

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. <i>C08G 69/36</i> (2006.01)	(45) 공고일자 2006년03월28일 (11) 등록번호 10-0564714 (24) 등록일자 2006년03월21일
(21) 출원번호 10-1999-7000264 (22) 출원일자 1999년01월15일 번역문 제출일자 1999년01월15일 (86) 국제출원번호 PCT/AU1997/000447 국제출원일자 1997년07월17일	(65) 공개번호 10-2000-0067876 (43) 공개일자 2000년11월25일 (87) 국제공개번호 WO 1998/03573 국제공개일자 1998년01월29일
(81) 지정국	국내특허 : 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 캐냐, 키르키즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 알바니아, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 성가포르, 짐바브웨, 가나, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로,
	AP ARIPO특허 : 캐냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 가나, 짐바브웨,
	EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,
	EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀란드,
	OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,
(30) 우선권주장	PO1044 1996년07월17일 오스트레일리아(AU)
(73) 특허권자	바이오몰레큘라 리서치 인스티튜트 리미티드 오스트레일리아 빅토리아 3052 파크빌 로얄 퍼레이드 343
(72) 발명자	매튜즈배리로스 오스트레일리아 빅토리아 3788 올린다로이로드 9 홀란조지 오스트레일리아 빅토리아 3186 브라이튼워스트리트 86
(74) 대리인	나영환 김성기

심사관 : 박노춘

(54) 혈관 형성을 억제하는 화합물

요약

본 발명은 하기 (i)와 (ii)로부터 선택된 화합물 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 인간 또는 인간을 제외한 동물에 있어서 예방 또는 치료를 위해 혈관 형성을 억제하는 방법에 관한 것이다:

- (i) 다수개의 측쇄기를 함유하는 선형의 비탄수화물 중합체(상기 측쇄기들 중 하나 이상은 그들에 결합 또는 연결되어 있는 하나의 음이온 또는 양이온 함유 부분을 가짐); 및
- (ii) 다수개의 말단기를 함유하는 덴드리머(상기 말단기들 중 하나 이상은 그들에 결합 또는 연결되어 있는 하나의 음이온 또는 양이온 함유 부분을 가짐).

명세서

기술분야

본 발명은 혈관 형성을 억제하는 데 효과적인 화합물에 관한 것으로서, 따라서 헤파린과 같은 황산화된 다당류 대신, 재발 협착증을 예방하고, 상처 유합(癒合)을 촉진시키고, 종양 세포 전이를 억제하는 데 사용될 수 있는 화합물에 관한 것이다.

배경기술

황산화된 다당류는 혈관 형성을 억제하고 혈관 형성과 관련한 질환 및 증상의 치료에 사용된다는 것은 이미 알려져 있다. 따라서, 본 명세서에서 참고로 인용한 국제 특허 출원 PCT/GB95/00515(WO 95/24907)에는 헤파린, 및 웬토산 폴리설플레이트 및 넥스트란설플레이트와 같은 기타의 황산화된 다당류가 이를 질환 및 증상의 치료에 사용된다는 것과 또 다른 황산화된 다당류인 라미나린설플레이트(이는 헤파린의 항응고 활성의 약 30%만을 보임)가 혈관의 평활근 세포 증식을 억제하고, 세포의 매트릭스내에 저장된 활성 성장 인자의 방출을 활성화시킴으로써 상처 유합을 촉진하고, 헤파린 분해 효소 활성을 억제함으로써 종양 세포 전이 억제에 사용된다는 것이 기재되어 있다.

국제 특허 출원 PCT/AU95/00350(WO 95/34595)에는 다수개의 말단기를 함유하는 폴리아미도아민 덴드리머(dendrimer) 또는 폴리라이신 덴드리머와 같은 덴드리머를 포함하는 일군의 항비루스성 화합물이 기재되어 있는데, 상기 말단기 중 하나 이상은 그들에 결합 또는 연결되어 있는 하나의 음이온 또는 양이온 함유 부분, 특히 세포산 함유 부분, 카르복실산 함유 부분 또는 트리메틸 암모늄 함유 부분을 갖는다.

본 발명은 이온기들을 선형 비탄수화물 중합체 또는 수상(樹狀; dendritic) 중합체에 결합시킴으로써 형성된 다이온성 물질을 혈관 형성을 억제하고 관련 질환 또는 증상의 치료에 사용하는 것에 관한 것이다

발명의 상세한 설명

본 발명에 따르면, 인간 또는 인간을 제외한 동물에 있어서 혈관 형성을 예방학적 또는 치료학적 측면에서 억제하는 방법을 제공하는 것으로, 이는 이하의 (i)와 (ii)로부터 선택된 화합물 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함한다:

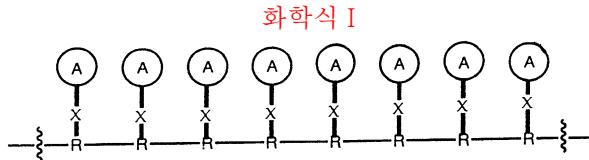
- (i) 다수개의 측쇄기를 함유하는 선형의 비탄수화물 중합체(상기 측쇄기들 중 하나 이상은 그들에 결합 또는 연결되어 있는 하나의 음이온 또는 양이온 함유 부분을 가짐); 및
- (ii) 다수개의 말단기를 함유하는 덴드리머(상기 말단기들 중 하나 이상은 그들에 결합 또는 연결되어 있는 하나의 음이온 또는 양이온 함유 부분을 가짐).

본 발명의 방법에 사용되는 화합물로는 세포산 함유 부분, 카르복실산 함유 부분, 인산 또는 포스포산 함유 부분, 봉소산 함유 부분, 누라민산 또는 시알산 함유 부분 또는 이들의 4 위치 또는 다른 위치가 변형된 누라민산 또는 시알산을 함유하

는 부분이 측쇄기에 연결되어 있는 선형 중합체 및 설폰산 함유 부분, 카르복실산 함유 부분, 인산 또는 포스포산 함유 부분, 봉소산 함유 부분, 누라민산 또는 시알산 함유 부분 또는 이들의 4 위치 또는 다른 위치가 변형된 누라민산 또는 시알산을 함유하는 부분이 말단기에 연결되어 있는 덴드리머가 특히 바람직하다.

본 발명의 방법에 사용된 화합물들은 각각 본 명세서에서는 선형의, 다이온성 중합체 또는 다이온성 덴드리머로 불리며, 이를 용어는 본 명세서 및 후술된 청구범위 걸쳐서 모두 사용되는 데, 이는 이를 중합체 또는 덴드리머 자체 뿐 아니라 그 것의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 수의학적으로 허용 가능한 염, 예를 들면 나트륨염, 칼륨염 또는 칼슘염과 같은 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속염도 포함하는 것이다.

본 발명에 사용되는 바람직한 화합물은 (i) 하기 화학식 I의 선형 다이온성 중합체와 (ii) 하기 화학식 II의 다이온성 덴드리머를 포함한다 :

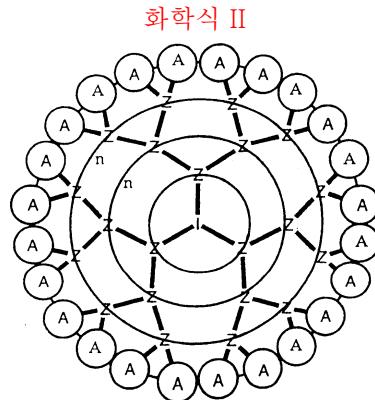


상기 식 중,

R은 선형 중합체 골격을 형성하는 비탄수화물 단량체 유닛이고,

X는 단량체 유닛 R의 측쇄기들 위에 있는 임의의 연결기이며,

A는 음이온 함유 부분이다.



상기 식 중,

I는 개시제 코어이고,

Z은 내부 분지 유닛이며,

n은 덴드리머 발생 수를 나타내는 정수이고,

A는 임의의 연결기 X를 통해 내부 분지 유닛 Z에 연결될 수 있는 음이온 함유 부분이다.

본 발명에 있어서, 바람직한 선형 다이온성 중합체는 음이온성 부분들(A)을, 임의로 연결기(X)를 통해 선형 비탄수화물 중합체 골격(다수개의 단량체 유닛 R로 구성됨)에 콘쥬게이션(conjugation)시킴으로써 형성되는 다이온성 물질이다. 얻어진 다이온성 선형 중합체는 일정한 중량 범위 분포의 반복 유닛을 가지므로 분자량 분포의 중앙값을 목적하는 범위로 제공한다. 분자량 분포의 중앙값은 1,000 내지 1,000,000인 것이 바람직하며, 10,000 내지 600,000인 것이 더욱 바람직하다.

단량체 유닛 R은 아미노 부분 또는 아미드 부분인 것이 바람직하며, 아미노산 부분인 것이 더욱 바람직하다. 라이신 부분이 단량체 유닛인 것이 특히 바람직하다. 다양한 분자량 범위를 갖는 폴리-L-라이신은 시그마 케미칼 컴퍼니에서 시판한다.

음이온성 부분 A는 직접적으로 또는 각종 작용성 연결기 X(그 예로는 에스테르, 아미드, 에테르, 티오에테르, 아민, 우레아, 티오우레아, 카르바메이트 및 카보네이트를 들 수 있으나 이에 한정하는 것은 아님)를 통해 선형 중합체 골격상의 반응성 측쇄기에 연결될 수 있다.

또한, 임의의 연결기 X는 중합체와 음이온 부분 A사이에서 스페이서(spacer)로 작용할 수 있으며, 알킬 사슬(임의 치환 또는 임의 분지됨), 알콕시, 폴리알콕시, 알킬티오 또는 폴리알킬티오 사슬(임의 치환됨), 또는 알케닐, 다수개의 알케닐, 알카닐 또는 다수개의 알카닐 사슬(임의 치환됨)로 이루어질 수 있다. 적당한 스페이서 사슬은식 $-(CH_2)_n-Z-(CH_2)_n-$ (식 중, Z은 $-CH_2-$, $-CH=CH-$, $-C \equiv C-$, $-O-$ 또는 $-S-$ 이고, n은 1 내지 15의 정수임)의 기를 포함한다.

덴드리머는 처음에는 코어 분자로부터 시작하여 반복적인 반응 순서에 의해 형성된 고도로 분지된 거대 분자성 화합물로서, 연속 층 또는 연속 단들이 연속적인 "생성 반응"으로 첨가되어 삼차원의 매우 질서 정연한 중합체 화합물을 형성한 것이다. 덴드리머는 다음과 같은 특징을 갖는다 : i 하나 이상의 반응 부위를 가질 수 있으며 점 형태 또는 눈에 띄는 크기이므로 덴드리머의 최종 위상(位相)에 영향을 미칠 수 있는 개시제 코어(I); ii 개시제 코어에 부착된 분지된 반복 유닛(Z)의 층들; iii 덴드리머의 표면에 임의로 연결기(예, 전술한 연결기 X)를 통해 부착된 작용성 말단기(예, 음이온 부분 A). 본 발명은 이온 부분을 부착시키기 위한 골격으로서 수상 구조(dendritic structure)를 사용한다. 본 발명은 본 명세서에서 상술한 구형 덴드리머로 한정하는 것은 아닌 바, 어떠한 수상 구조도 기본으로 할 수도 있다. 모양과 구조면에 있어서의 덴드리머의 다양성은 당해 기술 분야에 공지되어 있다.

덴드리머의 제법은 공지되어 있으며, 이는 미국 특허 제4,289,872호 및 제4,410,688호(라이신 유닛으로 된 층들을 기본으로 한 덴드리머가 기재되어 있음) 뿐 아니라 미국 특허 제4,507,466호, 제4,558,120호, 제4,568,737호 및 제4,587,329호(폴리아미도아민 또는 PAMAM 덴드리머를 비롯한 기타 유닛을 기본으로 한 덴드리머가 기재되어 있음)의 실시예에 기재되어 있다. 이들 미국 특허들에 기재된 덴드리머는 표면 변성제로서, 금속 칼레이트제로서, 항유화제(抗乳化劑) 또는 오일/물 에멀션으로서, 종이 제조시 습윤 강도 강화제로서, 페인트와 같은 수성 배합물의 점도 조절제로서 사용하기에 적당한 것으로 기재되어 있다. 또한, 라이신 유닛을 기본으로 하는 덴드리머를 약학적 투여 형태의 제조시 기재로서 사용할 수 있다는 것이 미국 특허 제4,289,872호 및 제4,410,688호에서 제안하고 있다.

국제 특허 출원 공개 WO 88/01178, WO 88/01179 및 WO 88/01180호에는 덴드리머가 담지된 약학적 물질 또는 농학적 물질과 같은 또 다른 물질과 콘쥬게이션 결합되거나 또는 배합되어 있는 콘쥬게이트가 기재되어 있다. 또한, 국제 특허 출원 공개 WO 95/24221에는 생물학적 감응 조절제로 가능한 담체 물질 및 임의의 표적 유도기와 함께 하나 이상의 덴드리머로 구성된 수상 중합체 콘쥬게이트가 기재되어 있다. 전술한 미국 특허와 이들 특허 공보에는 다양한 덴드리머가 광범위하게 개시되어 있으며, 그 제조 방법 또한 개시되어 있는 바, 이들 공보 각각의 내용은 본 명세서에서 참고로 인용하였다.

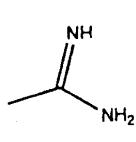
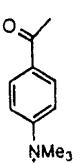
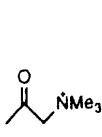
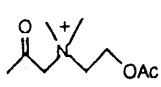
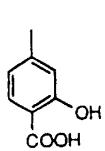
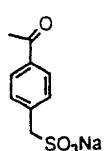
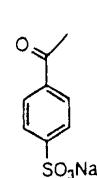
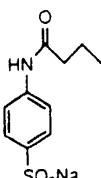
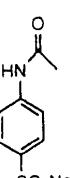
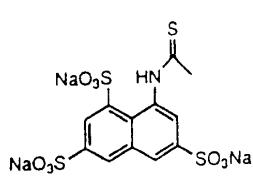
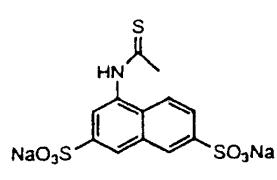
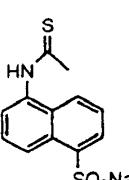
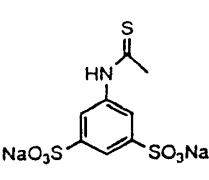
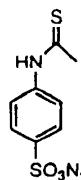
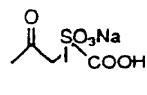
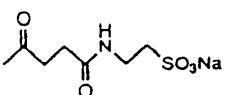
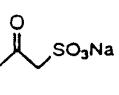
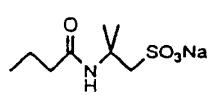
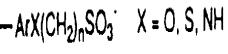
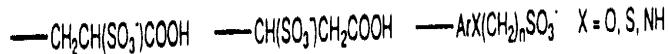
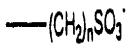
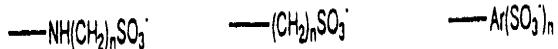
본 명세서에서 사용한 용어 "덴드리머"란 가장 광범위한 의미로 해석하여 특허 공고 WO 88/01178, WO 88/01179 및 WO 88/01180에 개시된 바와 같은 이들 덴드리머의 모든 형태와 조성을 본 발명의 범주에 포함시킨다. 또한, 이 용어는 이들 특허 공고 문현에 개시된 바와 같은 연결되거나 또는 브릿지된(bridged) 덴드리머를 포함하는 것이다.

본 발명의 바람직한 덴드리머는 2개 이상의 수상 분지에 공유 결합된 다가 코어를 포함하는 것으로서, 바람직하게는 2회 이상의 생성 반응을 통해 확장된다. 특히, 바람직한 덴드리머는 폴리아미도아민(PAMAM)덴드리머, PAMAM(EDA)덴드리머 및 폴리라이신 덴드리머이다.

본 발명에 따르면, 선형 중합체상의 측쇄기 또는 덴드리머 표면의 말단기를 중 한개 이상, 바람직하게는 다수개가 이들에 공유 결합되는 음이온 함유 부분 또는 양이온 함유 부분을 갖는다. 선형 중합체의 측쇄 또는 덴드리머의 분지쇄에는 아미노기 또는 기타 작용성 반응기(예, OH, SH 등)가 말단에 존재하며, 이는 연속하여 음이온 부분 또는 양이온 부분과 반응할 수 있다. 선형 중합체의 측쇄기 또는 덴드리머의 말단기가 아민기인 경우, 그 음이온 함유 부분 또는 양이온 함유 부분은 아미드 및 티오우레아 연결기를 비롯한 다양한 작용기를 통해 덴드리머에 연결될 수 있다. 선형 중합체의 측쇄기 또는 덴드리머의 말단기에 결합될 수 있는 바람직한 음이온 함유 부분 또는 양이온 함유 부분은 살포산 함유 부분, 카르복실산 함

유 부분(누라민산 함유 부분 및 시알산 함유 부분 및 변성된 누라민산 함유 부분 및 시알산 함유 부분을 포함함), 봉소산 함유 부분, 인산 및 포스폰산 함유 부분(에스테르화된 인산 및 포스폰산 함유 부분을 포함함) 및 트리메틸암모늄 함유 부분을 들 수 있다.

아미노 또는 기타의 측쇄 또는 말단기에 결합 또는 연결될 수 있는 적당한 음이온 함유 부분 및 양이온 함유 부분은, 예를 들면 이하의 기들(이 때, n은 0 또는 양의 정수이고, 더욱 구체적으로는 0 또는 1 내지 20의 정수임)을 들 수 있다 :



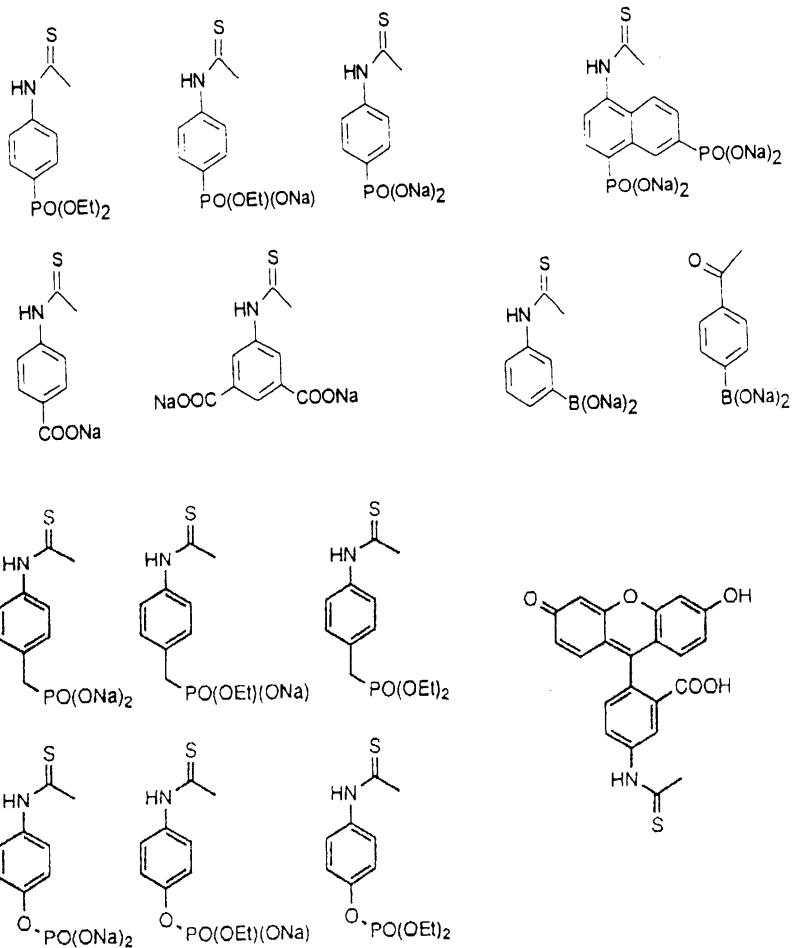
-ArXP(=O)(OR)₂ X = O, CH₂, CHF, CF₂ R = 알킬, 아릴, H, Na

-ArXP(=O)(OR¹)(NR²R³) X = O, CH₂, CHF, CF₂ R¹ = 알킬, 아릴, H, Na

R², R³ = 알킬, 아릴

-Ar[P(=O)(OR)₂]_n R = 알킬, 아릴, H, Na n = 1 ~ 3

$-Ar[B(OH)_2]_n$ n = 1 ~ 3 $-Ar[COOH]_n$ n = 1 ~ 3



전술한 것외에도, 다양한 누라민산 또는 시알산 함유 부분 또는 변성된 누라민산 또는 시알산 함유 부분들이 본 발명에 따라 측쇄 또는 말단기에 결합 또는 연결될 수 있다. 이들 부분은 누라민산의 다양한 N- 또는 O-치환 유도체, 특히 N- 또는 O-아실 유도체(예, N-아세틸, O-아세틸 및 N-글리콜릴 유도체) 뿐 아니라 누라민산 기가 변성된, 특히 4 위치가 아미노기, 아미도기, 시아노기, 아지도기 또는 구아니디노기에 의해 치환된 부분들을 들 수 있다.

본 발명의 음이온 또는 양이온 선형 중합체 및 덴드리머는 당해 기술 분야에 공지된 표준 화학적 방법으로 제조될 수 있다. 적당한 방법이 이하의 실시예에 기술되어 있다.

전술한 바와 같이, 본 발명의 음이온 또는 양이온 선형 중합체 또는 덴드리머는 혈관 형성을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 본 발명의 방법은 새로운 혈관 성장을 수반하는 증상, 예를 들면 만성 염증, 당뇨병 망막증, 건선, 류마티스양 관절염의 치료 뿐 아니라, 혈관의 평활근 세포 증식을 억제하는 것에 의한 재발협착증의 방지, 세포외 매트릭스에 저장되는 활성 성장 인자의 방출을 활성화시키는 것에 의한 상처 유합의 가속화 및 혈관 형성을 억제함으로써 종양 세포 전이를 억제하는 것을 비롯한 관련 질환 및 증상의 치료에 있어서 환자의 혈관 형성을 억제하는 것을 포함한다.

따라서, 본 발명의 또 다른 일면에서는 인간 또는 인간을 제외한 동물에서의 혈관 형성을 억제하는 예방학적 또는 치료학적인 약학 조성물 또는 수의학적 조성물을 제공하는 데, 이 조성물은 광의로 전술한 바와 같이 음이온 또는 양이온 선형 중합체 또는 덴드리머와 함께 1 종 이상의 약학적으로 허용 가능한 또는 수의학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제를 포함한다.

이러한 조성물의 배합은 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 적당한 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 희석제로는 종래의 모든 임의의 용매, 분산 매체, 충전제, 고체 담체, 수용액, 피복물, 항균제, 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등을 들 수 있다. 약학적 활성 물질에 대해 이러한 매체와 시약을 사용하는 것은 당해 분야에 공지되어 있는 것으로서, 예를 들면 레밍

톤의 *Pharmaceutical Sciences*(18판, 맥 출판사, 미국 펜실베니아주 소재)에 기재되어 있다. 활성 성분과 혼화되지 않는 임의의 종래 매체 또는 시약을 제외하고는 본 발명의 약학 조성물 내에 이들을 사용하는 것은 가능하다. 또한 보조적인 활성 성분도 조성물 내에 혼입될 수 있다.

투여가 용이하고 사용량에 특징이 있는 단위 복용량 형태의 조성물을 제제화하는 것이 특히 유리하다. 본 명세서에 사용된 단어 단위 복용량 형태란 용어는 치료를 요하는 인간에 대한 일회의 용량으로 적합한 물리적으로 분리된 단위를 말하는 것으로서, 각각의 단위는 필요로 하는 약학적 담체 및/또는 희석제와 함께 목적하는 치료 효과를 발휘할 것으로 계산된 활성 성분의 소정량을 함유한다. 본 발명의 신규한 단위 복용량 형태에 대한 구체적인 내역은 활성 성분의 독특한 특징 및 달성을 하고자 하는 특정한 치료 효과 (a)와, 이를 활성 성분을 특정한 치료 용도로 화합하는 데 있어서의 당해 기술 분야의 제한 (b)을 반영하며, 이에 일차적으로 좌우된다.

본 발명의 또 다른 일면은 인간 또는 인간을 제외한 동물 환자에서의 혈관 형성 억제에 의한 치료학적 또는 예방학적 치료에, 그러한 치료학적 또는 예방학적 치료용 의약의 제조에 광의로 위에 기술한 음이온 또는 양이온 선형 중합체 또는 텐드리머의 유효량을 사용하는 방법을 제공하는 것이다.

다양한 투여 경로에 의할 수 있다. 물론, 선택되는 특정의 유형은 치료하고자 하는 특정 증상 및 치료 효과에 요구되는 용량에 좌우된다. 일반적으로 말하자면, 본 발명의 방법은 의학적으로 허용 가능한 임의의 투여 유형을 사용하여 실시될 수 있는데, 이것이의 의미는 임상학적으로 허용할 수 없는 부작용을 일으키지 않고 본 발명의 활성 성분을 치료 농도로 방출하는 임의의 유형을 의미하는 것이다. 이러한 투여 형태로는 경구 투여, 직장내 투여, 국소 투여, 비강내 투여, 흡입 투여, 경피 투여 또는 비경구(예, 피하내, 근육내 및 정맥내) 투여 경로를 들 수 있다. 경구 투여용 제제는 캡슐, 정제, 로젠지 (lozenge) 등과 같은 개별적인 단위를 포함한다. 기타의 경로는 척수 유체내로의 직접적인 수막강내(隧膜腔内) 투여, 당해 분야의 업자에게 공지된 다양한 카테터 및 기구 혈관성형술 장치에 의한 것과 같은 직접 도입법 및 목적하는 부위로의 실질내(實質內) 주사를 들 수 있다.

조성물은, 편의상 단위 복용량 형태로 제공될 수 있으며 이는 약학 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 이러한 방법은 활성 성분을, 하나 이상의 보조 성분을 구성하는 담체와 배합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 조성물은 활성 성분을 액상 담체, 미분 고체 담체 또는 이들 모두와 균질하고 조밀하게 배합한 후, 필요에 따라 제품으로 성형시킴으로써 제조된다.

경구 투여용으로 적합한 본 발명의 조성물은 캡슐, 카세제(cachet), 정제 또는 로젠지와 같은 개별적인 단위로 제공할 수 있는데, 이들 각각은 소정량의 활성 성분을 수성 액제 또는 비수성 액체 중의 리포좀 형태로 또는 혼탁액(예, 시럽, 엘릭시르 또는 에멀션)으로서 함유한다.

비경구 투여용으로 적합한 조성물은, 편의상 수용자의 혈액과 등장성인 것이 바람직한 활성 성분의 멸균 수성 제제를 포함한다. 이 수성 제제는 적당한 분산제 또는 습윤제 및 혼탁제를 사용하여 공지된 방법에 따라 배합될 수 있다. 또한, 멸균 주사식 제제는 비독성의 경구 투여 가능한 희석제 또는 용매 중의 주사식 멸균 용액 또는 혼탁액으로서, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 중의 용액 형태가 될 수 있다. 사용할 수 있는 허용 가능한 부형제 및 용매로는 물, 링거(Ringer)의 용액 및 등장성 염화나트륨 용액을 들 수 있다. 또한, 편의상 멸균 고정 오일이 용매 또는 혼탁용 매체로 사용된다. 이를 위해, 합성 모노글리세라이드 또는 디글리세라이드를 비롯한 임의의 혼합 고정 오일이 사용될 수 있다. 또한, 올레산과 같은 지방산을 주사식 제제 중에 사용할 수 있다는 것이 밝혀졌다.

또한, 비강내로 또는 흡입에 의해 투여하도록 고안한 시스템으로의 송달을 위해 활성 성분을 제제화할 수 있는데, 예를 들면 활성 성분을 함유하는 미분 에어로졸 분무 형태로 제제화할 수 있다.

기타의 송달 시스템으로는 서방성 송달 시스템을 들 수 있다. 바람직한 서방성 송달 시스템은 서방성 펠렛 또는 캡슐 형태로 본 발명의 활성 성분을 방출시키기 위해 제공할 수 있는 것이다. 많은 유형의 서방성 송달 시스템이 유효하게 사용될 수 있다. 이는 (a) 활성 성분을 매트릭스 내에 포함시킨 침식성(erosional) 시스템 및 (b) 활성 성분이 중합체를 조절된 속도로 투과하는 확산 시스템을 들 수 있으나, 이에 제한하는 것은 아니다. 또한, 펌프계 하드웨어 송달 시스템을 사용할 수 있는데, 이 중 일부는 이식에 적합하다.

활성 성분은 예방학적 또는 치료학적 유효량으로 투여된다. 예방학적 또는 치료학적 유효량이란 소정의 효과를 달성하는데, 또는 치료하고자 하는 특정 증상의 개시를 지연시키거나, 전개를 억제하거나 또는 개시 또는 전개를 함께 정지시키는데 적어도 부분적으로 필요한 양을 의미한다. 이 양은, 물론 치료하고자 하는 특정 증상, 증상의 경증, 그리고 각 환자의 나이, 신체 콘디션, 치수, 몸무게 및 동시 치료를 비롯한 변수에 좌우된다. 이러한 요소들은 당해 기술 분야에 공지되어 있는

바, 본 명세서에서는 일상적인 실험 과정만을 기술하였다. 일반적으로, 최대 용량, 즉 확실한 의학적 판단에 따른 가장 안전한 용량을 사용하는 것이 바람직하다. 그러나, 당업자라면, 의학적인 이유로, 심리학적 이유로 또는 실질적인 기타 이유로 더 낮은 용량 또는 용인 가능한 용량을 투여할 수 있다는 것을 인식할 것이다.

일반적으로, 활성 성분의 일일 경구 투여 용량은 약 0.01 mg/kg/일 내지 약 1000 mg/kg/일이다. 처음에는 소량을(0.01 mg 내지 1 mg) 투여한 후, 최대 약 1000 mg/kg/일로 투여량을 증가시킬 수 있다. 이 용량에서 수용자의 치료 효과가 불충분한 경우에는 환자의 내성이 용인하는 한 더 많은 용량(또는 상이한 더욱 국한된 송달 경로에 의한 효과적인 더 많은 용량)을 사용할 수 있다. 화합물의 적당한 전신 농도를 얻기 위해 일일 수회 투여를 고려한다.

또한, 본 발명의 활성 성분은 수의학적 조성물의 형태로 사용할 수 있도록 제공될 수 있다. 이는, 예컨대 당해 기술 분야에 통상적인 방법으로 제조할 수 있다. 이러한 수의학적 조성물의 예들은 이하 투여 방법에 적당한 것을 포함한다 :

- (a) 경구 투여, 외부 투여, 예컨대 마시는 약(drench)(예, 수성 또는 비수성 용액 또는 혼탁액); 정제 또는 환과(丸塊); 공급 원료 배합용 분말, 과립 또는 펠릿; 혜에 도포되는 페이스트;
- (b) 비경구 투여, 예를 들면 멸균 용액 또는 혼탁액의 형태로, 예컨대 피하, 근육내 또는 정맥내 주사에 의한 비경구 투여; 또는 (적당한 경우) 혼탁액 또는 용액을 유두를 통해 유방에 도입시키는 유방내 주사에 의한 비경구 투여;
- (c) 국소 투여, 예를 들면 피부에 도포되는 크리임, 연고 또는 스프레이; 또는
- (d) 질내 투여, 예를 들면 폐사리, 크리임 또는 발포체 형태.

본 명세서 및 후술하는 특허 청구의 범위를 통해, 특별한 언급이 없으면 용어 "포함하다" 또는 이의 변형인 "포함하는"은 기술한 정수 또는 정수들의 군을 암시하는 것으로 이해되나, 기타 임의의 정수 또는 정수들의 군을 배제하는 것은 아닌 것으로 생각하여야 한다.

본 발명의 추가 특징은 이하의 실시예로 명확해진다. 이는 예시를 위한 것으로 본 발명을 한정하고자 하는 것은 아니다. 이하의 실시예에서, PAMAM 덴드리머란 암모니아 코어를 기본으로 하는 폴리아미도아민 덴드리머를 일컫는 것으로서, 이는 미국 특허 제4,507,466호, 제4,558,120호, 제4,568,737호 및 제4,587,329호에 상술되어 있다. PAMAM(EDA) 덴드리머란 에틸렌 디아민 코어를 기본으로 하는 폴리아미도아민 덴드리머를 일컫는 것이며, BHAl_xlys_ylys_z 덴드리머는 벤즈히드릴아민 코어와 라이신 분지 단위를 기본으로 하는 폴리라이신 비대칭 덴드리머를 일컫는 것으로서, 이는 미국 특허 제4,289,872호 및 제4,410,688호에 기재되어 있다. 폴리아미도아민 덴드리머 PAMAM 1.0, PAMAM 2.0, PAMAM 3.0, PAMAM 4.0, PAMAM 5.0 또는 더 높은 발생 형태, PAMAM 4.0(EDA) 및 폴리라이신 덴드리머 BHAl_{lys}_{lys}₂, BHAl_{lys}_{lys}₂lys₄, BHAl_{lys}_{lys}₂lys₄lys₈ 및 BHAl_{lys}_{lys}₂lys₄lys₈lys₁₆, BHAl_{lys}_{lys}₂lys₄lys₈lys₁₆lys₃₂, BHAl_{lys}_{lys}₂lys₄lys₈lys₁₆lys₃₂lys₆₄ 또는 이의 더 높은 발생 형태는 전술한 미국 특허 제4289872호, 제4410688호, 제4507466호, 제4558120호, 제4568737호 및 국제 특허 공개 WO 88/01178, WO 88/01179, WO 88/01180 및 WO 95/24221에 기술된 바와 같이 제조된다.

실시예

실시예 1

2-아크릴아미도-2-메틸 프로판 설폰산과 수상 중합체를 반응시켜서 설폰산 말단화된 덴드리머를 제조하는 방법

A PAMAM 1.0

고체 탄산나트륨(0.13 g, 1.0 mmol)을 물(3 mL) 중의 2-아크릴아미도-2-메틸 프로판 설폰산(0.41 g, 2.0 mmol)의 교반 용액에 서서히 첨가하였다. 가스 발생이 정지된 후, 그 용액의 pH는 8.0이었다. 이어서, 물(1 mL) 중의 PAMAM 1.0(0.12 g, 0.33 mmol)의 용액을 상기 용액에 첨가한 후, 벤질 트리메틸암모늄 수산화물의 40% 수용액 4 방울을 첨가하였다. 그 후, 그 용액을 3 일간 60°C에서 질소하에 가열한 후 농축시켰다. 그 잔류물을 젤 여과(Sephadex G10; 물)에 의해 정제한

후, 동결 건조시켜서 설포화된 PAMAM 1.0 텐드리머를 회백색 고체로 얻었다(0.51 g). ^1H 및 ^{13}C nmr 스펙트럼으로 디알킬화 PAMAM 1.0 텐드리머와 모노알킬화 PAMAM 1.0 텐드리머의 혼합물(약 70:30)이라는 것을 알았다. ^{13}C nmr (D_2O): δ 31.0, 31.1, 37.1, 37.7, 41.3, 48.6, 51.5, 53.1, 53.4, 55.6, 56.2, 61.2, 61.5, 178.3, 179.0, 179.8.

B PAMAM 2. 0

PAMAM 2.0을 전술한 2-아크릴아미도-2-메틸 프로판 설포산과 반응시켰다. 그 미정제 생성물을 겔 여과(Sephadex G10; 물)에 의해 정제한 후, 동결 건조시켜서 회백색 고체를 얻었다. ^1H 및 ^{13}C nmr 스펙트럼으로 디알킬화 PAMAM 2.0 텐드리머와 모노알킬화 PAMAM 2.0 텐드리머의 혼합물(약 65:35)이라는 것을 알았다. ^{13}C nmr (D_2O): δ 31.0, 31.1, 37.1, 37.7, 41.3, 48.7, 51.5, 53.4, 55.6, 56.2, 61.2, 61.5, 178.4, 179.0, 179.1, 179.6.

벤질트리메틸암모늄 수산화물을 첨가하지 않고 전술한 반응을 반복하여 유사한 결과를 얻었다.

C. PAMAM 3.0 BRI2783

PAMAM 3.0을 전술한 2-아크릴아미도-2-메틸 프로판 설포산과 반응시켰다. 단, 탄산나트륨을 약간만 과량으로 사용하고 벤질트리메틸암모늄 수산화물을 첨가하지 않았다. ^1H 및 ^{13}C nmr 스펙트럼으로 디알킬화 PAMAM 3.0 텐드리머와 모노알킬화된 PAMAM 3.0 텐드리머의 혼합물(약 50:50)이라는 것을 알았다. ^{13}C nmr(D_2O): δ 31.0, 31.1, 36.9, 37.4, 41.1, 48.6, 51.5, 53.4, 55.7, 56.2, 61.1, 61.5, 178.2, 178.9, 179.0, 179.8.

D. PAMAM 4.0 BRI2784

PAMAM 4.0을 PAMAM 3.0에 대해 전술한 바와 같이 2-아크릴아미도-2-메틸 프로판 설포산과 반응시켰다. ^1H 및 ^{13}C nmr 스펙트럼으로 디알킬화 PAMAM 4.0 텐드리머와 모노알킬화 PAMAM 4.0 텐드리머의 혼합물(약 35:65)이라는 것을 알았다. ^{13}C nmr(D_2O): δ 31.0, 31.1, 36.9, 37.3, 41.1, 48.5, 51.5, 53.5, 55.7, 56.2, 61.1, 61.5, 178.1, 178.9, 179.0, 179.8.

실시예 2

나트륨 설포아세트아미드 말단화된 텐드리머의 제법

A PAMAM 1.0

건조 DMF(1 mL) 중의 4-나트로페닐 브로모아세테이트(0.40 g, 1.5 mmol)의 용액을 DMF(3 mL) 중의 PAMAM 1.0(0.18 g, 0.5 mmol)의 교반한 용액에 첨가하였다. 얻은 황색의 용액을 실온에서 20 시간동안 교반하였으며, 이 때의 닌히드린 시험은 음성이었다. 그 용액을 농축하여(30° /0.1 mmHg) 황색 오일을 얻었다. 이 오일을 물과 클로로포름사이에 분배하여 수성 층을 분리한 후 클로로포름(2X)으로 세척하고 마지막으로 에틸 아세테이트로 세척하였다. 그 수용액을 농축하여(35° /25 mmHg) 브로모아세틸화된 PAMAM 1.0 텐드리머를 황색 오일 형태로 얻었다(0.36 g, 100%). ^{13}C nmr (D_2O): δ 32.8, 33.3, 43.0, 43.5, 54.4, 174.5, 176.4.

물(1 mL) 중의 아황산 나트륨(0.2 g, 1.6 mmol) 용액을 물(5 mL) 중의 전술한 브로모아세틸화된 PAMAM 1.0 텐드리머(0.36 g, 0.5 mmol)의 용액에 첨가하고, 그 용액을 실온에서 11 일간 방치하였다. 그 황색 용액을 농축하여 황색빛의 고체를 얻었다(0.60 g). ^{13}C nmr (D_2O): δ 34.4, 43.1, 43.4, 54.0, 61.7, 171.3, 177.2.

상기 아황산나트륨 용액을 제1 반응으로부터 얻은 미정제 수성 추출물에 단순히 첨가함으로써, 브로모아세틸화된 텐드리머 분리 단계를 수반하지 않고 전술한 반응 과정을 수행할 수 있었다.

B PAMAM 2. 0

방법 1:

건조 DMF(1 mL) 중의 4-니트로페닐 브로모아세테이트(0.18 g, 0.7 mmol)의 용액을 DMF(3 mL) 중의 PAMAM 2.0(0.10 g, 0.1 mmol)의 교반한 용액에 첨가하였다. 얻은 황색의 용액을 실온에서 20시간동안 교반하였으며, 이 때의 닌하드린 시험은 음성이었다. 그 용액을 와동시키면서 물(150 mL)에 첨가하고 그 혼합물을 클로로포름(3X) 및 에틸 아세테이트로 추출하였다. 물(1 mL) 중의 아황산나트륨(0.1 g, 0.8 mmol) 용액을 상기 미정제 브로모아세틸화된 텐드리머 용액에 첨가하고 그 혼합물을 실온에서 3일간 방치하였다. 이어서, 그 황색빛의 용액을 농축하여 황색 고체 잔류물을 얻었으며, 이를 겔여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제하여 나트륨 설포아세트아미드 말단화된 PAMAM 2.0 텐드리머를 얻었다(103 mg). ^{13}C nmr (D_2O): 833.0, 35.7, 36.0, 37.7, 40.3, 43.0, 43.2, 53.4, 53.7, 56.0, 61.6, 171.2, 174.6, 178.5.

방법 2

고체 숙신이미딜 아세틸티오아세테이트(67 mg, 0.33 mmol)를 건조 DMF(2 mL) 중의 PAMAM 2.0(52 mg, 0.05 mmol)의 용액에 첨가한 후, 얻은 용액을 실온에서 2일간 교반하였다. 그 후, 그 혼합물을 농축하여($30^\circ\text{C} / 10^{-3} \text{ mmHg}$) 오일 상태의 잔류물을 얻었다. 그 잔류물을 물과 클로로포름 사이에 분배하고 물 층을 분리한 후, 농축하여 점성의 오일(117 mg)을 얻었다. ^1H 및 ^{13}C nmr 스펙트럼으로 상기 오일이 아세틸화된 텐드리머와 N-히드록시 숙신이미드의 혼합물이라는 것을 알았다. 겔여과(Sephadex G10; 물)하여 아세틸티오아세트아미드 말단화된 PAMAM 2.0 텐드리머의 정제 샘플을 얻었다(29 mg). ^{13}C nmr (D_2O): 834.0, 34.2, 37.3, 43.0, 43.1, 43.3, 53.5, 54.0, 56.3, 175.4, 177.2, 177.5.

그 후, 전술한 작용기를 가진 텐드리머를 40% 수성 포름산(7 mL) 중에 용해시킨 용액을, 포름산(2 mL) 중의 과포름산(1.6 mmol)의 얼음 냉각시킨 새로이 제조된 용액에 첨가하였다. 그 혼합물을 0°C 에서 1시간동안 교반한 후 실온에서 20시간 동안 교반하였다. 이어서, 소량의 활성 카콜을 첨가하여 임의의 과산 과량을 분해시키고 그 혼합물을 30분간 교반한 후 여과하고 농축하여 점성 오일을 얻었다.

미정제 생성물을 물 중에 용해하고, 종탄산나트륨 수용액으로 pH를 9.0으로 조절한 후, 그 물질을 Sephadex G10 컬럼에 통과시켜서 탈염시켰다. 동결 건조시킨 후 백색 고체(20 mg)을 얻었으며 이는 방법 1에 의해 얻은 물질과 분광학적으로 거의 동일하였다. ^{13}C nmr (D_2O): 833.0, 38.7, 42.9, 43.0, 43.1, 53.9, 54.3, 56.5, 61.6, 171.2, 176.4, 177.0.

실시예 3

나트륨설포숙시남산 말단화된 텐드리머의 제법

A PAMAM 1.0

고체 상태의 말레산 무수물(0.11 g, 1.1 mmol)을 건조한 DMF(3 mL) 중의 PAMAM 1.0(0.12 g, 0.33 mmol)의 교반한 용액에 첨가하였다. 그 혼합물의 온도가 약간 상승하였으며 무수물이 용해됨에 따라 갈색빛을 띠었다. 얻은 용액을 실온에서 하룻밤 교반하였다. 그 후 그 용액을 농축하여($30^\circ\text{C} / 10^{-4} \text{ mmHg}$) 점성 오일을 얻었다. ^1H 및 ^{13}C nmr(D_2O) 스펙트럼으로 PAMAM 1.0이 약간의 말레산을 함유하면서 트리스아미드로 완전히 전환된다는 것을 알았다. ^{13}C nmr (D_2O): 833.1, 42.8, 43.1, 54.3, 135.0, 137.1, 169.1, 171.9, 173.3.

그 후, 미정제 트리스아미드를 물(4 mL) 중에 용해하고, 고체 상태의 아황산 나트륨(0.20 g, 1.6 mmol)을 첨가하였다. 그 얻은 용액을 실온에서 4일간 방치시킨 뒤 농축하였다. ^1H 및 ^{13}C nmr(D_2O) 스펙트럼으로 약간의 설포숙신산을 함유하는, 위치이성질체성 나트륨 설포숙시남산 말단화된 PAMAM 1.0 텐드리머들의 1:1 혼합물이라는 것을 알았다. 미정제 생성물을 겔여과(Sephadex G10; 물)에 의해 정제하여 나트륨 설포숙시남산 말단화된 PAMAM 1.0 텐드리머(107 mg)의 샘플을 얻었다. ^{13}C nmr (D_2O): 833.3, 39.6, 40.0, 42.9, 43.1, 54.0, 67.9, 69.4, 173.8, 176.3, 177.6, 181.8.

B PAMAM 2.0

위치이성질체성 나트륨 설포숙시남산 말단화된 PAMAM 2.0 텐드리머들의 혼합물을 전술한 바와 같이 제조하였다. ^{13}C nmr PAMAM 2.0 말레산 유도체(D_2O) : 632.8, 33.0, 38.7, 42.9, 53.8, 54.3, 56.5, 135.2, 136.8, 169.2, 171.9, 173.5, 174.6. ^{13}C nmr PAMAM 2.0 나트륨 설포숙시남산 유도체 (D_2O): δ 37.0, 40.1, 41.1, 43.0, 43.2, 43.9, 53.0, 53.3, 55.5, 68.0, 69.4, 173.8, 177.6, 179.1, 179.5, 179.8 182.3.

C PAMAM 4.0 BRI6038

고체 상태의 말레산 무수물(60 mg, 0.6 mmol)을 건조 DMF(2 mL) 중의 PAMAM 4.0(51 mg, 0.01 mmol)의 교반한 용액에 첨가하였다. 그 혼합물은 처음에는 뿌연 상태였으나 이를 실온에서 하룻밤 교반한 후 곧 투명한 용액이 되었다. 그 후, 그 용액을 농축하여(35. / 10^{-4} mmHg) 점성 오일을 얻었다. ^1H 및 ^{13}C nmr(D_2O) 스펙트럼으로 PAMAM 4.0이 약간의 말레산을 함유하면서 폴리아미드로 완전히 전환된다는 것을 알았다. 그 후, 미정제 폴리아미드를 물(2 mL) 중에 용해하고, 물(2 mL) 중의 아황산나트륨(126 mg, 1.0 mmol)의 용액을 첨가하였다. 그 얻은 용액을 실온에서 2 일간 방치시킨 뒤 농축하였다. ^1H 및 ^{13}C nmr(D_2O) 스펙트럼으로 약간의 설포숙신산을 함유하는, 위치이성질체성 나트륨 설포숙시남산 말단화된 PAMAM 4.0 텐드리머들의 혼합물이라는 것을 알았다. 미정제 생성물을 겔 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제하여 24개의 위치이성질체성 설포숙신남산기(90 mg)로 말단화된 PAMAM 4.0의 샘플(90 mg)을 얻었다. ^1H nmr (D_2O): δ 2.4-2.6; 2.7-3.1; 3.2-3.4; 3.8-4.0. ^{13}C nmr(D_2O): 636.2; 39.8; 40.5; 43.0; 43.2; 53.5; 55.8; 68.1; 69.5; 173.8; 177.4; 177.6; 178.7; 182.3.

실시예 4

나트륨 N-(2-설포에틸)숙신아미드 말단화된 텐드리머의 제법

a 테트라부틸암모늄 N-(2-설포에틸)숙시남산의 제법

고체 상태의 숙신산 무수물(0.5 g, 5.0 mmol)을 건조한 디클로로메탄(30 mL) 중의 테트라부틸암모늄 2-아미노에틸설폰산(1.83 g, 5.0 mmol)의 교반한 용액에 첨가하였다. 그 숙신산 무수물을 서서히 용해하여 얻은 뿌연 용액을 실온에서 하룻밤동안 교반하였다. 그 혼합물을 여과하고 여과액을 농축하여 점성의 오일(2.41 g)을 얻었다. ^{13}C nmr로 소량의 숙신산을 함유하면서 목적하는 모노아미드로 완전히 전환된다는 것을 알았다. 대과량의 디에틸 에테르에 디클로로메탄 용액을 적가함으로써 생성물을 반복적으로 침전시켜서 테트라부틸암노늄 N-(2-설포에틸)숙시남산을 백색 고체로 얻었다(1.762 g, 76%), mp 125-127°C. ^1H nmr(CDCl_3): 80.86(t, 12H, 4xCH₃), 1.28(m, 8H, 4xCH₂), 1.50(m, 8H, 4xCH₂), 2.33(m, 2H, CH₂COOH), 2.44(m, 2H, CH₂CONH), 2.76(m, 2H, CH₂NHCO), 3.12(m, 8H, 4xCH₂N), 3.50(m, 2H, CH₂SO₃⁻), 7.53(br t, 1H, NH). ^{13}C nmr (CDCl_3): 813.5, 19.5, 23.8, 30.1, 30.9, 35.6, 50.0, 58.5, 172.0, 174.1.

b 테트라부틸암모늄 4-니트로페닐 N-(2-설포에틸)숙시나메이트의 제법

건조 디클로로메탄(1 mL) 중의 디시클로헥실카르보디이미드(45 mg, 0.22 mmol)의 용액을 디클로로메탄(2 mL) 중의 테트라부틸암모늄 N-(2-설포에틸)숙시남산(94 mg, 0.20 mmol)의 교반한 용액에 첨가하고 그 혼합물을 하룻밤동안 실온에서 교반하였다. 얻은 혼탁액을 여과하고 여과액을 농축하여 미정제 활성 에스테르를 얻었으며, 이를 추가로 정제하지 않고 사용하였다.

A 나트륨 N-(2-설포에틸)숙시나미드 말단화된 PAMAM 텐드리머의 제법

PAMAM 4.0 BRI2786

건조 DMF(1 mL) 중의 미정제 테트라부틸암모늄 4-니트로페닐 N-(2-설포에틸)숙시나미드(0.30 mmol)의 용액을 50% DMF 수용액(3 mL) 중에 용해한 PAMAM 4.0(51.5 mg, 0.01 mmol)의 교반한 용액에 첨가하고, 얻은 황색 용액을 실온에서 밤새도록 교반하였다. 그 후, 그 혼합물을 농축하고(35. / 10^{-5} mmHg) 황색 잔류물을 물과 클로로포름사이에 분배시켰다.

물 층을 분리한 후, 클로로포름(2X)으로 세척하고 에틸 아세테이트로 세척한 후 농축하여 황색 오일을 얻었다(134 mg). 미정제 생성물을 Amberlite IR 120(Na)의 컬럼에 통과시켜서 나트륨 염으로 전환시킴으로써 물질 85 mg을 얻었다. 이 물질을 겔 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 추가로 정제하여 나트륨 N-(2-설포에틸)숙시나미드 말단화된 PAMAM 4.0 덴드리머를 얻었다(45 mg). ^{13}C nmr (D_2O): 833.2, 33.6, 35.5, 39.0, 39.5, 42.8, 43.2, 53.8, 54.1, 54.4, 56.6, 176.5, 176.9, 177.2, 178.9, 179.4.

나트륨 N-(2-설포에틸)숙시나미드기로 말단화된 상응하는 PAMAM 1.0 및 PAMAM 3.0(BRI2785) 덴드리머를 유사하게 제조하였다.

^{13}C nmr PAMAM 3.0 유도체(D_2O): 833.4, 35.5, 39.0, 39.5, 42.9, 43.2, 53.8, 54.1, 54.3, 56.5, 176.4, 176.9, 177.4, 178.9, 179.4.

^{13}C nmr PAMAM 1.0 유도체 (D_2O): 834.9, 35.5, 39.5, 42.9, 43.1, 53.7, 54.1, 179.0, 179.1, 179.3.

B 나트륨 N-(2-설포에틸)숙시나미드 말단화된 폴리라이신 덴드리머의 제법

BHAlys₂lys₄lys₈lys₁₆ BRI2789

건조한 디클로로메탄(1 mL) 중의 BHAlys₂lys₄lys₈DBL₁₆(36.5 mg, 5.0 μmol)의 혼탁액에 트리플루오로아세트산(1 mL)을 첨가하고 얻은 용액을 실온에서 질소하에서 2 시간동안 교반한 후 농축시켰다. 그 잔류물을 건조한 DMSO(2 mL) 중에 용해하고 트리에틸아민으로 pH를 8.5로 조절하였다. 그 후, DMSO(1 mL) 중의 미정제 테트라부틸암모늄 4-니트로페닐 N-(2-설포에틸)숙시나메이트(약 0.2 mmol)의 용액을 적가하고 그 혼합물을 하룻밤동안 실온에서 교반하였다. 그 후, 그 황색 용액을 농축하고(50. /10⁻⁵ mmHg) 황색 잔류물을 물과 클로로포름사이에 분배하였다. 수성층을 분리한 후, 클로로포름(3X)으로 세척하고 에틸 아세테이트로 세척하고 농축하여 오일을 얻었다(99 mg). 미정제 생성물을 Amberlite IR 120 (Na)의 컬럼에 통과시켜서 나트륨 염으로 전환시킴으로써 물질 81 mg을 얻었다. 이 물질을 겔 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 추가로 정제하여 나트륨 N-(2-설포에틸)숙시나미드 말단화된 BHAlys₂lys₄lys₈lys₁₆ 덴드리머를 얻었다(39 mg). ^{13}C nmr (D_2O): 827.0, 32.3, 35.2, 35.3, 35.6, 35.7, 39.5, 43.5, 54.1, 58.5, 131.5, 132.0, 133.3, 145.1, 177.8, 178.0, 178.4, 178.8, 178.9, 179.2, 179.7, 179.8.

나트륨 N-(2-설포에틸)숙시나미드기로 말단화된 대응하는 BHAlys₂, BHAlys₂lys₄(BRI2787) 및 BHAlys₂lys₄lys₈(BRI2788)를 유사하게 제조하였다.

^{13}C nmr BHAlys₂lys₄lys₈ 유도체(D_2O): 826.9, 32.3, 35.1, 35.3, 35.6, 35.7, 39.5, 43.5, 54.1, 58.5, 131.6, 131.9, 132.2, 132.3, 133.2, 133.3, 145.0, 145.2, 177.2, 177.8, 177.9, 178.0, 178.2, 178.3, 178.6, 178.7, 178.8, 178.9, 179.2, 179.3, 179.7, 179.8.

^{13}C nmr BHAlys₂lys₄ 유도체(D_2O): 826.9, 32.3, 35.1, 35.4, 35.7, 35.8, 39.5, 43.5, 54.1, 58.5, 61.8, 131.7, 132.0, 132.2, 132.3, 133.2, 133.3, 145.0, 145.1, 177.3, 178.0, 178.3, 178.4, 178.7, 178.9, 179.0, 179.3, 179.7, 179.8.

^{13}C nmr BHAlys₂ 유도체(D_2O): 826.9, 27.1, 32.2, 32.3, 34.7, 34.8, 35.1, 35.3, 35.6, 35.7, 39.5, 43.4, 54.1, 58.6, 61.8, 131.7, 131.9, 132.2, 132.3, 133.3, 144.9, 145.0, 177.7, 178.4, 178.8, 179.0, 179.3, 180.0.

실시예 5

나트륨 4-설포페닐티오우레아 말단화된 덴드리머의 제법

A PAMAM 4.0 BRI2791

고체 상태의 나트륨 4-설포페닐이소티오시아네이트 일수화물(500 mg, 1.96 mmol)을 물(10 mL) 중의 PAMAM 4.0(300 mg, 0.0582 mmol)의 용액에 첨가하여 얻은 용액을 53°C의 질소하에서 2 시간동안 가열한 후 냉각시켰다. 그 용액을 농축한 후, 황색 고체 잔류물을 겔 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제하였다. 정제된 분획들을 합하여 동결 건조시켜서 나트륨 4-설포페닐티오우레아 말단화된 PAMAM 4.0 텐드리머를 보풀이 있는(fluffy) 백색 고체로 얻었다(370 mg). ^1H nmr (D_2O): 82.28, 2.52, 2.69, 3.15, 3.27, 3.60, 7.32(d, $J=9\text{Hz}$), 7.72(d, $J=9\text{Hz}$). ^{13}C nmr (D_2O) : 836.9, 41.1, 43.1; 48.3; 53.6; 55.8; 129.0; 131.1; 144.4; 178.5; 179.1; 184.4.

각각 3, 6, 12 및 48개의 나트륨 4-설포페닐티오우레아기로 말단화된 대응하는 PAMAM 1.0, PAMAM 2.0(BRI2790), PAMAM 3.0 및 PAMAM 5.0(BRI2991) 텐드리머를 유사하게 제조하였다.

B PAMAM 4.0(EDA) BRI6045

고체 상태의 나트륨 4-설포페닐이소티오시아네이트 일수화물(130 mg, 0.5 mmol)을 물(4 mL) 중의 PAMAM 4.0(EDA) (69 mg, 0.01 mmol)의 용액에 첨가하여 얻은 용액을 53°C의 질소하에서 2 시간동안 가열한 후 냉각시켰다. 그 용액을 농축한 후, 고체 잔류물을 겔 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제하였다. 정제된 분획들을 합하여 동결 건조시켜서 32개의 나트륨 4-설포페닐티오우레아기로 말단화된 PAMAM 4.0을 보풀이 있는 백색 고체로 얻었다(136 mg). ^1H nmr (D_2O) : 82.30, 2.50, 2.70, 3.18, 3.62, 7.35(d, $J=9\text{Hz}$), 7.72(d, $J=9\text{Hz}$). ^{13}C nmr (D_2O): 836.8, 41.0, 43.1, 48.4, 53.6, 55.7, 128.9, 131.0, 144.3, 178.5, 179.0, 184.5.

C BHAllys₂lys₄lys₈lys₁₆ BRI2792

건조 디클로로메탄(4 mL) 중의 BHAllys₂lys₄lys₈DBL₁₆(0.73 g, 0.1 mmol)의 혼탁액에 트리플루오로아세트산(4 mL)을 질소하에서 첨가하였다. 단시간 동안 가스를 격렬하게 방출하는 것이 관찰되었으며 이렇게 얻은 용액을 실온에서 2 시간 동안 교반한 후 농축시켰다. 잔류한 시럽을 물(5 mL) 중에 용해하고 그 용액을 Amberlite IRA-401(OH)의 컬럼에 통과시킨 뒤, 그 여과액을 농축하여 BHAllys₂lys₄lys₈lys₁₆을 점성 오일로 얻었다(0.49 g). 그 오일을 물(5 mL) 중에 재용해하고 N,N-디메틸-N-알릴아민 완충액(pH 9.5, 3 mL)을 첨가하였다. 그 후, 고체 상태의 나트륨 4-설포페닐이소티오시아네이트 일수화물(1.30 g, 5.1 mmol)을 첨가하여 얻은 용액을 53°C의 질소하에서 2 시간동안 가열한 후 냉각시켰다. 그 용액을 농축하고 겔 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제하여 갈색빛의 고체 잔류물을 얻었다. 그 정제된 분획을 합하여 Amberlite IR 120(Na)의 컬럼에 통과시킨 뒤 동결 건조시켜 나트륨 4-설포페닐티오우레아 말단화된 BHAllys₂lys₄lys₈lys₁₆ 텐드리머를 보풀이 있는 백색 고체로 얻었다(374 mg). ^1H nmr (D_2O): 81.40, 1.72, 3.08, 3.42, 4.24, 4.60, 7.30, 7.40(d, $J=9\text{Hz}$), 7.78(d, $J=9\text{Hz}$). ^{13}C nmr (D_2O): 827.3, 32.5, 35.9, 43.7, 48.9, 58.6, 63.3, 128.8, 131.0, 143.7, 144.7, 145.1, 177.7, 178.1, 183.8, 185.2.

16, 64 및 128개의 나트륨 4-설포페닐티오우레아기들로 각각 말단화된 대응하는 BHAllys₂lys₄lys₈, BHAllys₂lys₄lys₈lys₁₆lys₃₂(BRI2992) 및 BHAllys₂lys₄lys₈lys₁₆lys₃₂lys₆₄(BRI2993) 텐드리머를 유사하게 제조하였다.

실시예 6

나트륨 3,6-디설포나프틸티오우레아 말단화된 텐드리머의 제법

A PAMAM 4.0 BRI2923

고체 상태의 나트륨 3,6-디설포나프틸이소티오시아네이트(160 mg, 0.41 mmol)을 물(3 mL) 중의 PAMAM 4.0(51 mg, 0.01 mmol)의 용액에 첨가하여 얻은 용액을 53°C의 질소하에서 2 시간동안 가열한 후 냉각시켰다. 그 용액을 농축한 후, 갈색 고체 잔류물을 겔 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제하였다. 정제된 분획들을 합하여 농축시켜서 나트륨 3,6-디

설포나프틸티오우레아 말단화된 PAMAM 4.0 텐드리머를 갈색빛의 고체로 얻었다(73 mg). ^1H nmr (D_2O): 82.30, 2.60, 2.74, 3.20, 3.57, 7.75, 7.86, 8.28. ^{13}C nmr (D_2O): 835.0, 39.9, 43.1, 48.1, 53.8, 56.1, 128.4, 128.6, 129.3, 131.0, 131.3, 136.0, 136.8, 138.2, 145.5, 146.0, 177.2, 177.8, 185.5.

나트륨 3,6-디설포나프틸티오우레아기로 말단화된 대응하는 PAMAM 2.0 텐드리머를 유사하게 제조하였다.

B PAMAM 4.0(EDA) BRI6046

고체 상태의 나트륨 3,6-디설포나프틸이소티오시아네이트(220 mg, 0.57 mmol)을 물(4 mL) 중의 PAMAM 4.0(EDA)(74 mg, 0.01 mmol)의 용액에 첨가하여 얻은 용액을 53°C의 질소하에서 2 시간동안 가열한 후 냉각시켰다. 그 용액을 농축한 후, 갈색빛의 고체 잔류물을 겔 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제하였다. 정제된 분획들을 합하여 농축시켜서 32개의 나트륨 3,6-설포나프틸티오우레아기로 말단화된 PAMAM 4.0 텐드리머를 황갈색 고체로 얻었다(148 mg). ^1H nmr (D_2O): 62.30, 2.80, 3.20, 3.54, 7.74, 7.85, 8.25. ^{13}C nmr (D_2O): 636.0, 40.8, 43.1, 48.3, 53.6, 55.9, 128.5, 129.4, 131.0, 131.3, 136.0, 136.8, 138.3, 145.5, 146.0, 178.2, 185.6.

C BHAllys₂lys₄lys₈lys₁₆ BRI2999

건조 디클로로메탄(2 mL) 중의 BHAllys₂lys₄lys₈DBL₁₆(73 mg, 0.01 mmol)의 혼탁액에 트리플루오로아세트산(2 mL)을 질소하에서 첨가하였다. 단시간 동안 가스를 격렬하게 방출하는 것이 관찰되었으며 이렇게 얻은 용액을 실온에서 2 시간 동안 교반한 후 농축시켰다. 잔류한 시럽을 물(5 mL) 중에 용해하고 그 용액을 Amberlite IRA-401(OH)의 컬럼에 통과시킨 뒤, 그 여과액을 농축하여 BHAllys₂lys₄lys₈lys₁₆을 점성 오일로 얻었다. 그 오일을 물(5 mL) 중에 재용해하고 N,N-디메틸-N-알릴아민 완충액(pH 9.5, 3 mL)을 첨가하였다. 그 후, 고체 상태의 나트륨 3,6-디설포나프틸이소티오시아네이트(234 mg, 0.60 mmol)을 첨가하여 얻은 용액을 53°C의 질소하에서 2 시간동안 가열한 후 냉각시켰다. 그 용액을 농축하고 갈색빛의 고체 잔류물을 겔 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제하였다. 그 정제된 분획을 합하여 Amberlite IR 120 (Na)의 컬럼에 통과시킨 뒤 동결 건조하여 32개의 나트륨 3,6-디설포나프틸티오우레아기로 말단화된 BHAllys₂lys₄lys₈lys₁₆ 텐드리머를 보풀이 있는 회백색 고체로 얻었다(119 mg). ^1H nmr (D_2O): 81.0-2.0, 3.18, 3.43, 4.31, 7.22, 7.80, 7.89, 8.25. ^{13}C nmr (D_2O): 827.2, 32.4, 35.3, 43.7, 49.0, 58.5, 63.6, 128.4, 129.1, 131.4, 136.1, 136.6, 138.6, 139.0, 145.1, 145.6, 178.4, 184.8, 186.7.

실시예 7

나트륨 4-설포나프틸티오우레아 말단화된 텐드리머의 제법

PAMAM 4.0 BRI2997

고체 상태의 나트륨 4-설포나프틸이소티오시아네이트(180 mg, 0.5 mmol)를 물(5 mL) 중의 PAMAM 4.0(51 mg, 0.01 mmol)의 용액에 첨가하여 얻은 용액을 53°C의 질소하에서 2 시간동안 가열한 후 냉각시켰다. 얻은 혼탁액으로부터 감압 하에서 물을 증류 제거하였으며 회백색 잔류물을 겔 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제하였다. 정제된 분획들을 합하여 동결 건조시켜서 나트륨 4-설포나프틸티오우레아 말단화된 PAMAM 4.0 텐드리머를 보풀이 있는 백색 고체로 얻었다(60 mg). ^1H nmr (D_2O): 82.20, 2.60, 3.14, 3.48, 7.23, 7.47, 7.56, 7.77, 7.93(d, J=6Hz), 8.56(d, J=6Hz). ^{13}C nmr (D_2O): 635.8, 40.5, 43.1, 48.4, 53.6, 55.9, 127.6, 128.6, 130.3, 131.9, 132.5, 133.5, 134.7, 140.5, 142.7, 177.8, 178.0, 185.4.

실시예 8

나트륨 3,5-디설포페닐티오우레아 말단화된 텐드리머의 제법

PAMAM 4.0 BRI6039

고체 상태의 나트륨 3,5-디설포페닐이소티오시아네이트(110 mg, 0.32 mmol)을 물(3 mL) 중의 PAMAM 4.0(63 mg, 0.012 mmol)의 용액에 첨가하여 얻은 용액을 53°C의 질소하에서 2 시간동안 가열한 후 냉각시켰다. 그 용액을 농축한 후, 갈색 빛의 고체 잔류물을 젤 여과(Sephadex G25; 물)에 의해 정제하였다. 정제된 분획들을 합하여 농축시켜서 24개의 나트륨 3,5-디설포페닐티오우레아기로 말단화된 PAMAM 4.0 텐드리머를 회백색 고체로 얻었다(110 mg). ^1H nmr (D_2O): 82.53, 3.08, 3.36, 3.66, 7.90, 7.95. ^{13}C nmr (D_2O): 834.8, 41.0, 48.0, 53.7, 56.2, 124.1, 128.6, 143.5, 148.8, 177.6, 185.0.

실시예 9

나트륨 3,6,8-트리설포나프틸티오우레아 말단화된 텐드리머의 제법

PAMAM 4.0 BRI2998

고체 상태의 나트륨 3,6,8-트리설포나프틸이소티오시아네이트(250 mg, 0.5 mmol)을 물(2 mL) 중의 PAMAM 4.0(51 mg, 0.01 mmol) 및 N,N-디메틸-N-알릴아민 완충액(pH 9.5, 1 mL)의 용액에 첨가하고 그 혼합물을 53°C의 질소하에서 2 시간동안 가열한 후 냉각시켰다. 그 혼합물을 감압하에서 농축하여 오렌지색 고체를 얻었다. 잔류한 고체를 물(2 mL) 중에 용해하고 Amberlite IR-120(Na)의 짙은 컬럼에 통과시켰다. 그 후, 여과액을 농축시키고 잔류물을 젤 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제하였다. 정제된 분획들을 합하여 동결 건조시켜서 나트륨 3,6,8-트리설포나프틸티오우레아 말단화된 PAMAM 4.0 텐드리머를 회백색 고체로 얻었다(102 mg). ^1H nmr (D_2O): 82.65, 3.02, 3.30, 3.66, 8.05, 8.42, 8.59, 8.67. ^{13}C nmr (D_2O): 833.2, 38.7, 43.2, 43.7, 47.8, 54.0, 54.3, 56.7, 131.0, 131.3, 131.9, 135.9, 138.0, 139.6, 143.8, 144.1, 145.6, 176.2, 176.5, 186.0.

실시예 10

나트륨 4-(설포메틸)벤즈아미드 말단화된 텐드리머의 제법

PAMAM 4.0 BRI6040

고체 상태의 4-니트로페닐 4-(클로로메틸)벤조에이트(200 mg, 0.68 mmol)를 건조 DMSO(4 mL) 중의 PAMAM 4.0(70 mg, 0.014 mmol)의 교반한 용액에 첨가하여 얻은 황색 용액을 실온에서 2 시간동안 교반하였다. 그 후, 그 용액을 농축하고(10^{-4} mmHg/40°), 잔류물을 물과 디클로로메탄의 혼합물(1:1)로 추출하였다. 나머지 고체 물질을 DMSO(5 mL) 중에 용해하고 물(3 mL) 중의 아황산나트륨(130 mg, 1 mmol)의 용액을 첨가하였다. 얻어진 약간 뿐연 혼합물을 4 일간 방치하고 이후에 물(2 mL)을 더 첨가하여 투명하고 균질한 황색 용액을 형성하였다. 그 후, 용액을 농축하였는데 처음에는 25 mmHg 및 40°에서, 그 후에는 10^{-4} mmHg 및 50°에서 농축하여 미정제 생성물을 얻었다. 그 미정제 생성물을 젤 여과(Sephadex G25; 물)에 의해 정제하여 24개의 나트륨 4-(설포메틸) 벤즈아미드기로 말단화된 PAMAM 4.0을 얻었다(24 mg). ^1H nmr (D_2O): 82.25, 2.66, 3.08, 3.20, 3.33, 3.38, 4.01, 7.40(br d), ^{13}C nmr (D_2O): 836.7, 40.9, 43.0, 43.6, 53.5, 55.5, 61.0, 131.6, 135.0, 137.2, 140.4, 174.5, 178.6, 179.2.

실시예 11

4-설포벤즈아미드 말단화된 텐드리머의 제법

PAMAM 4.0(EDA) BRI6116

고체 상태의 칼륨 N-히드록시숙신이미딜 4-설포벤조에이트(100 mg, 0.3 mmol)를 0.1 M pH 8.5 보레이트 완충액(5 mL) 중의 PAMAM 4.0(EDA)(35 mg, 0.005 mmol)의 용액에 첨가하고 그 용액을 실온에서 2 시간동안 교반하였다. 이 단계에서 얻은 우유빛 용액의 pH는 4.5였다. 그 후, 1 M 탄산나트륨 용액(1 mL)을 첨가하여 투명한 용액을 얻었으며 이를 농축시켜서 백색 고체 상태의 미정제 생성물을 얻었다. 그 미정제 생성물을 젤 여과(Sephadex G25; 물)에 의해 정제하여 32개의

나트륨 4-설포벤즈아미드기로 말단화된 PAMAM 4.0(EDA)을 얻었다(47 mg). ^1H nmr (D_2O): 82.25, 2.42, 2.63, 3.05, 3.18, 3.31, 3.38, 7.72(d, $J=8\text{Hz}$), 7.78(d, $J=8\text{Hz}$). ^{13}C nmr (D_2O): 836.0, 40.4, 43.0, 43.7, 53.7, 55.8, 130.2, 132.2, 140.4, 150.1, 173.6, 178.0, 178.5.

실시예 12

나트륨 N-(4-설포페닐)프로판아미드 말단화된 텐드리머의 제법

PAMAM 4.0(EDA) BRI6117

고체 상태의 나트륨 N-(4-설포페닐)아크릴아미드(250 mg, 1 mmol)와 고체 상태의 탄산나트륨(106 mg, 1 mmol)을 물(4 mL) 중의 PAMAM 4.0(EDA)(78 mg, 0.011 mmol)의 교반한 용액에 연속하여 첨가하였다. 얻은 용액을 4 일간 질소하에서 교반한 후, 동결 건조시켜서 보풀이 있는 백색 고체를 얻었다. 미정제 생성물을 젤 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제하여 64개의 나트륨 N-(4-설포페닐)프로판아미드기로 말단화된 PAMAM 4.0(EDA)을 얻었다(206 mg). 이들중 미량을 취하여 ^{13}C nmr한 결과 관찰된 희미한 흔적은 모노알킬화된 말단 아미노기라는 것을 알았다. ^1H nmr (D_2O): 82.10, 2.48, 2.58, 2.79, 3.20, 7.42(d, $J=7\text{Hz}$), 7.65(d, $J=7\text{Hz}$). ^{13}C nmr (D_2O): 836.5, 37.9, 41.1, 53.4, 55.6, 124.8, 130.9, 143.0, 144.2, 177.4, 178.5

실시예 13

나트륨 4-설포페닐우레아 말단화된 텐드리머의 제법

PAMAM 4.0(EDA) BRI6115

건조한 DMSO(3 mL) 중의 나트륨 설파닐산(195 mg, 1 mmol) 용액을 건조 DMSO(4 mL) 중의 N,N'-디숙신이미딜 카보네이트(530 mg, 2 mmol)의 용액에 적가하여 얻은 갈색빛의 용액을 실온에서 20 시간동안 교반하였다. 건조 DMSO(1 mL) 중의 PAMAM 4.0(EDA)(75 mg, 0.011 mmol)의 용액을 첨가하고 그 용액을 18 시간동안 더 교반하였다. 그 후, 그 용액을 고진공(10^{-5} mmHg , 35。)하에서 농축하여 황색빛의 반 고체를 얻었다. 그 미정제 생성물을 DMSO(4 mL) 중에 용해하고 그 용액을 잘 교반한 에틸 아세테이트 200 mL에 첨가하였다. 그 침전된 백색 고체를 여과에 의해 수거하고 에틸 아세테이트(2X) 및 에테르(2X)로 세척한 후, 건조시켜 백색 분말을 얻었다(275 mg). 이 물질을 젤 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 추가로 제하여 32개의 나트륨 4-설포페닐우레아기로 말단화된 PAMAM 4.0(EDA)을 얻었다(106 mg). ^1H nmr (D_2O): 82.31, 2.55, 2.75, 3.19, 7.32(d, $J=9\text{Hz}$), 7.63(d, $J=9\text{Hz}$). ^{13}C nmr (D_2O): 836.3, 40.7, 43.3, 43.8, 53.7, 55.7, 123.3, 130.9, 140.9, 146.0, 161.4, 178.2, 178.6.

실시예 14

N,N,N-트리메틸글라이신아미드 클로라이드 말단화된 텐드리머의 제법

BHAlys₂lys₄lys₈lys₁₆ BRI2922

건조 디클로로메탄(2 mL) 중의 BHAlys₂lys₄lys₈DBL₁₆(220 mg, 30 μmol)의 혼탁액에 트리플루오로아세트산(4 mL)을 첨가하여 얻은 용액을 실온에서 질소하에 2 시간 동안 교반한 후, 농축하였다. 잔류물을 건조한 DMSO(5 mL) 중에 용해하고 그 pH를 트리에틸아민으로 8.5로 조절하였다. 그 후, 고체 상태의 4-니트로페닐 N,N,N-트리메틸글리시네이트 클로라이드(0.50 g, 1.8 mmol)을 첨가하고 그 혼합물을 실온에서 하룻밤동안 교반하였다. 그 후, 그 뿐연 용액을 농축하고(50。/ 10^{-5} mmHg), 잔류물을 물과 디클로로메탄 사이에 분배시켰다. 수성 층을 분리하고 디클로로메탄(3X) 및 에틸아세테이트로 세척한 후, 농축하여 오일(1.128 g)을 얻었다. 미정제 생성물을 젤 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제하여 N,N,N-트리메틸글라이신아미드 말단화된 BHAlys₂lys₄lys₈lys₁₆ 텐드리머를 얻었다(116 mg). ^{13}C nmr (D_2O): 825.5, 30.5, 30.8, 33.4, 42.1, 56.5, 57.1, 67.5, 68.1, 166.7, 167.0, 167.1, 176.0, 176.2.

실시예 15

4-트리메틸암모늄 벤즈아미드 말단화된 텐드리머의 제법

PAMAM 4.0 BRI6043

건조 DMF(4 mL) 중의 4-트리메틸암모늄 벤조산 요오드화물(154 mg, 0.5 mmol)의 용액에 1,1'-카르보닐디이미다졸(85 mg, 0.52 mmol)을 첨가하고 그 혼합물을 실온의 아르곤하에서 2 시간동안 교반하였다. 이 시간동안 용액으로부터 백색 고체를 분리하였다. 그 후, 건조 DMF(2 mL) 중의 PAMAM 4.0(58 mg, 0.011 mmol)의 용액을 첨가하고 그 혼합물을 실온에서 하룻밤동안 교반하였다. 이 후, 대부분의 침전물이 용해되었으며 이 용액의 닌히드린 시험 결과는 음성이었다. 그 혼합물을 농축하여(10^{-4} mmHg, 30.) 백색 고체 잔류물을 얻었다. 미정제 생성물을 겔 여과(Sephadex LH20; 10% AcOH)에 의해 정제하여 24개의 4-트리메틸암모늄벤즈아미드기로 말단화된 PAMAM 4.0를 아세트산염 형태로 얻었다(89 mg). ^1H nmr (D_2O): 81.96, 2.65–2.85, 3.25–3.55, 3.64, 7.92. ^{13}C nmr (D_2O): 825.8, 33.1, 33.5, 38.7, 43.1, 43.5, 53.5, 54.1, 56.4, 61.2, 124.8, 133.6, 139.9, 153.2, 173.2, 176.3, 176.8, 182.6.

6개의 4-트리메틸암모늄 벤즈아미드 기로 말단화된 대응하는 PAMAM 2.0을 유사하게 제조하였다.

실시예 16

4-(트리메틸암모늄메틸)벤즈아미드 말단화된 텐드리머의 제법

PAMAM 4.0 BRI6044

건조 DMSO(3 mL) 중의 PAMAM 4.0(52 mg, 0.01 mmol)의 교반한 용액에 고체 상태의 4-니트로페닐 4-(클로로메틸)벤조에이트(150 mg, 0.5 mmol)을 첨가하였다. 얻은 황색 용액을 실온에서 20 시간동안 교반하였으며 이 때의 닌히드린 시험 결과는 음성이었다(pH 약 8.5). 그 후 그 용액을 농축하고(10^{-5} mmHg, 40.), 잔류물을 물과 디클로로메탄의 혼합물(1:1)과 함께 진탕하였다. 그 불용성 겔 형태의 물질을 여과에 의해 수거하고 물(2X) 및 디클로로메탄(2X)으로 세척한 후 공기 건조시켰다. 미정제 4-(클로로메틸)벤즈아미드 말단화된 텐드리머를 25% 수성 트리메틸아민(20 mL) 중에 용해하고 그 황색 용액을 하룻밤동안 방치하였다. 그 후, 그 용액을 농축하고 잔류물을 물(5 mL) 중에 용해한 후 그 용액을 Amberlite IRA-401(OH)의 컬럼에 통과시켰다. 무색 여과액을 농축하여 점성의 오일을 얻었으며 이를 겔 여과(Sephadex G10, 10% AcOH)에 의해 정제하여 24개의 4-(트리메틸암모늄메틸)벤즈아미드기로 말단화된 PAMAM 4.0을 얻었다(90 mg). ^1H nmr (D_2O): 81.88, 2.65–2.80, 2.98, 3.10–3.60, 7.52(br d, $J=9\text{Hz}$), 7.72(br d, $J=9\text{Hz}$). ^{13}C nmr (D_2O): 826.6, 33.4, 38.8, 43.2, 43.5, 53.6, 53.6, 54.1, 56.8, 62.8, 73.0, 132.1, 135.3, 137.5, 140.0, 176.4, 176.9, 183.6.

실시예 17

N-(2-아세톡시에틸)-N,N-(디메틸암모늄)메틸 카르복스아미드 말단화된 텐드리머의 제법

PAMAM 4.0

건조 DMF(3 mL) 중의 N-(2-아세톡시에틸)-N-(카르복시메틸)-N,N-디메틸암모늄 브롬화물(135 mg, 0.5 mmol)의 용액에 고체 상태의 1,1'-카르보닐디이미다졸(85 mg, 0.52 mmol)을 첨가하여 얻은 용액을 질소하에서 2 시간동안 교반하였다. 그 후, DMF(2 mL) 중의 PAMAM 4.0(60 mg, 0.012 mmol)의 용액을 첨가하였으며, 이로 인해 서서히 재용해되는 응집성 침전물의 중간체가 형성되었다. 그 혼합물을 2 일간 교반한 후 농축하여(10^{-4} mmHg, 40.) 점성 오일을 얻었다. 미정제 생성물을 겔 여과(Sephadex G10, 10% AcOH)에 의해 정제하여 24개의 N-(2-아세톡시에틸)-N,N-(디메틸암모늄)메틸카르복스아미드기로 말단화된 PAMAM 4.0을 얻었다(64 mg). ^1H nmr (D_2O): 81.93, 2.05, 2.70, 3.10–3.60, 3.28, 3.39(m), 4.14, 4.48(m). ^{13}C nmr (D_2O): 824.6, 26.2, 33.2, 38.7, 42.8, 42.9, 53.9, 57.4, 62.6, 67.3, 67.5, 168.9, 176.4, 176.8, 177.3, 183.2.

실시예 18

구아니디노 말단화된 텐드리머의 제법

PAMAM 4.0 BRI6042

물(5 mL) 중의 PAMAM 4.0(63 mg, 0.012 mmol) 및 메틸티오쥬도우레아 세페이트(170 mg, 0.61 mmol)의 용액(pH 10.5)을 80°C의 질소하에서 2 시간동안 가열하였다. 그 후, 그 용액을 농축하고 잔류물을 젤 여과(Sephadex G10, 10% AcOH)에 의해 정제하여 24개의 구아니디노 기로 말단화된 PAMAM 4.0을 아세테이트 염 형태로 얻었다(107 mg). ¹H nmr (D₂O): δ 2.00, 2.80(br t), 3.09(br t), 3.32, 3.45(br t), 3.60(br t). ¹³C nmr (D₂O): 825.2, 33.2, 33.4, 38.7, 41.2, 42.6, 43.4, 44.7, 53.5, 54.0, 56.3, 176.5, 176.7, 176.9, 181.6.

6개의 구아니디노기로 말단화된 대응하는 PAMAM 2.0 텐드리머를 유사하게 제조하였다.

실시예 19

4-([1,4,8,11-테트라아자시클로테트라데칸]메틸)벤즈아미드 말단화된 텐드리머의 제법

PAMAM 4.0 BRI6041

pH 7 인산염 완충액(10 mL) 중에 1-(4-카르복시페닐)메틸-1,4,8,11-테트라아자시클로테트라데칸 4 염산염(120 mg, 0.25 mmol), N-히드록시숙신이미드(60 mg, 0.52 mmol) 및 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카르보디이미드 염산염(250 mg, 1.3 mmol)의 용액을 실온에서 1 시간동안 방치한 후, pH 7 인산염 완충액(10 mL) 중의 PAMAM 4.0(32 mg, 0.006 mmol)의 용액을 첨가하였다. 그 혼합물을 2 일간 방치한 후 농축하였다. 잔류물을 젤 여과(Sephadex LH20; 10% AcOH)에 의해 정제하였으며, ¹H 및 ¹³C nmr(D₂O) 스펙트럼으로 측정한 결과 약 12개의 4-([1,4,8,11-테트라아자시클로테트라데칸]메틸)벤즈아미드기로 말단화된 PAMAM 4.0을 얻었다(80 mg). 그 후 그 생성물을 물 중에 용해하고 Amberlite IRA-401(Cl) 수지로 된 컬럼에 통과시킨 후 농축하였다. 그 잔류물을 물(1 mL) 중에 용해한 후, 농축 HCl(1 mL)을 첨가하고 용액을 에탄올(30 mL)로 희석하여 백색 고체를 침전시켰다. 그 고체를 여과에 의해 수거하였다(68 mg). 또 다시 ¹H 및 ¹³C nmr(D₂O)를 수행하여 말단 아미노기가 약 50% 작용기화되었다는 것을 알았다. ¹H nmr (D₂O): 82.17, 2.36, 2.50, 2.78, 2.85, 3.25, 3.40, 3.50, 3.60, 3.62, 4.49, 7.63(br d), 7.78(br d). ¹³C nmr (D₂O): 822.7, 23.1, 33.2, 38.8, 39.9, 40.2, 40.3, 41.0, 41.2, 42.0, 42.9, 43.2, 43.6, 45.5, 46.1, 49.1, 52.2, 53.9, 54.3, 56.6, 62.7, 132.5, 135.7, 137.1, 139.7, 174.3, 176.2, 176.3, 176.7, 177.0, 178.2, 178.5.

실시예 20

4-카르복시-3-히드록시벤질아민 말단화된 텐드리머의 제법

PAMAM 4.0(EDA) BRI6119

나트륨 시아노보로하이드라이드(32 mg, 0.5 mmol)을 물(4 mL) 중의 PAMAM 4.0(EDA)(69 mg, 0.01 mmol), 4-포르밀-2-히드록시벤조산(83 mg, 0.5 mmol) 및 탄산수소나트륨(42 mg, 0.5 mmol)의 혼합물에 첨가하였다. 그 불균질한 오렌지색 혼합물을 실온에서 4 시간동안 교반하여 균질하게 만들었다. 그 후, 그 오렌지색 용액을 농축하고 잔류물을 젤 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제하여 약 32개의 4-카르복시-3-히드록시벤질아민기로 말단화된 PAMAM 4.0(EDA)을 얻었다(91 mg). ¹H 및 ¹³C nmr(D₂O) 스펙트럼으로 대부분 모노알킬화되었다는 것을 알 수 있으나, 일부 말단 아미노기는 디알킬화된 것을 알았으며 이 둘의 스펙트럼은 모두 넓은 피크를 보여주었다. ¹³C nmr (D₂O): 83.70, 41.1, 50.9, 53.4, 55.5, 55.8, 61.5, 120.9, 122.2, 122.4, 132.3, 132.7, 135.0, 135.8, 163.5, 163.7, 169.0, 178.6, 179.3. ¹H nmr(D₂O) : δ 2.20, 2.35, 2.60, 3.15, 3.30, 3.55, 4.25, 6.68, 7.12, 7.55

실시예 21

4-카르복시페닐아미드 말단화된 텐드리머의 제법

PAMAM 4.0(EDA)

물(20 mL) 중의 PAMAM 4.0(EDA)(69 mg, 0.01 mmol)의 용액에 고체 상태의 4-카르복시페닐이소티오시아네이트(86 mg, 0.48 mmol)을 첨가하였다. 얻어진 뿌연 용액의 pH를 NaHCO₃용액으로 9로 조절하고 실온에서 24 시간동안 교반한 후 냉 치하였다. 그 후, 그 반응 혼합물을 여과하고 여과액을 농축하여 백색 고체 잔류물을 얻었으며 이를 젤 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제한 후, 동결 건조하여 생성물을 백색의 보풀이 있는 고체로 얻었다(68 mg).

실시예 22

3,5-디카르복시페닐아미드 말단화된 텐드리머의 제법

PAMAM 4.0(EDA)

물(5 mL) 중의 PAMAM 4.0(EDA)(70 mg, 0.01 mmol)의 용액에 고체 상태의 3,5-디카르복시페닐이소티오시아네이트(112 mg, 0.5 mmol)을 첨가하였다. 얻어진 뿌연 용액의 pH를 1 M Na₂CO₃ 용액으로 10으로 조절하고 53°C의 질소하에서 2 시간동안 가열하였다. 그 후, 그 반응 혼합물을 여과하고 그 여과액을 농축하여 갈색빛의 고체 잔류물을 얻었으며 이를 젤 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제한 후, 동결 건조하여 엷은 갈색의 고체인 생성물을 얻었다(112 mg).

실시예 23

나트륨 4-포스포노옥시페닐티오우레아 말단화된 텐드리머의 제법

PAMAM 4.0(EDA)

물(20 mL) 중의 PAMAM 4.0(EDA)(69 mg, 0.01 mmol)의 용액에 고체 상태의 나트륨 4-포스포노옥시페닐이소티오시아네이트(251 mg)을 첨가하였다. 얻어진 용액(pH 9)을 실온에서 질소하에 24 시간동안 교반하였다. 그 후, 그 반응 혼합물을 농축하여 백색 고체 잔류물을 얻었으며 이를 젤 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제한 후, 동결 건조하여 생성물을 백색의 보풀이 있는 고체로 얻었다(86 mg).

실시예 24

나트륨 4-(포스포노메틸)페닐티오우레아 말단화된 텐드리머의 제법

PAMAM 4.0(EDA)

물(30 mL) 중의 PAMAM 4.0(EDA)(69 mg, 0.01 mmol)의 용액에 고체 상태의 나트륨 4-(포스포노메틸)페닐이소티오시아네이트(97 mg)을 첨가하였다. 얻어진 용액을 실온에서 질소하에 3 일간 교반하고 포화 NaHCO₃ 용액을 주기적으로 첨가하여 pH를 8로 유지하였다. 그 후, 그 반응 혼합물을 농축하여 백색 고체 잔류물을 얻었으며 이를 젤 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제한 후, 동결 건조하여 생성물을 백색의 보풀이 있는 고체로 얻었다(102 mg).

실시예 25

나트륨 에틸 4-(포스포노메틸)페닐티오우레아 말단화된 텐드리머의 제법

PAMAM 4.0(EDA)

DMF(30 mL) 중의 PAMAM 4.0(EDA)(69 mg, 0.01 mmol)의 용액에 고체 상태의 나트륨 에틸 4-(포스포노메틸)페닐이소티오시아네이트(109 mg)을 첨가하였다. 얻어진 용액을 실온에서 질소하에 17 시간동안 교반하고 포화 NaHCO₃ 용액을 주기적으로 첨가하여 pH를 8로 유지하였다. 그 후, 그 반응 혼합물을 농축하여 백색 고체 잔류물을 얻었으며 이를 겔 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제한 후, 동결 건조하여 생성물을 백색의 보풀이 있는 고체로 얻었다(30 mg).

실시예 26

나트륨 4-설포페닐티오우레아 말단화된 폴리라이신의 제법

물(20 mL)과 N,N-디메틸-N-알릴아민 완충액(pH 9.5, 15 mL)의 혼합물 중의 폴리-L-라이신(15-30K)(시그마 케미칼 컴페니)(1.0 g)의 용액에 고체 상태의 나트륨 4-설포페닐이소티오시아네이트 일수화물(2.55 g, 10 mmol)을 첨가하였다. 얻어진 혼합물을 질소하에 3 시간동안 53°C에서 가열하였으며, 이 때의 닌히드린 시험 결과는 음성이었다. 냉각시킨 혼합물을 여과하고 여과액을 농축하여 회색 고체 잔류물을 얻었다. 그 고체 잔류물을 물 중에 재용해하고 Amberlite IR-120(Na)의 컬럼에 통과시킨 후 농축하였다. 그 미정제 생성물을 겔 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제한 후, 동결 건조하여 4-설포페닐티오우레아 말단화된 폴리-L-라이신 BRI2995를 백색의 보풀이 있는 고체로 얻었다(1.25 g).

분자량 분획이 1-4K BRI2994, 4-15K BRI2967, 150-300K BRI2996인 나트륨 4-설포페닐티오우레아 말단화된 폴리라이신을 유사하게 제조하였다.

실시예 27

나트륨 3,6-디설포나프틸티오우레아 말단화된 폴리라이신의 제법

물(2 mL)과 N,N-디메틸-N-알릴아민 완충액(pH 9.5, 2 mL)의 혼합물 중의 폴리-L-라이신(15-30K)(50 mg)의 용액에 고체 상태의 나트륨 3,6-디설포나프틸이소티오시아네이트(200 mg, 0.51 mmol)을 첨가하였다. 얻어진 혼합물을 질소하에 3 시간동안 53°C에서 가열하였으며, 이 때의 닌히드린 시험 결과는 음성이었다. 냉각시킨 혼합물을 여과하고 여과액을 농축하여 갈색빛의 고체 잔류물을 얻었다. 그 고체 잔류물을 물 중에 재용해하고 Amberlite IR-120(Na)의 컬럼에 통과시킨 후 농축시켰다. 그 미정제 생성물을 겔 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제한 후, 동결 건조하여 나트륨 3,6-디설포나프틸티오우레아 말단화된 폴리-L-라이신 BRI6047를 백색의 보풀이 있는 고체로 얻었다(87 mg).

실시예 28

C_n-알킬 연결된 2-티오시알로사이드 말단화된 덴드리머 및 선형 중합체의 제법

메틸[(8-옥탄산 N-히드록시숙신이미드 에스테르) 5-아세트아미도-4,7,8,9-테트라-O-아세틸-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로-α-D-갈락토-2-노눌로피라노시드]오네이트를 다음의 방법으로 제조하였다.

건조 디메틸포름아미드(1 mL) 중의 메틸 5-아세트아미도-4,7,8,9-테트라-O-아세틸-2-S-아세틸-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로-α-D-갈락토-2-노눌로피라노소네이트(Hasegawa 등, 1986)(100 mg)의 용액에 8-브로모옥탄산(41 mg) 및 디에틸아민(280 mg)을 첨가하고 그 용액을 20°C에서 17 시간동안 교반하였다. 용매를 진공하에서 제거하고 잔류물을 에틸 아세테이트와 열음 냉각한 5% 염산 사이에 분배하였다. 유기층을 물로 세척한 후, 황산나트륨 상에서 건조시키고 증발시켜서 잔류물(130 mg)을 얻었다. 이것을 에틸 아세테이트(5 mL) 중에 용해하고 N-히드록시숙신이미드(26 mg) 및 디시클로헥실카르보디이미드(46 mg)를 첨가하였다. 그 혼합물을 20°C에서 17 시간동안 교반한 후 백색 침전물을 여과분리하였다. 그 여과액을 농축하고 에틸 아세테이트를 용출물로 하는 실리카겔 상의 섬광 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 생성물을 함유하는 분획들을 합한 후 증발시켜서 백색 발포체를 얻었다(97 mg, 71%).

유사하게 다음을 제조하였다.

메틸 [(11-운데칸산 N-히드록시숙신이미드 에스테르) 5-아세트아미도-4,7,8,9-테트라-O-아세틸-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로-α-D-갈락토-2-노눌로피라노시드]오네이트.

메틸 [(아세트산 N-히드록시숙신이미드 에스테르) 5-아세트아미도-4,7,8,9-테트라-O-아세틸-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드]오네이트.

메틸 [(4-부탄산 N-히드록시숙신이미드 에스테르) 5-아세트아미도-4,7,8,9-테트라-O-아세틸-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드]오네이트.

메틸 [(4-메틸벤조산 N-히드록시숙신이미드 에스테르) 5-아세트아미도-4,7,8,9-테트라-O-아세틸-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드]오네이트.

A PAMAM [EDA] 4.0[(8-옥탄아미도)-5-아세트아미도-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드산]₃₂ BRI6112.

건조 디메틸설폐시드(4 mL) 중의 PAMAM [EDA] 4.0(50 mg)의 용액에 비활성 대기하에서 메틸 [(8-옥탄산 N-히드록시숙신이미드 에스테르) 5-아세트아미도-4,7,8,9-테트라-O-아세틸-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드]오네이트(300 mg)을 첨가하고 그 용액을 20°C에서 60시간동안 교반하였다. 용매를 진공하에서 제거하고 잔류물을 메탄올(2 mL) 중에서 용해하였다. 이 용액을 메탄올로 용출하는 Sephadex LH20상의 크기별 배제 크로마토그래피처리하였다. 용매를 증발시켜서 생성물 PAMAM [EDA] 4.0 [메틸[(8-옥탄아미도) 5-아세트아미도-4,7,8,9-테트라-O-아세틸-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드]오네이트]₃₂을 백색 분말로 얻었다. 182 mg, 93%.

이것을 이하의 방법으로 유리 시알로사이드로 전환시켰다.

건조 메탄올(3 mL) 중의 PAMAM [EDA] 4.0[메틸[(8-옥탄아미도) 5-아세트아미도-4,7,8,9-테트라-O-아세틸-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드]오네이트]₃₂(182 mg)의 용액에 20°C의 아르곤하에서 새로이 제조한 메탄올(7 mL) 중의 0.19 M 나트륨메톡사이드 용액을 첨가하고 그 혼합물을 2.5시간동안 교반하였다. 용매를 증발시키고 잔류물을 물(10 mL) 중에서 용해한 후, 3시간동안 교반하였다. 이 용액을 물로 용출하는 Sephadex LH20상의 크기별 배제 크로마토그래피처리하였다. 동결 건조시키면, 생성물 PAMAM [EDA] 4.0[(8-옥탄아미도)-5-아세트아미도-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드산]₃₂을 얇은 레몬색 분말로 얻었다. 110 mg, 77%.

유사한 과정을 사용하여 다음의 화합물을 제조하였다.

PAMAM [EDA] 4.0[(11-운데칸아미도)-5-아세트아미도-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드산]₃₂ BRI6147

PAMAM [EDA] 4.0[(아세트아미도)-5-아세트아미도-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드산]₃₂ BRI6121

PAMAM [EDA] 4.0[(4-메틸벤즈아미도)-5-아세트아미도-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드산]₃₂ BRI6120

B BHA lyslys₂lys₄lys₈lys₁₆[(8-옥탄아미도)-5-아세트아미도-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드산]₃₂ BRI6169

트리플루오로아세트산(2 mL)와 디클로로메탄(2 mL)의 혼합물중의 BHA lyslys₂lys₄lys₈lys₁₆(t-Boc)₃₂(20.3 mg)의 용액을 20°C에서 2시간동안 교반한 후 용매를 진공하에서 제거하였다. 그 잔류물을 건조 디메틸설폐시드(1 mL) 중에 용해하고, 디이소프로필에틸아민(25 mg)과 메틸[(8-옥탄산 N-히드록시숙신이미드 에스테르) 5-아세트아미도-4,7,8,9-테트라-O-아세틸-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드]오네이트(78 mg)을 첨가하였다. 그 혼합물을 20°C의 아르곤하에서 60시간동안 교반한 후, 용매를 진공하에서 제거하였다. 잔류물을 새로이 제조한 메탄올(2.5 mL) 중의 0.1 M 나트륨메톡사이드 용액 중에 용해하고 그 혼합물을 3시간동안 20°C의 아르곤하에서 교반하였다. 용매를

증발시키고 잔류물을 물(1 mL) 중에서 용해한 후, 17 시간동안 교반하였다. 이 용액을 물로 용출하는 Sephadex LH20상의 크기별 배제 크로마토그래피처리하였다. 동결 건조시킨 후, 생성물 BHA lys₂lys₄lys₈lys₁₆[(8-옥탄아미도)-5-아세트아미도-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드산]₃₂를 백색 분말로 얻었다. 44 mg, 86%

C 폴리-L-리실[(8-옥탄아미도)-5-아세트아미도-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드산]_nBRI6150

건조 디메틸 셀록시드(1 mL) 중의 폴리-L-라이신. HBr MW 150-300Kd(22 mg)의 용액에 디이소프로필에틸아민(15 mg)과 메틸[(8-옥탄산 N-히드록시숙신이미드 에스테르) 5-아세트아미도-4,7,8,9-트리데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드]오네이트(90 mg)을 첨가하였다. 그 혼합물을 20°C의 아르곤하에서 60시간동안 교반한 후, 용매를 진공하에서 제거하였다. 그 잔류물을 새로이 제조한 메탄올(4 mL) 중의 0.5 M 나트륨메톡사이드 용액 중에 용해하고 그 혼합물을 48 시간동안 20°C의 아르곤하에서 교반하였다. 용매를 증발시키고 잔류물을 물(1.5 mL) 중에서 용해한 후, 24 시간동안 교반하였다. 이 용액을 물로 용출하는 Sephadex LH20상의 크기별 배제 크로마토그래피처리하였다. 동결 건조시킨 후, 생성물 폴리리실[(8-옥탄아미도)-5-아세트아미도-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드산]_n을 백색 분말로 얻었다. 49 mg, 94%.

실시예 29

시알산의 4 위치가 변형된 수상 시알로사이드의 제법

메틸 4-아지도-5-아세트아미도-7,8,9-트리-O-아세틸-2-S-아세틸-3,4,5-트리데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노소네이트를 다음의 방법으로 제조하였다. 건조 디클로로메탄(150 mL) 중의 메틸 4-아지도-5-아세트아미도-7,8,9-트리-O-아세틸-2-클로로-3,4,5-트리데옥시-D-글리세로- β -D-갈락토-2-노눌로피라노소네이트(Sabesan, 1994)(5 g)의 용액에 미세하게 분말화된 칼륨 티올아세테이트(5.8 g)을 첨가하고 그 혼탁액을 20°C에서 48시간동안 격렬하게 교반하였다. 그 혼합물을 여과하고 증발시켜서 밝은 갈색 발포체(5.2 g)를 얻었다. 목적하는 생성물을 예비 역상 HPLC[C₁₈, 30% 아세토니트릴/물]에 의해 백색 발포체로서 분리하였다. 3.9 g, 72%

메틸 [(8-옥탄산 N-히드록시숙신이미드 에스테르) 4-아지도-5-아세트아미도-7,8,9-트리-O-아세틸-3,4,5-트리데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드]오네이트를 다음과 같이 제조하였다.

건조 디메틸포름아미드(3.5 mL) 중의 메틸 4-아지도-5-아세트아미도-7,8,9-트리-O-아세틸-2-S-아세틸-3,4,5-트리데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노소네이트(300 mg)의 용액에 8-브로모옥탄산(155 mg)과 디에틸아민(1.26 mL)을 첨가하고 그 용액을 17 시간동안 20°C에서 교반하였다. 진공하에서 용매를 제거하고 잔류물을 에틸아세테이트와 얼음 냉각한 10% 염산사이에 분배시켰다. 유기층을 물로 세척하고 황산나트륨상에서 건조시킨 후 증발하여 황색 발포체(385 mg)를 얻었다. 이것을 에틸 아세테이트(20 mL) 중에서 용해하고 N-히드록시숙신이미드(95 mg) 및 디시클로헥실카르보디이미드(175 mg)를 첨가하였다. 그 혼합물을 20°C에서 17 시간동안 교반한 후 백색 침전물을 여과 분리하였다. 그 여과액을 농축하고 예비 역상 HPLC[C₁₈, 30% 아세토니트릴/물]에 의해 백색 발포체로서 분리하였다. 340 mg, 83%

A PAMAM [EDA] 4.0[(8-옥탄아미도)-4-아지도-5-아세트아미도-3,4,5-트리데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드산]₃₂ BRI6146.

건조 디메틸 셀록시드(5 mL) 중의 PAMAM [EDA] 4.0(72 mg)의 용액에 비활성 대기하에서 메틸 [(8-옥탄산 N-히드록시숙신이미드 에스테르) 4-아지도-5-아세트아미도-7,8,9-트리-O-아세틸-3,4,5-트리데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드]오네이트(318 mg)을 첨가하고 그 용액을 20°C에서 60시간동안 교반하였다. 용매를 진공하에서 제거하고 잔류물을 메탄올(2 mL) 중에서 용해하였다. 이 용액을 메탄올로 용출하는 Sephadex LH20상의 크기별 배제 크로마토그래피처리하였다. 용매를 증발시켜서 생성물 PAMAM [EDA] 4.0 [메틸[(8-옥탄아미도) 4-아지도-5-아세트아미도-7,8,9-트리-O-아세틸-3,4,5-트리데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드]오네이트]₃₂을 백색 발포체로 얻었다. 225 mg, 81%.

이것을 이하의 방법으로 유리 시알로사이드로 전환시켰다.

건조 메탄올(1 mL) 중의 PAMAM [EDA] 4.0 [(8-옥탄아미도) 4-아지도-5-아세트아미도-7,8,9-트리-O-아세틸-3,4,5-트리데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로파라노시드] ₃₂(215 mg)의 용액에 20°C의 아르곤하에서 새로이 제조한 메탄올(1 mL) 중의 1 M 나트륨메톡사이드 용액을 첨가하고 그 혼합물을 3 시간동안 교반하였다. 용매를 진공하에서 제거하고 잔류물을 물(2 mL) 중에서 용해한 후, 17 시간동안 교반하였다. 이 용액을 물로 용출하는 Sephadex LH20상의 크기별 배제 크로마토그래피처리하였다. 동결 건조시키면, 생성물 PAMAM [EDA] 4.0 [(8-옥탄아미도)-4-아지도-5-아세트아미도-3,4,5-트리데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로파라노시드산] ₃₂을 보풀이 있는 백색 분말로 얻었다. 160 mg, 90%.

B PAMAM [EDA] 4.0[(8-옥탄아미도)-4-아미노-5-아세트아미도-3,4,5-트리데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로파라노시드산] ₃₂BRI6149

황화수소의 저속 증기를 피리딘(40 mL)과 물(20 mL)의 혼합물 중의 PAMAM [EDA] 4.0 [(8-옥탄아미도)-4-아지도-5-아세트아미도-3,4,5-트리데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로파라노시드산] ₃₂(25 mg)의 용액에 20°C에서 5 일간 통과시켰다. 그 후, 그 용액에 2 시간동안 질소 기포를 발생시켜서 과량의 황화수소를 제거하였다. 그 용액을 증발 건조시키고 잔류물을 물(5 mL) 중에 취한 후 0.45 μ m 멤브레인 필터를 통해 여과하여 황을 제거하였다. 동결 건조시키면, 생성물 PAMAM [EDA] 4.0[(8-옥탄아미도)-4-아미노-5-아세트아미도-3,4,5-트리데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로파라노시드산] ₃₂을 보풀이 있는 백색 분말로 얻었다. 23 mg, 96%.

실시예 30

붕소산 말단화된 덴드리머의 제법

4-카르복시페닐붕소산 N-히드록시숙신이미드 에스테르

건조 디메틸 포름아미드(5 mL) 중의 4-카르복시페닐붕소산(500 mg)의 용액에 N-히드록시숙신이미드(380 mg) 및 디시클로헥실카르보디이미드(680 mg)을 첨가하였다. 그 혼합물을 20°C에서 64 시간동안 교반한 후 백색 침전물을 여과 제거하였다. 용매를 진공하에서 제거하고 잔류물을 에틸 아세테이트(100 mL) 중에 용해하였다. 이 용액을 물로 세척하고, 황산나트륨상에서 건조시킨 뒤 증발시켜서 백색 고체를 얻었으며 이를 아세토니트릴/물로 결정화하여 미세한 침상형 물질을 얻었다. 730 mg, 92%

PAMAM [EDA] 4.0[4-벤즈아미도붕소산] ₃₂BRI6160

건조 디메틸설록시드(5 mL) 중의 PAMAM [EDA] 4.0(69 mg)의 용액에 비활성 대기하에서 4-카르복시페닐붕소산 N-히드록시숙신이미드 에스테르(130 mg)을 첨가하고 그 용액을 20°C에서 65 시간동안 교반하였다. 농축 슬러리에 1 M 탄산나트륨 용액(1 mL)를 첨가하고 투명한 용액을 추가로 24 시간동안 교반하였다. 용매를 진공하에서 제거하고 잔류물을 10% 암모니아 용액(5 mL) 중에서 용해하였다. 이 용액을 10% 암모니아 용액으로 용출하는 Sephadex LH20상의 크기별 배제 크로마토그래피처리하였다. 용매를 증발시켜서 생성물 PAMAM [EDA] 4.0[4-벤즈아미도붕소산] ₃₂을 백색의 보풀이 있는 고체로 얻었다. 110 mg, 94%.

실시예 31

나트륨 3,6-디설포나프틸티오우레아 말단화된 덴드리머의 제법

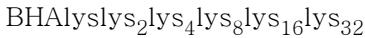
BHAlyslys₂lys₄lys₈lys₁₆lys₃₂

건조 디클로로메탄(2 mL) 중의 BHAlyslys₂lys₄lys₈lys₁₆DBL ₃₂(147 mg)의 교반한 혼탁액에 트리플루오로아세트산(2 mL)을 첨가하여 얻은 용액을 실온에서 질소하에 2 시간동안 교반한 후 농축하였다. 잔류물을 N,N-디메틸-N-알릴아민 완충액(pH 9.5, 5 mL) 중에 용해한 후 고체 상태의 3,6-디설포나프틸 이소티오시아네이트(400 mg)을 첨가하였다. 그 후, 1 M

탄산나트륨을 첨가하여 상기 혼합물의 pH를 9.5로 조절하고 그 용액을 질소하에서 3 시간동안 53°C로 가열하였다. 그 반응 혼합물을 농축시키고 잔류물을 물 중에 용해한 뒤 그 용액을 Amberlite IR 120(Na)의 컬럼에 통과시켰다. 그 여과액을 농축하여 미정제 생성물을 얻었다. 이를 겔 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제하여 64개의 나트륨 3,6-디설포나프틸우레아기로 말단화된 BHAllys₂lys₄lys₈lys₁₆lys₃₂를 보풀이 있는 백색 고체로 얻었다(175 mg).

실시예 32

나트륨 3,5-디설포페닐티오우레아 말단화된 텐드리머의 제법



건조 디클로로메탄(3 mL) 중의 BHAllys₂lys₄lys₈lys₁₆DBL₃₂(300 mg, 0.02 mmol)의 교반한 혼탁액에 트리플루오로아세트산(3 mL)을 첨가하여 얻은 용액을 실온에서 질소하에 2 시간동안 교반한 후 농축하였다. 잔류물을 물 중에 용해한 뒤 그 용액을 Amberlite IR 401(OH)의 컬럼에 통과시키고 여과액을 농축하여 점성의 오일을 얻었다(187 mg). 이 오일을 피리딘/물 1:1 혼합물(8 mL) 중에 용해하고 고체 상태의 나트륨 3,5-디설포페닐 이소티오시아네이트(680 mg, 2 mmol)를 첨가하였다. 얻은 용액을 53°C의 질소하에서 3 시간동안 가열하였다. 그 후, 그 용액을 농축하여 백색 고체 잔류물을 얻었다. 미정제 생성물을 겔 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제하여 64개의 나트륨 3,5-디설포페닐우레아기로 말단화된 BHAllys₂lys₄lys₈lys₁₆lys₃₂를 보풀이 있는 백색 고체로 얻었다.

실시예 33

나트륨 3,5-디카르복시페닐티오우레아 말단화된 텐드리머의 제법



건조 디클로로메탄(3 mL) 중의 BHAllys₂lys₄lys₈lys₁₆DBL₃₂(300 mg, 0.02 mmol)의 교반한 혼탁액에 트리플루오로아세트산(3 mL)을 첨가하여 얻은 용액을 실온에서 질소하에 2 시간동안 교반한 후 농축하였다. 잔류물을 물 중에 용해한 뒤 그 용액을 Amberlite IRA 401(OH)의 컬럼에 통과시키고 여과액을 농축하여 점성의 오일을 얻었다(186 mg). 이 오일을 피리딘/물 1:1 혼합물(8 mL) 중에 용해하고 나트륨 3,5-디카르복시페닐 이소티오시아네이트(450 mg, 2 mmol)를 첨가하였다. 얻은 용액을 53°C의 질소하에서 13 시간동안 가열하였다. 그 후, 그 용액을 농축하여 백색 고체 잔류물을 얻었다. 미정제 생성물을 겔 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제하여 64개의 나트륨 3,5-디카르복시페닐우레아기로 말단화된 BHAllys₂lys₄lys₈lys₁₆lys₃₂를 보풀이 있는 백색 고체로 얻었다.

실시예 34

나트륨 4-포스포노옥시페닐티오우레아 말단화된 텐드리머의 제법



건조 디클로로메탄(2 mL) 중의 BHAllys₂lys₄lys₈lys₁₆DBL₃₂(147 mg, 0.01 mmol)의 교반한 혼탁액에 트리플루오로아세트산(2 mL)을 첨가하여 얻은 용액을 실온에서 질소하에 2 시간동안 교반한 후 농축하여 점성의 오일을 얻었다. 그 오일을 N,N-디메틸-N-알릴아민 완충액(pH 9.5, 5 mL) 중에 용해하고 고체 상태의 4-포스포노옥시페닐 이소티오시아네이트(250 mg)을 첨가하였다. 얻은 용액의 pH를 1 M 탄산나트륨으로 10으로 조절하고 그 혼합물을 53°C의 질소하에서 3 시간동안 가열하였다. 그 후, 그 용액을 농축하여 백색 고체 잔류물을 얻었다. 이 잔류물을 물 중에 용해하여 그 용액을 Amberlite IR 120(Na)의 컬럼에 통과시킨 후, 여과액을 농축하였다. 그 후, 잔류물을 겔 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제하여 64개의 나트륨 4-포스포노옥시페닐우레아기로 말단화된 BHAllys₂lys₄lys₈lys₁₆lys₃₂를 보풀이 있는 백색 고체로 얻었다(150 mg).

실시예 35

나트륨 4-포스포노페닐티오우레아 말단화된 텐드리머의 제법

BHAlyslys₂lys₄lys₈lys₁₆lys₃₂

건조 디클로로메탄(2 mL) 중의 BHAlyslys₂lys₄lys₈lys₁₆DBL₃₂(147 mg, 0.01 mmol)의 교반한 혼탁액에 트리플루오로아세트산(2 mL)을 첨가하여 얻은 용액을 실온에서 질소하에 2 시간동안 교반한 후 농축하여 점성의 오일을 얻었다. 그 오일을 N,N-디메틸-N-알릴아민 완충액(pH 9.5, 5 mL) 중에 용해하고 고체 상태의 4-포스포노페닐 이소티오시아네이트(250 mg)을 첨가하였다. 얻은 용액의 pH를 포화 중탄산나트륨 용액으로 9로 조절하고 그 혼합물을 53°C의 질소하에서 3 시간동안 가열하였다. 그 후, 그 용액을 농축하여 백색 고체 잔류물을 얻었다. 이 잔류물을 물 중에 용해하고 그 용액을 Amberlite IR 120(Na)의 컬럼에 통과시키고 여과액을 농축하였다. 그 후 잔류물을 겔 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제하여 64개의 나트륨 4-포스포노페닐우레아기로 말단화된 BHAlyslys₂lys₄lys₈lys₁₆lys₃₂ BRI6196을 동결 건조시킨 후, 보풀이 있는 백색 고체로 얻었다(152 mg).

실시예 36

나트륨 4,6-디포스포노나프틸티오우레아 말단화된 덴드리머의 제법

PAMAM 4.0

물(2 mL) 중의 나트륨 4,6-디포스포노나프틸 이소티오시아네이트(165 mg)의 용액을 물(2 mL) 중의 PAMAM 4.0(51 mg, 0.01 mmol)의 용액에 첨가하였다. 그 혼합물을 pH를 포화 중탄산나트륨 용액으로 9.5로 조절하고 그 혼합물을 실온에서 1 시간동안 격렬하게 교반한 후 53°C의 질소하에서 3 시간동안 가열하였다. 그 후, 그 혼합물을 여과하고 여과액을 농축하여 갈색 고체 잔류물을 얻었다. 그 미정제 생성물을 겔 여과(Sephadex G25, 물)에 의해 정제하여, 24개의 나트륨 4,6-디포스포노나프틸티오우레아기로 말단화된 PAMAM 4.0을 동결 건조시킨 후 갈색 고체로 얻었다(81 mg).

실시예 37

플루오레세인티오우레아 말단화된 덴드리머의 제법

PAMAM 4.0(EDA)

물(3 mL) 중의 PAMAM 4.0(EDA)(74 mg, 0.01 mmol)의 용액에 고체 상태의 플루오레세인 이소티오시아네이트(188 mg)를 첨가하였다. 포화된 중탄산나트륨 용액을 첨가하여 pH를 9로 조절하여 얻은 균질한 용액을 실온에서 하룻밤동안 교반한 후 농축하였다. 그 오렌지색 잔류물을 겔 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제하여, 21개의 플루오레세인티오우레아기로 말단화된 PAMAM 4.0(EDA)를 동결 건조시킨 후 보풀이 있는 오렌지색 고체로 얻었다(193 mg).

실시예 38

나트륨 (페닐-3-붕소산)-티오우레아 말단화된 덴드리머의 제법

PAMAM 4.0(EDA)

물(5 mL) 중의 PAMAM 4.0(EDA)(69 mg, 0.01 mmol)의 용액에 고체 상태의 (페닐-3-붕소산) 이소티오시아네이트(100 mg, 0.5 mmol)를 첨가하였다. 상기 용해된 이소티오시아네이트(pH 약 10)에 1 M 탄산나트륨을 첨가하였다. 그 혼합물을 53°C의 질소하에서 2 시간동안 가열한 뒤, 여과하고 그 여과액을 농축하여 갈색빛의 고체 잔류물을 얻었다. 미정제 생성물을 겔 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제하여, 32개의 (페닐-3-붕소산)티오우레아기로 말단화된 PAMAM 4.0(EDA)를 동결 건조시킨 후 보풀이 있는 백색 고체로 얻었다(87 mg).

실시예 39

나트륨 3,5-디카르복시페닐티오우레아 말단화된 폴리라이신의 제법

물(2 mL) 중의 폴리-L-라이신·하이드로브로마이드(4-15K)(시그마 캐미칼 캄파니)(50 mg)의 용액을 물(3 mL) 중의 나트륨 3,5-디카르복시페닐 이소티오시아네이트(305 mg)의 용액에 첨가하여 얻은 용액의 pH를 수성 중탄산나트륨으로 9로 조절

하였다. 그 후, 그 용액을 53°C의 질소하에서 4 시간동안 가열하였다. 그 용액을 냉각시키고 여과한 후, 여과액을 농축하여 회백색 고체 잔류물을 얻었다. 그 미정제 생성물을 젤 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제하고 동결 건조하여, 나트륨 3,5-디카르복시페닐티오우레아 말단화된 폴리-L-라이신을 보풀이 있는 백색 고체로 얻었다(71 mg).

실시예 40

나트륨 4-(포스포노메틸)페닐티오우레아 말단화된 폴리라이신의 제법

피리딘/물 1:1 혼합물 중의 폴리-L-라이신·하이드로브로마이드(30-70K)(시그마 캐미칼 캄파니)(50 mg)의 용액에 고체 상태의 4-(포스포노메틸)페닐 이소티오시아네이트(231 mg, 1.0 mmol)을 첨가하였다. 그 혼합물의 pH를 1 M 탄산나트륨으로 9.5로 조절한 후, 그 용액을 53°C의 질소하에서 하룻밤동안 가열하였다. 그 혼합물을 냉각시키고 여과한 후, 여과액을 농축하여 갈색 고체 잔류물을 얻었다. 그 미정제 생성물을 젤 여과(Sephadex LH20; 물)에 의해 정제하여, 갈색 고체를 얻었다(82 mg).

실시예 41

1-포스포노-옥시페닐-4-티오우레아 말단화된 폴리-L-라이신의 제법

물(10 mL) 중의 폴리-L-라이신·하이드로브로마이드(50 mg, 시그마 P2636, 30-70 칠로달톤)의 53°C로 가열한 교반 용액에 4-포스포노옥시페닐 이소티오시아네이트(153 mg)을 첨가하고 그 혼합물의 pH를 1 M 탄산나트륨 용액으로 9.5~10으로 조절하였다. 그 혼합물을 53°C에서 5 시간동안 가열하고 교반한 후 여과하였다. 그 투명한 용액을 물로 용출하는 Sephadex LH20상에서 젤여과에 의해 정제하였다. 용출물을 동결 건조시켜 백색 발포체 형태의 생성물을 얻었다. 77 mg, 94%

실시예 42

벤즈아미도-4-붕소산 말단화된 폴리-L-라이신의 제법

비활성 대기하에서 DMSO(10 mL) 중의 폴리-L-라이신·하이드로브로마이드(50 mg, 시그마 P2636, 30-70 칠로달톤)의 용액에 4-카르복시페닐붕소산 N-히드록시숙신이미드 에스테르(90 mg)을 첨가하고 1 M 탄산나트륨 용액(2 mL)을 첨가하였다. 그 혼합물을 20°C에서 60 시간동안 교반하였다. 용매를 진공하에서 제거하고 잔류물을 물(5 mL) 중에 용해하여 여과하였다. 그 투명한 용액을 물로 용출하는 Sephadex LH20상에서 젤여과에 의해 정제하였다. 용출물을 동결 건조시켜 백색 발포체 형태의 생성물을 얻었다. 50 mg, 90%

실시예 43

I. 용모요막(絨毛尿膜; CAM) 분석

풀크맨(1985)에 의해 처음으로 기술되었으며 마라고우다키스 등(1988)에 의해 수정된 생체내 CAM 혈관 형성 모델을 사용하였다. 간략히 말하면, 새로 수정한 달걀을 37°C에서 4 일간 항온하였으며 이 시점에서 CAM을 노출시키도록 달걀 껌질에 창을 내었다. 그 창을 셀로판 테이프로 덮고 달걀을 항온기에 도로 넣어 9 일간 보관한 후 시험 화합물을 적용하였다. 시험 화합물을 멸균 플라스틱 디스크(10 mm)상에 놓고 멸균 조건하에서 건조시켰다. 시험 물질을 함유하는 디스크로부터 1 cm 떨어진 곳의 CAM 상에 대조군 디스크(PBS를 함유)를 놓았다. 염증 반응을 막기 위해 코르티손 아세테이트의 멸균 용액(100 µg/디스크, 시그마)을 모든 디스크에 혼입시켰다. 적재된 건조시킨 디스크들을 거꾸로 하여 CAM상에 놓았으며, 창을 덮고, 달걀을 항온시켜서 11 일 후 혈관 형성을 평가하였다.

CAM 분석에서의 혈관 형성의 형태학적 평가

형태학적 평가를 위해, 달걀을 전술한 바와 같이 처리하였다. 11 일째에 달걀을 10% 완충 된 포르말린(Janssen Chimica, Geel, 벨기에)으로 분출시키고 그 플라스틱 디스크를 제거한 뒤 달걀을 실온에서 4 시간 이상 방치하였다. 디스크 주변의 넓은 면적을 절단하여 유리 슬라이드 위에 놓았다. 혈관 밀도 지수(혈관의 갯수로 표시됨)를 해리스-훅커 등의 방법에 의해 측정하였다(1983).

II. 래트 대동맥 분석

니코시아 등(1990)에 의해 처음으로 기술된 래트 대동맥 고리 모델을 사용하였다. 간략하게 말하면, 멸균한 1.5% 아가로스(agarose) 용액(Pharmacia Biotech AB, Uppsala, 스웨덴)을 배양 접시에 붓고 그것을 젤화시켰다. 아가로스 고리는 아가로스 젤내에 각각 직경 10 mm와 17 mm인 두개의 동심원을 천공함으로써 만들어진다. 고리안과 고리밖의 과량의 아가로스를 제거하였다. 그 고리를 하나의 웰이 세개의 고리를 함유하는 6 웰 플레이트(Nunction, Roskilde, 덴마아크)로 이동시켰다. 3 개월 된 수컷 비스타 래트로부터 흉곽 대동맥을 분리하였다. 그 대동맥을 즉시 혈청을 함유하지 않는 최소 요구량 매체(MEM)를 갖는 배양 디스크로 이동시켰다. 대동맥 벽을 손상시키기 위해 대동맥 주변의 섬유지방 조직을 조심스럽게 제거하였다. 대동맥 고리의 얇은 슬라이스(0.5 mm 두께)를 절개하여 혈청을 함유하지 않은 매체로 12 회 연속하여 세척함으로써 철저히 행구었다. 대동맥 고리를 배양 플레이트 내 배양 고리에 주입하기 전, 각각의 아가로스 벽의 바닥을 150 μl 응고용 피브리노겐으로 피복하였다. 피브린 젤이 형성된 후, 대동맥 고리를 아가로스 벽에 이동시키고 아가로스 벽 중앙에 위치시켰다. 그 후, 그 아가로스 벽을 응집용 피브리노겐으로 완전히 채웠다. 부분적으로 정제된 소의 피브리노겐(시그마)을 혈청을 함유하지 않은 매체 중에 용해하여 3 mg/ml의 농도를 얻었다. 피브리노겐 용액 1 ml에 50 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 소의 트롬빈 용액(시그마) 20 μl 을 첨가함으로써 응집시켰다. 피브린 젤이 실온에서 30 초내에 형성되었다. 피브린 젤화 후, MEM 매체 6 ml에 20% FCS(지브코), 10 mM Hepes(지브코) 및 1 mM L-글루타민(지브코)을 보충하였다. 이것을 6 웰 플레이트 각각에 첨가하고 그 시험 화합물을 적당한 농도로 상기 매체에 첨가하였다.

래트 대동맥 고리 분석에 대한 혈관 형성 평가

배지를 매일 검사하고 도립 현미경하에서 기록하였다. 미세 혈관의 성장은 미세혈관 성장 곡선으로 알 수 있다. 통상, 200 개 내지 250개 이상의 미세혈관이 형성되었다(니코시아 등 1990). 이는 미세혈관 그물구조의 3차원 복잡성에 기인한다. 관찰자가 미세혈관을 계수하는 데 있어서의 오차는 컸다. 그러므로, 형성된 미세혈관은 0(혈관이 형성되지 않음) 내지 10(최대 혈관수) 등급으로 기록하였다.

결과

I. CAM 분석

달걀 번호	BRI6112 (25 $\mu\text{g}/\text{cam}$)	BRI2923 (25 $\mu\text{g}/\text{cam}$)	BRI2995 (25 $\mu\text{g}/\text{cam}$)	BRI2784 (25 $\mu\text{g}/\text{cam}$)	BRI6039 (25 $\mu\text{g}/\text{cam}$)
1	-11%	-45%	-36%	0	+11%
2	-13%	-17%	-22%	-7%	-33%
3	-26%	-35%	-54%	-36%	-9%
4	+11%	-87%	-73%	+10%	-34%
5	-42%	-48%	-55%	-40%	-26%
6	-41%	-8%	-43%	-27%	-27%
7	-32%	-57%	-34%	0	-12%
8	-15%		-20%	-27%	-18%
9	0		-22%	-36%	-63%
10	-57%		-88%	-54%	-53%
11			+23%	0	-16%
12			-30%	-57%	+43%
13			0		
x =	-22.6 ± 20.9 p ≤ 0.01	-42.4 ± 26.2 p ≤ 0.05	-34.9 ± 29.3 p ≤ 0.01	-22.8 ± 22.8 p ≤ 0.05	-19.8 ± 27.8 p ≤ 0.05

●BRI2995와 BRI6112의 더 높은 농도(50 $\mu\text{g}/\text{cam}$)를 평가하였다: BRI2995는 50% 태내 사망률을 일으킨다. 생존한 달걀은 혈관 밀도가 73% 억제되었음을 보여준다. 이 농도에서는 BRI6112에 대해 어떠한 독성도 발견되지 않았다. 그러나, 혈관 밀도가 단지 소량 억제(-16%)되었음이 관찰되었다.

임상학적 시도로서 두개의 화합물, 즉 TNP-470(50 $\mu\text{g}/\text{cam}$) 및 펜토산 폴리설페이트(PPS)(50 μg)을 참고 화합물로서 실험하였다. 그것들은 혈관 밀도를 각각 21% ± 16 및 42% ± 28 씩 감소시켰다. 그러나, PPS는 이 농도에서 80%의 태내 사망률을 보였다.

II. 래트 대동맥 분석

BRI2995, BRI2996 및 BRI2999는 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 미세혈관 형성을 (거의)완전히 억제하였다.

BRI6196은 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 거의 완전히 억제하였으며 또한 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서도 억제하였다.

BRI2923 및 BRI6039는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 미세혈관 성장을 감소시켰다.

참고문헌 :

1. Folkman J. (1985) J. Biol. Chem. 267:10931–10934.
2. Harris-Hooker S.A 등(1983) J. Cell. Physiol. 114:302–310.
3. Hasegawa A. 등(1986) J. Carbohydrate Chemistry. 5(1):11–19.
4. Maragoudakis M.E. 등(1988) Tissue Cell. 26:531–539.
5. Nicosia R.F. 및 Ottinetti A. (1990) Cell Dev. Bio. 26:119–128.
6. Sabesan S. (1994) Bio-Organic 및 Medicinal Chemistry Letters. 4(20):2457–2460.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

다수개의 말단기를 가지는 덴드리머 화합물을 포함하는 인간 또는 인간을 제외한 동물에서의 혈관 형성을 치료적 또는 예방적으로 억제하는 약제로서, 상기 말단기 중 하나 이상은 이에 결합 또는 연결되어 있는 음이온 또는 양이온 함유 부분을 가지는 것인 약제.

청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

삭제

청구항 5.

삭제

청구항 6.

삭제

청구항 7.

삭제

청구항 8.

삭제

청구항 9.

제1항에 있어서, 상기 화합물은 두개 이상의 수상 분지쇄에 공유 결합된 다가 코어를 포함하며, 2회 이상의 생성 반응을 통해 확장되는 텐드리머인 것인 약제.

청구항 10.

제9항에 있어서, 상기 텐드리머는 암모니아 코어를 기본으로 하는 폴리아미도아민 텐드리머인 것인 약제.

청구항 11.

제9항에 있어서, 상기 텐드리머는 에틸렌 디아민 코어를 기본으로 하는 폴리아미도아민 텐드리머인 것인 약제.

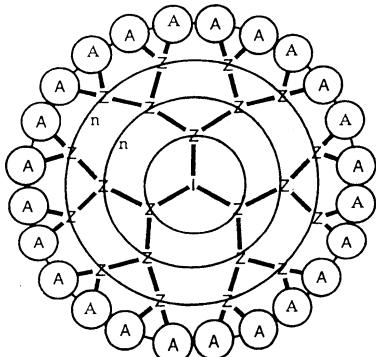
청구항 12.

제9항에 있어서, 상기 텐드리머는 벤즈히드릴아민 또는 기타의 적당한 코어를 기본으로 하는 폴리리신 텐드리머인 것인 약제.

청구항 13.

제9항에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 II의 다이온성 텐드리머인 것인 약제:

화학식 II



상기 식 중,

I는 개시체 코어이고,

Z은 내부 분지 유닛이며,

n은 텐드리머 발생 수를 나타내는 정수이고,

A는 임의의 연결기 X를 통해 내부 분지 유닛 Z에 연결될 수 있는 음이온 함유 부분이다.

청구항 14.

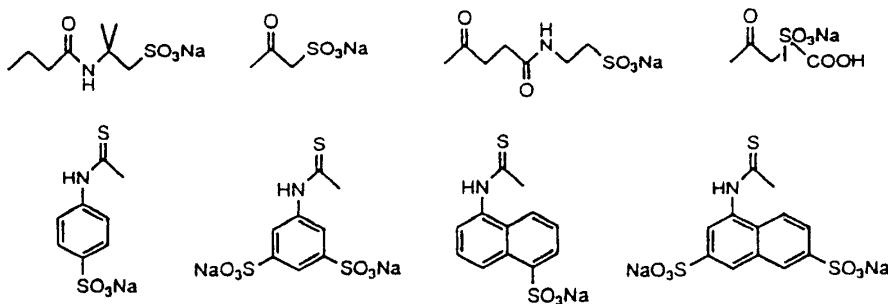
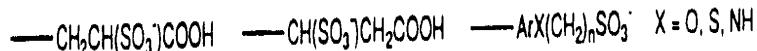
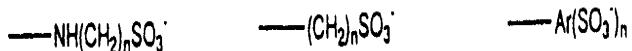
제1항, 제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물 내의 상기 음이온 또는 양이온 함유 부분 또는 부분들은 아미드 또는 티오우레아 연결기에 의해 덴드리머의 아민, 설프히드릴, 히드록시 또는 기타 반응성 말단 작용기에 결합되는 것인 약제.

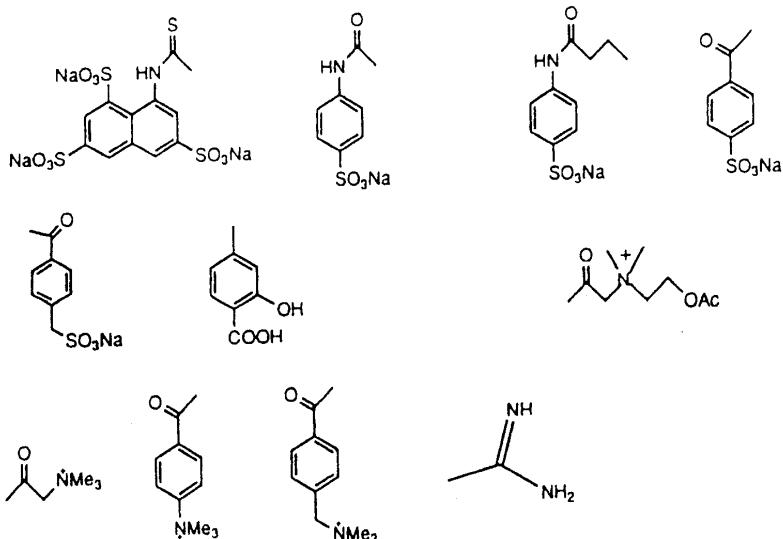
청구항 15.

제1항, 제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물 내의 상기 음이온 함유 부분들은 셀론산 함유 부분, 카르복실산 함유 부분(누라민산 및 시알산 함유 부분, 변성된 누라민산 및 시알산 함유 부분을 포함함), 봉소산 함유 부분 및 인산 및 포스폰산 함유 부분(에스테르화된 인산 및 포스폰산 함유 부분을 포함함)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 약제.

청구항 16.

제1항, 제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물 내의, 덴드리머의 아미노 또는 기타의 반응성 말단 작용기에 결합된 부분 또는 부분들은 이하의 군 중에서 선택되며, 이 때 n은 0 또는 양의 정수인 것인 약제 :





-ArXP(=O)(OR)₂ X = O, CH₂, CHF, CF₂ R = 알킬, 아릴, H, Na

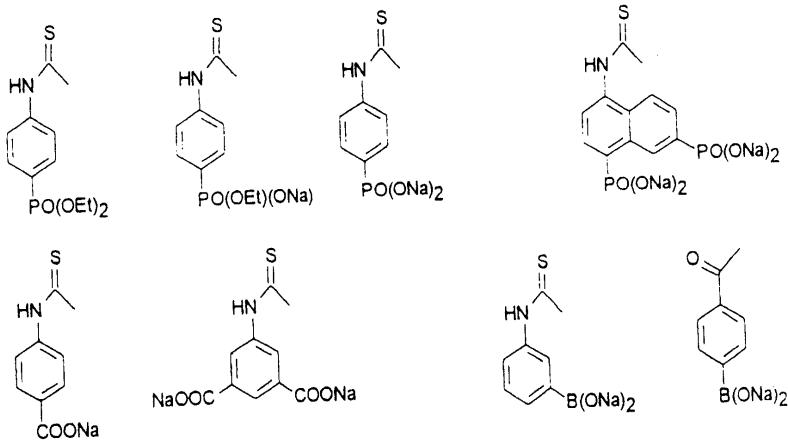
-ArXP(=O)(OR¹)(NR²R³) X = O, CH₂, CHF, CF₂ R¹ = 알킬, 아릴, H, Na

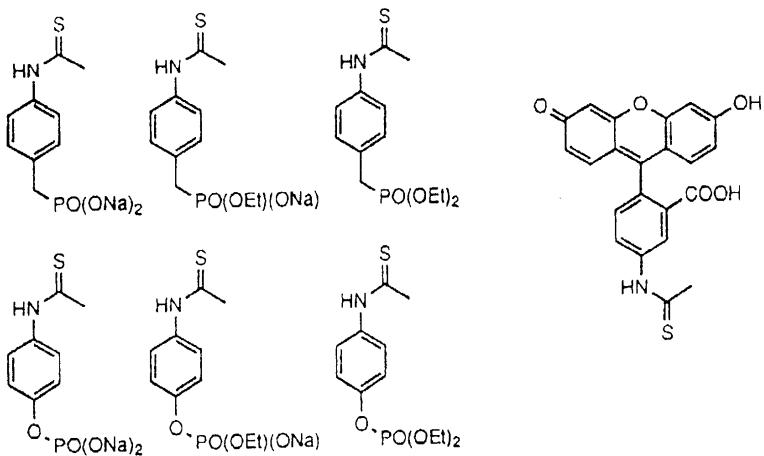
R², R³ = 알킬, 아릴

-Ar[P(=O)(OR)₂]_n R = 알킬, 아릴, H, Na n = 1 ~ 3

-Ar[B(OH)₂]_n n = 1 ~ 3

-Ar[COOH]_n n = 1 ~ 3



**청구항 17.**

[삭제]

청구항 18.

제1항 또는 제9항에 있어서, 상기 화합물은 하기 i 내지 xxxviii로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 약제:

- i. 알킬설폰산 말단화된 텐드리머;
- ii. 설포아세트아미드 말단화된 텐드리머;
- iii. 설포숙시남산 말단화된 텐드리머;
- iv. N-(2-설포에틸) 숙신아미드 말단화된 텐드리머;
- v. 4-설포페닐티오우레아 말단화된 텐드리머;
- vi. 3,6-디-설포나프틸티오우레아 말단화된 텐드리머;
- vii. 4-설포나프틸티오우레아 말단화된 텐드리머;
- viii. 3,5-디-설포페닐티오우레아 말단화된 텐드리머;
- ix. 3,6,8-트리-설포나프틸티오우레아 말단화된 텐드리머;
- x. 4-(설포메틸)벤즈아미드 말단화된 텐드리머;
- xi. 4-설포벤즈아미드 말단화된 텐드리머;
- xii. N-(4-설포페닐)프로판아미드 말단화된 텐드리머;
- xiii. 4-설포페닐우레아 말단화된 텐드리머;
- xiv. N,N,N-트리-메틸글리신아미드 말단화된 텐드리머;
- xv. 4-트리메틸암모늄 벤즈아미드 말단화된 텐드리머;

- xvi. 4-(트리메틸암모늄메틸)벤즈아미드 말단화된 텐드리머;
- xvii. N-(2-아세톡시에틸)-N,N-(디메틸암모늄)메틸카르복스아미드 말단화된 텐드리머;
- xviii. 구아니디노 말단화된 텐드리머;
- xix. 4-([1,4,8,11-테트라아자시클로테트라데칸]메틸)벤즈아미드 말단화된 텐드리머;
- xx. 4-카르복시-3-히드록시-벤질아민 말단화된 텐드리머;
- xxi. 4-카르복시페닐아미드 말단화된 텐드리머;
- xxii. 3,5-디카르복시페닐아미드 말단화된 텐드리머;
- xxiii. 4-포스포노옥시페닐티오우레아 말단화된 텐드리머;
- xxiv. 4-(포스포노메틸)페닐티오우레아 말단화된 텐드리머;
- xxv. 에틸-4-(포스포노메틸)페닐티오우레아 말단화된 텐드리머;
- xxvi. (8-옥탄아미도)-5-아세트아미도-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드산 말단화된 텐드리머;
- xxvii. (11-운데칸아미도)-5-아세트아미도-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드산 말단화된 텐드리머;
- xxviii. (아세트아미도)-5-아세트아미도-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드산 말단화된 텐드리머;
- xxix. (4-부탄아미도)-5-아세트아미도-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드산 말단화된 텐드리머;
- xxx. (4-메틸벤즈아미도)-5-아세트아미도-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드산 말단화된 텐드리머;
- xxxi. (8-옥탄아미도)-4-아지도-5-아세트아미도-3,4,5-트리데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드산 말단화된 텐드리머;
- xxxii. (8-옥탄아미도)-4-아미노-5-아세트아미도-3,4,5-트리데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드산 말단화된 텐드리머;
- xxxiii. 4-벤즈아미도봉소산 말단화된 텐드리머;
- xxxiv. 3,5-디카르복시페닐티오우레아 말단화된 텐드리머;
- xxxv. 4-포스포노페닐티오우레아 말단화된 텐드리머;
- xxxvi. 4,6-디포스포노페닐티오우레아 말단화된 텐드리머;
- xxxvii. 플루오로세인티오우레아 말단화된 텐드리머; 및
- xxxviii. (페닐-3-봉소산)-티오우레아 말단화된 텐드리머.

청구항 19.

제1항, 제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료는 환자의 혈관 형성의 억제, 새로운 혈관 성장을 수반하는 만성 염증, 당뇨병 망막증, 건선 및 류마티스양 관절염 및 기타 증상의 치료, 혈관의 평활근 세포 증식을 억제하여 재발협착증의 방지, 세포외 매트릭스에 저장되는 활성 성장 인자의 방출을 활성화시켜 상처 유합의 가속화, 및 혈관 형성을 억제하여 종양 세포 전이의 억제를 포함하는 것인 약제.

청구항 20.

제1항, 제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에서 정의한 음이온 또는 양이온 텐드리머와 1 종 이상의 약학적으로 허용 가능한 또는 수의학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제를 포함하는, 인간 또는 인간을 제외한 동물에서의 혈관 형성을 억제하는 예방학적 또는 치료학적 약학 조성물 또는 수의학 조성물.

청구항 21.

삭제

청구항 22.

다수개의 말단기를 가지는 텐드리머를 포함하는 화합물로서, 상기 말단기 중 하나 이상은 이에 결합 또는 연결되어 있는 음이온 함유 부분을 가지며, 상기 음이온 함유 부분은 하기 i 내지 iv로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 화합물:

- i. 2-티오시알산 부분을 제외한 누라민산 및 시알산 함유 부분;
- ii. 변성된 누라민산 및 시알산 함유 부분;
- iii. 봉소산 함유 부분; 및
- iv. 에스테르화된 인산 및 포스폰산 함유 부분을 포함하는 인산 및 포스폰산 함유 부분.

청구항 23.

제22항에 있어서, 상기 텐드리머는 두개 이상의 수상 분지에 공유 결합된 다가 코어를 포함하며, 2회 이상의 생성 반응을 통해 확장되는 것인 화합물.

청구항 24.

제22항 또는 제23항에 있어서, 상기 텐드리머는 암모니아 코어를 기본으로 하는 폴리아미도아민 텐드리머인 것인 화합물.

청구항 25.

제22항 또는 제23항에 있어서, 상기 텐드리머는 에틸렌 디아민 코어를 기본으로 하는 폴리아미도아민 텐드리머인 것인 화합물.

청구항 26.

제22항 또는 제23항에 있어서, 상기 텐드리머는 벤즈히드릴아민 또는 기타의 적당한 코어를 기본으로 하는 폴리리신 텐드리머인 것인 화합물.

청구항 27.

제22항 또는 제23항에 있어서, 상기 음이온 함유 부분은 아미드 또는 티오우레아 연결에 의해 상기 텐드리머의 말단 아민, 말단 설프히드릴, 말단 히드록시 또는 기타의 반응성 말단 작용기에 결합되는 것인 화합물.

청구항 28.

제22항에 있어서, 하기 i 내지 xiv로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 화합물:

- i. 4-포스포노옥시페닐티오우레아 말단화된 텐드리머;
- ii. 4-(포스포노메틸)페닐티오우레아 말단화된 텐드리머;
- iii. 에틸-4-(포스포노메틸)페닐티오우레아 말단화된 텐드리머;
- iv. (8-옥탄아미도)-5-아세트아미도-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드산 말단화된 텐드리머;
- v. (11-운데칸아미도)-5-아세트아미도-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드산 말단화된 텐드리머;
- vi. (아세트아미도)-5-아세트아미도-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드산 말단화된 텐드리머;
- vii. (4-부탄아미도)-5-아세트아미도-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드산 말단화된 텐드리머;
- xv. (4-메틸벤즈아미도)-5-아세트아미도-3,5-디데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드산 말단화된 텐드리머;
- ix. (8-옥탄아미도)-4-아지도-5-아세트아미도-3,4,5-트리데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드산 말단화된 텐드리머;
- x. (8-옥탄아미도)-4-아미노-5-아세트아미도-3,4,5-트리데옥시-2-티오-D-글리세로- α -D-갈락토-2-노눌로피라노시드산 말단화된 텐드리머;
- xii. 4-벤즈아미도봉소산 말단화된 텐드리머;
- xiii. 4,6-디포스포노나프틸티오우레아 말단화된 텐드리머; 및
- xiv. (페닐-3-봉소산)-티오우레아 말단화된 텐드리머.