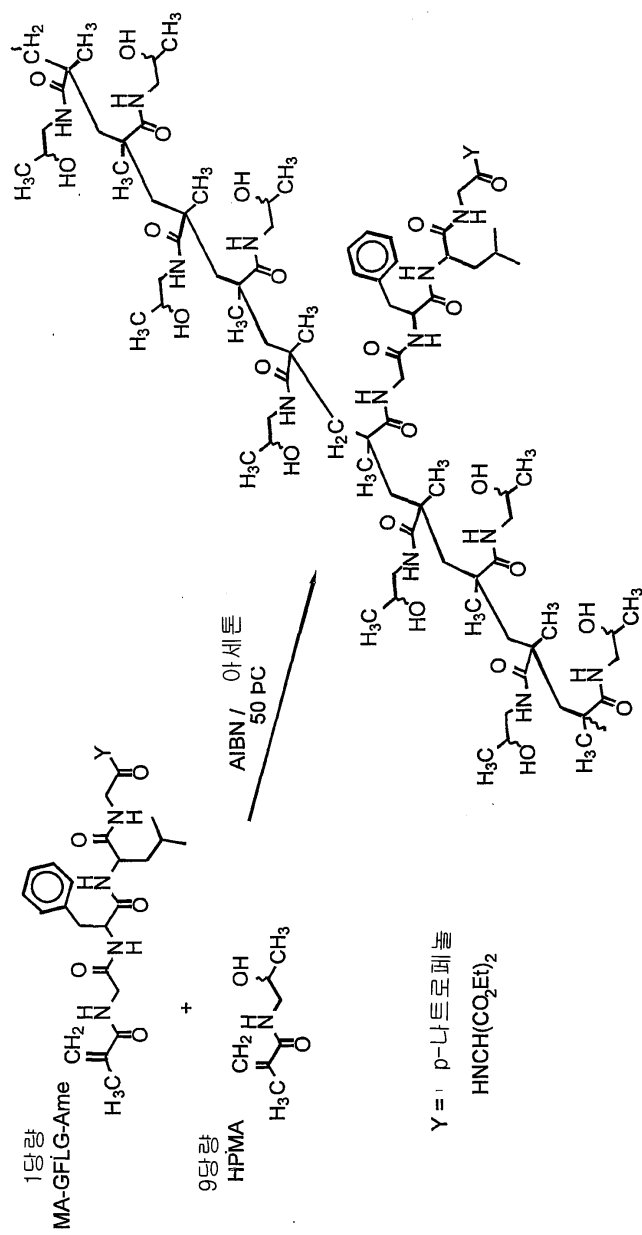
도면3a



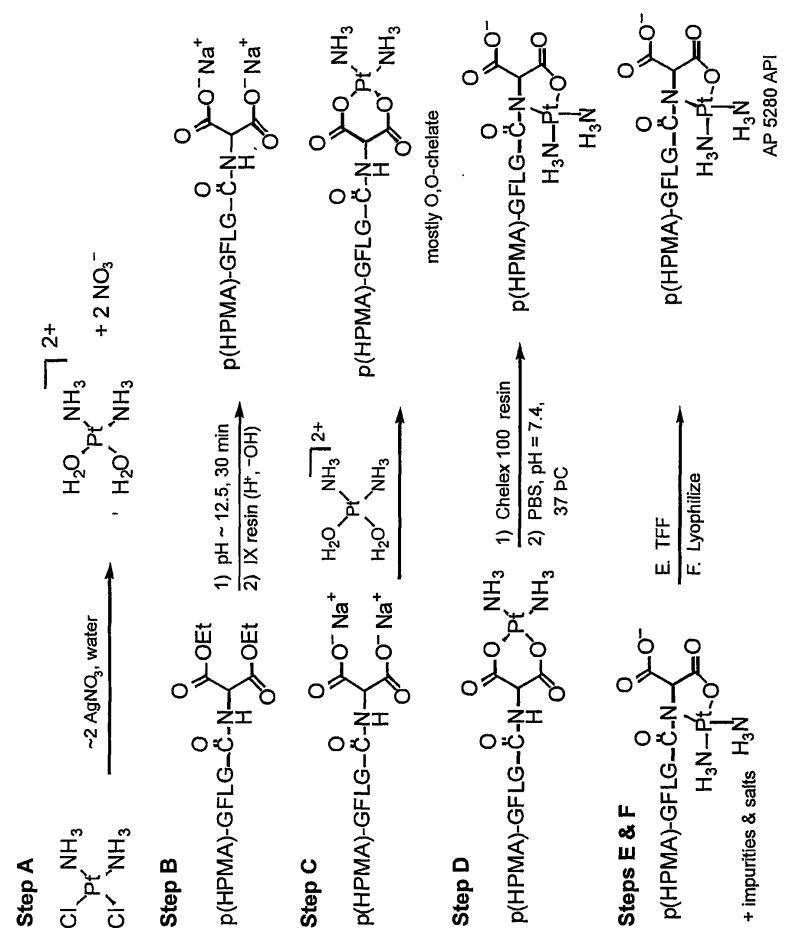
도면3b



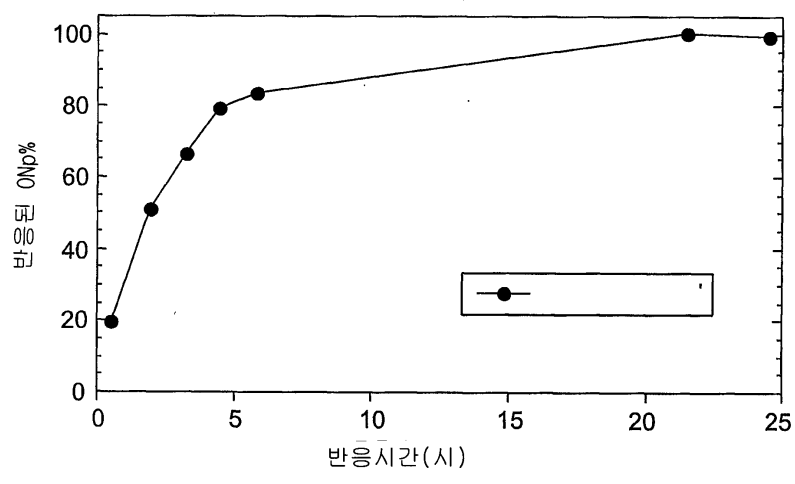
도면4



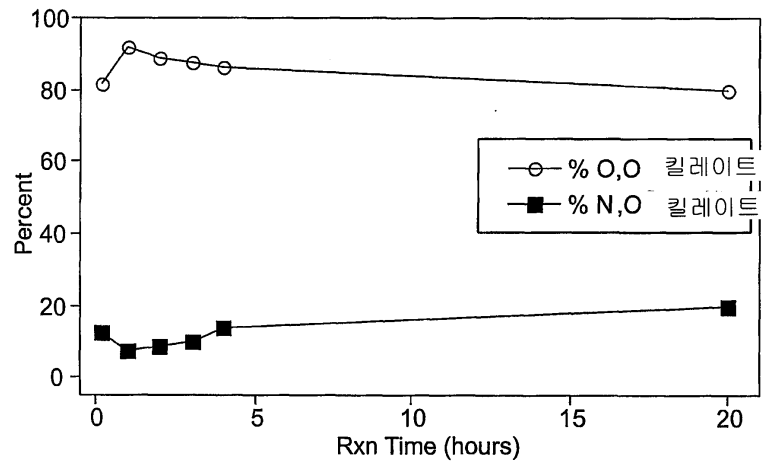
도면5



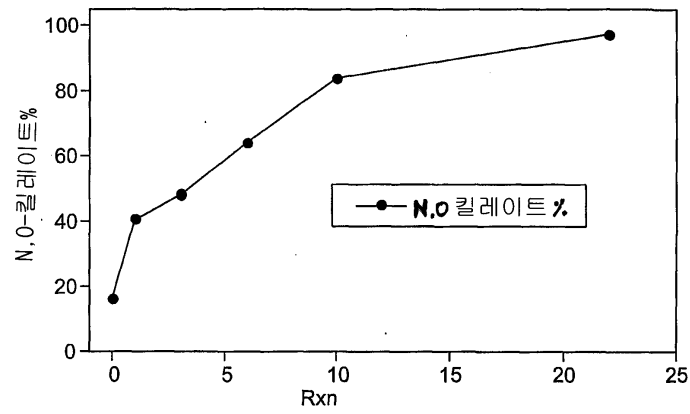
도면6



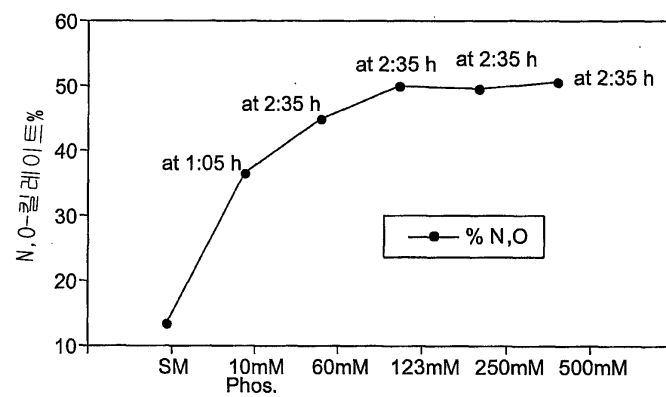
도면8



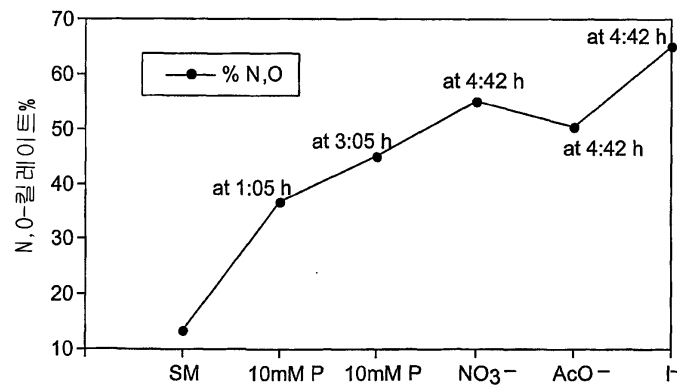
도면9



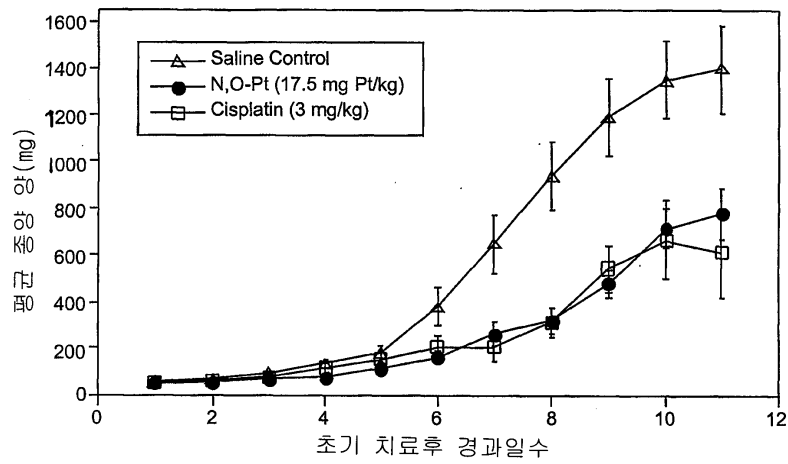
도면10



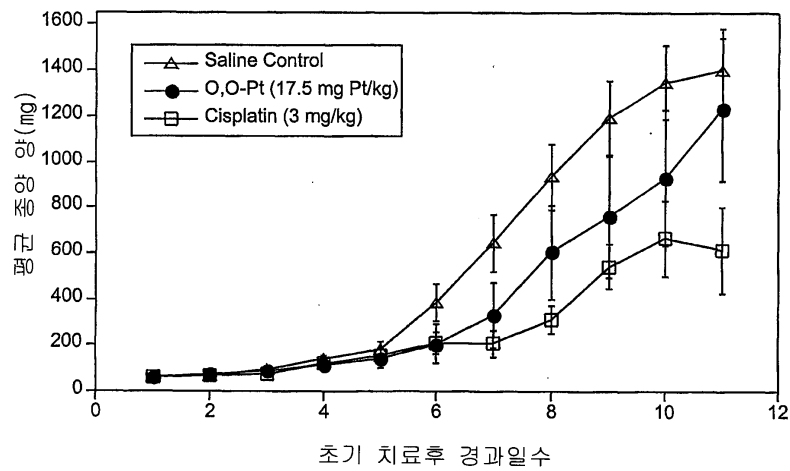
도면11



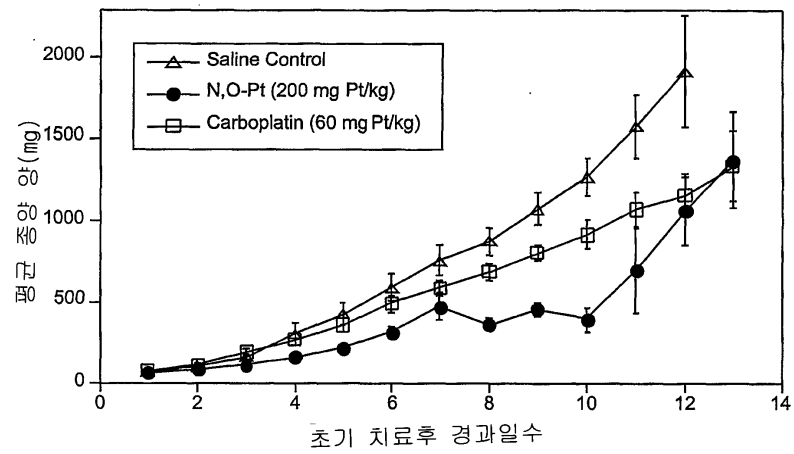
도면12



도면13



도면14



도면15

