



(19) 대한민국특허청(KR)  
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0098373  
 (43) 공개일자 2008년11월07일

(51) Int. Cl.

C08G 65/48 (2006.01) A61K 9/58 (2006.01)  
 C08F 8/34 (2006.01) C08K 5/05 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7020259

(22) 출원일자 2008년08월19일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2008년08월19일

(86) 국제출원번호 PCT/US2006/001820

국제출원일자 2006년01월19일

(87) 국제공개번호 WO 2007/084126

국제공개일자 2007년07월26일

(71) 출원인

올엑셀, 임크.

미국 코네티컷주 06516 웨스트 하벤, 우드 스트리트 135

(72) 발명자

디완 어널

미국 06516 케네디컷주 웨스트 해븐 우드 스트리트 135

온톤 앤 루이스

미국 06825 케네디컷주 페어필드 퍼스트 스트리트 69

타타케 사이언트 지

미국 06482 케네디컷주 샌디 혹 미스티 베일 로드 14

(74) 대리인

김성기, 김진희

전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 자기 조립형 양쪽성 중합체를 이용한 약물의 가용화 및 표적화된 전달

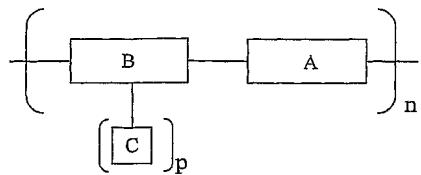
### (57) 요 약

본 발명은 현수형 지방족 기를 소수성 성분으로서 갖는 친수성 골격을 포함하는 양쪽성의 생분해성 공중합체를 제공한다. 상기 중합체는 수성 환경에서 나노 크기의 분자 응집체를 형성하는데, 이 응집체는 약물, 비타민, 염료 및 영상제와 같은 불용성 유기 화합물을 가용화할 수 있는 소수성 내부를 갖는다. 상기 중합체는 선택적으로 약물 및 영상제의 표적화된 전달에 유용한 항체, 리간드 및 다른 표적화 부분에 대한 부착점을 제공하는 반응성 작용기를 특징으로 한다.

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

교호하는 분자점 부분 B와 친수성의 수용성 중합체 블록 A로 형성되는 골격을 포함하고, 상기 분자점 부분에 부착된 소수성 측쇄 C를 가지는 하기 구조로 필수적으로 구성되는 콤형(comb) 중합체로서, 여기서 각각의 측쇄 C는 하나 이상의 친수성 치환기로 임의로 치환된 선형 탄화수소, 하나 이상의 친수성 치환기로 임의로 치환된 다환 탄화수소, 소수성 아미노산, 펩티드 및 중합체로 구성된 군에서 독립적으로 선택되는 것인 콤형 중합체:



(여기서,  $n$ 은 3~약 100이며, 평균적으로  $1 < p \leq 4$ 임).

### 청구항 2

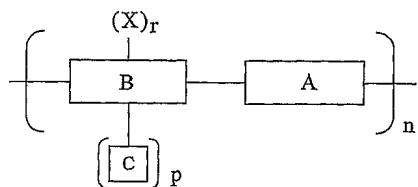
제1항에 있어서, 평균적으로  $p$ 는 약 2~4인 콤형 중합체.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 평균적으로  $1.5 \leq p \leq 2$ 인 콤형 중합체.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 각각의 분자점 부분에 부착된 하나 이상의 반응성 작용기 X를 더 포함하며, 하기 구조로 필수적으로 구성되는 콤형 중합체:



(여기서, 평균적으로  $r$ 은 약 1~약 4임).

### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수용성 중합체 블록 A가 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리(프로필렌 글리콜), 폴리(에틸렌 이민), 폴리(비닐 알코올), 폴리(비닐파롤리돈) 및 다당류와 이들의 공중합체로 구성된 군에서 선택되는 것인 콤형 중합체.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 중합체 블록 A가 폴리(에틸렌 글리콜) 및 폴리(프로필렌 글리콜)과 이들의 공중합체로 구성된 군에서 선택되는 것인 콤형 중합체.

### 청구항 7

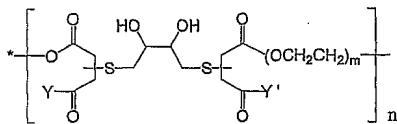
제6항에 있어서, 상기 중합체 블록 A가 폴리(에틸렌 글리콜)인 콤형 중합체.

### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 중합체 블록 A는 평균 길이가 4~700 단량체 단위인 콤형 중합체.

### 청구항 9

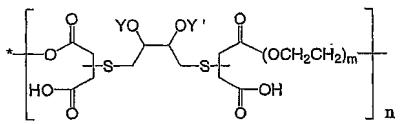
제4항에 있어서, 하기 구조를 가지는 콤형 중합체:



(여기서,  $m$ 은 4~700이고, Y 및 Y'은 R, OR, COOR, SR, NHR, NRR', ONHR, NHOR, NRNH<sub>2</sub>, NHNHR, NRNHR' 및 NHNR'R'으로 구성된 군에서 독립적으로 선택되며, 여기서 R 및 R'은 하나 이상의 친수성 치환기로 임의로 치환된 선형 탄화수소, 하나 이상의 친수성 치환기로 임의로 치환된 다환 탄화수소, 소수성 아미노산, 펩티드 및 중합체로 구성된 군에서 독립적으로 선택됨).

### 청구항 10

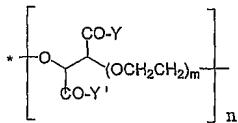
제4항에 있어서, 하기 구조를 가지는 콤형 중합체:



(여기서,  $m$ 은 4~700이고, Y 및 Y'은 R, COR, COOR, CONHR, CONRR', CONHOR, CONRNH<sub>2</sub>, CONHNHR, CONRNHR' 및 CONHNRR'으로 구성된 군에서 독립적으로 선택되며, 여기서 R 및 R'은 하나 이상의 친수성 치환기로 임의로 치환된 선형 탄화수소, 하나 이상의 친수성 치환기로 임의로 치환된 다환 탄화수소, 소수성 아미노산, 펩티드 및 중합체로 구성된 군에서 독립적으로 선택됨).

### 청구항 11

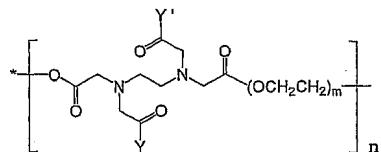
제4항에 있어서, 하기 구조를 가지는 콤형 중합체:



(여기서,  $m$ 은 4~700이고, Y 및 Y'은 R, OR, COOR, SR, NHR, NRR', ONHR, NHOR, NRNH<sub>2</sub>, NHNHR, NRNHR' 및 NHNR'R'으로 구성된 군에서 독립적으로 선택되며, 여기서 R 및 R'은 하나 이상의 친수성 치환기로 임의로 치환된 선형 탄화수소, 하나 이상의 친수성 치환기로 임의로 치환된 다환 탄화수소, 소수성 아미노산, 펩티드 및 중합체로 구성된 군에서 독립적으로 선택됨).

### 청구항 12

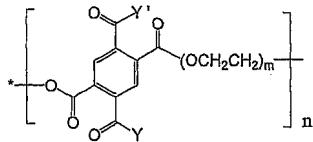
제3항에 있어서, 하기 구조를 가지는 콤형 중합체:



(여기서,  $m$ 은 4~700이고, Y 및 Y'은 R, OR, COOR, SR, NHR, NRR', ONHR, NHOR, NRNH<sub>2</sub>, NHNHR, NRNHR' 및 NHNR'R'으로 구성된 군에서 선택되며, 여기서 R 및 R'은 하나 이상의 친수성 치환기로 임의로 치환된 선형 탄화수소, 하나 이상의 친수성 치환기로 임의로 치환된 다환 탄화수소, 소수성 아미노산, 펩티드 및 중합체로 구성된 군에서 독립적으로 선택됨).

**청구항 13**

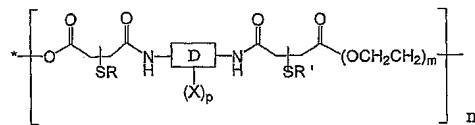
제3항에 있어서, 하기 구조를 가지는 콤형 중합체:



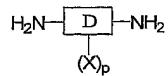
(여기서,  $m$ 은 4~700이고, Y 및 Y'은 R, OR, COOR, SR, NHR, NRR', ONHR, NHOR, NRNH<sub>2</sub>, NHNHR, NRNHR' 및 NHNR'R'으로 구성된 군에서 독립적으로 선택되며, 여기서 R 및 R'은 하나 이상의 친수성 치환기로 임의로 치환된 선형 탄화수소, 하나 이상의 친수성 치환기로 임의로 치환된 다환 탄화수소, 소수성 아미노산, 펩티드 및 중합체로 구성된 군에서 독립적으로 선택됨).

**청구항 14**

제3항에 있어서, 하기 구조를 가지는 콤형 중합체:



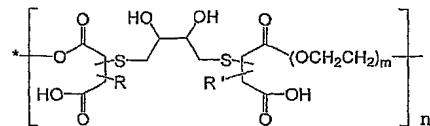
(여기서, 부분 D는 하기 일반 구조식:



으로 표시되는 디아민으로부터 유도되고, 각각의 X는 독립적으로 반응성 작용기이며, p는 0~4이고,  $m$ 은 4~700이며, 여기서 R 및 R'은 하나 이상의 친수성 치환기로 임의로 치환된 선형 탄화수소, 하나 이상의 친수성 치환기로 임의로 치환된 다환 탄화수소, 소수성 아미노산, 펩티드 및 중합체로 구성된 군에서 독립적으로 선택됨).

**청구항 15**

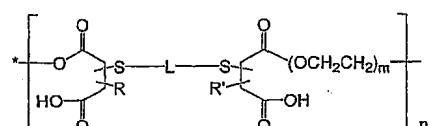
제4항에 있어서, 하기 구조를 가지는 콤형 중합체:



(여기서,  $m$ 은 4~700이고, R 및 R'은 하나 이상의 친수성 치환기로 임의로 치환된 선형 탄화수소, 하나 이상의 친수성 치환기로 임의로 치환된 다환 탄화수소, 소수성 아미노산, 펩티드 및 중합체로 구성된 군에서 독립적으로 선택됨).

**청구항 16**

제4항에 있어서, 하기 구조를 가지는 콤형 중합체:



(여기서,  $m$ 은 4~700이고, L은 폐닐렌, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 알킬렌 또는 벤젠디메틸렌이며, R 및 R'은 하나 이상의 친수성 치

환기로 임의로 치환된 선형 탄화수소, 하나 이상의 친수성 치환기로 임의로 치환된 다환 탄화수소, 소수성 아미노산, 펩티드 및 중합체로 구성된 군에서 독립적으로 선택됨).

### 청구항 17

말레산 무수물에 의한 폴리에틸렌 글리콜의 말단 하이드록실기의 실질적으로 완전한 에스테르화를 초래하는 폴리에틸렌 글리콜과 말레산 무수물의 화학 반응으로부터 형성된 조성물.

### 청구항 18

말레산 무수물에 의한 폴리프로필렌 글리콜의 말단 하이드록실기의 실질적으로 완전한 에스테르화를 초래하는 폴리프로필렌 글리콜과 말레산 무수물의 화학 반응으로부터 형성된 조성물.

### 청구항 19

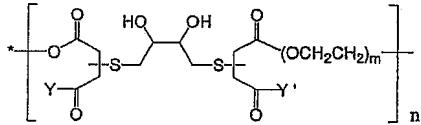
디티오트레이톨과 제17항의 조성물의 화학 반응으로부터 형성된 조성물.

### 청구항 20

디티오트레이톨과 제18항의 조성물의 화학 반응으로부터 형성된 조성물.

### 청구항 21

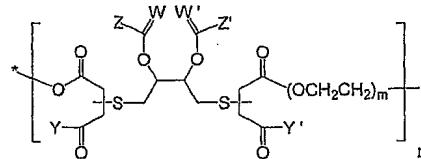
하기 구조를 가지는 중합체:



(여기서, m은 4~약 700이고, n은 3~약 100이며, 여기서, 도시된 구조를 가지는 각각의 단량체 단위에 있어서, Y 및 Y'은 OH, COOH, SH, NH<sub>2</sub>, NHR, ONH<sub>2</sub>, NHOH, NHNH<sub>2</sub> 및 NRNH<sub>2</sub>로 구성된 군에서 독립적으로 선택되고, 여기서 R은 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬 및 (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>Y(여기서, k는 2~5임)로 구성된 군에서 선택됨).

### 청구항 22

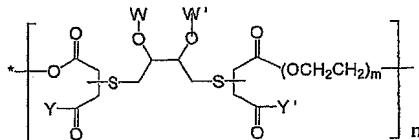
하기 구조를 가지는 중합체:



(여기서, m은 4~약 700이고, n은 3~약 100이며, 여기서, 도시된 구조를 가지는 각각의 단량체 단위에 있어서, Y 및 Y'은 OH, COOH, SH, NH<sub>2</sub>, NHR, ONH<sub>2</sub>, NHOH, NHNH<sub>2</sub> 및 NRNH<sub>2</sub>로 구성된 군에서 독립적으로 선택되고, 여기서 R은 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬 및 (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>Y(여기서, k는 2~5임)로 구성된 군에서 선택되며, W 및 W'은 독립적으로 O 또는 H<sub>2</sub>O이고, 여기서, 각각의 단량체 단위에 있어서, Z 및 Z'은 하나 이상의 친수성 치환기로 임의로 치환된 선형 탄화수소, 하나 이상의 친수성 치환기로 임의로 치환된 다환 탄화수소, 소수성 아미노산, 펩티드 및 중합체로 구성된 군에서 독립적으로 선택됨).

**청구항 23**

하기 구조를 가지는 중합체:



(여기서,  $m$ 은 4~700이고,  $Y$  및  $Y'$ 은 R, OR, SR, NHR, NRR', ONHR, NHOR, NRNH<sub>2</sub>, NHNHR, NRNHR' 및 NHNR $R'$ 으로 구성된 군에서 독립적으로 선택되며, 여기서 R 및 R'은 하나 이상의 친수성 치환기로 임의로 치환된 선형 탄화수소, 하나 이상의 친수성 치환기로 임의로 치환된 다환 탄화수소, 소수성 아미노산, 펩티드 및 중합체로 구성된 군에서 독립적으로 선택되고, 여기서, 각각의 단량체 단위에 있어서, W 및 W'은 H, -COCH=CH<sub>2</sub>, -COC(CH<sub>3</sub>)=CH<sub>2</sub>, COCH=CHCO<sub>2</sub>H 및 -COC(CH<sub>3</sub>)=CHCO<sub>2</sub>H로 구성된 군에서 독립적으로 선택됨).

**청구항 24**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 중합체를 포함하고 유효량의 약리 활성 물질을 더 포함하는 약학 조성물.

**청구항 25**

수성 용매 중의 물질의 용해도를 증가시키는 방법으로서, 상기 물질을 제1항 또는 제2항에 따른 중합체와 접촉시켜 상기 물질과 상기 중합체의 수용성 복합체를 형성하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 26**

비수성 용매 중의 물질의 용해도를 증가시키는 방법으로서, 상기 물질을 제1항 또는 제2항에 따른 중합체와 접촉시켜 상기 비수성 용매 중에 가용성인 상기 물질과 상기 중합체의 복합체를 형성하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 27**

제25항 또는 제26항에 있어서, 상기 물질이 비타민, 영양소, 약물, 염료, 핵산 복합체 및 영상제로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

**청구항 28**

제27항에 있어서, 상기 물질이 약물인 방법.

**청구항 29**

제4항에 따른 중합체 중에서 생물학적 표적에 대한 결합 친화력을 유도하는 방법으로서, 표적화 부분을 상기 중합체 상에 존재하는 하나 이상의 반응성 작용기 X에 부착시키는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 30**

제29항에 있어서, 상기 생물학적 표적이 세포 또는 바이러스의 표면인 방법.

**청구항 31**

제30항에 있어서, 상기 표적화 부분이 수용체 특이적 리간드, 항체, 항체 단편, RGD 아미노산 서열을 포함하는 펩티드, YISRG 모티프를 포함하는 펩티드, 성장 인자, 시알산 유도체, N-아세틸뉴라민산 유도체, 폴레이트, 메토트렉세이트, 프테로산, 에스트라디올, 에스트라트리올, 테스토스테론, 만노스-6-포스페이트, 당, 비타민, 트립토판, 아미노알킬아다만탄, 푸제온(Fuzeon)<sup>TM</sup>, PRO-542, BMS-488043, 시알산, 2-데옥시-2,3-디데하이드로-N-아세틸뉴라민산, 4-구아니디노-Neu5Ac2en(자나미비어), 오셀타미비어 및 RWJ-270201로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

## 청구항 32

제31항에 있어서, 상기 표적화 부분이 단일 클론 항체 또는 항체 단편인 방법.

## 명세서

### 기술 분야

<1> 본 발명은 양쪽성 중합체 분야에 관한 것이며, 상세하게는 생체적합성 마이셀 형성성 콤형(comb-type) 중합체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 약물 가용화 및 표적화된 약물 전달 분야에 관한 것이다.

### 배경 기술

<2> 소수성 블록과 친수성 블록을 포함하는 양쪽성 블록 공중합체는 주변 용매가 달라짐에 따라 다양한 나노구조로 자기 조립되는 그 능력으로 인하여 최근 수년간 많이 연구되어 왔다[참고 문헌: Cameron et al., Can. J. Chem./Rev. Can. Chim. 77:1311-1326 (1999)]. 양쪽성 중합체의 소수성 부분은 수용액에서 자기 조립되어 물과의 접촉을 피함으로써 계의 자유 계면 에너지를 최소화하는 경향이 있다. 동시에, 친수성 블록은 수성 환경에서 수화된 "코로나"를 형성하여, 그 응집체가 열역학적으로 안정한 구조를 유지하게 된다. 그 결과, 소수성 코어와 친수성 코로나를 갖는 중합체 응집체 입자의 유액과 같은 안정한 콜로이드성 혼탁액이 형성된다.

<3> 콤형의 양쪽성 공중합체는 그 골격이 대체로 소수성이거나 친수성이고 반대 극성의 중합체 사슬이 골격으로 통합되는 것이 아니라 골격으로부터 현수(pendant)되어 있다는 점에서 블록 공중합체와 다르다. 콤형 공중합체는 소수성 골격 및 친수성 분지(Mayes et al., 미국 특허 제6,399,700호)와, 또, 친수성 골격 및 소수성 분지(Watterson et al., 미국 특허 제6,521,736호)를 사용하여 제조하여 왔다. 전자는 세포 표면 수용체에 대한 리간드의 다가 제시를 제공하는 데 사용되었고, 후자는 약물을 가용화하여 그것을 세포에 전달하는 데 사용되었다.

<4> 양쪽성 중합체 응집체는 불용성 약물을 가용화하기 위한 담체(carrier), 표적화된 약물 전달 수송체(vehicle) 및 유전자 전달 시스템으로서 연구되어 왔다. 이 응집체는 사슬 얹힘 및/또는 내부 소수성 영역의 결정도에 기인하여 종래의 저분자량 마이셀보다 더 안정한 구조를 갖는다. 상기 수송체의 중합체 특성은 응집체가, 보통의 리포솜이 그 임계 마이셀 농도 이하로 회석될 때 겪게 되는 붕괴에 대하여 비교적 영향을 받지 않도록 한다. 이들은 또한, 이중층 막이 없기 때문에 이들이 세포막과 더 쉽게 융합하여 그 적재물을 세포에 직접 전달할 수 있도록 한다는 점에서, 종래의 리포솜형 약물 전달 조성물보다 유리하다.

<5> 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG)의 우수한 생체적합성과, PEG로 코팅된 "스텔스(stealth)" 입자가 세망내피계를 피하는 명백한 능력으로 인하여, PEG를 혼입한 마이셀, 리포솜 및 중합체는 약물 전달 시스템을 위한 재료로서 널리 고려되어 왔다. 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG)을 PEG 지질의 친수성 성분으로서 사용하는 것(리포솜 및 마이셀을 형성함)에 관한 보고가 다수 있다[참고 문헌: Krishnadas et al., Pharm. Res. 20:297-302 (2003)]. 더 강한 "폴리머솜(polymersome)"으로 자기 조립되는 자기 조립형 양쪽성 블록 공중합체 역시 약물 가용화 및 전달을 위한 수송체로서 연구된 바 있다[Photos et al., J. Controlled Release, 90:323-334 (2003)]. 문헌[Gref et al., Int. Symp. Controlled Release Mater. 20:131 (1993)]; 문헌[Kwon et al., Langmuir, 9:945 (1993)]; 문헌[Kabanov et al., J. Controlled Release, 22:141 (1992)]; 문헌[Allen et al., J. Controlled Release, 63:275 (2000)]; 문헌[Inoue et al., J. Controlled Release, 51:221 (1998)]; 문헌[Yu and Eisenberg, Macromolecules, 29:6359 (1996)]; 문헌[Discher et al., Science, 284:113 (1999)]; Kim 등의 미국 특허 제6,322,805호; Seo 등의 미국 특허 제6,616,941호 및 Seo 등의 유럽 특허 EP 0583955호도 참조할 수 있다. 이러한 능력에 있어서 폴리(에틸렌이민)(PEI)의 사용도 보고된 바 있으며, 이 경우 올리고뉴클레오티드의 전달에 초점이 맞추어졌다[Nam et al., 미국 특허 제6,569,528호; Wagner et al., 미국 특허 출원 공보 제20040248842호]. 유사한 특징에 있어서, 문헌[Luo et al., Macromolecules 35:3456 (2002)]은 폴리뉴클레오티드의 전달에 적합한 PEG 접합 폴리아미도아민("PAMAM") 텐드리머에 관해 기술한다.

<6> 약물을 가용화, 분배 및 전달할 필요성 이외에도, 표적 조직, 종양 또는 장기에 특이적으로 위치시키는 표적화된 약물 전달 시스템이 요구되고 있다. 이것은 통상 표적 부위에 있는 세포벽에 대해 특이적 친화성을 갖는 항체 또는 다른 리간드의 부착에 의해 이루어진다. 그러나, PEG는 중합체 사슬의 말단을 제외하고는 작용기가 결여되어 있고, 말단기의 대부분은 불가피하게 다른 블록 공중합체 성분에 대한 결합에 이용된다. 이러한 이유로, PEG 블록 공중합체에 대한 항체 또는 세포 부착 분자 등의 표적화 부분의 부착은 일반적으로 비PEG 블록에 제한

되고 있으며, 상기 블록은 불행히도 자기 조립된 응집체의 코로나에서 일반적으로 노출되는 공중합체의 부분이 아니다.

- <7> 블록 공중합체의 중합체 응집체로의 자기 조립을 초래하는 상 분리 현상은 역전이 용이하며, 소수성 코어를 가교시킴으로써 응집체의 안정성을 증가시키기 위한 시도가 이루어진 바 있다(유럽 특허 EP 0552802호 참조). 블록 공중합체의 소수성 성분에 대한 약물의 공유 결합 역시 시도된 바 있다(Park and Yoo, 미국 특허 제 6,623,729호; 유럽 특허 EP 0397307호).
- <8> 응집체 외부에 표적화 부분을 부착시키는 데 이용될 수 있고 생체적합성이며 안정하고, 목적 세포 표적에 약물을 전달하는 데 효율적인 약물 전달 시스템이 요구되고 있다.

### 발명의 상세한 설명

#### [발명의 개요]

<10> 본 발명은 분지점 부분을 갖는 친수성 골격과 상기 분지점 부분에 부착된 소수성 분지를 포함하는 생체적합성 콤형 중합체 분자를 제공한다. 본 발명은 상기 중합체로부터 형성된 중합체 응집체의 수성 혼탁액을 제공하며, 약물, 염료, 비타민 등과 같은 불용성 또는 난용성 유기 화합물을 중합체 응집체의 소수성 코어 내로 혼입함으로써 상기 화합물을 가용화하는 방법을 제공한다. 수불용성 유기 종을 수성 용매에 가용화하는 방법은 기본적으로 수성 또는 혼합 수성 용매 중에서 수불용성 유기 종을 본 발명의 중합체와 접촉시키는 단계를 포함한다.

<11> 특정 실시형태에 있어서, 상기 분지점 부분은 표적화 부분을 위한 부착점으로서 이용될 수 있는 반응성 작용기를 더 포함한다. 특히 바람직한 실시형태에 있어서, 리간드 또는 항체와 같은 표적화 부분은 본 발명의 상기 중합체의 분지점 부분에 공유 결합되며, 약물은 응집체의 코어 내로 혼입되어 표적화된 약물 복합체를 형성한다.

<12> 본 발명은 또한 본 명세서에 기재된 콤형 중합체, 응집체 및 표적화된 약물 복합체의 제조 방법을 제공한다. 본 발명의 중합체는 약물을 효율적으로 가용화하고 분배하여 생체 내에 약물을 전달하며, 비독성이고 생체적합성이며, 안정하고, 복수의 세포 표적화 부분을 그 외부 표면 상에 보유할 수 있는 중합체 응집체로 자기 조립된다.

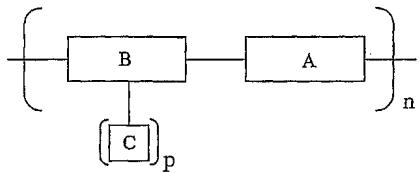
#### [도면의 간단한 설명]

<14> 도 1은 3종의 친지성 염료(A, 수단 IV; B, 디클로로플루오레세인; C, 스피릿(spirit) 가용성 에오신 Y)의 탈이온수 중의 포화 용액 샘플 20  $\mu\text{l}$ 를 실리카 겔 TLC 플레이트 상에 점적한 것을 도시한다. 윗열: 실시예 1의 50 mg/ml의  $\pi$ -중합체 함유; 아랫열:  $\pi$ -중합체 비함유.

<15> 도 2는 4종의 불용성 약물(1열, 페퓨린; 2열, 캄프토테신; 3열, 암포테리신 B; 4열, 독소루비신)의 탈이온수 중의 포화 용액 샘플 50  $\mu\text{l}$ 를 실리카 겔 TLC 플레이트 상에 점적한 것을 도시한다. 컬럼 A, 폴레이트화 중합체 A; 컬럼 B, 중합체 A, 컬럼 C, 중합체 비함유. 각 스팟 주변의 3개의 연필 표시는 플레이트 상에서의 용매의 확산 범위를 나타낸다. 컬럼 A와 B에서의 중심원은 실리카 내로 균일하게 분산되어 있으며, 이는 용액이 투명함을 나타내며; 컬럼 C에서의 중심원은 대체로 고형 침착물로 구성되어 있다.

#### [상세한 설명]

<17> 본 명세서에서 " $\pi$ -중합체"라고 칭한 본 발명의 중합체는 교호하는 분지점 부분 B와 친수성의 수용성 중합체 블록 A로 형성된 골격을 가지며 각 분지점 부분에 부착된 복수의 소수성 측쇄 C를 가지는 콤형 구조를 갖는다. 이 중합체는 화학식 1에 도시된 구조로 필수적으로 구성된다. 상기 측쇄 C는 비교적 짧은 소수성 부분이며, 상기 소수성 부분은 지방족 분자, 사슬 또는 올리고머일 수 있다. p의 값은 이상적으로는 2, 3 또는 4의 정수이다. 실제로, 측쇄는 화학 반응을 통해 불완전한 효율로 도입되는 것이 가장 일반적이며, 이로 인해 중합체 제조를 위한 p의 평균값은 대체로 의도한 정수가 아니게 된다. 정수가 아닌 평균값은 후술하는 것과 같은 디자인에 의해서도 얻을 수 있다. 따라서, 본 발명의 중합체에 있어서 p의 평균값은 1 초과 4 이하( $1 < p \leq 4$ )일 수 있다. 바람직한 실시형태에 있어서, p는 약 2~4이고, 가장 바람직하게는  $1.5 < p \leq 2$ 이다.



1

&lt;18&gt;

골격 중합체 블록 A는 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리(프로필렌 글리콜), 폴리(에틸렌 이민), 폴리(비닐 알코올), 폴리(비닐피롤리돈), 다당류 등을 포함하나 이에 한정되지 않는 친수성 및/또는 수용성 중합체 사슬로부터 선택된다. 바람직하게는, 상기 중합체 단위 A는 화학식  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-$ (식 중, m은 1~10,000, 바람직하게는 3~3,000임)의 폴리(에틸렌 글리콜) 사슬이다. 상기 중합체 사슬의 말단 작용기는 특성을 규명하지 않았으며 본 발명에 관련이 없다.

&lt;20&gt;

다양한 등급의 폴리(에틸렌 글리콜) 제조와 관련하여, 산업에서는, 이가 링커 부분(예를 들어, 비스페놀 A 디글리시딜 에테르)을 2개의 폴리(에틸렌 글리콜) 사슬에 커플링하여, 분자량 범위를 비교적 좁게 유지하면서 중합체의 분자량을 효과적으로 두배로 만드는 방법이 알려져 있다. 그 결과, 형성된 "폴리(에틸렌 글리콜)" 분자에는 중합체 사슬의 중간점에서 비글리콜 링커 부분이 개재된다[참고 문헌: 폴리(에틸렌 글리콜)-비스페놀 A 디글리시딜 에테르 부가 생성물, CAS 등록 번호 37225-26-6]. 고급 올리고머, 즉 2개의 비스페놀 A 디글리시딜 에테르 부분에 의해 분리된 3개의 PEG 사슬을 갖는 것 역시 알려져 있으며, 이에 대해서는 예를 들어 국제 특허 출원 WO 00/24008을 참조할 수 있다. 따라서 본 명세서에서 사용된 바와 바와 같이 "폴리(에틸렌 글리콜)" 및 "폴리(프로필렌 글리콜)"이란 용어는 비스페놀 A 디글리시딜 에테르, 비스페놀 B 디글리시딜 에테르, 비스페놀 S 디글리시딜 에테르, 하이드로퀴논 디글리시딜 에테르 등을 포함하나 이에 한정되지 않는 비글리콜 링커 단위를 통합한 폴리(에틸렌 글리콜) 및 폴리(프로필렌 글리콜) 중합체 사슬을 포함한다. 본 명세서의 목적상, 임의의 그러한 링커 부분은 "단량체 단위"로서 간주되지 않는다.

&lt;21&gt;

상기 중합체 블록 A는 가장 바람직하게는 평균 길이가 20~50 단량체 단위이다. 상기 폴리에틸렌 글리콜 사슬은 한쪽 또는 양쪽 말단에서 다른 부분에 대한 링커로서 사용하기에 적합한 작용기(아미노, 머캅토, 아크릴레이트, 아크릴아미드, 말레이이트, 말레이미드 등을 포함하나 이에 한정되지 않음)로 말단 치환될 수 있다. n의 값은 1~1,000이고, 바람직하게는 3~100이다. 상기  $\pi$ -중합체의 전체 분자량은 1,000~100,000 달톤 또는 그 이상일 수 있으며, 바람직하게는 2,000 달톤 이상, 더 바람직하게는 7,000 달톤 이상이다.

&lt;22&gt;

소수성 부분 C는 동일하거나 상이할 수 있으며, 예를 들어 선형 탄화수소 (하나 이상의 친수성 치환기로 임의로 치환됨), 다환 탄화수소(하나 이상의 친수성 치환기로 임의로 치환됨), 소수성 아미노산, 웨티드 및 중합체일 수 있다. 적합한 친수성 치환기로는 하이드록실, 에테르, 시아노 및 아미드 작용기를 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다.  $\omega$ -하이드록시,  $\omega$ -시아노,  $\omega$ -아미도 또는  $\omega$ -알콕시 치환기를 보유하는  $C_8-C_{20}$  알킬기가 특별히 고려된다. 이와 관련하여, "치환기"라는 용어는 소수성 부분 C의 탄화수소 사슬 또는 고리계의 탄소 원자를 O, N 또는 S와 같은 이종 원자로 치환하는 것을 포함한다. 따라서, 에테르 및 아미드 결합과 복소환 고리가 C로 통합될 수 있다.

&lt;23&gt;

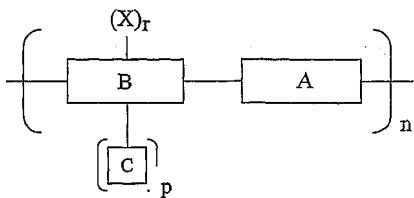
소수성 부분 C는 바람직하게는 비교적 짧은 ( $C_8-C_{20}$ ) 지방족 사슬이나, 짧은 올리고머일 수도 있다. 적합한 올리고머로는 올리고 하이드록시산, 예컨대 폴리(글리콜산), 폴리(DL-락트산), 폴리(L-락트산), 및 폴리(글리콜산)과 폴리(락트산)하이드록시산의 공중합체, 폴리(아미노산), 폴리(안하이드라이드), 폴리(오르토에스테르)와 폴리(포스포에스테르)의 공중합체, 폴리락톤, 예컨대 폴리( $\epsilon$ -카프로락톤), 폴리( $\delta$ -발레로락톤), 폴리( $\gamma$ -부티로락톤) 및 폴리( $\beta$ -하이드록시부티레이트)를 포함한다. 소수성 부분 C는 또한 소수성 분자, 예컨대 콜레스테롤, 콜산, 리토콜산, 소수성 웨티드 등으로부터 선택될 수 있다. 각각의 소수성 부분 C의 분자량은 40 초과, 바람직하게는 50~1,000, 가장 바람직하게는 100~500이다. 일반적으로, 분자 형태 C-H일 때 물에 현저히 용해되지 않는 임의의 소수성 부분 C는 본 발명에 사용하기에 적합한 것으로 생각된다.

&lt;24&gt;

측쇄 C가 중합체 사슬을 따라 규칙적이고 균일하게 분포되지 않고 오히려 클러스터  $[C]_p$ 로 나타나는 것은 본 발명의 콤형 중합체의 두드러진 특징이다. 이러한 클러스터는 중합체 단위 A의 단분산성(monodispersity) 정도에 따라 중합체 사슬을 따라 다소 규칙적으로 이격되어 있다. 따라서, 공통의 분지화 부분 B에 부착된 2개의 측쇄

C 사이의 간격은 상이한 분지화 부분에 부착된 2개의 측쇄 사이의 간격과 다르다.

<25> 본 발명의 제2 실시형태에 있어서, 상기 분지점 부분 B는 하나 이상의 반응성 작용기 X를 더 포함하며, 상기 종합체는 하기 화학식 2에 도시된 구조로 필수적으로 구성된다.



2

&lt;26&gt;

상기 화학식 2에서, 개개의 반응기 X는 서로 동일하거나 다를 수 있으며, 종합체 2의 조립 과정 중에 필요하다면 경우에 따라 차단 또는 보호될 수 있다. r의 평균값은 0(X 기 없음)~약 4이다. 일반적으로, 상기 반응기는 문자 종 사이의 공유 결합을 형성하기에 유용한 것으로 당업계에 알려진 작용기로부터 선택된다. X기는 약물 분자, 조직 또는 세포 표적화 부분, 바이러스 표적화 부분, 또는 매트릭스 부착 부분(예를 들어, 스텐트 또는 다른 의료 디바이스의 표면을 코팅하기 위한 목적으로)에 대한 부착점으로서의 역할을 한다. 특정 실시형태에 있어서, 부착점 X가 하나 존재할 수 있다. 다른 실시형태에 있어서, 3종 또는 4종의 상이한 유형의 반응기가 존재할 수 있다. 상기 매트릭스 부착 부분은 공유 결합, 특이적 비공유 상호작용[예를 들어, 항체-항원 또는 비특이적 상호작용(예를 들어, 이온 쌍 형성 또는 "소수성" 상호작용을 통해)을 통해 매트릭스에 부착될 수 있다. 적합한 반응기 X는 -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, -CHO, -HNH<sub>2</sub>, -COOH, -CONHNH<sub>2</sub>, 할로아실, 아세토아세틸, -CN, -OCN, -SCN, -NCO, -NCS 등; 반응성 이중 결합, 예컨대 비닐 결합, 아크릴 결합, 알릴 결합, 말레 결합, 신남 결합 등과, 반응성 삼중 결합을 갖는 기, 예컨대 아세틸렌카복시 및 아세틸렌카복스아미도[미카엘(Michael) 첨가 반응, 딜스-알더(Diels-Alder) 반응 및 자유 라디칼 첨가 반응에 적합함]를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

&lt;28&gt;

대표적인 세포 표적화 부분으로는 수용체 특이적 리간드, 항체 및 기타 표적화 부분, 예컨대 아르기닌-글리신-아스파르트산(RGD) 아미노산 서열 또는 티로신-이소루신-세린-아르기닌-글리신(YISRG) 모티프를 보유하는 웨티드; 상피 세포 성장 인자, 혈관 내피 세포 성장 인자 및 섬유아세포 성장 인자를 비롯한 성장 인자; 바이러스 표면 리간드, 예컨대 시알산 및 N-아세틸뉴라민산 유도체; 세포 수용체 리간드, 예컨대 폴레이트(folate), 메토트렉세이트, 프테로산, 에스트라디올, 에스트라트리올, 테스토스테론 및 기타 호르몬; 만노스-6-포스페이트, 당, 비타민, 트립토판 등을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 항체는 세포 특이적 표면 항원에 대한 단일 클론 항체인 것이 바람직하며; 적합한 표적화 부분은 완전한 항체뿐 아니라 활성 항원 결합 서열을 포함하는 항체 단편, 예컨대 Fab'2 단편, Fab' 단편 또는 상기 항체의 활성 항원 결합 서열의 단쇄 웨티드 유사체를 포함한다.

&lt;29&gt;

바이러스 표적화 부분의 예로는 바이러스에 결합하는 소분자 리간드, 예컨대 아미노알킬아다만탄, 푸제온(Fuzeon)<sup>TM</sup>, PRO-542, BMS-488043, 시알산, 2-데옥시-2,3-디데하이드로-N-아세틸뉴라민산, 4-구아니디노-Neu5Ac2en(자나미비어), 오셀타미비어, RWJ-270201 등; 바이러스 표면에 결합하는 올리고웨티드, 올리고당 및 당웨티드와, 바이러스 특이적 표면 항원에 대한 항체 및 항체 단편을 포함한다. 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명은 바이러스 뉴라미니다제 또는 헤마글루터닌에 대한 리간드를 보유하는 π-종합체를 제공한다. 상기 종합체가 스스로 항바이러스 특성을 나타낸다는 것은 잘 확립되어 있다[참고 문헌: T. Masuda et al., Chemical & Pharmaceutical Bulletin 51:1386-98 (2003); M. Itoh et al., Virology 212:340-7 (1995) 및 Reece et al., 미국 특허 제6,680,054호 (2004)]. 본 발명의 항바이러스 종합체 및 종합체 응집체의 소수성 코어에는 경우에 따라, 바이러스 입자 부근에서 방출되는 것이 유익한 1종 이상의 종래의 항바이러스 약물이 장입될 수 있다.

&lt;30&gt;

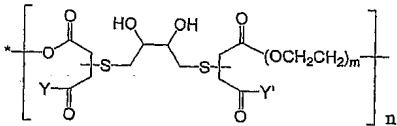
의학적 관련성이 있는 다른 부착기는 소형 화학 물질, 웨티드, 항체 또는 항체 단편, 효소, 또는 생물학적 과정에 영향을 줄 수 있는 약리 활성 성분, 예컨대 호르몬 또는 호르몬 효현체 또는 길항체, 바이러스 결합에 간섭하는 물질, 세포 내로 진입한 후 세포 주기 또는 세포내 과정에 간섭하는 물질 등일 수 있다. 박테리아, 진균류, 고등 동물 및 식물을 비롯한 단세포 및 다세포 유기체의 세포가 표적이 될 수 있다. 비오틴은 상기 π-종합체에 부착되어 아비딘 및 스트렙타비딘 커플링 단백질, 웨티드 및 기타 표적화 또는 약리 활성 물질, 예컨대 항체, 성장 호르몬, 영상제(imaging agent) 등에 대한 부착점으로서 사용될 수 있다.

&lt;31&gt;

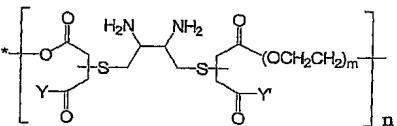
"매트릭스"란 유기 또는 무기 물질, 표면 및 침착물, 예컨대 유리, 실리카 또는 금속 표면, 세포외 매트릭스, 단백질 침착물, 예컨대 다양한 유형의 아밀로이드 플라크, 세포 표면, 바이러스 표면과, 프리온을 비롯한 충분

히 규명되거나 규명되지 않은 총체적인 균질 또는 불균질 표면을 말한다.

- <32> 유리 또는 실리카 매트릭스 부착 부분의 예로는 각종 할로실란, 알콕시실란, 아실실란과, 중합체를 비롯하여 그러한 작용기를 보유하는 화학 물질을 들 수 있다. 그 밖의 부착기는 매트릭스의 특정 물리화학적 특성에 기초하여 고안할 수 있다. 적합한 부착 부분, 예를 들어 스텐트의 코팅에 사용되는 것은 당업자에게 알려져 있다.
- <33> 본 발명의 제3 양태에 있어서, 상기 분지점 부분 B는 중합체 사슬 내의 다른 어느 곳의 분지점 부분에 결합되어, 가교된 하이드로겔 구조를 형성한다. 그러한 가교는 중합체를, 동종 작용기 또는 이종 작용기(이중 적어도 하나는 X 기 또는 제1 분지점 부분 상에 위치하는 C 상의 반응기와 반응하고, 이중 적어도 하나는 X, 또는 제2 분지점 부분에서 C 상에 존재하는 반응성 작용기와 반응함)를 포함하는 다작용성 부분과 반응시켜 수행할 수 있다. 가교는 또한 중합체 사슬 A의 말단 작용기에의 결합을 통해 행할 수도 있다. 그러한 가교 중합체는 경우에 따라 약물 분자 또는 표적화 부분의 부착에 적합한 반응성 작용기를 포함할 수 있다.
- <34> 분지점 부분 B는 일반적으로 복수의 반응기를 갖는 다작용성 분자로부터 유도되며, 상기 반응기 중 2개는 친수성 중합체 단위 A에의 부착에 적합하고 상기 반응기 중 2개는 소수성 부분 C의 부착에 적합하다. 상기 부분 B는 경우에 따라 전술한 것과 같은 추가의 반응기 X를 가질 수 있다.
- <35> 특히 바람직한 분지점 부분은 디티오토레이톨(DTT), 디티오에리트리톨(DTE), 또는 2,3-디아미노부탄-1,4-디티올과 2 분자의 말레산과의 접합체이다. 상기 분지점 부분과 상기 부분 A로서의 폴리에틸렌 글리콜의 조합은 하기 화학식 3 및 3a의 중합체 골격을 형성한다.



3



3a

&lt;36&gt;

- <37> 상기 식에서, Y 및 Y'은 동일하거나 상이할 수 있으며, 바람직하게는 OH, NH<sub>2</sub>, ONH<sub>2</sub>, NHOH 및 NHNH<sub>2</sub>로부터 선택된다. 바람직한 실시형태에 있어서, 디티올의 하이드록시 또는 아미노 기는 표적화 또는 약물 부분에 대한 부착점으로서 이용되는 반응기 X인 한편, 작용기 Y 및 Y'은 상기 C 부분에 대한 부착점으로서 이용된다. 대안으로, 상기 기 Y 및 Y'이 부착점으로서 이용되고 하이드록실 또는 아미노 기가 C 부분을 부착시키는 데 이용된다.

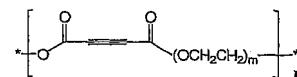
&lt;38&gt;

- 화학식 3 및 3a는, 각각의 황 원자가 독립적으로 PEG 에스테르 카보닐기에 알파 또는 베타 결합될 수 있음을 시사하는 것으로 의도된다. 본 발명은 단독 이성질체 조성물과 한쪽 또는 양쪽 C-S 결합에서의 위치 이성질체의 혼합물을 포함한다. 또한, 화학식 1에서의 4개의 비대칭 탄소로 인하여, 본 발명은 모든 키랄, 메소 및 부분임체 이성질체와 그 혼합물을 포함한다.

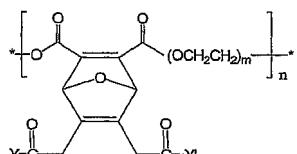
&lt;39&gt;

- 아세틸렌 디카복실산과 퓨란의 딜스-알더 부가 생성물 역시 적합한 분지점 부분으로서 이용될 수 있다. 예를 들어, PEG 및 아세틸렌디카복실산으로부터 유도된 폴리에스테르(4)는 퓨란과 딜스-알더 반응을 겪는 것으로 알려져 있다[M. Delerba et al., Macromol Rapid Commun. 18(8):723-728 (1997)].

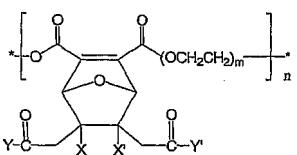
## 반응식 1



4



[ 산화 ]

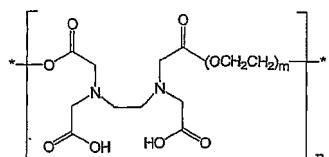


5

<40> 따라서, 이것을 3,4-이치환 퓨란과의 딜스-알더 반응에 적용하여 중합체(5)와 같은 종을 생성하고, 이 중합체(5)를 하이드록시화 또는 에폭시화로 개질하여 반응기(예를 들어, 반응식 1에서의 X 및 X')를 제공할 수 있다.

&lt;41&gt;

유사하게, PEG와 에틸렌디아민 테트라아세트산 이무수물과의 반응은 하기 화학식 6의 폴리에스테르를 제공한다.



6

&lt;42&gt;

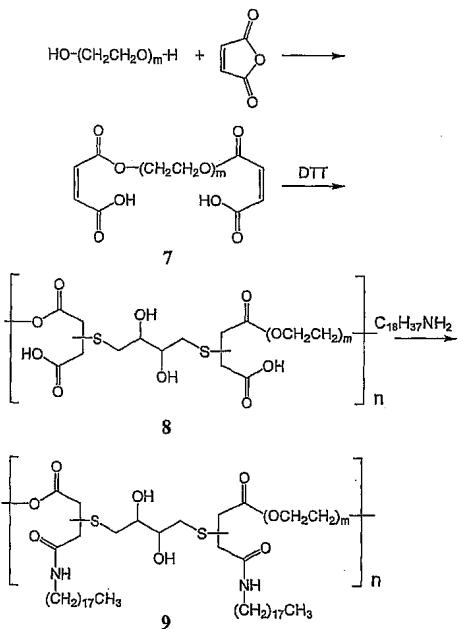
<43> 다른 적합한 분자점 부분은 타르타르산, 아세틸렌디카복실산, 니트릴로트리아세트산, 3,4,3',4'-디페닐 셀폰 테트라카복실산 이무수물, 3,4,3',4'-디페닐 에테르 테트라카복실산 이무수물, 피로멜리트산 이무수물, 알칸디티올, 예컨대 1,2-에탄디티올 및 1,4-부탄디티올, 비스(2-머캅토에틸)에테르, 2-머캅토에틸설파이드, 디머캅토프로판올, 디머캅토퓨린, 디머캅토티아디아졸, 디머캅토숙신산, 벤젠티아세트산, 벤젠티올, 이 할로겐화 벤젠티메탄티올, 이 할로겐화 4,4'-티오비스벤젠티올 등으로부터 유도될 수 있다.

&lt;44&gt;

Y 및 Y'이 OH인 경우, 소수성 기 C는 카복실산기의 아미드화 또는 에스테르화에 의해 중합체에 결합될 수 있다. 상기 소수성 기 C는 바람직하게는 비교적 작고( $C_8-C_{20}$ ) 주로 탄화수소 부분이며, 선형 또는 분지형일 수 있거나, 하나 이상의 고리를 포함할 수 있다. 그 예로는 공유 결합된 도데실아민, 펜타데실아민, 콜레스테롤 및 콜산 부분을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 편의상 본 발명의 중합체를 최대 2개의 상이한 소수성 측쇄를 갖는 것으로 예시하였지만, 다양한 소수성 측쇄를 특정 중합체에 도입하는 데 2종 이상의 소수성 화합물의 혼합물이 이용될 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

&lt;45&gt;

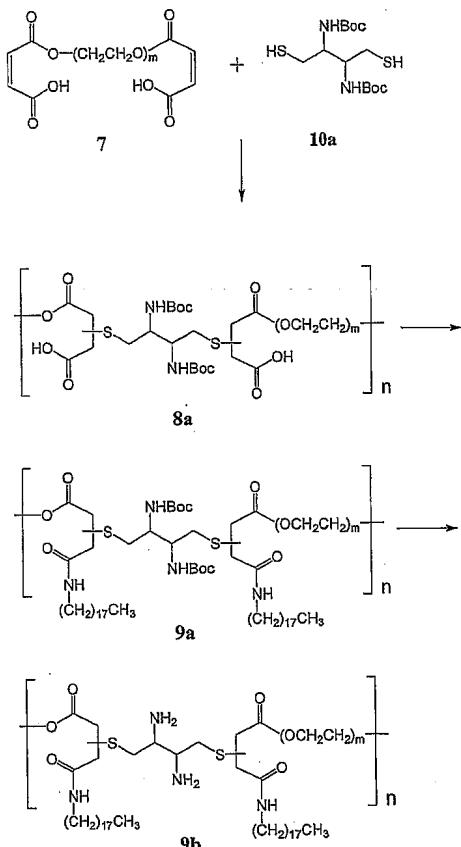
일 특정 예로서, 화학식 2(식 중, X는 OH이고 r은 2임)의 중합체는 폴리에틸렌 글리콜을 말레산 무수물과 반응시켜 폴리에스테르(7)를 형성하고 그 후 디티오프레이틀과 반응시켜 화합물(8)을 형성함으로써 제조하였다. 그 후 산(7)을 옥타데실아민으로 아미드화하여 목적 콤형 중합체(9)를 형성하였다(반응식 2). 화학식 9로 표시되는 DTT 유도 아미드 콤형 중합체는 본 명세서에서 " $\pi$ -중합체 A"라고 칭하며; 반응식 2의 특정 중합체(9)는 " $C_{18}-\pi$ -중합체 A"라 칭한다.

**반응식 2**

&lt;47&gt;

&lt;48&gt;

디티오트레이톨을 2,3-비스(t-부톡시카보닐아미노)부탄-1,4-디티올(DuPriest 등이 미국 특허 제4,755,528호의 방법으로 제조함)로 치환하면 탈보호 후 상응하는 아미노 작용기화된 π-중합체(9b)가 생성된다(반응식 3).

**반응식 3**

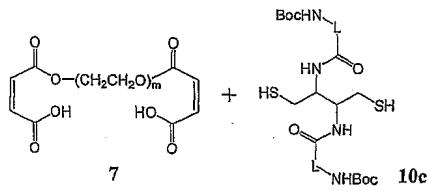
&lt;49&gt;

&lt;50&gt;

부탄디티올(10c)의 사용 역시 표적화 부분의 후속 부착을 위한 자리에 스페이서 기 L을 갖는 일반 구조식(9C)의 중합체를 생성한다. 상기 스페이서 기 L은 C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> 알킬렌 및 올리고(에틸렌 글리콜) 스페이서를 포함하나 이에

한정되지 않는, 기질 분자에 리간드 또는 라벨을 부착하는 데 사용하기 위한 당업계에 공지된 임의의 스페이서 기일 수 있다.

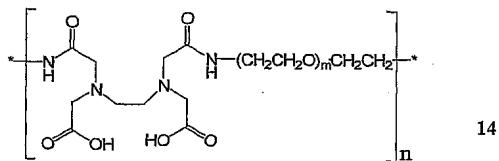
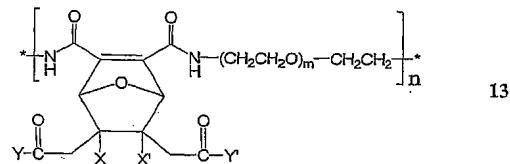
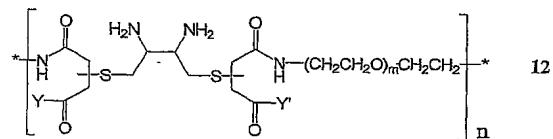
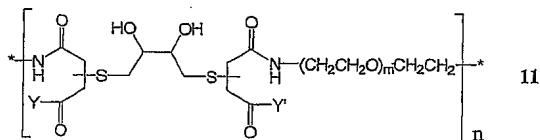
#### 반응식 4



&lt;51&gt;

&lt;52&gt;

다른 실시형태에 있어서, 하기 구조식 10~14에 도시된 바와 같이, A 단위와 B 단위 사이에 아미드 결합을 갖는 예를 제조하는 데 말단 아미노기를 갖는 PEG 중합체를 사용할 수 있다. 이러한 폴리아미드 각각은 PEG 디아민 H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>와 적절한 환형 무수물과의 반응을 통해 유도할 수 있다.

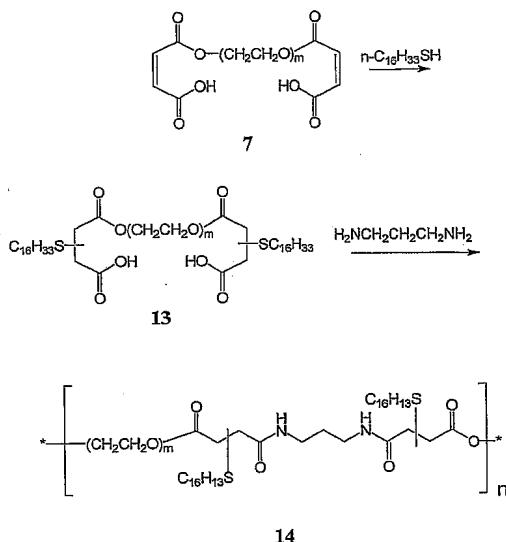


&lt;53&gt;

&lt;54&gt;

온화한 조건 하에서는 상기 아미도 산이 예상 생성물이다. 가열시, 이미드 형성을 예상할 수 있으며, 반응기 수는 적지만 소수성 C 부분의 부착에 여전히 적합한 중합체가 형성된다. 대안으로, 상기 현수형 측쇄 C는 중합체 A 블록의 말단에 첨가될 수 있으며, 상기 분자점 부분은 중합시에 생성될 수 있다(반응식 5).

## 반응식 5

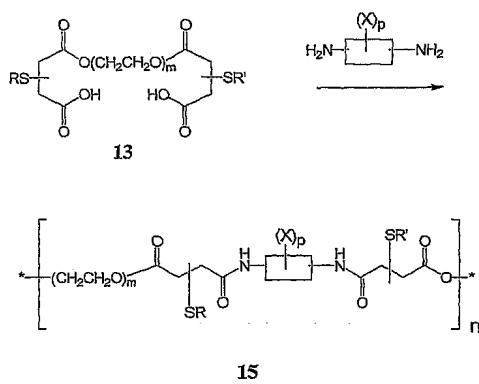


&lt;55&gt;

&lt;56&gt;

반응식 5에 도시된 것과 같이, 1,3-디아미노프로판과 같은 단순한 디아민 이외에도, (경우에 따라 차폐된) 반응성 작용기 X를 갖는 디아민을 이용할 수 있으며, 이는 표적화 부분의 부착에 적합한 중합체(15)를 형성한다(반응식 6). 하기 화학식에서, p는 0~4일 수 있으며, 각각의 X는 독립적으로 존재할 수 있는 임의의 다른 기 X와 동일하거나 상이하다. 반응기 X는 현수형일 필요는 없지만, 예를 들어, 단량체  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$ 에서와 같이, 디아민을 구성하는 원자의 사슬 내의 NH 기일 수 있다.

## 반응식 6



&lt;57&gt;

&lt;58&gt;

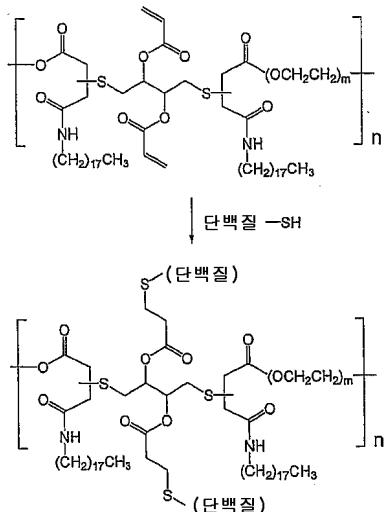
상기와 같이 제조한  $\pi$ -중합체 중 특정한 것은 소분자, 펩티드, 뉴클레오티드, 당, 항체 등과 같은 표적화 부분에의 부착을 위해, 또는 이가 또는 다가 가교제를 통한 중합체 사슬의 가교를 실시하기 위해, 추가 유도체화에 적합한 반응기 X를 보유한다. 특정 실시형태에 있어서, 중합체 사슬 상의 반응기의 부분 유도체화를 수행하여, 다양한 표적화 부분과 약물 부분을 단일 중합체 사슬에 부착할 수 있도록 각종 상이한 반응기를 갖는  $\pi$ -중합체를 생성한다. 따라서, 실시예 1의  $\pi$ -중합체에 아화학량의 아크릴로일 클로라이드(또는 말레산 무수물)을 첨가하면 아크릴로일(또는 말레일) 기와 잔류 하이드록실기를 둘 다 갖는 중합체가 형성된다. 아화학량의 머캅토-카복실산, 예를 들어  $\text{HS}-(\text{CH}_2)_3-\text{COOH}$ 의 후속 미카엘 첨가는 하이드록실, 아크릴로일 및 카복실 기를 갖는 중합체를 형성한다. 시스테인의 첨가는, 아화학량의 반응제에 의해 남겨진 임의의 잔류 반응기 이외에도, 아미노 및 카복실 기를 도입한다.

&lt;59&gt;

다작용성  $\pi$ -중합체를 얻기 위한 또 다른 방법은 소수성 사슬 C 부분의 생략을 검토하는 것을 포함한다. 예를 들어, 실시예 1의  $\pi$ -중합체는 아미드화 단계에서 현수형 알킬아민의 양을 제한하는 단순한 조치로 미반응 카복실산기를 갖도록 제조할 수 있다. 또 다른 방법은 아민의 혼합물(그 일부는 반응기 X를 포함함)에 의한 아미드화이다. 또한, 적절한 조건(단계 A에서의 과잉 말레산 무수물과 단계 B에서의 과잉 DTT) 하에, 원하는 유리 티울기 집단을 갖는 중합체 제제를 생성할 수 있다.

<60> 실시예 1의  $\pi$ -중합체는, 계획적으로, 반응기 X로서 이용되는, 골격 내의 DTT 부분으로부터 유도된 하이드록실기를 포함한다. 수성 매질 중에서 카보네이트/바이카보네이트 완충액 존재 하에서의 아크릴로일 클로라이드 또는 메타크릴로일 클로라이드에 의한 상기 기들의 에스테르화는 -OH 기 상의 아크릴로일 치환을 초래한다. 아크릴화된 중합체는 (아크릴 화합물과 같은) 라디칼 단량체 또는 비스아크릴 화합물과 같은 가교제를 첨가하거나 첨가하지 않아도) 라디칼 중합이 용이하여, 제어된 약물 전달용(중합체 데포우 또는 저장기로서 이용됨)과 국소 도포용(예컨대 피부 패치 또는 연고)에 적합한 하이드로겔을 얻을 수 있다.

### 반응식 7



&lt;61&gt;

<62> 아크릴기 역시 미카엘 첨가 반응에, 특히 티올, 예컨대 단백질, 효소, 웨티드, 항체, Fab'2 단편 또는 Fab' 단편 또는 다른 표적화 부분의 시스테인 잔기의 티올과의 미카엘 첨가 반응에 이용될 수 있다(반응식 7). 반응성 하이드록실기를 보유하는  $\pi$ -중합체는 또한, 건조 후, 말레산 무수물로 에스테르화하여, 미카엘 수용체(acceptor)인 말레이이트기를 부착시키고 동시에 유리 카복실기를 생성할 수 있다. 생성된 중합체에서, 말레이 중 결합은 미카엘 첨가 반응에, 특히, 티올, 예컨대 단백질, 효소, 웨티드, 항체, Fab'2 단편 또는 Fab' 단편 또는 다른 표적화 부분의 시스테인 잔기의 티올과의 미카엘 첨가 반응에 이용될 수 있으며(반응식 8), 카복실기는 약물 또는 리간드의 아미노기, 또는 단백질 및 웨티드의 리신 잔기에의 커플링에 이용될 수 있다.

&lt;63&gt;

아미드화를 통해 새로 도입된(또는 이전부터 이용 가능한) 카복실기에 상이한 부분이 추가로 부착될 수 있다. 따라서, 포화 반응 조건에서도(즉, 부착하고자 하는 부분이 화학량론적 과잉량으로 존재하는 경우에도) 2종 이상의 상이한 표적화 부분이 부착될 수 있다.

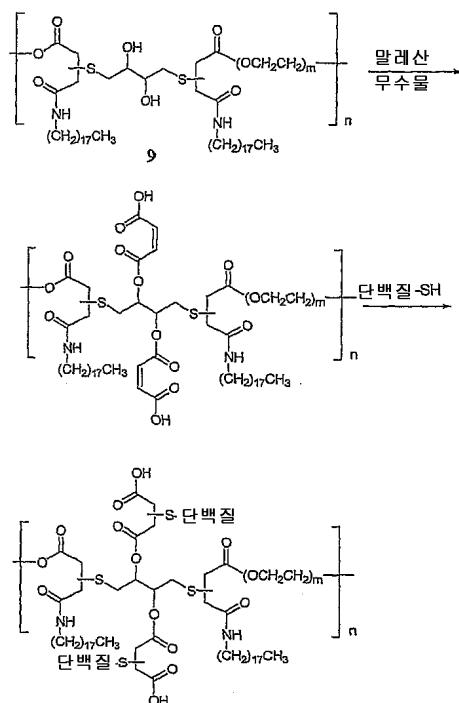
&lt;64&gt;

현수형 카복실레이트기를 보유하는 중합체는 전형적인 커플링 조건 하에 아민으로 아미드화할 수 있으며, 이것은 또한 커티스(Curtius) 재배열 반응을 통해 이소시아네이트기로 전환시키고, 그 후 아민 또는 알코올과 커플링하여 각각 요소 및 카바메이트를 형성할 수 있다. 이러한 반응은 소수성 기 C를 도입하거나, 표적화 부분을 부착시키는 데 이용될 수 있다.

&lt;65&gt;

반응기 중 하나와 디아민을 적어도 부분적으로 반응시킴으로써 중합체 내에 유리 아민을 도입할 수 있다. 상기 디아민은 아민기 중 하나가 보호되거나 반응 조건 하에 비반응성이 되도록 선택되어야 한다. 후자는 대개 pH 약 7.5의 에틸렌디아민을 사용함으로써 수행할 수 있는데, 그 이유는 2개의 아미노 기의 pKa가 크게 다르기 때문이다. 바람직하게는, 상기 아미드화는 소수성 현수기의 도입 후에 별도의 단계로서 수행한다. 그 후 웨티드, 또는 카복실기를 갖는 다른 분자를 상기 유리 아민에서의 아미드화로 부착시킬 수 있다.

## 반응식 8



&lt;66&gt;

<67> 따라서, 포화 조건 하에서도, 3종의 상이한 웨პ티드 또는 다른 표적화 부분을 하나는 티올을 통해, 하나는 아민 또는 하이드록실을 통해, 하나는 카복실산기를 통해  $\pi$ -중합체에 부착시킬 수 있다.

&lt;68&gt;

하이드록실 및 티올 기는 또한 아지리딘 또는 할로알킬 아민(예컨대 브로모에틸아민 또는 클로로에틸아민)과의 반응에 의해 1차 아민으로 전환시킬 수 있다. 시스테아민에 의한 아미드화는 디설파이드를 도입하며, 이는 웨პ티드 또는 항체의 시스테인과 직접 반응하여 웨პ티드 또는 항체를 부착시킬 수 있으며; 또는 예를 들어 웨პ티드 또는 항체와의 추가 반응을 위해 아미노에탄티올 또는 DTT로 먼저 환원시킬 수 있다.

&lt;69&gt;

부분 반응을 수행함으로써, (1) 티올 반응기, 예컨대 아크릴산 또는 말레산 유도체, (2) 카복실산 반응기, 예컨대 아미노 또는 하이드록실, (3) 아민 반응기, 예컨대 카복실 및 (4) 디설파이드 반응기, 예컨대 머캅토를 포함하거나 이에 한정되지 않는 추가의 반응성 작용기를 본 발명의 중합체에 도입할 수 있다. 중합체 분자당 그와 같이 첨가되는 작용기의 수는 사용되는 반응제와 사용되는 양에 따라  $1/r$  내지  $r$ 의 몇 배가 될 수 있다.

&lt;70&gt;

대안으로, 예를 들어 바이러스 또는 세포 표면에의 결합의 특이성을 향상시키기 위해 2종 이상의 특이적 리간드를 부착시킬 수 있다. 또한, 상이한 세포 표적 간의 상호작용을 유발할 수 있도록 2종 이상의 특이적 리간드를 사용할 수 있는데, 예를 들어 제1 리간드는 바이러스 입자를 표적으로 하고, 제2 리간드는 식세포에의 결합을 촉진함으로써 바이러스 입자를 식세포 부근으로 이동시키거나 그와 접촉시켜 식작용을 촉진할 수 있다.

&lt;71&gt;

상기 유도체화는 상이한 작용기 부착(예컨대 아민, 카복실레이트 및 티올)을 통해 3종 이상의 상이한 표적화 및 /또는 치료 부분을 중합체에 부착시킨다. 따라서, 조직 특이적 표적화제, 영상제 및 치료제를 단일 중합체 사슬에 부착시킬 수 있으며, 이어지는 중합체의 자기 조립에 의해 표적화 분포 및 효율을 모니터할 수 있는 표적화된 치료제가 산출된다.

&lt;72&gt;

리간드가 본 발명 중합체의 반복 단위에 부착되면 중합체 사슬과 나노입자 표면 상에 리간드의 다가 표시(multivalent display)가 이루어진다. 다가 표시는 대개 표적에 대한 친화력을 크게 증가시킨다. 예를 들어, 다가 항체는 보통의 이가 항체보다 그 표적의 제거에 있어서 훨씬 더 효과적일 수 있다. 탄수화물 결합성 단백질 및 탄수화물은 그 특성이 다가이며 일가라면 비효과적인 것으로 알려져 있다. 마찬가지로, 다가 웨პ티드 및 탄수화물 표적화 부분은 단량체 단독에 비해 훨씬 더 효과적이다. 중합체에의 부착으로 인한 MW의 증가는 웨პ티드 및 다른 리간드의 신장 제거율을 감소시킨다. 또한, PEG 골격은 면역 감시의 회피를 비롯하여 PEG화와 유사한 웨პ티드 이익을 제공한다.

&lt;73&gt;

또한, 다가 표적화 부분은 다가 표적(예를 들어, 바이러스 입자)을 수식하여, 그것을 단량체(monomeric) 표적화

부분보다 훨씬 더 효과적으로 중화시킨다. 다가 형태로서 복수의(상이한) 웨티드를 표시하는 능력으로 인해 특이성이 증강된다. 예를 들어, 순수한 HIV 특이적(HIV 바이러스 결합성) 중합체는 CD4 결합 영역에 상응하는 제1 웨티드와, 바이러스의 CCR-5 또는 CXCR-4 결합 영역에 상응하는 제2 웨티드와, 가능하게는 다른 수용체(각각 CXCR-4 또는 CCR-5)에 상응하는 제3 웨티드를 부착시킴으로써 형성할 수 있다. 상기 중합체는 바이러스의 결합 영역을 완전히 차폐하여 그 바이러스가 세포에 부착할 수 없도록 하여 비감염성이 되도록 할 수 있다. 또한, 중합체의 계면활성 특성은 결합시 바이러스 구조 자체의 불안정화를 초래한다. 웨티드 대신에, 동일한 결합 패턴(CD4, CCR-5, CXCR-4)을 간접하는 소분자, 또는 바람직하게는 상보 활성을 갖는, 웨티드와 소분자의 혼합물을 이용할 수 있다. 생성된 중합체는 임의의 자유 바이러스를 무력하게 하기 때문에, 이것을 콘돔 유통제 등의 성분으로서 사용하게 되면 감염 확산을 막는 데 이상적일 수 있다. 또한, 상기 중합체는 HIV 존재량(burden)을 감소시키기 위해 환자에게 주사될 수 있다.

<74> 일반적으로, DTT와 같은 다작용성 시약이 사용될 경우, DTT에 의한 카복실산의 에스테르화 또는 유사한 부반응을 통해 중합체 사슬의 부분적 가교가 발생할 수 있다. PEG 사슬의 중심 영역 내의 2차 하이드록실기, 예를 들어 비스페놀 A 디글리시딜 에테르 잔기와 회합된 것 역시, 이것이 PEG 출발 물질 내에 존재할 경우, 가교에 기여할 수 있다. 그렇게 생성된 가교된 하이드로겔 구조체 역시 유용한 재료이다. 예를 들어, 상기 가교의 정도를 적절하게 증가시키거나 대안의 가교제(예를 들어, 비스옥시란)를 이용한 확실한 가교에 의해, 약물의 저장 데포우로서 이용될 수 있는 가요성 하이드로겔인 재료를 제조할 수 있다. 재료를 적절히 개질함으로써(예를 들어, PEG 길이를 줄이고, 열린 카복실기를 증가시키고, 적절한 아크릴기를 도입함으로써), 스텐트와 같은 디바이스 상에 고정화되거나 접착 패치 또는 피하 삽입 패치용 패드와 같은 디바이스에 흡수되어 지지될 수 있는 저장기로서 이용될 수 있는 선형 또는 가교형 하이드로겔 재료를 제조할 수 있다. 일반적으로, 상기 가교형 재료는 강화된 표적화 방출보다는 제어 방출에 적합하다.

<75> 본 발명의 콤형 중합체는 수성 용매계에서 수난용성 물질을 가용화하는 데 유용하다. 수성 용매에 물질을 가용화하는 방법은 수중에서 난용성 물질을 본 발명의 콤형 중합체와 접촉시켜, 물질과 중합체의 수용성 복합체를 형성하는 단계를 포함한다. 대안으로, 가용화하고자 하는 물질과 중합체를 2상의 수계-유기계 혼합선 중에서 배합하고, 중발로 유기 용매를 제거할 수 있다. 대표적인 방법은 본 명세서에서 참고 문헌으로 인용하는 미국 특허 제6,838,089호에 기재되어 있다. 대부분의 경우, 중합체는, 입자의 코어에서 유착되는 소수성 C 사슬 중에 난용성 물질이 용해되어 있는 나노입자로 자기 조립되는 한편, A 블록은 계면 자유 에너지를 충분히 낮추어 수성 입자 혼탁액이 안정하게 유지되도록 하는 친수성 코로나를 형성하는 것으로 생각된다.

<76> 일부 경우, 난용성 물질은 코어 내에 완전히 용해되는 것은 아니나, 나노입자의 코어에서 C 사슬에 의해 둘러싸여 혼탁된 고체 나노입자로서 존재할 수 있다. 본 발명의 목적상, 이것은 정도의 차이인데, 왜냐하면 본 발명의 입자는 난용성 물질과 C 사슬의 임의의 특정 혼합 정도에 의존하지 않기 때문이다. 상기 물질은 어떤 경우에는 C 사슬 중에서 분자 수준으로 용해될 수 있으나, 다른 경우에는 C 사슬 환경으로부터의 임의의 상 분리 정도를 나타낼 수 있다. 어떤 경우에는, 그 계가 온도의 함수로서 한 상태에서 다른 상태로 이행하는 것을 예상할 수 있다.

<77> 중합체 입자의 소수성 코어의 가용화력은 소수성 C 부분을 개질시킴으로써 변경할 수 있다. 적절한 개질법으로는 소수성 코어의 극성 및/또는 분극률을 증가시키기 위해 하나 이상의 친수성 치환기, 예컨대 하이드록실, 에테르, 아미드 및 시아노 작용기를 도입하는 방법을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

<78> 상기 중합체에 의해 가용성으로 될 수 있는 난용성 물질로는 지용성 비타민 및 영양소(비타민 A, D, E 및 K, 카로틴, 콜레칼시페롤 및 조효소 Q를 포함하나 이에 한정되지 않음); 불용성 약물, 예컨대 도세탁센, 암포테리신 B, 니스타틴, 파클리탁센, 독소루비신, 에피루비신, 루비테칸, 테니포사이드, 에토포사이드, 다우노마이신, 메토트랙세이트, 미토마이신 C, 사이클로스포린, 이리노테칸 대사물질(SN-38), 스타틴 및 스테로이드; 염료, 광역학 물질 및 영상제, 및 핵산, 핵산 유사체와, 핵산 복합체를 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 핵산 유사체는 티오포스페이트 및 웨티드 핵산과 같은 종들을 포함하며; 핵산 복합체는 실질적으로 전하를 중화시키는 양의 양이온성 또는 다가 양이온성 종과 올리고핵산의 이온성 복합체이다.

<79> 본 발명 개시 내용의 목적상, 중성 pH에서 불용성인 약물은 "난용성"인 것으로 간주되는데, 그 이유는 대개의 경우 중성 약학 조성물이 요구되기 때문이다. 예를 들어, 사이프로플록사신은 pH 4.5 이하의 물에 폐 용해될 수 있으나, 그 약물이 점안 투여용으로 제제화될 경우 상기 pH는 고자극성일 수 있다. 본 발명의 중합체는 pH 7의 표준 염수에서 사이프로플록사신을 가용화시킨다. 또한, 본 발명 개시 내용의 목적상, "난용성"은 수성 매체 중에서의 용해도를 증가시키는 것이 향상된 또는 더 유용한 조성물이 되게 하는 용해도를 갖는 임의의 물질을 청

하는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 용해도가 중간 정도인 약물, 예를 들어 2 g/L 정도인 약물은, 정맥내 투여를 위한 단위 용량이 5 g일 경우, "난용성"이다.

<80> 약리 활성 종을 가용화하는 본 발명 중합체의 능력으로 인하여, 본 발명은 또한 치료 유효량의 1종 이상의 약리 활성 물질과 함께 본 발명의 1종 이상의  $\pi$ -중합체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 본 발명의 중합체는 이것이 없으면 유효하지 않은 양의 약리 활성 물질이 유효하게 되도록 할 수 있다. 따라서 본 발명 개시 내용의 목적상, "치료 유효량"은 전체 조성물을 유효하게 하는 제제의 양이다.

<81> 본 명세서에서 언급된 모든 특허, 특히 출원 및 공보는 그 전체가 참고 문헌으로서 본 명세서에 포함된다.

## 실시예

### 실험예

#### 1. 일반 절차

<84> 본 발명은 또한 본 발명의 콤형 중합체의 제조 방법을 제공한다. 상기 중합체의 합성은 후술하는 절차에 따라 유기 합성 분야의 당업자에 의해 용이하게 수행될 수 있다. 주요 출발 물질은 폴리에틸렌 글리콜로서, 이것은 사용 전에 건조 상태인 것이 바람직하다. 이는 고온에서 진공 하에 기포 형성이 중단될 때까지 용융 PEG를 교반함으로써 적절히 행한다. 여기에는 PEG의 품질에 따라 8~12 시간이 소요된다. 건조되면 PEG는 아르곤 하에서 무기한 저장할 수 있다. 시판되는 공업용 및 연구용 등급의 PEG, 예를 들어 분자량 분포가 1,430~1,570인 시판되는 다분산 "PEG 1500"을 본 발명의 중합체를 제조하는 데 이용할 수 있다. 상기 물질은 PEG 사슬 중심에 2차 하이드록실기를 도입하는 비스페놀 A 디글리시딜 에테르를 혼입할 수 있다. 본 발명의 중합체가 가장 큰 재현성 및 일관성을 갖도록 하기 위해서는, PEG에 비스페놀 A가 없고 저분산도인 것이 바람직하다. 단분산도가 95%를 초과하는 PEG 중합체, 예컨대 미국 알라바마주 헌츠빌 소재의 넥타 세라퓨틱스(이전 명칭: 쉐어워터 폴리머스)와 노르웨이 오슬로의 폴리퓨어 에이에스에서 시판되는 것이 가장 바람직하다. 특히 바람직한 PEG의 일례는 폴리퓨어의 "PEG-28"로서, 이것은 HO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>28</sub>H가 95%를 초과하고 분자량이 1,252이다.

<85> 모든 반응은 질소 또는 아르곤과 같은 비활성 분위기 하에 자기 교반 또는 바람직하게는 기계 교반을 이용하여 수행한다.

<86> 단계 A에서는, 건조 PEG를 용융시키고, 말레산 무수물(PEG mol당 2 mol)을 교반하면서 첨가한다. 말레산 무수물의 양은 PEG 말단 하이드록실기의 수에 가능한 한 가까이 일치하여야 한다. 말레산 무수물이 부족하면 하이드록실 말단 중합체 사슬이 형성되는 반면, 말레산 무수물이 과잉이면 후속 단계에서 티올기를 소모시켜 초기 사슬 종결과 말단 카복실기가 형성된다. 반응 온도는 중요하지 않으며, 본 공정은 45°C~100°C의 온도에서 적절히 수행할 수 있다. 바람직한 반응 온도는 65°C~90°C이다. 고온이 이용될 경우, 말레산 무수물이 승화하는 경향이 있기 때문에, 말레산 무수물이 용액 상태로 존재하도록 공정에 주의를 기울여야 한다. 상부 공간(headspace)을 최소화하고 반응 용기를 오일욕에 침지하는 것이 효과적인 방법이다.

<87> 선택된 온도에 따라, 반응은 2 시간 이내에 완료되거나 밤새 수행될 수 있다. 반응은 실리카 겔 플레이트에서의 TLC로 모니터할 수 있으며, 말레산 무수물이 사라질 때까지 지속한다. TLC 플레이트를 조사하는 데 시각적 콘트라스트, UV 및 요오드 염색을 모두 이용할 수 있다.

<88> 단계 B에서는, 단계 A에서 제조된 미정제 PEG 비스-말레이트 에스테르를 디티오트레이톨(DTT) 및 N,N,N',N'-테트라메틸에틸렌디아민(TEMED)과 배합하고(필요에 따라 유동성을 위해 물을 첨가함), 그 혼합물을 70°C에서 교반한다. 반응은 30분 내에 완료되며, 이는 점성의 급격한 증가로 알 수 있다. 최적량보다 많거나 적은 DTT가 이용될 경우 생성물의 분자량은 감소하게 된다. 생성물의 분자량은 또한, 필요하다면, TEMED를 효과가 떨어지는 3차 아민 염기(예컨대 TEA)로 대체함으로써 감소시킬 수 있다.

<89> 단계 C에서는, 충분한 양의 물을 상기 반응 혼합물에 첨가하여 점도를 감소시키고, 중합체 내의 카복실산기 mol 당 0.1 mol의 N-하이드록시숙신이미드(NHS) 및 1.05 mol의 헥사데실아민을 첨가한다(이 양의 NHS는 부반응 정도를 최적으로 최소화하는 것으로 생각됨). 그 후, 과잉량의 N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카보디이미드(EDC)(카복실산기 mol당 1.4 mol의 EDC)를 일부씩 첨가하고, 교반을 계속하면서 필요에 따라 추가분의 물을 첨가한다. 반응 혼합물의 pH는 7 이상으로, 바람직하게는 9~11로 유지하여, 알킬아민의 반응성을 최적화한다. 도데실아민을 사용할 경우, 상기 반응은 약 40°C~45°C에서 수행할 수 있는 한편, 옥타데실아민을 사용할 경우, 상기 온도는 약 55°C~57°C이다. 잔류 알킬아민이 일정한 수준으로 관찰될 때까지, 일반적으로 밤새 진행한 후

까지 반응을 TLC로 추적한다.

<90> 상기 반응 혼합물을 pH 약 3.0~약 4.5로 산성화하고, 실온에서 약 24 시간 동안 교반하여 미반응 EDC를 파괴한 후, 1 N NaOH를 사용하여 pH 7.0으로 적정한다. 최종 반응 혼합물을 약 800 xg로 1~3 시간 동안 원심분리하여 고체 오염물과 부산물을 제거한다.

<91> 원심분리 후, 상청액으로 GPC 컬럼[토요펄(Toyopearl)<sup>TM</sup>, 세파덱스(Sephadex)<sup>TM</sup>, 세파크릴(Sephacryl)<sup>TM</sup>, 바이오겔(Bio gel)<sup>TM</sup> 등] 크로마토그래피를 행할 수 있다.  $\pi$ -중합체는 양쪽성 물질로서 대부분의 GPC 컬럼 충전물에 대해 친화력을 나타내기 때문에 오염물 제거를 복잡하게 한다. 대안으로, 상기 중합체로 공극이 큰 소수성 상호작용 컬럼(예를 들어, 토요펄<sup>TM</sup> 폐널 650C, 미국 팬실베니아주 몽고메리빌 소재의 토쇼 바이오사이언시즈 제품)에서 메탄올 수용액 구배를 이용한 크로마토그래피를 행할 수 있다. 바람직하게는, 상기 반응 혼합물에 대해 산성수와 중성수를 여러 차례 교환하여 투석을 행하여, 저분자량 출발 물질과 반응 부산물을 제거한다.

<92> 유기 불순물을 제거하기 위해 상기 반응 혼합물은 또한 부타논, 이소프로판올, 부탄올 또는 다른 극성 유기 용매로 추출할 수 있으나, 상당량의 양쪽성 중합체가 추출 용매로 유실된다. 상기 반응 혼합물에 대해, 적절한 막을 이용한 한회 여과를 수행하여 생성물을 분자량 등급에 따라, 이용된 여과막의 컷오프에 따라, 예컨대 5 kDa ~10 kDa; 10 kDa~30 kDa, 30 kDa~50 kDa 등으로 분별하는 것이 바람직하다. 중합체의 수용액으로 전량 여과(dead end filtration)를 수행하여, 여과막 또는 여과 매체의 선택에 따라, 멸균 또는 바이러스 비함유 용액을 제조할 수 있다.

## 2. $\pi$ -중합체의 합성

<94> 실시예 1: PEG-디(알킬아미도숙시닐)디티오에테르 중간 분자량 중합체(C16-  $\pi$ -중합체 A)

<95> 폴리에틸렌 글리콜(PEG-1500, 시그마 케미칼 컴퍼니)을 기포 형성이 중단될 때까지(PEG의 품질에 따라 8~12 시간) 진공 하에 80°C에서 건조시켰다. 건조된 PEG는 아르곤 하에 무기한 건조 상태로 저장할 수 있다.

<96> 건조된 PEG를 아르곤 하의 오일욕에서 용융시키고, 말레산 무수물(PEG mol당 2 mol, 불순물에 대해 보정)을 교반하면서 단계적으로 첨가하였다. 이 혼합물을 아르곤 하에 90°C에서 교반하였다. 말레산 무수물은 승화하는 경향이 있기 때문에, 상부 공간을 최소화하였고, 전체 반응 용기를 반응 온도로 유지하였다. 용기 벽에 응축된 임의의 말레산 무수물은 반응 혼합물로 다시 긁어 모았다. 반응의 진행은 에탄올 및 헥сан을 개별적으로 용매로서 사용한 실리카 젤 플레이트에서의 TLC, UV 가시화 및 요오드 염색으로 모니터하였다. 반응은 말레산 무수물이 사라지고 나서 1 시간 동안 지속하였다.

<97> 미정제 PEG 디말레이트를 2배 부피의 물로 희석하였다. 그 후, 물(TEMED 부피당 2배 부피의 물) 중 디티오트레이탈(DTT, PEG 당량당 1.01 당량) 및 N,N,N',N'-테트라메틸에틸렌디아민(TEMED, 1.02 당량)을 상기 반응 혼합물에 교반하면서 첨가하였다. 반응물은 아르곤 하에 70°C에서 2.5 시간 동안 교반하고, 실온에서 밤새 정치한 후, 70°C에서 2 시간 동안 다시 교반하였다. 반응은 TLC로 모니터하였으며, DTT가 완전히 사라졌을 때 반응이 완료된 것으로 판단하였다.

<98> 점도를 감소시키기 위해 상기 반응 혼합물을 교반할 때까지(고체 함량 약 25%), 물을 첨가하고, 그 혼합물을 아르곤 하에 65°C에서 교반하고 N-하이드록시숙신이미드(PEG-디말레이트-DTT 중합체의 카복실산기 mol당 0.1 mol)를 첨가한 후, 헥사테실아민(중합체의 카복실산기 mol당 1.05 mol) 및 N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카보디이미드(EDC, 중합체의 카복실산기 mol당 0.56 mol)를 첨가하였다. 이 혼합물을 아르곤 하에 1 시간 동안 교반하고 제2 분량의 EDC(중합체의 카복실산기 mol당 0.56 mol)를 첨가하였다. 1 시간이 더 경과한 후, 제3 분량의 EDC(중합체의 카복실산기 mol당 0.28 mol, 카복실산 mol당 총 1.4 mol의 EDC)를 추가로 첨가하여 가수분해된 EDC 손실을 고려하였다. 첨가된 고체가 혼탁액을 교반하기 어렵게 만들기 때문에 유동성을 유지하기 위해 필요에 따라 추가분의 물을 첨가하였고, 필요에 따라 1 M NaOH를 첨가하여 pH를 8~10으로 유지하였다. 이 혼합물을 아르곤 하에 65°C에서 교반하고, 알킬아민이 일정한 농도에 도달한 것으로 나타날 때까지 TLC(실리카 젤, 에탄올로 용리)로 모니터하고, 그 후, 4 시간 동안 더 교반하였다. 그 후, 반응 혼합물을 1 N HCl을 사용하여 pH 약 4.5로 산성화하고, 24 시간 동안 교반하여 미반응 EDC를 파괴하고, 1 N NaOH를 적가하여 pH 7.0으로 조정하였다. 도데실아민을 사용할 경우, 상기 반응은 약 40°C~45°C에서 수행하는 반면, 옥타데실아민을 사용할 경우, 상기 온도는 바람직하게는 55°C~57°C였다.

<99> 상기 혼합물을 원심분리병으로 옮겨서 벤치탑 원심분리기에서 약 800 xg로 2 시간 동안 회전시켜 잔류 고체를 분리하였다. 원심분리 후, 반응 혼합물을 이소프로판올로 추출하여 유기 불순물을 추출하였다. 이소프로판올을 추

출에 대한 대안으로서는 한외 여과가 바람직하다.

<100> 상기 방법에 의해, 하기 아미노 화합물을 상기 중합체에 접합시켰다:

<101> 실시예 1a: 운데실아민

<102> 실시예 1b: 옥타데실아민

<103> 실시예 1c: 4-노닐벤질아민

<104> 실시예 1d: 3-[<sup>14</sup>C-(4-페녹시)페닐]프로필아민

#### **실시예 2: PEG-디(알킬아미도숙시닐)디티오에테르 고분자량 중합체**

말레산 무수물 mol당 0.55 mol의 DTT 및 0.55 mol의 TEMED를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1에 기재된 절차에 준하였다. 점도가 급격히 상승하였기 때문에 격렬한 교반이 필요하였다. 반응은 5~10분 내에 대부분 완료되었고, 그 후 온도를 55°C에서 80°C로 상승시킴에 따라 다음 4 시간에 걸쳐 서서히 완료되는 것으로 나타났다.

#### **실시예 3: PEG-디(알킬아미도숙시닐)디티오에테르 중합체**

중합체 내의 카복실산기 mol당 1.5 mol의 도데실아민을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1에 기재된 절차에 준하였다. N-하이드록시숙신이미드(NHS, 카복실산기 mol당 1.0 mol) 및 1,1'-카보닐디이미다졸(CDI, 카복실산기 mol당 3.0 mol)을 첨가하고, 반응물을 80°C에서 4 시간 동안 교반하였으며, 전술한 바와 같이 후처리하였다.

<109> 상기 방법에 의해, 하기 아미노 화합물을 상기 중합체에 접합시켰다:

<110> 실시예 3a: 운데실아민

<111> 실시예 3b: 테트라데실아민

<112> 실시예 3c: 옥타데실아민

<113> 실시예 3d: 테하이드로아비에틸아민

<114> 실시예 3e: 콜레스테롤 2-아미노에틸 에테르

<115> 실시예 3f: 10-페녹시데실아민

<116> 실시예 3g: 세바스산 하이드라지드

<117> 실시예 3h: 올레산 하이드라지드

<118> 실시예 3i: 테하이드로아비에트산 하이드라지드

<119> 실시예 3j: 콜산 하이드라지드

<120> 실시예 3 k: 팔미트산 하이드라지드

#### **실시예 4: PEG-코-(알킬아미도숙시네이트) 중합체**

<122> 무수 디에틸 에테르(10 ml) 중 PEG(6.66 mmol) 및 트리에틸아민(2.32 ml, 16.65 mmol)의 용액을 아르곤 하에 0°C에서 냉각시키고, 메탄설포닐 클로라이드(1.03 ml, 13.32 mmol)를 적가 처리하였다. 0°C에서 1 시간 동안 교반을 지속하고, 그 후 실온에서 2 시간 동안 교반하였다. 에테르를 증발시키고, 잔류물에 무수 아세톤(15 ml)을 첨가하여 염화트리에틸아민을 침전시켰으며, 이것을 용액으로부터 여과하였다. 여과물을 브롬화리튬(2.31 g, 26.64 mmol)으로 처리하여 20 시간 동안 가열 환류하였다. 그 후 이 혼합물을 헥산으로 희석하여 셀라이트(Celite)<sup>TM</sup>(0.5 cm)로 회복된 짙은 실리카 컬럼(3 cm)을 통해 여과하고 헥산으로 용리시켰다. 여과물을 건조시키고 여과하고 증발시켜 α, ω-디브로모-PEG를 오일로서 얻었다.

<123> 문헌[Godjoian et al., Tetrahedron Letters, 37:433-6 (1996)]의 방법으로, α, ω-디브로모-PEG를 1 당량의 2,2-디부틸-4,5-비스(메톡시카보닐)-1,3,2-디옥사스타놀레인과 반응시켰다. 생성된 디메틸타르트레이트-PEG 폴리에테르를 메탄올 중에서 KOH로 비누화한 후, 상기 실시예 1 및 3에서와 같이 도데실아민 또는 헥사데실아민으로 또는 실시예 3a~3k에서와 같이 아민으로 아미드화하였다.

#### **실시예 5: EDTA 이무수물과의 PEG 공중합**

<125> 실시예 1에 기재된 방법으로 무수 PEG를 에틸렌디아민테트라아세트산 이무수물과 반응시킨 후, 실시예 1에서와

같이 도데실아민으로, 또는 실시예 3에서와 같이 헥사데실아민으로, 또는 실시예 3a~3k에서와 같이 아민으로 아미드화하였다.

<126> 동일한 방식으로, 하기 이무수물을 PEG와 공중합하고, 그 후 아미드화하였다:

<127> 실시예 5a: 나프탈렌테트라카복실산 이무수물

<128> 실시예 5b: 폐릴렌테트라카복실산 이무수물

<129> 실시예 5c: 벤조페논테트라카복실산 이무수물

<130> 실시예 5d: 4,4'-(헥사플루오로이소프로필리덴)디프탈산 무수물

<131> 실시예 5e: 부탄 테트라카복실산 이무수물

<132> 실시예 5f: 비사이클로(2,2,2)옥트-7-엔-2,3,5,6-테트라카복실산 이무수물

<133> 실시예 5g: 디에틸렌테트라아민 웬타아세트산 이무수물

<134> 실시예 5h: 3,4,3',4'-디페닐설폰 테트라카복실산 이무수물

<135> 실시예 5i: 3,4,3',4'-디페닐 에테르 테트라카복실산 이무수물

<136> 실시예 5j: 피로멜리트산 이무수물

#### 실시예 6A: 현수형 티오에테르를 갖는 PEG-다아민 공중합체

<138> 실시예 1에서 DTT에 대해 이용된 것과 동일한 절차를 이용하여 실시예 1에서와 같이 제조된 PEG 디말레이이트를 도데칸티올(PEG 디말레이이트 당량당 2 당량)과 반응시켰다. 중합이 일어나지 않았기 때문에 희석은 필요하지 않았으며, 반응은 용융된 PEG-디말레이이트 중에서 수행하였다. TEMED 촉매를 첨가한 후, 티올을 첨가하였다. 반응은 TLC를 이용하여 출발 물질의 소멸로 추적하였다. 증발에 의한 알킬티올의 소실이 유의적이 되는 지점까지의 온도를 이용할 수 있다(최대 약 100°C). 약간 과잉량의 알킬티올을 이용하여 말레기를 완전히 포화시킬 수 있다. 질소 또는 아르곤을 살포하고/하거나 진공 하에 가열하면서 냄새 또는 TLC에 의해 아무 것도 검출되지 않을 때까지 반응 종료시에 과잉량의 알킬티올을 제거하였다.

<139> 상기 방법에 의해, 하기 티올을 PEG 디말레이이트에 접합시킬 수 있다:

<140> 실시예 6Aa: 머캅토숙신산 디-t-부틸 에스테르

<141> 실시예 6Ab: 테트라데칸티올

<142> 실시예 6Ac: 헥사데칸티올

<143> 실시예 6Ad: 2-머캅토에탄설폰산

<144> 실시예 6Ae: 3-머캅토프로판설폰산

<145> 실시예 6Af: 6-머캅토헥산산 t-부틸 에스테르

<146> 실시예 6Ag: 4-머캅토벤조산 t-부틸 에스테르

<147> 실시예 6Ah: 머캅토아세트산 t-부틸 에스테르

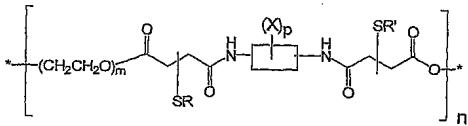
<148> 실시예 6Ai: 4-(t-부톡시카보닐아미노)부탄티올

<149> 실시예 6Aj: 3-(t-부톡시카보닐아미노)벤질 머캅탄

<150> 실시예 6Ak: 4-데실벤질 머캅탄

<151> 반응성 작용기를 갖는 티올은 C 사슬의 부착에 적합하고/하거나, 반응성 작용기는 표적화 부분에 대한 부착점(X)으로서 이용될 수 있다.

&lt;152&gt; 실시예 6B: 혼수형 티오에테르를 갖는 PEG-디아민 공중합체



&lt;153&gt;

<154> 실시예 1에서 도데실아민에 대해 이용된 것과 동일한 절차를 이용하여, 실시예 6A에서 얻은 티올 부가 생성물을 1,4-디아미노부탄(2개의 COOH 기당 1 당량의 디아민)으로 아미드화하였으며, 이때 반응 혼합물의 유동성을 유지하기 위해 필요에 따라 물로 회석하였다. 완전한 중합을 확보하기 위해 필요에 따라 추가분의 EDC를 첨가하였다. 이 방법에 의해, 실시예 6A 및 6Aa~6Ak의 티올 부가 생성물을 PEG-디아미노부탄 폴리아미드로 전환시켰다.

<155> 상기 방법에 의해, 하기 디아민을 PEG 폴리아미드로 전환시킬 수 있다(BOC = t-부톡시카보닐):

<156> 실시예 6Ba: 2-(0-BOC)-1,3-디아미노-2-프로판올

<157> 실시예 6Bb: N',N"-디(BOC) 헥사에틸렌 테트라아민

<158> 실시예 6Bc: N',N"-디(BOC) 스퍼민

<159> 실시예 6Bd: N'-BOC 스퍼미딘

<160> 실시예 6Be: N',N",N'"-트리(BOC) 펜타에틸렌 헥사민

<161> 실시예 6Bf: 아그마틴

<162> 실시예 6Bg: 리신 t-부틸 에스테르

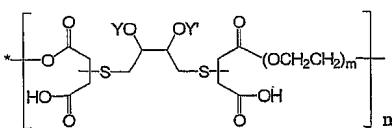
<163> 실시예 6Bh: 1,6-디아미노헥산

<164> 실시예 6Bi: 1,4-페닐렌디아민

<165> 실시예 6Bj: 1,3-페닐랜디아민

<166> 실시예 6Bk: 1,4-디아미노부탄-2,3-디올 아세토나이드

<167> 실시예 7: PEG-디(알킬숙시네이트)디티오에테르



&lt;168&gt;

<169> DTT(메소-2,3-비스(헥사데실옥시)부탄-1,4-디티올)의 2,3-비스-0-헥사데실 에테르는 문현[S. Sasaki et al., Chem. Pharm. Bull. 33(10):4247-4266 (1985)]의 방법의 변형법으로 제조하였다. 이것을 실시예 1의 방법에 의해 PEG-디말레이이트에 첨가하였다.

<170> 상기 방법에 의해, 하기 에테르 디티올을 PEG 중합체에 커플링하였다:

<171> 실시예 7a: 메소-2,3-비스(n-부톡시)부탄-1,4-디티올

<172> 실시예 7b: 메소-2,3-비스(4-노닐페닐메톡시)부탄-1,4-디티올

<173> 실시예 7c: 메소-2,3-비스(비페닐-4-메톡시)부탄-1,4-디티올

<174> 실시예 7d: 4,6-비스(데실옥시)벤젠-1,3-디메탄티올

<175> 실시예 7e: 4,5-비스(데실옥시)벤젠-1,2-디메탄티올

<176> 실시예 7f: 3,4-비스(데실옥시)티오펜-2,5-디메탄티올

<177> 실시예 8A: 치환된 PEG 숙시네이트

<178> 2-도데센-1-일 숙신산 무수물을 말레산 무수물 대신에 사용한 것을 제외하고는, 실시예 1의 방법에 준하였다.

도데세닐 치환기는 최종 중합체에 현수형 C 사슬을 제공한다.

<179> 상기 방법에 의해, 하기의 치환된 숙신산 무수물을 PEG로 에스테르화하였다:

<180> 실시예 8Aa: 이소부테닐숙신산 무수물

<181> 실시예 8Ab: 2-옥텐-1-일 숙신산 무수물

<182> 실시예 8Ac: 옥타데세닐 숙신산 무수물

<183> 실시예 8Ad: 3-옥사비사이클로-헥산-2,4-디온

<184> 실시예 8Ae: 사이클로헥산디카복실산 무수물

<185> 실시예 8Af: 프탈산 무수물

<186> 실시예 8Ag: 4-데실 프탈산 무수물

<187> 실시예 8Ah: 헥사하이드로메틸프탈산 무수물

<188> 실시예 8Ai: 테트라하이드로프탈산 무수물

<189> 실시예 8Aj: 노르보넨디카복실산 무수물

<190> 실시예 8Ak: 칸타리딘

<191> 실시예 8Al: 비사이클로옥тен디카복실산 무수물

<192> 실시예 8Am: 엑소-3,6-에폭시-1,2,3,6-테트라하이드로프탈산 무수물

<193> 실시예 8An: S-아세틸 머캅토숙신산 무수물

<194> **실시예 8B: 현수형 알킬기를 갖는 PEG-디(알킬아미도숙시닐)디티오에테르**

<195> 실시예 1의 방법에 의해, 실시예 8A 및 8Aa~8An에 기재된 바와 같이 얻은 치환된 PEG 숙시네이트를 DTT와 반응시켰다.

<196> 상기 방법에 의해, 하기 디티올을 실시예 8A 및 8Aa~8An에 기재된 바와 같이 얻은 치환된 임의의 PEG 숙시네이트와 반응시켰다:

<197> 실시예 8Ba: 에탄-1,2-디티올

<198> 실시예 8Bb: 프로판-1,3-디티올

<199> 실시예 8Bc: 부탄-1,4-디티올

<200> 실시예 8Bd: 펜탄-1,5-디티올

<201> 실시예 8Be: 헥산-1,6-디티올

<202> 실시예 8Bf: 1,4-벤젠디티올

<203> 실시예 8Bg: 1,3-벤젠디티올

<204> 실시예 8Bh: 1,4-벤젠디메탄티올

<205> 실시예 8Bi: 1,3-벤젠디메탄티올

<206> 실시예 8Bj: 1,2-벤젠디메탄티올

<207> **실시예 8C: 현수형 알킬기를 갖는 PEG-디아민 공중합체**

<208> 실시예 6B의 방법에 의해, 실시예 8A에 기재된 바와 같이 얻은 치환된 PEG 숙시네이트를 1,4-디아미노부탄과 공중합하였다.

<209> 상기 방법에 의해, 하기 디아민을 실시예 8A 및 8Aa~8An의 치환된 임의의 PEG 숙시네이트와 공중합하였다:

<210> 실시예 8Ca: 20-BOC 1,3-디아미노-2-프로판올

<211> 실시예 8Cb: N<sup>1</sup>,N<sup>2</sup>-디(BOC) 헥사에틸렌 테트라아민

<212> 실시예 8Cc: N',N"-디(BOC) 스퍼민

<213> 실시예 8Cd: N'-BOC 스퍼미딘

<214> 실시예 8Ce: N',N",N'''-트리(BOC) 펜타에틸렌 헥사민

<215> 실시예 8Cf: 아그마틴

<216> 실시예 8Cg: 리신 t-부틸 에스테르

<217> 실시예 8Ch: 1,6-디아미노헥산

<218> 실시예 8Ci: 1,4-페닐렌디아민

<219> 실시예 8Cj: 1,3-페닐렌디아민

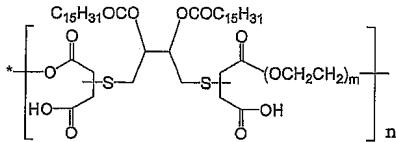
<220> 실시예 8Ck: 1,4-디아미노부탄-2,3-디올 아세토나이드

### <221> 실시예 9: 치환된 산을 이용한 PEG 에스테르 교환 반응

<222> PEG 디토실레이트: 1 mol의 PEG(DMF에 용해된 상태 또는 용융된 그 상태로)에 아르곤 하에 교반하면서 2.1 mol의 토실 클로라이드(5% 몰 과량)를 첨가하였다. 이 반응 혼합물에 2.2 mol의 테트라메틸 에틸렌 디아민(TEMED)을 첨가하였다. 그 후, 반응물을 45°C에서 2 시간 동안 항온처리하였다. 에틸아세테이트, 툴루엔 또는 에탄올을 TLC 용매로서 사용하여 생성물을 분해하였다. 툴루엔을 사용하여 반응 혼합물로부터 PEG 디토실레이트를 추출할 수 있다. 툴루엔설포닐 클로라이드 대신에, 다른 설포닐화제, 예컨대 메실 클로라이드(실시예 4 참조), 트리플산 무수물 또는 트레실 클로라이드 역시 사용할 수 있다(미국 특허 출원 제10/397332호, 공개 공보 20040006051호 참조).

<223> PEG 디토실레이트의 폴리에스테르화: 아르곤 하에 교반하면서 1 mol의 용융 PEG-디토실레이트에 1 mol의 S,S'-디데실-메소-2,3-디머캅토숙신산 및 2 mol의 TEMED를 첨가하였다. 유동성을 유지하기 위해 필요에 따라 DMF를 첨가하였다. 반응 혼합물을 80°C로 가열하고 24 시간 동안 또는 TLC에 의해 완료가 확인될 때까지 교반하였다.

### <224> 실시예 10: PEG-디(숙시닐)-디-(0-아실화)티오에테르 중간 분자량 중합체 (C16-π-중합체 B)



<225>

<226> 실시예 1에서와 같이 제조한 PEG-디말레이이트(10.24 g, 6.1 mmol)를 건조된 125 mL들이 플라스크에 넣고 아르곤 하에 70°C로 가열하여 PEG-디말레이이트를 용융시켰다. 이 용융 물질에, 교반하면서 물(10 mL)과 물(3 mL) 중 DTT(0.961 g, 6.168 mmol) 및 TEMED(0.723 g, 6.166 mmol)의 용액을 첨가하였다. 이 용액을 70°C에서 약 4 시간 동안 교반하였다. 진공 하에 물을 제거하여 고체 중합체를 약 90%의 수율로 얻었다.

<227> 건조된 중합체(5 g, 2.7 mmol)를 아르곤 하에 70°C~90°C로 가열하여 용융시키고, TEMED(0.635 g, 5.5 mmol)를 첨가하였다. 팔미토일 클로라이드(1.689 g, 5.5 mmol)를 교반하면서 첨가하고, 그 혼합물을 아르곤 하에 밤새 교반하였다(중합체 대 아실 클로라이드의 비를 변화시켜 화학량론으로 0~100%의 치환도를 얻을 수 있다). 상기 반응 혼합물에 물을 첨가하여 "C16-π-중합체 B"를 단리하였다.

<228> 상기 방법에 의해, 하기 산을 디(숙시닐)PEG-DTT 공중합체의 하이드록실기로 에스테르화하였다:

<229> 실시예 10a: 올레산

<230> 실시예 10b: 콜레스테릴 숙시네이트

<231> 실시예 10c: 비페닐-4-카복실산

<232> 실시예 10d: 4-옥틸페닐아세트산

<233> 실시예 10e: 헥사데스-6-이노산

<234> 산 할라이드를 사용하는 것 대신에, π-중합체의 DTT 유도 하이드록실기는 또한 1,3-비스(2,2-디메틸-1,3-디옥

솔란-4-일메틸) 카보디이미드(BDDC)로 활성화시키고, 카복실산에 직접 커플링할 수 있다[참고 문헌: Handbook of Reagents for Organic Synthesis, Reagents for Glycoside, Nucleotide, and Peptide synthesis, Ed. David Crich, Wiley, 2005 p 107-108 및 이 문헌에 인용된 참고 문헌].

<235> **실시예 11: C16- $\pi$ -중합체 A의 디말레이트**

<236> 말레산 무수물을 중합체 A 하이드록실기와 반응시켜 중합체 A 디말레이트를 제조하였다. 도입된 활성화된 이 중 결합은 티올 함유 리간드를 중합체에 첨가하는 데 이용될 수 있다. 중합체 A 대 말레산 무수물의 비를 변화시켜, 치환율 0~100%의 완전한 화학량론적 에스테르화로 다양하게 할 수 있다.

<237> C16- $\pi$ -중합체(2 g) 및 말레산 무수물(0.85 g)을 건식 분쇄기(dry mortar)에서 분쇄하여 50 mL들이 등근 바닥 플라스크로 옮겼다. 이 플라스크를 아르곤 하에 90°C에서 교반하면서 2~3 시간 동안 가열하였다. 그 후, 고체 반응 혼합물을 물을 사용하여 투석백(3.5 kDa 컷오프)으로 옮기고 물에 대해 투석하여 과잉량의 말레산과 저분자량 부산물을 제거하였다. 그 후, 투석백으로부터 보유액을 회수하여 60°C에서 일정한 중량이 될 때까지 건조시켜 C16- $\pi$ -중합체 디말레이트(1.79 g)를 얻었다.

<238> **실시예 12: C16- $\pi$ -중합체 A 디말레이트의 시스테인 부가 생성물**

<239> 분말화된 C16- $\pi$ -중합체 A 디말레이트(실시예 11)(253 mg)를 물(5 mL)에 첨가하고, 이 혼합물을 격렬히 교반하였다. 시스테인(24 mg) 및 TEMED(30.5  $\mu$ L)를 상기 반응 혼합물에 첨가하고 이 혼합물을 아르곤 분위기 하에 실온에서 교반하였다. 닌하이드린으로 검출하면서 TLC(실리카겔 플레이트, n-부탄올-아세트산-물, 3:1:1)로 반응의 진행을 모니터하였다. 반응 혼합물은 닌하이드린 양성 스팟이 중합체와 동시에 이동함을 나타내었다. 시스테인 역시 닌하이드린 양성 스팟을 나타낸 반면, 출발 중합체는 닌하이드린에 의해 어떠한 색도 발현하지 않았다.

**3. 불용성 또는 난용성 물질을 가용화하기 위한  $\pi$ -중합체의 용도**

<241> **실시예 1: 염료의 가용화**

<242> 별개의 용기[플렉스엑셀(FlexExcel)<sup>TM</sup> 투명 폴리프로필렌 계량기(weigh-boat), WB2.5 규격, 미국 커네티컷주 웨스트 해븐 소재의 올엑셀 인코포레이티드 제품]에서, 불용물을 제거하기 위해 원심분리를 하되 달리 정제하지 않은 PEG1500-코-숙시닐-DTT-비스-C16-아미드 중합체(C16-중합체 A, 실시예 1)의 50 mg/mL 수용액 분액 1.0 mL에, 과잉량의 염료 애오신 Y, 디클로로플루오레세인 및 수단 IV를 첨가하고, 성분들을 함께 교반하여 페이스트를 형성하였다. 그 후, 용기 바닥을 내수성 이중 스틱 테이프를 사용하여 소형 귀금속 초음파 클리너 수조의 바닥에 부착시켰다. 계량기가 약 1/3 높이까지 침지하도록 하는 양의 물을 수조에 첨가하였다. 초음파 처리는 5분 씩 15분 동안 행하였다. 액체를 원심분리 튜브로 옮겨서 벤치탑 원심분리기에서 30분 동안 2회 원심분리하여 비용해 염료를 펠릿화하였다. 상청액을 깨끗한 튜브로 옮겨서 다시 원심분리하여 동반 고체(entrained solid)를 제거하였다. 중합체 용액과 동량의 중류수 중의 동량의 염료 혼탁액을 동일한 방식으로 처리하여 대조군으로 하였다. 얻어진 용액을 TLC 플레이트 상에 점적하여(25  $\mu$ L) 점적액으로부터 원이 형성되게 하였다. 스팟의 강도를, 에탄올 또는 에탄올/물 중의 표준 염료액으로부터 형성된 스팟의 강도와 비교하여 대략의 농도를 측정하였으며, 상기 스팟은 도 1에 도시되어 있다. 염료의 수용해도는 적정량의 염료를 실온에서 11 이상의 탈이온 수(비완충)에 용해시키고 포화 용액이 형성되도록 필요에 따라 추가분의 물을 첨가함으로써(즉, 적정함으로써) 측정하였다.

<243> 50 mg/mL 중합체 중의 수단 IV의 농도는 약 0.2 mg/mL인 반면, H<sub>2</sub>O 중에서의 농도는 0.000 mg/mL였다(수단 IV는 중성 pH에서 불용성이다). 디클로로플루오레세인의 농도는 50 mg/mL 중합체 중에서 약 5 mg/mL인 반면, H<sub>2</sub>O 중에서는 0.010 mg/mL였다. 50 mg/mL 중합체 중에서의 애오신 Y의 농도는 약 5 mg/mL인 반면, H<sub>2</sub>O 중에서는 농도는 0.007 mg/mL였다. 적재량 비(payload ratio)(중합체 단위량당 약물의 양, g/g)는 수단 IV의 경우 약 1:250이고, 디클로로플루오레세인의 경우 1:10, 애오신 Y의 경우 1:10인 것으로 계산되었다.

<244> 약리 활성 물질과 물리화학적 특성에 있어서 유사한 극성 화합물에 대한 적재량 비 1:10은 리포솜, 사이클로덱스트린, 크레모포(Cremophor)<sup>TM</sup> 또는 계면활성제(detergent) 또는 다른 가용화 시스템으로 일반적으로 얻을 수 있는 것보다 더 크다. 애오신 Y는 효율이 매우 큰 광활성화 가능한 일종항 산소 발생제로서, 실시예 1의 중합체를 사용하여 제조되는 것과 같은 그러한 애오신 Y의 농축액은 광활성화 가능한 세포 독성제로서 약리 활성을 나타낼 것으로 예상할 수 있다.

- <245> 수중에서의 디클로로플루오레세인의 형광 스펙트럼(녹황색)에 대한 중합체 용액 중에서의 디클로로플루오레세인의 형광 스펙트럼(적황색/오렌지색)의 변화는 시각적으로 인지할 수 있었고, 이는 염료가 수성 환경에 있지 않고 자기 조립 중합체 입자 코어의 유기 환경 내에 캡슐화되어 있음의 징후를 나타낸다. 실제로, 형광 스펙트럼의 변화는 미세 환경(예를 들어, "지질 프로브")의 극성 변화를 측정하는 방법으로서 이용되어 왔다. 중합체 중 수단 IV 용액의 색은 적갈색인 반면, 에탄올 용액 중에서는 적색이고, 물에 혼탁시킬 때는 갈색 분말이었다. 에오신 Y는 유의적인 시각적 변화를 나타내지 않았다(물 중에서는 핑크색, 중합체 용액에서는 적핑크색).
- <246> **실시예 2: 의학적으로 관련된 물질의 가용화**
- <247> 퍼퓨린, 암포테리신 B, 캄프토테신 및 독소루비신을 대표적인 난용성 약리 활성 성분(API)으로서 선택하였다. 암포테리신 B는 주사용 항진균제로서 리포솜형 제제에 사용되는 한편, 캄프토테신 및 독소루비신은 항암제이다. 퍼퓨린은 잠재적인 약학적 유용성을 갖는 DNA 충간삽입(intercalating) 염료이며, 에오신 Y는 광역학 요법에서 잠재적 용도를 갖는 감광성 일중향 산소 발생제이다. 각각의 API를 C16- $\pi$ -중합체 A, C18- $\pi$ -중합체 B 및/또는 C16- $\pi$ -중합체 A-풀산 접합체를 함유하는 물에 가용화하였다(하기 참조). 가용화는, 염료에 대해 전술한 바와 같이 TLC 플레이트 상에 가용화 API와 비가용화 대조군을 점적하여 확인하였다.
- <248> 건조된 중합체를 가열하고 진탕시키고 필요에 따라 초음파 처리하면서 물로 재구성하였다. 용액의 점도가 너무 높을 경우 희석하였다. C16- $\pi$ -중합체 A는 10% w/v로 사용되었고, 플레이트화 C16- $\pi$ -중합체 A는 5% w/v로 사용되었으며, C18- $\pi$ -중합체 B는 2% w/v로 사용되었다.
- <249> 약물 성분(20 mg)은 1 ml의 중합체 용액에 바로 첨가하여, 중합체 대 API의 질량비가 C16- $\pi$ -중합체 A의 경우 5:1, 플레이트화 C16- $\pi$ -중합체 A의 경우 2.5:1, C18- $\pi$ -중합체 B의 경우 1:1이 되게 하였으며, 독소루비신은 제외하였다(하기 참조). 이 혼합물을 저출력으로 1 시간 동안 초음파 처리한 후, 2,000 xg로 2회 원심분리하여 비용해 고체를 제거하였다. 펠릿화된 고체의 양은 유의적이지 않았다. 실리카 겔 TLC 상의 용액의 점적은 약물이 전방의 용매로부터 지체된 이동을 보이면서 가용화되었음을 나타내었다(도 2).
- <250> 염산독소루비신을, C16- $\pi$ -중합체 A 대 염산독소루비신 질량비 10:1, 또는 플레이트화 C16- $\pi$ -중합체 A 대 독소루비신 질량비 5:1로, 전술한 바와 같이 중합체와 배합한 후, 충분한 양의 3 M 아세트산나트륨을 첨가하여 염산독소루비신을 중화시켰다. 이 혼합물을 24 시간 동안 격렬히 진탕시킨 후 2,000 xg로 2회 원심분리하여 비용해 고체를 제거하였다. 펠릿화된 고체의 양은 유의적이지 않았다.
- <251> 가용화된 API 대 중합체의 질량비는 하기 표 1에 기재하였다. 중합체의 장입량을 최대화하기 위한 시도는 하지 않았으며, 따라서, 이러한 비는 중합체가 용액으로 옮길 수 있는 API 양의 하한을 나타낸다.
- <252> 각 용액의 샘플 50  $\mu$ l를 베이커플렉스(Bakerflex)<sup>TM</sup> 실리카 겔 TLC 플레이트에 점적하여 퍼지게 하였다. 수용액은 캡슐화된 물질을 함유한 중합체의 이동에 의해 형성된 원의 외곽선과 내부 원을 형성한다(도 2). 모든 경우, 수성으로만 된 영역의 주연부에는 API가 거의 없었고, 이는 캡슐화된 물질이 성공적으로 가용화되고 누출이 최소였음을 나타낸다.

**표 1**

	API의 가용화		
	중합체 대 기질 질량비		
	C16- $\pi$ -중합체 A 10% w/v	플레이트화 C16- $\pi$ -중합체 A 5% w/v	C18- $\pi$ -중합체 B 2% w/v
퍼퓨린	5:1	2.5:1	수행하지 않음
캄프토테신	5:1	2.5:1	수행하지 않음
암포테리신 B	5:1	2.5:1	수행하지 않음
독소루비신	10:1	5:1	수행하지 않음
에오신 Y	수행하지 않음	수행하지 않음	1:1

#### 4. $\pi$ -중합체의 생체적합성

##### 실시예 1: 국소 연화제, 크림 또는 페이스트에의 적합성

실시예 1 중합체의 농축 유성 왁스를 발명자가 손목 안쪽 피부에 도포하고 흡수를 관찰하였다. 상기 물질은 피부를 약간 연화시키면서 왁스형 약물 크림과 유사하게 흡수되는 것으로 보였다. 이와 같이 1회 도포한 것으로는

발적, 발진 또는 가려움과 같은 즉각적인 또는 지연된 알레르기 반응이 관찰되지 않았다.

<257> 이러한 중합체 중 다수는 실온에서 흡습성인 약스이며 그 조성에 따라 예상 용점이 약 45°C~60°C 또는 그 이상이다. 저분자량 PEG로 제조된 중합체는 실온에서 심지어 액체일 수 있다. 일부 중합체는 실온에서 고체이며 체온에서 용융될 수 있다. 따라서, 이러한  $\pi$ -중합체의 특성으로 인해 이 중합체는 단독으로 또는 약리 활성 물질을 비롯한 다양한 물질과의 혼합물로서 로션, 크림, 연고, 연화제 및 기타 전달 형태의 제조를 위한 우수한 기재가 된다.

#### 실시예 2: 비경구 투여에의 적합성

<259> 인산염 완충 염수 중에서 실시예 1 중합체의 수용액을 제조한 후 0.22  $\mu\text{m}$  필터를 통해 멸균 퓨브로 여과하였다.

<260> 최대 내성 용량 프로토콜을 이용하였는데, 이때 CD-1 마우스에 최대 5% w/v의 중합체 수용액을 체중 kg당 10 mL의 용량으로 꼬리 정맥에 주사하였다. 이 마우스를 12 시간 동안 계속 관찰하고 그 후에는 군에 따라 48~72 시간 동안 2 시간마다 관찰하였다. 혈액 샘플을 채혈하여 분석하였다. 마우스 몇 마리는 희생시켜 종합적 조직 검사를 1차로 행하였다. 그 후 선택된 절편에 대해 현미경 조직 검사를 행하였다.

<261> 대조군 마우스와 처리군 마우스 간에 혈액 화학 분석에 있어서는 차이를 관찰할 수 없었다. 심장, 폐, 신장, 비장, 간, 장, 위, 방광, 피부, 근육, 뼈, 뇌 및 림프절을 비롯한 다양한 장기의 종합적 조직 검사의 경우 대조군 동물에 비해 관찰 가능한 차이나 병변이 확인되지 않았다. 상이한 군의 동물로부터 얻은 복수의 표본을 조사하였으나 동일한 결과가 관찰되었다. 조사된 조직의 세포 조직 구조에 있어서 차이를 관찰할 수 없었다. 신장의 일부는 중합체에의 노출 시간에 따라 감소된 약간의 캐스팅(casting)을 나타내었다. 이는 캐스팅이 일시적 상태이며 시간이 경과함에 따라 정상적으로 될 것임을 함축한다.

<262> 상기 중합체는 주사제와 기타 비경구 제제의 약리 물질로서 의료용으로 사용하기에 안전하다는 결론을 내릴 수 있다. 이 중합체는 경구 용액, 캐플릿 및 정제, 점비 스프레이, 경구/기관지용 에어로졸, 설하, 피부 크림/로션/패치, 점안제, 기타 국소 경로와 기타 투여 경로에 안전하다고 예측하는 것은 합당하다.

#### 5. $\pi$ -중합체에의 표적화 부분의 부착

##### 실시예 1: 아미드 결합 형성에 의한 C-16 $\pi$ -중합체 B에의 갈락토사민의 부착

<264> 갈락토사민(GA)은 간내 아시알로당단백질 수용체(ASGPR)를 표적으로 하며, 공유 결합된 갈락토사민을 보유하는 중합체는 간으로 수송된다[참고 문헌: L. Seymour et al., "Hepatic Drug Targeting: Phase I Evaluation of Polymer-Bound Doxorubicin" J. Clin. Oncology, 20(6): 1668-1676 (2002) 및 이 문헌에 인용된 참고 문헌].

<265> C16- $\pi$ -중합체 B(상기 합성 방법 섹션의 실시예 10)(461 mg, 반복 단위당 0.2 mmol 당량의 COOH)를 14 mL의 물에 분산시키고, 이 분산액에 EDC · HC1(0.485 mmol) 및 N-하이드록시숙신이미드(0.464 mmol)를 첨가하였다. 이 혼합물을 상온에서 15분 동안 교반하고, 물 1 mL 중 갈락토사민 · HC1(0.386 mmol) 및 TEMED(0.387 mmol)의 용액을 첨가하였다. 이 용액을 교반하고, 실리카 젤 상의 TLC와 1-부탄올-아세트산-물(3:1:1)에서의 전개로 반응을 추적하였다. 추가분의 TEMED(0.079 mmol), NHS(0.078 mmol) 및 EDC · HC1(0.193 mmol)을 첨가하여 반응이 완료되게 하였다. TLC가 GA의 소비가 일정한 상태임을 나타내었을 때, 반응 혼합물을 3 x 1,000 mL의 탈이온수에 대해 투석하여(3,500 Da 컷오프 막), 저분자량 반응물과 부산물을 제거하였다. 보유액을 회수하여 일정한 중량(348 mg)이 될 때까지 60°C에서 건조시켰다.

<266> 생성물의 TLC는 유리 GA가 없음(닌하이드린 음성)을 나타내었다. 생성물 샘플을 100°C에서 6 N HCl로 가수분해하여 결합된 GA를 가수분해하였다. TLC 분석은 참조 물질 GA와 동일한 Rf에서 GA가 존재함(닌하이드린 양성)을 나타내었다.

##### 실시예 2: C18- $\pi$ -중합체 A에의 폴산의 부착

<267> BDDC(2.44 g, 8.56 mmol)를 아르곤으로 세정한(BDDC는 꿀과 같은 점조도를 갖는 점성이 큰 물질로서 취급이 까다로움) 125 mL들이 둑근 바닥 플라스크에 청량하였다. C18- $\pi$ -중합체 A(10 g, 4.28 mmol)를 상기 플라스크에 첨가하고, 그 혼합물을 70°C로 가열하고, 반응물을 약 30 분 동안 함께 교반하였다. 폴산(3 g)을 첨가한 후 교반이 가능하도록 충분한 양의 THF를 첨가하였다. 반응물을 방습 상태로 40~70°C에서 밤새 교반하였다. 그 후, THF를 증발시키고, 물(80 mL)을 첨가하고, 그 혼합물을 50°C에서 2 시간 동안 더 교반하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 혼합물을 컷오프가 3,500 달톤인 투석 퓨브 섹션으로 옮기고, 0.1 N HCl(2 x 2,000 mL), 물(2,000 mL), 5% 탄산나트륨(2 x 2,000 mL) 및 물(4 x 2,000 mL)에 대해 투석하여, 미반응 반응물과 부산물을 제거하였다. 담

황색-오렌지색 보유액을 회수하였다. 한 분액을 일정한 중량이 될 때까지 증발시켜 고체 농도를 측정하고 전술한 가용화 실험에 사용하였다.

#### <270> 실시예 3: C16- $\pi$ -중합체 B에의 N-아세틸 뉴라민산(NANA)의 부착

뉴라민산 유도체는, 헤마글루티닌 및 뉴라미니다제 코트 단백질(둘 다 시알산에 결합하는 것으로 알려짐)로 인하여 인플루엔자 바이러스에 대한 표적화 부분인 것으로 생각된다.

<271> BDDC(2.44 g, 8.56 mmol) 및 C18- $\pi$ -중합체 A(10 g, 4.28 mmol)를 배합하여 70°C로 가열하고, 아르곤 하에 약 30분 동안 함께 교반하였다. N-아세틸 뉴라민산(3 g)을 첨가한 후, 유동성을 유지하기 위해 필요에 따라 THF를 첨가하였다. 반응물은 방습 상태로 40~70°C에서 밤새 교반하였다. 물(80 mL)을 첨가하고, 그 혼합물을 50°C에서 2 시간 동안 더 교반하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 이 혼합물을 3.5 kDa 컷오프 막을 사용하여 0.1 N HCl, 5% NaHCO<sub>3</sub> 및 물(각 2,000 mL씩 2회)에 대해 투석하였다.

#### <273> 실시예 4: C16- $\pi$ -중합체 B에의 $\beta$ -D-메틸 뉴라민산(MNA)의 부착

물 1 mL 중 C16- $\pi$ -중합체 B(43  $\mu$ mol COOH 기준)와 뉴라민산  $\beta$ -D-메틸 글리코시드(토론토 리서치 케미칼스)(40  $\mu$ mol)를 함께 혼합하고, 물 0.1 mL 중 40  $\mu$ mol NHS를 첨가한 후, 물 0.1 mL 중 40  $\mu$ mol EDC · HCl을 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 상온에서 48 시간 동안 진탕시키고, 이소프로판올-에틸 아세테이트-물 (4:3:2)을 사용한 실리카 겔 상의 TLC로 분석하였다. 130°C에서의 70% 황산 중 0.2% 오르시놀을 사용한 검출은 출발 중합체에 의한 색 반응을 유발하지 못하였으나, 반응 혼합물의 TLC는 중합체와 함께 이동한 자주색 스팟을 나타내었다.

#### <275> 실시예 5: C16- $\pi$ -중합체 B에의 자나미비어의 부착

자나미비어(GG167)는 바이러스 뉴라미니다제의 강력한 억제제이며, 다가 리간드로서 이 분자를 보유하는 중합체는 인플루엔자 바이러스 복제의 억제제이다.

<277> C16- $\pi$ -중합체 B(920 mg)를 물 30 mL에 분산시키고, 여기에 EDC · HCl(1.2 mmol) 및 N-하이드록시숙신이미드(1.1 mmol)를 첨가하였다. 이 혼합물을 상온에서 20분 동안 교반하고, 물 1 mL 중 5-아세트아미도-7-(6'-아미노헥실)-카바밀옥시-4-구아니디노-2,3,4,5-테트라데옥시-D-글리세로-D-갈락토-논-2-에노피라노손산의 트리플루오로아세트산 염(미국 특허 제6,242,582호 및 제6,680,054호)(0.39 g, 0.67 mmol) 및 TEMED(0.67 mmol)의 용액을 첨가하였다. 이 용액을 실온에서 교반하고, 반응을 TLC로 추적하였다. 이 반응 혼합물을 3 x 1,000 mL 탈이온수에 대해 투석하여(3,500 kDa 컷오프 막), 저분자량 반응물과 생성물을 제거하였다. 보유액을 회수하여 60°C에서 일정한 중량이 될 때까지 건조시켰다. 당 혼입 수준은 구아니딘기에 대한 비색 분석으로 측정할 수 있다[Can. J. Chem., 36:1541 (1958)]. 문헌[Potier et al., Anal. Biochem., 29 287 (1979)]의 방법에 따라 뉴라미니다제 분석을 행할 수 있다.

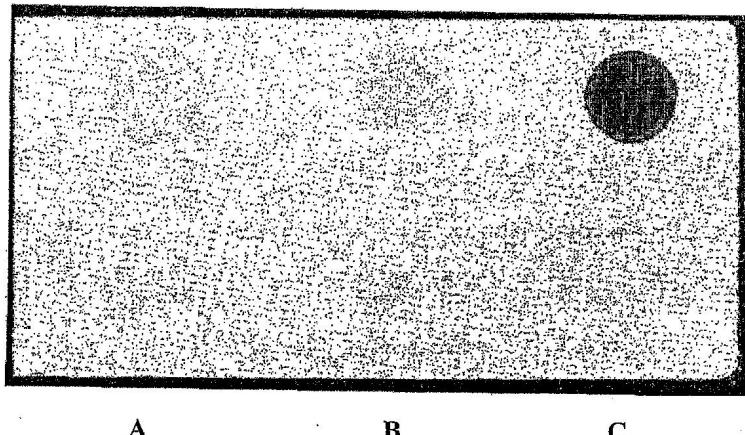
#### <278> 실시예 6: C16- $\pi$ -중합체 A 디말레이트에의 Fab 단편의 부착

표면 당단백질 고분자량 흑색종 관련 항원(HMW-MAA)에 대해 유도된 단일쇄 가변 단편 항체(scFv)는 흑색종 세포를 표적으로 한다[참고 문헌: F. Martin et al., J. Virology, 73:6923-6929 (1999)].

<280> 상기 항체 단편의 디설파이드 결합을, 제조업자의 프로토콜에 따라, 고정화된 TCEP 디설파이드 환원 겔(미국 일리노이주 록포드 소재의 피어스 바이오테크놀러지 제품)을 사용하여 환원시키고, 합성 방법 섹션의 실시예 12의 방법으로 C16- $\pi$ -중합체 A 디말레이트와 반응시켰다.

도면

도면1



도면2

