



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0085380
(43) 공개일자 2020년07월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08B 37/08 (2006.01) A61K 41/00 (2020.01)
A61K 47/61 (2017.01) A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C08B 37/003 (2013.01)
A61K 41/0057 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7019532(분할)
(22) 출원일자(국제) 2013년05월14일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2014-7035218
원출원일자(국제) 2013년05월14일
심사청구일자 2018년05월14일
(85) 번역문제출일자 2020년07월06일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2013/059968
(87) 국제공개번호 WO 2013/189663
국제공개일자 2013년12월27일
(30) 우선권주장
1208548.6 2012년05월15일 영국(GB)

(71) 출원인
피씨아이 바이오테크 에이에스
노르웨이, 0379 오슬로, 울런차우세엔 64
(72) 발명자
버그, 크리스티안
노르웨이, 엔-1389 헤게달, 볼렌베이엔 158 에이
하그세트, 앤덜스
노르웨이, 엔-0681 오슬로, 로그너루드베이엔 55
(74) 대리인
특허법인이룸리온

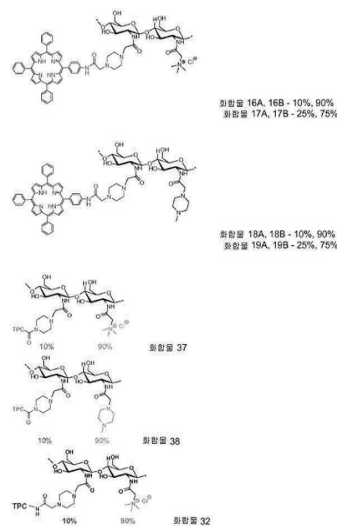
전체 청구항 수 : 총 40 항

(54) 발명의 명칭 광감제 및 키토산의 컨쥬게이트, 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 광감제에 결합된 생체적합성 고분자 키토산의 유도체를 포함하는 신규한 키토산-계 컨쥬게이트, 예를 들어 나노전달체, 및 광화학 내재화(photochemical internalisation, PCI) 및 광역학요법(photodynamic therapy, PDT)에서 이의 용도에 관한 것이다. 또한 본 발명은 예방접종을 위해 질환, 특히 암의 예방 또는 치료에서 본 발명의 신규한 컨쥬게이트의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 47/61 (2017.08)

A61P 35/00 (2018.01)

(72) 발명자

마손, 마르

아이슬란드, 아이에스-101 레이카비크, 프졸니스베
기 1

가와레, 비베크 에스.

아이슬란드, 아이에스-101 레이카비크, 에거즈고투
2

명세서

청구범위

청구항 1

광감제 및 키토산의 컨쥬게이트를 포함하는 화합물로서, 상기 화합물은 화학식 (I)의 화합물:



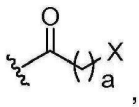
여기서,

n은 3 이상의 정수이고,

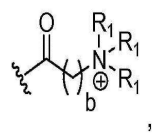
R은 상기 화합물에서 n번 나타나서 Rn 기를 제공하고,

0.5% - 99.5%의 상기 총 Rn 기에서, 각 R은 하기로부터 선택된 그룹 A이고:

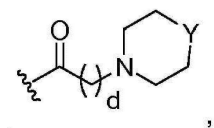
H,



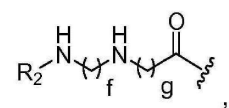
여기서, a는 1, 2, 3, 4 또는 5이며; X는 Br, Cl 또는 OH 이다;



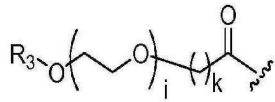
여기서, 각 R1은 같거나 다를 수 있으며, H, CH3 및 -(CH2)c-CH3로부터 선택되고; b는 1, 2, 3, 4 또는 5이며; c는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이다;



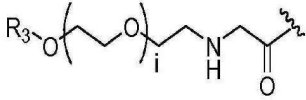
여기서, Y는 O; S; SO2; -NCH3; 또는 -N(CH2)eCH3 이고; d=1, 2, 3, 4 또는 5; 및 e=1, 2, 3, 4 또는 5;



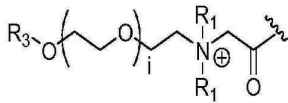
여기서, R2는 -(CH2)h-CH3 또는 -CO-(CH2)h-CH3 이고; f는 1, 2, 3, 4 또는 5이며; g는 1, 2, 3, 4 또는 5이고; h는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이다;



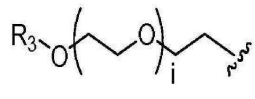
여기서, R_3 는 $-(CH_2)_j-CH_3$ 이고, i 는 1 내지 200의 정수이며; j 는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고; k 는 1, 2, 3, 4 또는 5이다;



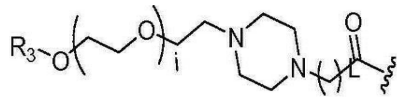
여기서, R_3 는 $-(CH_2)_j-CH_3$ 이고, i 는 1 내지 200의 정수이며; j 는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이다;



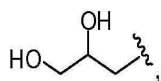
여기서, R_3 는 $-(CH_2)_j-CH_3$ 이고, i 는 1 내지 200의 정수이며; j 는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고; 각 R_1 은 같거나 다를 수 있으며, H, CH_3 및 $-(CH_2)_c-CH_3$ 로부터 선택되고; c 는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이다;



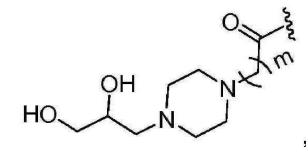
여기서, R_3 는 $-(CH_2)_j-CH_3$ 이고, i 는 1 내지 200의 정수이며; j 는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이다;



여기서, R_3 는 $-(CH_2)_j-CH_3$ 이고, i 는 1 내지 200의 정수이며; L 은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이고; j 는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이다;



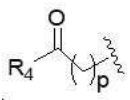
및



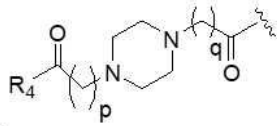
여기서, m 은 1, 2, 3, 4 또는 5이다;

여기서, 각 R 기는 같거나 다를 수 있다; 및

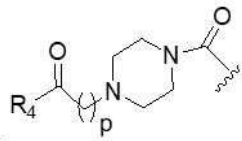
0.5% - 99.5%의 상기 총 R_n 기에서, 각 R은 하기로부터 선택된 그룹 B이다:



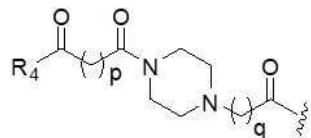
, 여기서, p 는 1, 2, 3, 4 또는 5이고,



, 여기서, p는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고,

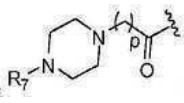


, 여기서, p는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고,



, 여기서, p는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고,

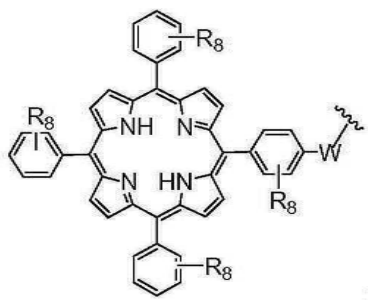
및



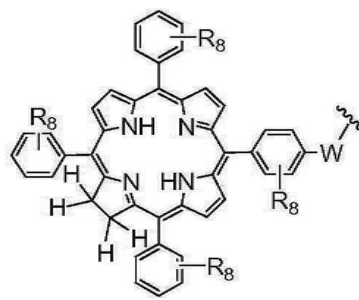
, 여기서, p는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고,

여기서, q는 1, 2, 3, 4 또는 5이며;

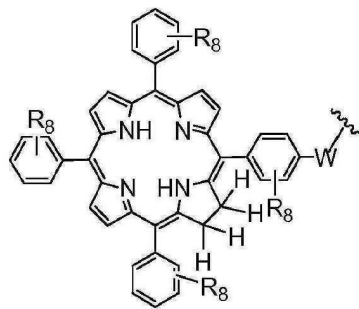
R_4 는 하기로부터 선택된 기이며:



;



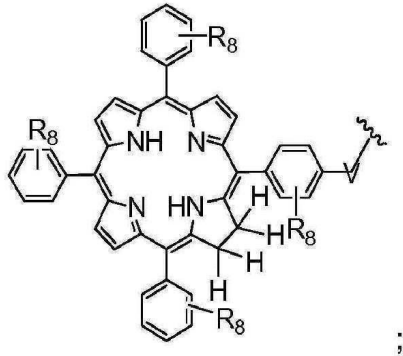
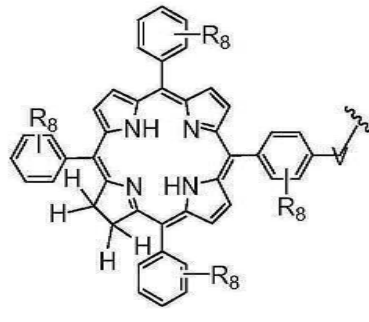
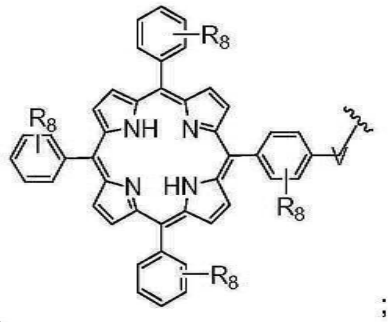
및



;

W 는 O, S, NH 또는 $N(CH_3)$ 로부터 선택된 기이고;

R_7 은 하기로부터 선택된 기이고:



V는 CO, SO₂, PO, PO₂H 또는 CH₂로부터 선택된 기이며;

R₈은 같거나 다를 수 있으며, H, -OH, -OCH₃, -CH₃, -COCH₃, C(CH₃)₄, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂ 및 -NCOCH₃로부터 선택된 (o, m 또는 p 위치에서 치환된) 기이고;

여기서, 각 R 기는 같거나 다를 수 있다.

청구항 2

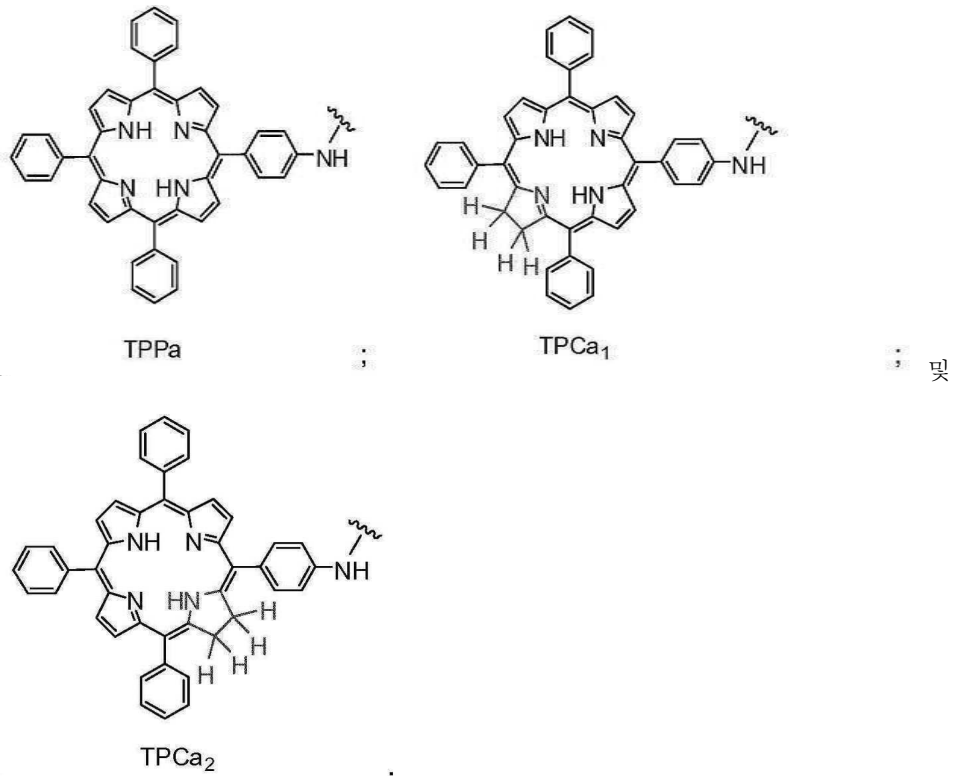
제 1항에 있어서, 상기 i 가 1 내지 10의 정수인 화합물.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 n은 10 내지 100의 정수인 화합물.

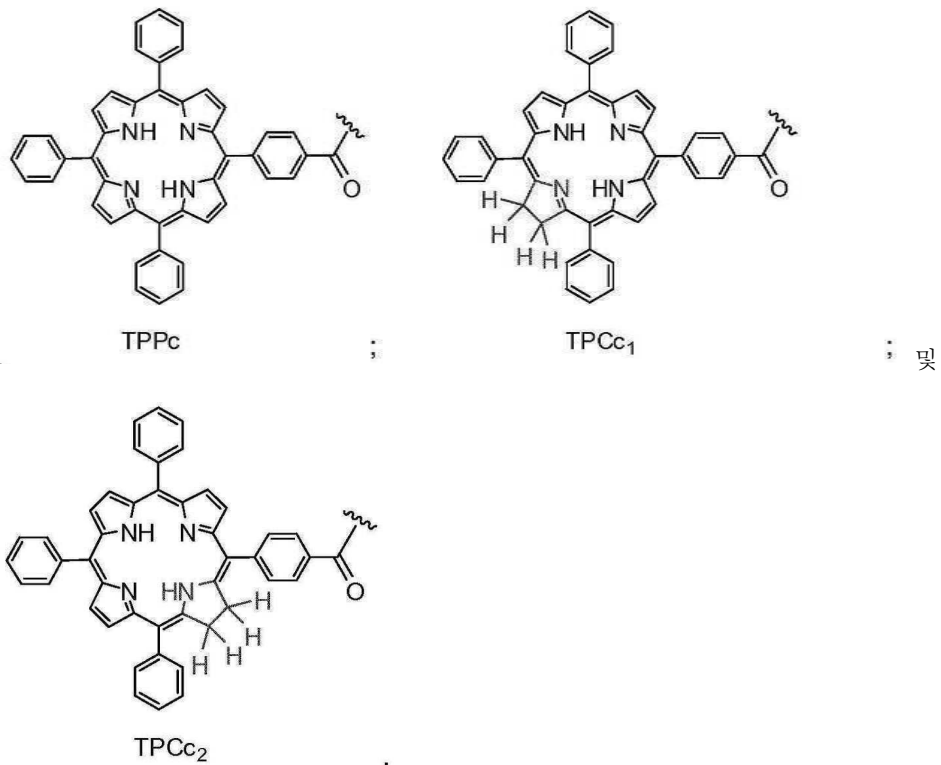
청구항 4

제 1항 또는 제 2항에 있어서, R₄는 하기로부터 선택된 화합물:



청구항 5

제 1항 또는 제 2항에 있어서, R₇은 하기로부터 선택된 화합물:



청구항 6

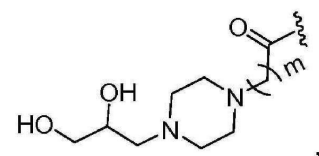
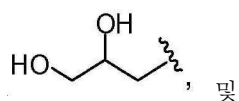
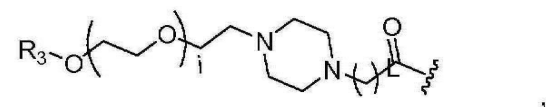
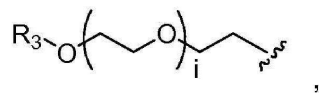
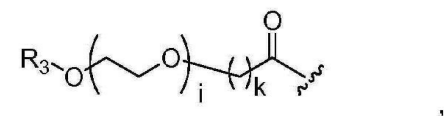
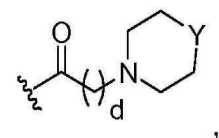
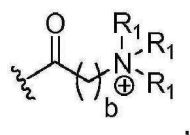
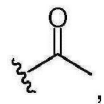
제 4항에 있어서, R₄는 TPC_{a1} 또는 TPC_{a2}인 화합물.

청구항 7

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 그룹 A는 70 내지 95%의 총 Rn 기를 제공하고, 그룹 B는 5 내지 30%의 총 Rn 기를 제공하는 화합물.

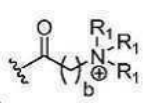
청구항 8

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 각 그룹 A R 기는 하기로부터 선택되는 화합물:

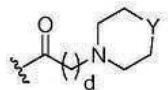


여기서, 각 R 기는 같거나 다를 수 있다.

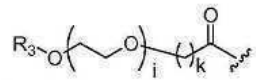
청구항 9

제 8항에 있어서, 그룹 A가  인 경우, 각 R1은 CH3이고, b는 1인 화합물.

청구항 10

제 8항에 있어서, 그룹 A가  인 경우, Y는 -NCH₃이고, d는 1인 화합물.

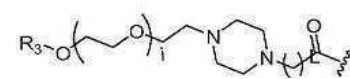
청구항 11

제 8항에 있어서, 그룹 A가  인 경우, j는 0 또는 1이고, i는 3 또는 6이며, k는 1인 화합물.

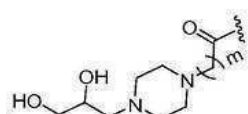
청구항 12

제 8항에 있어서, 그룹 A가  인 경우, j는 1이고, i는 2인 화합물.

청구항 13

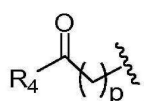
제 8항에 있어서, 그룹 A가  인 경우, j는 0 또는 1이고, i는 2, 4 또는 5이며, L은 1인 화합물.

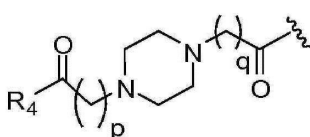
청구항 14

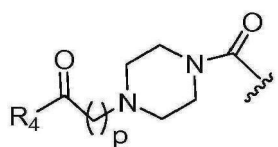
제 8항에 있어서, 그룹 A가  인 경우, m은 1인 화합물.

청구항 15

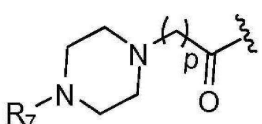
제 1항 또는 제 2항에 있어서, 각 그룹 B R 기는 하기로부터 선택되는 화합물:

, 여기서, p는 1, 2, 3, 4 또는 5이고,

, 여기서, p는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고,

, 여기서, p는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고,

및

, 여기서, p는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고,

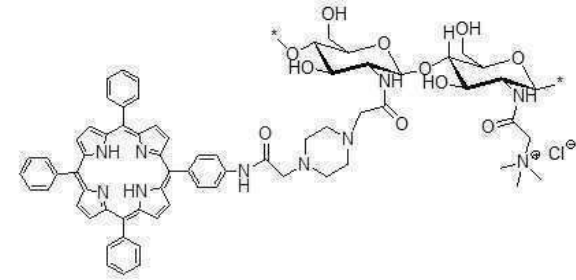
여기서, q는 1, 2, 3, 4 또는 5이며,
여기서, 각 R 기는 같거나 다를 수 있다.

청구항 16

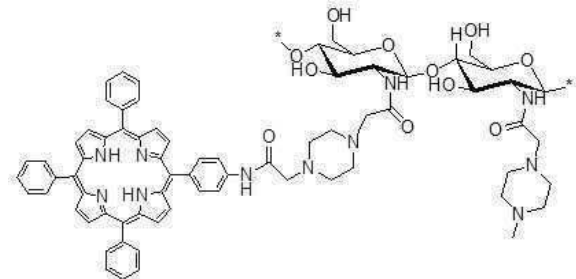
제 15항에 있어서, p가 1이고, 존재하는 경우 q가 1 인 화합물.

청구항 17

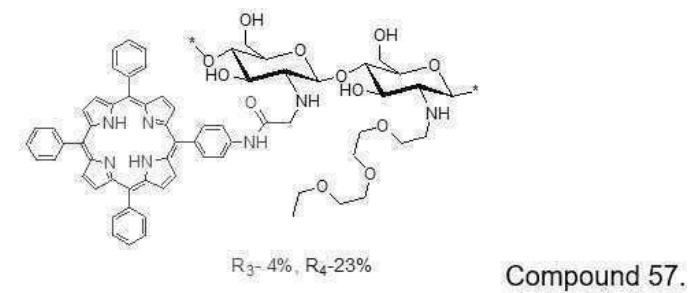
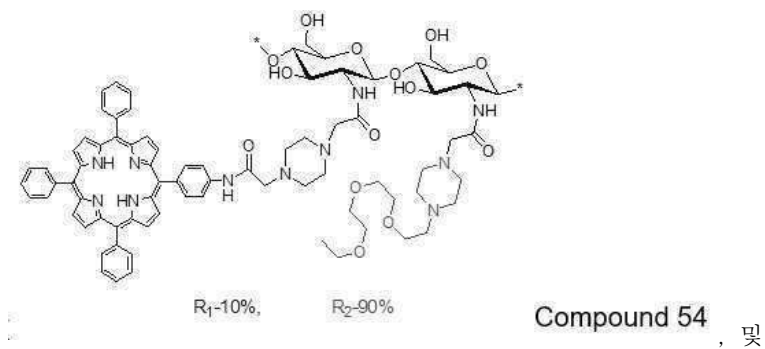
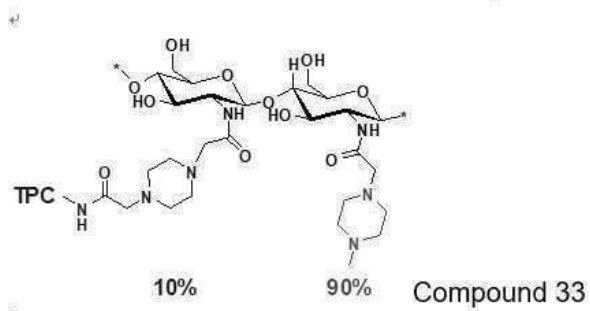
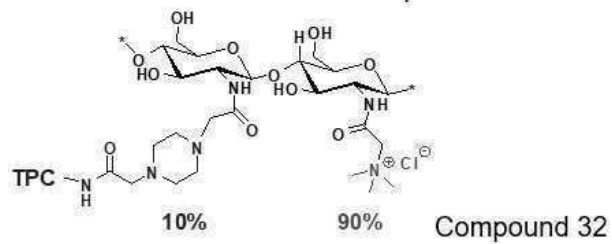
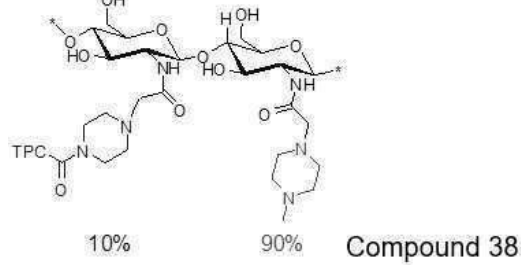
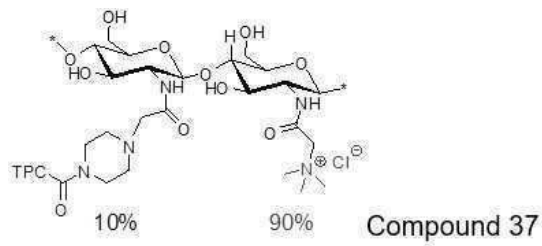
제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 화합물이 하기에 기재된 화합물로부터 선택되는 화합물:



Compound 16A, 16B - 10%, 90%
Compound 17A, 17B - 25%, 75%



Compound 18A, 18B - 10%, 90%
Compound 19A, 19B - 25%, 75%



청구항 18

분자를 세포의 세포질로 도입하기 위한 시험관 내 (*in vitro*) 또는 생체 외 (*ex vivo*) 방법 또는 비-인간 (non-human) 동물에서 분자를 세포의 세포질로 도입하기 위한 생체 내 (*in vivo*) 방법으로서, 상기 세포를 도입될 분

자와 제 1항 또는 제 2항의 화합물과 접촉시키는 단계, 및 화합물의 광감제를 활성화시키는데 효과적인 파장의 빛으로 세포를 조사하여 분자를 세포질로 방출하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 19

세포사를 이루는 시험관 내 또는 생체 외 방법 또는 비-인간 동물에서 세포사를 이루는 생체 내 방법으로서, 상기 세포를 제 1항 또는 제 2항의 화합물과 접촉시키는 단계, 및 상기 세포의 죽음을 일으키는 활성 산소종을 생성하기 위해 화합물의 광감제를 활성화시키는데 효과적인 파장의 빛으로 세포를 조사하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 20

세포의 표면 위에 항원 분자 또는 이의 일부를 발현하는 시험관 내 또는 생체 외 방법 또는 비-인간 동물에서 세포의 표면 위에 항원 분자 또는 이의 일부를 발현하는 생체 내 방법으로서, 상기 세포를 상기 항원 분자 및 제 1항 또는 제 2항의 화합물과 접촉시키는 단계, 및 화합물의 광감제를 활성화시키는데 효과적인 파장의 빛으로 세포를 조사하는 단계를 포함하며, 상기 항원 분자는 세포의 세포질로 방출되고, 면역 반응을 자극하기에 충분한 크기의 항원 분자 또는 이의 일부는 세포의 표면 위에 제시되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 21

제 1항의 화합물 및 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 희석제, 담체 또는 부형제, 및 임의로 내재화되는 분자를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 22

제 1항에 있어서, 상기 화합물은 치료, 유전자 치료 또는 면역 반응을 자극하기 위한 것임을 특징으로 하는, 화합물.

청구항 23

제 22 항에 있어서, 상기 치료가 암 치료인, 화합물.

청구항 24

제 1항에 있어서, 피험자에게서 질환, 장애 또는 감염의 치료 또는 예방용으로 사용하기 위해 분자가 임의로 내재화되는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 25

제 24항에 있어서, 상기 질환, 장애 또는 감염에서 비정상 또는 과도한 세포 성장이 명백하거나 비정상적으로 상승 또는 억제된 유전자 발현이 명백한 것인, 화합물.

청구항 26

제 25항에 있어서, 상기 질환이 암인, 화합물.

청구항 27

제 24항에 있어서, 상기 치료 또는 예방은 피험자의 세포를 내재화되는 분자 및 상기 화합물과 접촉시키는 단계, 및 화합물의 광감제를 활성화시키는데 효과적인 파장의 빛으로 세포를 조사하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 화합물.

청구항 28

제 27항에 있어서, 상기 내재화되는 분자는 세포독성 분자인 것을 특징으로 하는, 화합물.

청구항 29

제 28항에 있어서, 상기 세포 독성 분자가 블레오마신인 것을 특징으로 하는, 화합물.

청구항 30

제 24항에 있어서, 상기 예방 또는 치료는 피험자의 세포를 상기 화합물과 접촉시키는 단계, 및 상기 세포의 죽음을 일으키는 활성 산소종을 생성하기 위해 화합물의 광감제를 활성화시키는데 효과적인 파장의 빛으로 세포를 조사하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 화합물.

청구항 31

제 1항에 있어서, 상기 화합물은 면역 반응을 발생시킴으로써 피험자에게서 질환, 장애 또는 감염을 치료 또는 예방하기 위해 사용되는 것인, 화합물.

청구항 32

제 31항에 있어서, 상기 치료 또는 예방이 예방접종에 의해 달성되는 것인, 화합물.

청구항 33

제 31항에 있어서, 상기 치료 또는 예방은 피험자의 세포를 상기 화합물 및 항원 분자와 접촉시키는 단계, 및 화합물의 광감제를 활성화시키는데 효과적인 파장의 빛으로 세포를 조사하는 단계를 포함하며, 상기 항원 분자는 세포의 세포질로 방출되고, 면역 반응을 자극하기에 충분한 크기의 항원 분자 또는 이의 일부가 세포의 표면 위에 제시되는 것을 특징으로 하는, 화합물.

청구항 34

제 18항의 방법으로 얻어질 수 있는, 세포 또는 세포 집단.

청구항 35

제 34항에 있어서, 치료용으로 사용하기 위한, 세포 또는 세포 집단.

청구항 36

제 35항에 있어서, 암 치료, 유전자 치료 또는 면역 반응 자극을 위해 사용하기 위한, 세포 또는 세포 집단.

청구항 37

제 1항 또는 제 21항의 화합물 또는 조성물, 및 내재화된 분자를 포함하는 키트.

청구항 38

제 37항에 있어서, 피험자의 질환, 장애 또는 감염의 예방 또는 치료를 위해 동시, 별도 또는 순차적으로 사용하기 위한 것인, 키트

청구항 39

제 37항에 있어서, 치료용으로 사용하기 위한 것인, 키트.

청구항 40

제 39항에 있어서, 상기 치료는 암 치료, 유전자 치료 또는 면역 반응 자극을 위한 치료인 것인, 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 광감제에 결합된 생체적합성 고분자 키토산의 유도체를 포함하는 신규한 키토산-계 컨쥬게이트, 예를 들어 나노전달체(nanocarriers), 및 광화학 내재화(photochemical internalisation, PCI) 및 광역학요법(photodynamic therapy, PDT)에서 이의 용도에 관한 것이다. 또한 본 발명은 예방접종을 위해 질환, 특히 암의 예방 또는 치료에서 본 발명의 신규한 컨쥬게이트의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 나노물질은 동일한 조성의 벌크물질에 비해 작은 크기, 큰 표면적 대 질량비 및 높은 활성을 포함하는 특수한 물리화학적 특성을 가진다. 이러한 고유 특성은 전통 의학에서 확인된 일부 한계를 개선하고 극복할 수 있다. 나노물질의 적용은 용해도, 확산도, 혈액 순환 반감기, 약물 방출 특성 및 면역원성과 같은 특성을 변형하려는 기회를 제공한다. 지난 20년 동안, 치료 및 진단 적용을 위한 많은 나노입자-계 물질이 질환의 치료를 위해 개발되었다.
- [0003] 나노물질의 사용은 더 효과적이고 더 편리한 투여 경로, 낮은 독성, 최소화된 부작용, 증가된 생체이용률 및 시스템에서 생성물의 확장된 수명-주기를 제공할 수 있다. 약물-전달 시스템으로서, 나노입자 또는 나노전달체는 표적 전달 및 제어 방출을 제공할 수 있다. 또한, 이들은 진단을 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 이들은 기존의 전통 방법에 의해 검출될 수 없는 전암성 세포, 바이러스 단편 및 질환 마커를 검출할 수 있다.
- [0004] 현재, 리포솜과 함께 천연- 및 합성 고분자는 문헌에서 만나는 주요 나노입자 플랫폼이다 (Peer et al., 2007, Natl., 2(12), p751-760). 기타 일반적인 플랫폼은 덴드리머, 오일 나노에멀전, 메조기공(mesoporous) 실리카 나노입자 및 산화철 나노입자를 포함한다.
- [0005] 나노전달체일 수 있는 본 발명의 신규한 컨쥬게이트는, 키틴으로부터 유래된 생체적합성 고분자 키토산의 유도체를 포함한다. 키틴 (폴리 (β -(1 $\rightarrow$ 4)-N-아세틸-D-글루코사민))은 자연적으로 발생하는 다당류 및 곤충과 갑각류의 지지 물질이다. 키틴은 셀룰로오스 다음으로 지구상에서 두 번째로 풍부한 천연 다당류이다. 이것은 일반적으로 게 및 새우 세포와 같은 공급원으로부터 유래된다. 구조적으로, 키틴은 셀룰로오스와 유사하나 고분자 백본의 C2 위치에 있는 히드록실 기 대신에 아세트아미드 기를 가진다.
- [0006] 키토산은 알칼리 방법에 의해 아세틸 기를 제거함으로써 통상적으로 생성된 가장 중요한 키틴 유도체이다. 대부분의 자연적으로 발생하는 고분자는 사실상 중성 또는 산성인 반면, 키토산은 고도의 염기성 다당류이다. C2 위치에서 질소 원자는 어떤 바람직한 특성, 예를 들어 증가된 용해도 및 개선된 생물학적 특성 쪽으로 분자를 맞추려는 합성 방식에 의해 고분자를 변형하려는 기회를 제공한다.
- [0007] 키토산 고분자는 다양한 탈아세틸화도(degrees of deacetylation, DD)를 가진 β -(1 $\rightarrow$ 4) 연결된 D-글루코사민 단위로 이루어지며, 남아있는 아세틸 기는 선형 고분자 사슬을 통해 무작위로 블록에 분포된다. 키토산은 산성 조건에서 아미노 기의 양전하로 인해 아세트산과 같은 약산에서 가용성이다. 비록 DD가 매우 가변적일 지라도, 이것은 거의 100%는 아니다. DD에 관하여 키틴 대 키토산의 독특한 명명법은 정의되지 않았으나 키토산에 대한 DD는 40-100%로 다양할 수 있다. 분자량은 2000kDa 까지일 수 있으나, 50kDa 이하의 것들은 때때로 올리고키토산으로서 간주된다.
- [0008] 의약품에서 이들의 적용 가능성에 대하여 지난 10년 동안 키틴과 키토산에 대한 관심이 집중되었다. 다양한 키토산 유도체는 용해도를 향상시키고 이의 물리적, 화학적, 및 생물학적 특성을 더 개선시키기 위하여 제조되고 합성되었다.
- [0009] 본 발명의 컨쥬게이트는 키토산 유도체 이외에도 키토산에 결합된 광감제를 포함한다. 따라서, 컨쥬게이트는 광감작(photosensitisation)과 관련된 방법에서 특히 유용하다.
- [0010] 광감작은 흡수된 빛의 에너지를 전달하는 과정이다. 흡수 후, 에너지는 (선택된) 반응물에 전달된다. 광감제는 빛 에너지를 제 II 형 화학 반응으로 전달할 수 있는 화합물이다. 이러한 과정의 고도로 반응적인 최종 생성물은 세포(cyto-) 및 혈관 독성(vascular toxicity)을 야기한다.
- [0011] 광감제는 직접 또는 간접적으로 다양한 메커니즘에 의해 이들의 효과에 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 어떤 광감제는 빛에 의해 활성화되었을 때 직접 독성이 되는 반면, 다른 것들은 독성 종, 예를 들어 단일항 산소(singlet oxygen)와 같은 산화제 또는 세포 물질 및 지질, 단백질 및 핵산과 같은 생체분자에 대해 매우 파괴적인 기타 산소-유래 자유 라디칼을 발생시키도록 작용한다.
- [0012] 포피린, 프탈로시아닌, 푸푸린(purpurins), 클로린, 벤조포피린, 리소솜 친화성 약염기(lysomotropic weak bases), 나프탈로시아닌, 양이온성 염료 및 테트라시클린 또는 이의 유도체를 포함하여, 많은 공지된 광감제가 있다 (Berg et al., (1997), J. Photochemistry and Photobiology, 65, 403-409). 기타 광감제는 텍사피린(texaphyrins), 페오포비드(pheophorbides), 포피센(porphycenes), 박테리오크로린(bacteriochlorins), 케토클로린(ketochlorins), 헤마토포피린 유도체 (hematoporphyrin derivatives), 및 5-아미노레볼린산(5-aminolevulinic acid)에 의해 유도된 내인성 광감제를 포함한다. 하기에 논의된 바와 같이, 본 발명의 키토산-

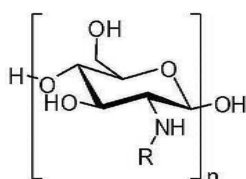
계 분자에는 포피린 및 클로린, 특히 테트라페닐포피린(tetraphenylporphyrin, TPP) 및 테트라페닐클로린(tetraphenylchlorin, TPC)이 사용된다.

- [0013] 포피린은 가장 광범위하게 연구된 광감제이다. 이들의 분자 구조는 메틴(methine) 다리를 통해 서로 연결된 4개의 피롤 고리를 포함한다. 이들은 종종 금속-복합체를 형성할 수 있는 천연 화합물이다. 예를 들어, 산소 운반 단백질 헤모글로빈의 경우, 철 원자는 헴(heme) B의 포피린 코어로 도입된다.
- [0014] 클로린은 코어에 4개의 메틴 결합을 통해 결합된 3개의 피롤 및 1개의 피롤린으로 이루어진 커다란 헤테로고리 방향족 고리(heterocyclic aromatic rings)이다. 따라서, 클로린은 포피린과는 달리, 대부분 방향족이나 고리의 전체가 모두 방향족은 아니다.
- [0015] 광감제는 광역학요법(PDT) 및 광화학 내재화(PCI) 방법에서 사용된다. PDT는 전신적으로 또는 국소적으로 광감제의 투여 다음에 적당한 파장의 빛 조명을 포함하는 2단계 과정이다. 세포독성 효과가 일어나기 위해서는, 산소 분자도 있어야 한다. 이러한 3개의 인자(즉, 광감제, 빛 및 산소)가 성공적으로 조합될 때, 광역학 반응이 발생한다. 광역학 반응은 세포사 및 조직 손상을 일으키는 세포독성 종의 생성을 야기한다.
- [0016] PDT는 암의 치료에 사용된다. 광역학 반응으로부터의 라디칼 중간체는 생물학적 조직에서 산소에 의해 제거되어 단일항 산소($^1O_2$)와 같은 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성한다. $^1O_2$ 는 고도의 세포독성 가능성을 가진 수명이 짧은 형태의 산소이다. 따라서, 전신적 부작용을 크게 피할 경우 고도의 선택적인 세포독성 치료가 이루어질 수 있다.
- [0017] PCI는 PDT와 동일한 원리를 근거로 하나, (예를 들어, 낮은 빛 선량(lower light doses)을 이용하여) 보다 적은 ROS를 생산하여 ROS로 인한 상당한 세포사 없이 세포질(cytosol)로 엔도솜으로부터 포획된 약물 및 거대분자의 방출을 유도한다. PCI에서, 여기광(light excitation)은 리소솜 및/또는 엔도솜 막의 선택적으로 ROS 매개된 손상 및 포획된 친수성 약물 및 거대분자의 방출을 야기한다. 이에 따라 세포내 이입된 분자(endocytosed molecules)는 방출되어 리소솜에서 분해되기 전에 이들의 작용 표적에 도달할 수 있다.
- [0018] PCI는 다양한 거대분자 및 제 I 형 리보솜-불활성화 단백질, 면역독소, 블레오마이신(Blenoxane®) 및 독소루비신과 같은 화학요법제, 유전자 인코딩 플라스미드 및 올리고뉴클레오타이드를 포함하여 원형질막을 통해 즉시 침투되지 않는 다른 분자의 생물학적 활성을 향상시키는 것으로 나타내었다. 상응하는 PDT 보다 더 깊은 조직 층에서 세포독성을 유도하는 것으로 확인되었다. 고체 종양에서 우선적으로 축적되는 광감제에 의해 유도된 빛-활성화된 세포질 전달과 함께 표적 치료제의 조합으로 인해, PCI는 매우 특이적일 수 있고, 또한 이는 향상된 항종양 효능에 기여한다.
- [0019] 임상 적용에서 PDT와 관련된 공통 문제 중 하나는 피부 광민감성 및 광감제의 불리한 생체분포이다. 덴드리머, 리포솜 및 고분자 미셀과 같은 나노전달체는 PDT에서 부작용을 감소시키고 약물동태학(pharmacokinetics)을 개선시키는 방법으로서 도입되었다.
- [0020] PCI 및 PDT 방법에서 사용하기 위한 나노전달체 및 광감제를 개선시킬 필요가 있다. 본 발명은 이러한 필요성을 설명한다. 본 발명자들은 광감제 및 키토산의 컨쥬게이트를 기반으로 한 신규한 화합물을 개발하였다. 신규한 분자는 놀랍게도 PCI 방법에서 높은 효능을 가지고 있고, 하기의 실시예에서 예시된 바와 같이, 놀랍게도 *in vitro* 및 *in vivo*에서 모두 우수한 효능을 설명한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0021] 따라서, 첫 번째 측면에서 본 발명은 광감제 및 키토산의 컨쥬게이트를 포함하는 화합물, 예를 들어 나노전달체를 제공하며, 상기 화합물은 화학식 (I)의 화합물이다:



(I)

[0022]

[0023] 여기서,

[0024] n 은 3 이상의 정수이고,

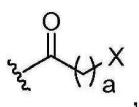
[0025] R 은 상기 화합물에서 n 번 나타나며,

[0026] 0.1% - 99.9%의 상기 총 R_n 기에서, 각 R 은 하기로부터 선택된 그룹 A이고:

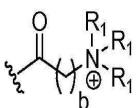
H,



[0027]

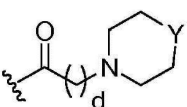


[0028] 여기서, a 는 1, 2, 3, 4 또는 5이며; X 는 Br, Cl 또는 OH 이다;



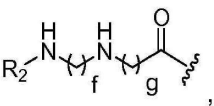
[0029]

[0030] 여기서, 각 R_1 은 같거나 다를 수 있으며, H, CH_3 및 $-(CH_2)_c-CH_3$ 로부터 선택되고; b 는 1, 2, 3, 4 또는 5이며; c 는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이다 (여기서 반대이온은 Cl^- 일 수 있다);



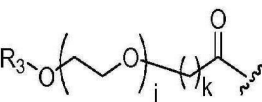
[0031]

[0032] 여기서, Y 는 O; S; SO_2 ; $-NCH_3$; 또는 $-N(CH_2)_eCH_3$ 이고; $d=1, 2, 3, 4$ 또는 5; 및 $e=1, 2, 3, 4$ 또는 5;



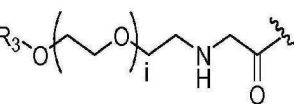
[0033]

[0034] 여기서, R_2 는 $-(CH_2)_h-CH_3$ 또는 $-CO-(CH_2)_h-CH_3$ 이고; f 는 1, 2, 3, 4 또는 5이며; g 는 1, 2, 3, 4 또는 5이고; h 는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이다;



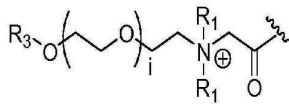
[0035]

[0036] 여기서, R_3 는 $-(CH_2)_j-CH_3$ 이고, i 는 1 내지 200의 정수, 바람직하게는 1-50 또는 1-10, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10, 또는 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 또는 200 이며; j 는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고; k 는 1, 2, 3, 4 또는 5이다;



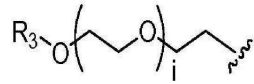
[0037]

[0038] 여기서, R_3 는 $-(CH_2)_j-CH_3$ 이고, i 는 상기 정의된 바와 같은 정수이며; j 는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이다;



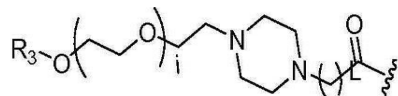
[0039] ,

[0040] 여기서, R_3 는 $-(CH_2)_j-CH_3$ 이고, i 는 상기 정의된 바와 같은 정수이며; j 는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고; 각 R_1 은 같거나 다를 수 있으며, H, CH_3 및 $-(CH_2)_c-CH_3$ 로부터 선택되고; c 는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이다;



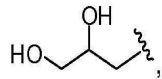
[0041] ,

[0042] 여기서, R_3 는 $-(CH_2)_j-CH_3$ 이고, i 는 상기 정의된 바와 같은 정수이며; j 는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이다;



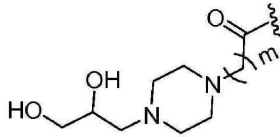
[0043] ,

[0044] 여기서, R_3 는 $-(CH_2)_j-CH_3$ 이고, i 는 상기 정의된 바와 같은 정수이며; L 은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 이고; j 는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이다;



[0045] ,

[0046] 및

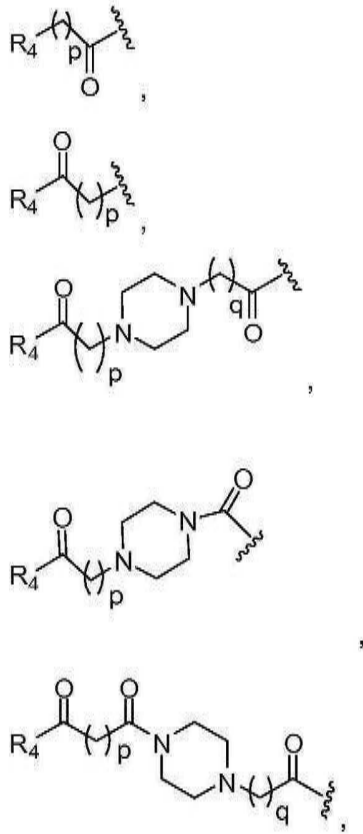


[0047] ,

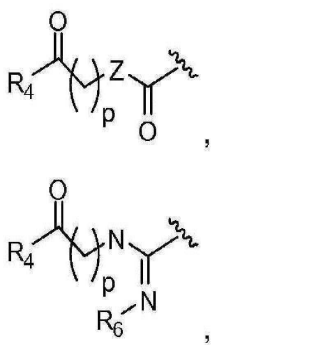
[0048] 여기서, m 은 1, 2, 3, 4 또는 5이다;

[0049] 여기서, 각 R 기는 같거나 다를 수 있다; 및

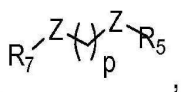
[0051] 0.1% - 99.9%의 상기 총 Rn 기에서, 각 R은 하기로부터 선택된 그룹 B이다:



[0052]



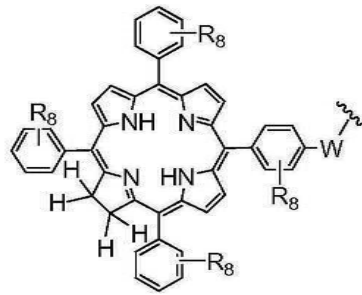
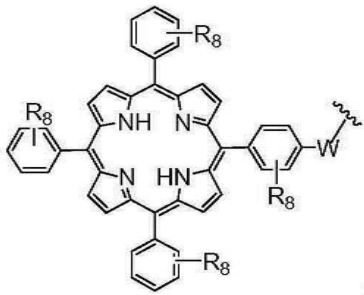
[0053] , 및



[0054]

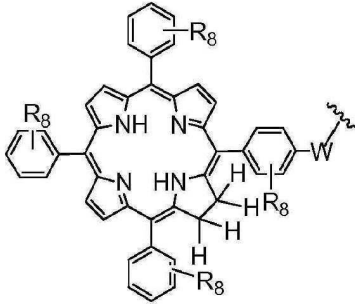
[0055] 여기서, p는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고; q는 1, 2, 3, 4 또는 5이며; r은 1, 2, 3, 4 또는 5이고;

[0056] R_4 는 하기로부터 선택된 기이며:



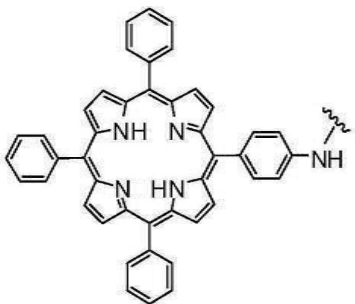
[0057] ;

및

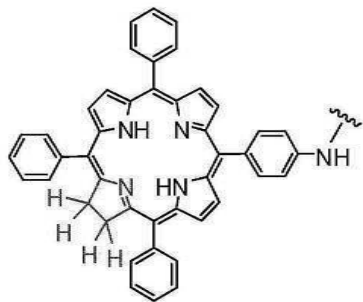


[0058] ;

[0059] (바람직하게는, R_4 는 하기로부터 선택된다:



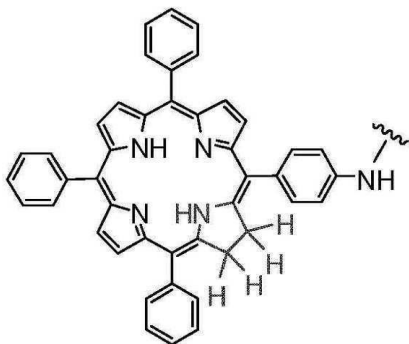
TPPa



TPCa₁

[0060] ;

및



TPCa₂

[0061]);

[0062] W는 O, S, NH 또는 N(CH₃)로부터 선택된 기이고;

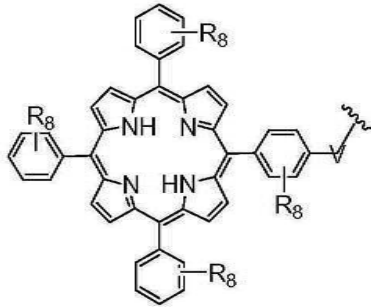
[0063] R_5 는 $-(CH_2)_s-CO-$; $-(CH_2)_s-Z-(CH_2)_t-CO-$ 및 $-(CH_2)_s-Z-(CH_2)_t-Z-CO-$ 로부터 선택된 기이며; 여기서 s는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고; t는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이며;

[0064] Z는 NH, O, S, 또는 SO₂이고;

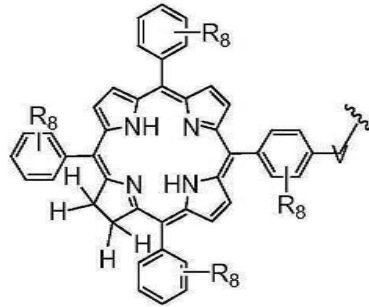
[0065] R_6 는 -CN 및 CH_3 로부터 선택된 기이며;

[0066] R_7 은 하기로부터 선택된 기이고:

[0067]



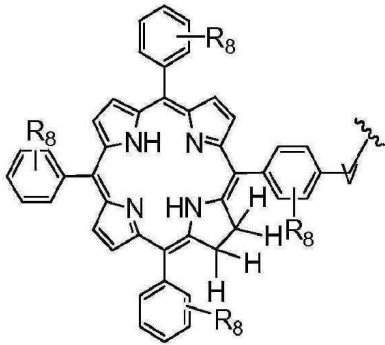
;



;

및

[0068]

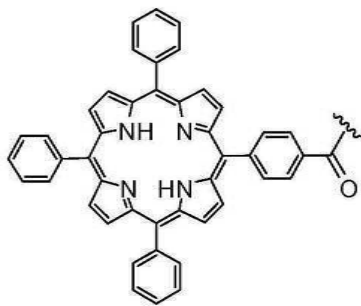


;

[0069] V는 CO, SO_2 , PO, PO_2H 또는 CH_2 로부터 선택된 기이며;

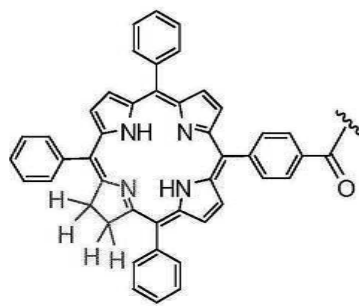
[0070] (바람직하게는, R_7 은 하기로부터 선택된다:

[0071]



TPPc

;

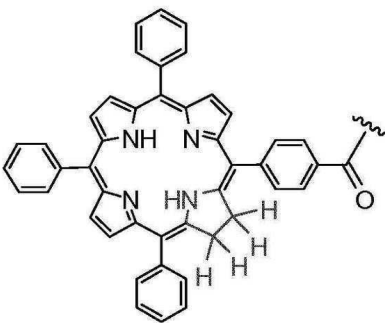


TPCc₁

;

및

[0072]



TPCc₂

),

[0073] R_8 은 같거나 다를 수 있으며, H, -OH, -OCH₃, -CH₃, -COCH₃, $C(CH_3)_4$, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂ 및 -NCOCH₃로부터

선택된 (o, m 또는 p 위치에서 치환된) 기이고 (바람직하게는, 각 R_8 은 H이고 또는 적어도 하나의 R_8 은 H가 아니다);

[0074] 여기서, 각 R 기는 같거나 다를 수 있다.

[0077] 키토산 고분자는 적어도 3 단위 ($n=3$)를 가진다. 그러나, 바람직하게는 n 은 적어도 10, 20, 50, 100, 500, 1000 이고, 예를 들어 10 내지 100 또는 10 내지 50이다.

[0078] 상기 언급한 바와 같이, 컨쥬게이트에 사용된 광감제는 포피린 및 클로린 유도체이고, 특히 TPP_a , TPC_{a1} , TPC_{a2} , TPP_c , TPC_{c1} 및 TPC_{c2} 이다. 바람직하게는, 상기 광감제 유도체 R_4 또는 R_7 은 TPC_{a1} , TPC_{a2} , TPC_{c1} 또는 TPC_c 이고, 특히 바람직하게는 TPC_{a1} 또는 TPC_{a2} 이다.

[0079] 컨쥬게이트의 키토산 유도체는 상기 R 기와 함께 다양한 치환도(degrees of substitution, DS)를 가질 수 있다. 예를 들어, 존재하는 경우, 상기 기재된 하나 이상의 R 기는 1% 이하, 바람직하게는 0.1 내지 1.0%, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5 또는 99.9% 이상의 키토산 치환을 포함할 수 있다. 상기 언급한 바와 같이, 그룹 A 및 그룹 B에서 R 기는 각각 0.1% - 99.9% (바람직하게는 0.5 내지 99.5%)의 총 R_n 기를 제공한다. 바람직하게는, 그룹 A는 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 60, 70, 80, 90 또는 95%의 총 R_n 기를 제공한다. 특히 바람직하게는, 그룹 A는 50 내지 95%, 예를 들어 70 내지 95%의 총 R_n 기를 제공한다. 바람직하게는, 그룹 B는 50% 미만, 예를 들어 바람직하게는 적어도 40, 30, 20, 10 또는 5% 미만의 총 R_n 기를 제공한다. 특히 바람직하게는, 그룹 B는 5 내지 30%, 예를 들어 10-25%의 총 R_n 기를 제공한다.

[0080] 그룹 A R 기 (또는 그룹 B R 기)는 같거나 다를 수 있다. 바람직한 측면에서, 다른 기가 존재하는 경우, 예를 들어 그룹 A R 기에서, 각 기의 비율은 변할 수 있다. 예를 들어, 하나의 R 기는 주요 성분으로서 (총 R_n 기의) 75 내지 95%의 범위 내에 존재할 수 있는 반면, 다른 R 기는 미량 성분으로서 (총 R_n 기의) 0.1 내지 10%의 범위 내에 존재할 수 있다. 그러나, 대안적으로, 주요 성분이 낮은 수준 (예를 들어, 50 내지 90%)으로 존재할 수 있고, 미량 성분이 높은 수준 (예를 들어, 0.1 내지 50%)으로 존재할 수 있다. 바람직하게는, A R 기가 존재하



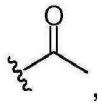
는 경우 키토산 분자의 아세틸화를 반영한다, 즉, R이 이면, 이것은 총 R_n 기의 <1%로 존재한다. 이 R 기는 본 발명의 화합물의 생성에 사용된 출발 키토산 분자의 아세틸화도(degree of acetylation, DA)를 반영하는 경향이 있으므로, 이의 출현율 (prevalence)은 변할 수 있다. 바람직하게는, 이것은 <60%의 총 R_n 기, 바람직하게는 30% 또는 20% 미만, 예를 들어 0.1 내지 30%의 총 R_n 기를 제공한다.

[0081] 알 수 있는 바와 같이, 그룹 A 및 B의 모든 R 기에 의해 제공된 총 %는 100%이고, 따라서 상기 범위 내로부터의 선택이 이루어진다.

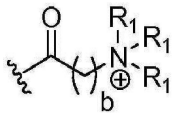
[0082] 사용된 합성 방법에 따라, 약간의 불순물 또는 대안 생성물이 낮은 수준으로 존재할 수 있고, 예를 들어 최종 생성물에 미량의 다른 R 기 또는 잔류 보호기 (예를 들어, TBDMS)가 남아있을 수 있다는 것을 유의할 것이다. 그러나, 이러한 미량 성분 또는 화합물은, 만일 존재한다면, 전체의 <1% (바람직하게는 <0.1%)로 존재하고 기능성에는 영향을 미치지 않는다. 이러한 미량 성분 또는 화합물을 포함하는 화합물 또는 조성물은 본 발명의 범위 내에 있다.

[0083] 본 명세서에 기재된 바람직한 측면에서, 총 R_n 기의 비율에 따라 선택된 R 기의 %가 제공된다. 이러한 경우, %의 범위가 선호된다 (예를 들어, 제조에서 변화를 반영하기 위해). 바람직하게는, 범위는 5%이다, 즉 기준이 특정 구조를 가지는 A R 기의 90%로 만들어질 때, 이것은 A R 기 등의 85 내지 95%를 갖는 화합물로 확장한다.

[0085] 바람직한 A R 기는 하기와 같다:

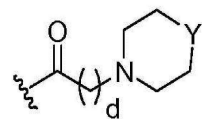


[0086]



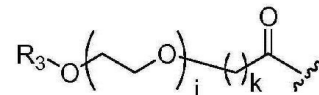
[0087] 여기서, 바람직하게는 각 R₁은 CH₃이고, b는 1이다;

[0088]



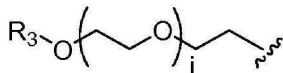
[0089] 여기서, 바람직하게는 Y는 -NCH₃이고, d는 1이다;

[0090]



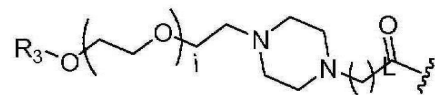
[0091] 여기서, 바람직하게는 j는 0 또는 1이고; i는 3 또는 6이며, k는 1이다;

[0092]



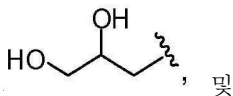
[0093] 여기서, 바람직하게는 j는 1이고, i는 2이다;

[0094]

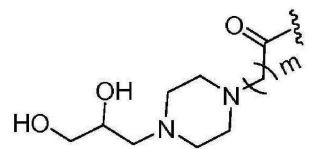


[0095] 여기서, 바람직하게는 j는 0 또는 1이고, i는 2, 4 또는 5이며 (예를 들어, 2 또는 4), L은 1이다;

[0096]

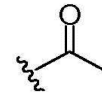


[0097]



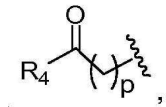
[0098] 여기서, 바람직하게는 m은 1이다.

[0100] 바람직하게는, 상기 R 기는 주요 성분 (즉, (상기 논의된 바와 같이) 75% 이상의 총 Rn 기) 또는 미량 성분



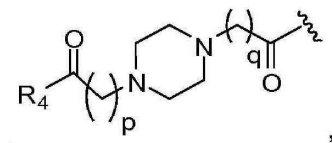
(즉, (상기 논의된 바와 같이) 10% 미만의 총 Rn 기)으로 존재한다. 바람직하게는 는 단지 미량 성분으로만 존재한다.

[0102] 바람직한 B R 기는 하기와 같다:



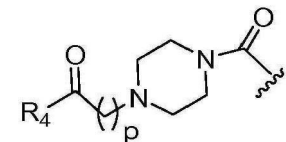
[0103]

[0104] 여기서, 바람직하게는 p는 1이다;



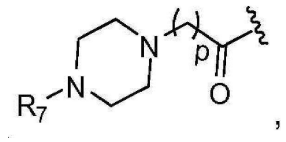
[0105]

[0106] 여기서, 바람직하게는 p는 1이고, q는 1이다;



[0107]

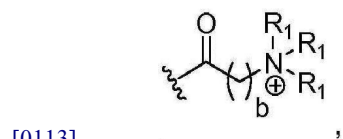
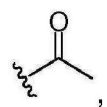
[0108] 여기서, 바람직하게는 p는 1이다; 및



[0109]

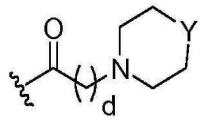
[0110] 여기서, 바람직하게는 p는 1이다.

[0112] 특히 바람직한 A R 기는 하기와 같다:



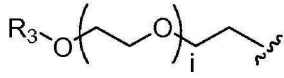
[0113]

[0114] 여기서, 바람직하게는 각 R_1 은 CH_3 이고, b 는 1이다;



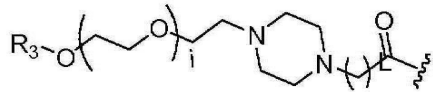
[0115] ,

[0116] 여기서, 바람직하게는 Y 는 $-NCH_3$ 이고, d 는 1이다;



[0117] ,

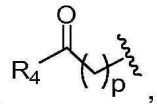
[0118] 여기서, 바람직하게는 j 는 1이고, i 는 2이다; 및



[0119] ,

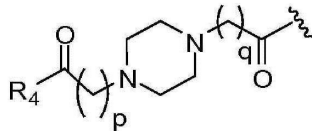
[0120] 여기서, 바람직하게는 j 는 0 또는 1이고, i 는 2, 4 또는 5이며 (예를 들어, 2 또는 4), L 은 1이다.

[0122] 특히 바람직한 B R 기는 하기와 같다:



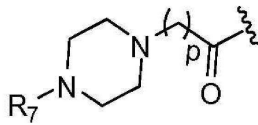
[0123] ,

[0124] 여기서, 바람직하게는 p 는 1이다;



[0125] ,

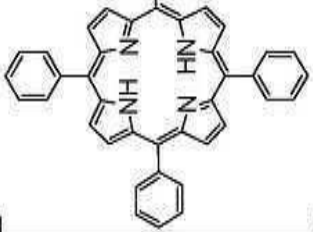
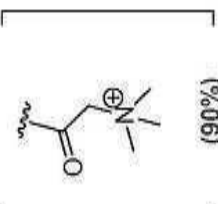
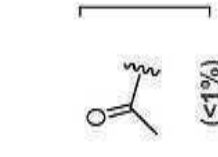
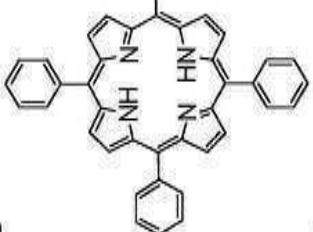
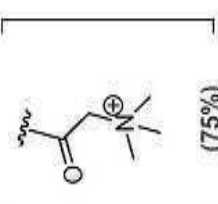
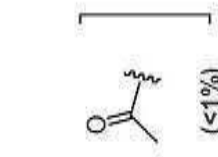
[0126] 여기서, 바람직하게는 p 는 1이고, q 는 1이다; 및



[0127] ,

[0128] 여기서, 바람직하게는 p 는 1이다.

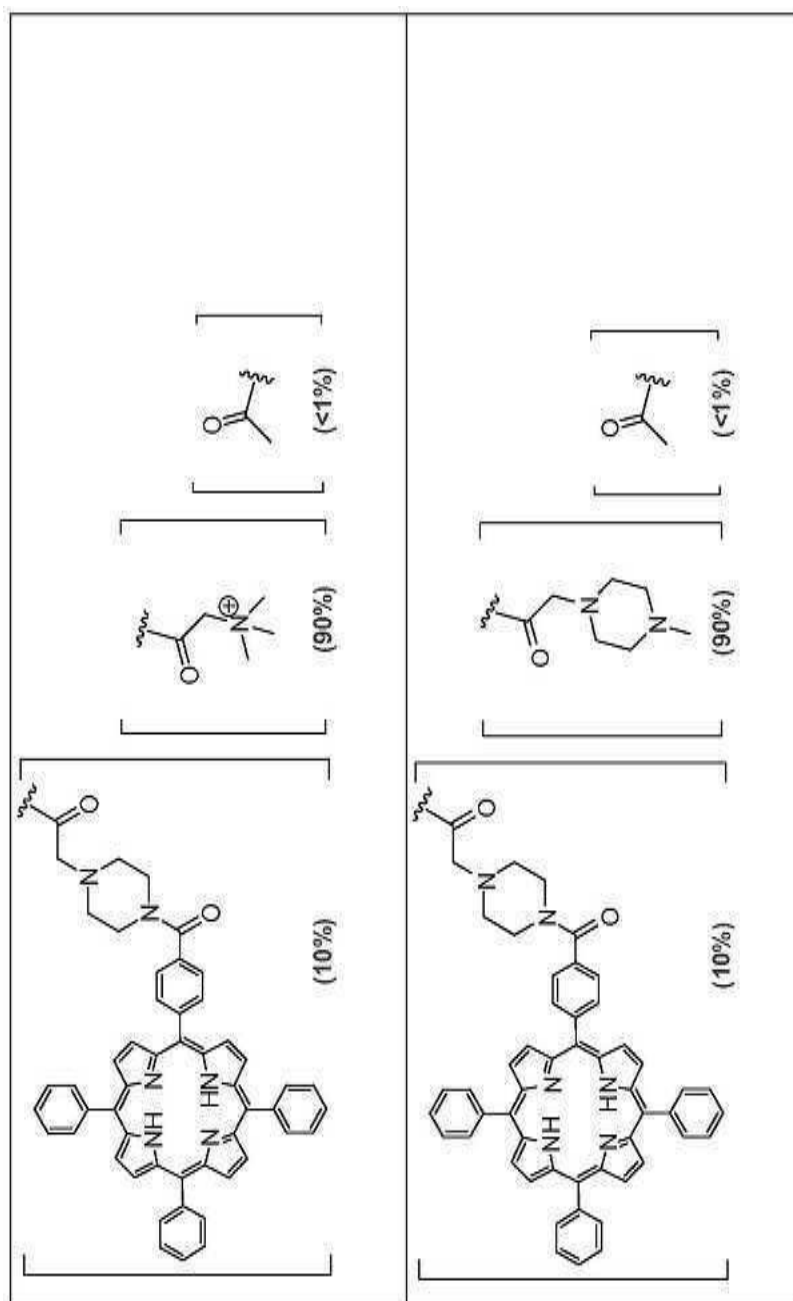
[0130] 바람직한 R 기 및 총 R_n 기에서 이의 상대적인 출현율은 하기 표에 제공되며, 다른 가능한 R 기는 키토산과 결합된 것으로 나타난다. 각 우세 유형의 R 기는 괄호 안에 나타내었으며, 표시된 값의 양쪽 5% 이내에서 변할 수 있다. 그룹 B R 기는 부착된 광감제 기 R_4 또는 R_7 을 가진다.

TPP Derivatives	 (10%)   (90%)   (<1%)	 (25%)   (75%)   (<1%)
------------------------	---	---

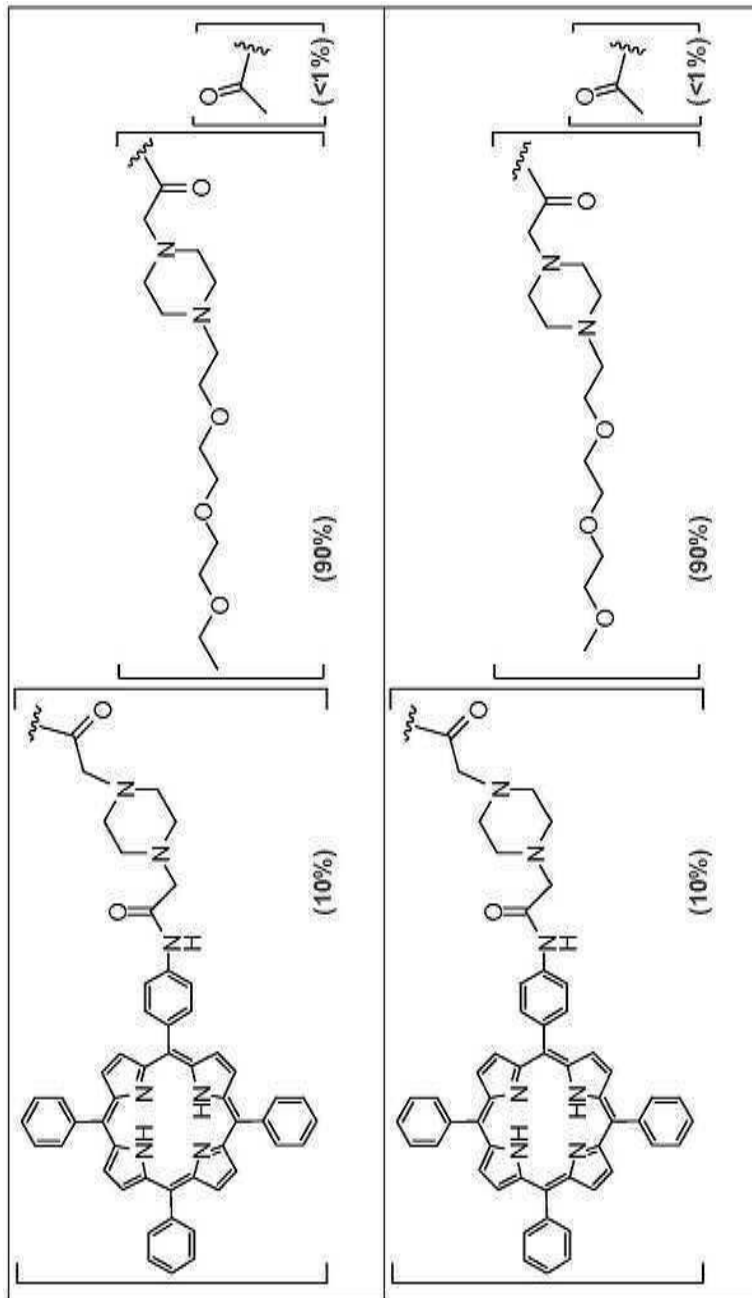
[0131]

(10%)	(25%)
(90%)	(75%)
(<1%)	(<1%)

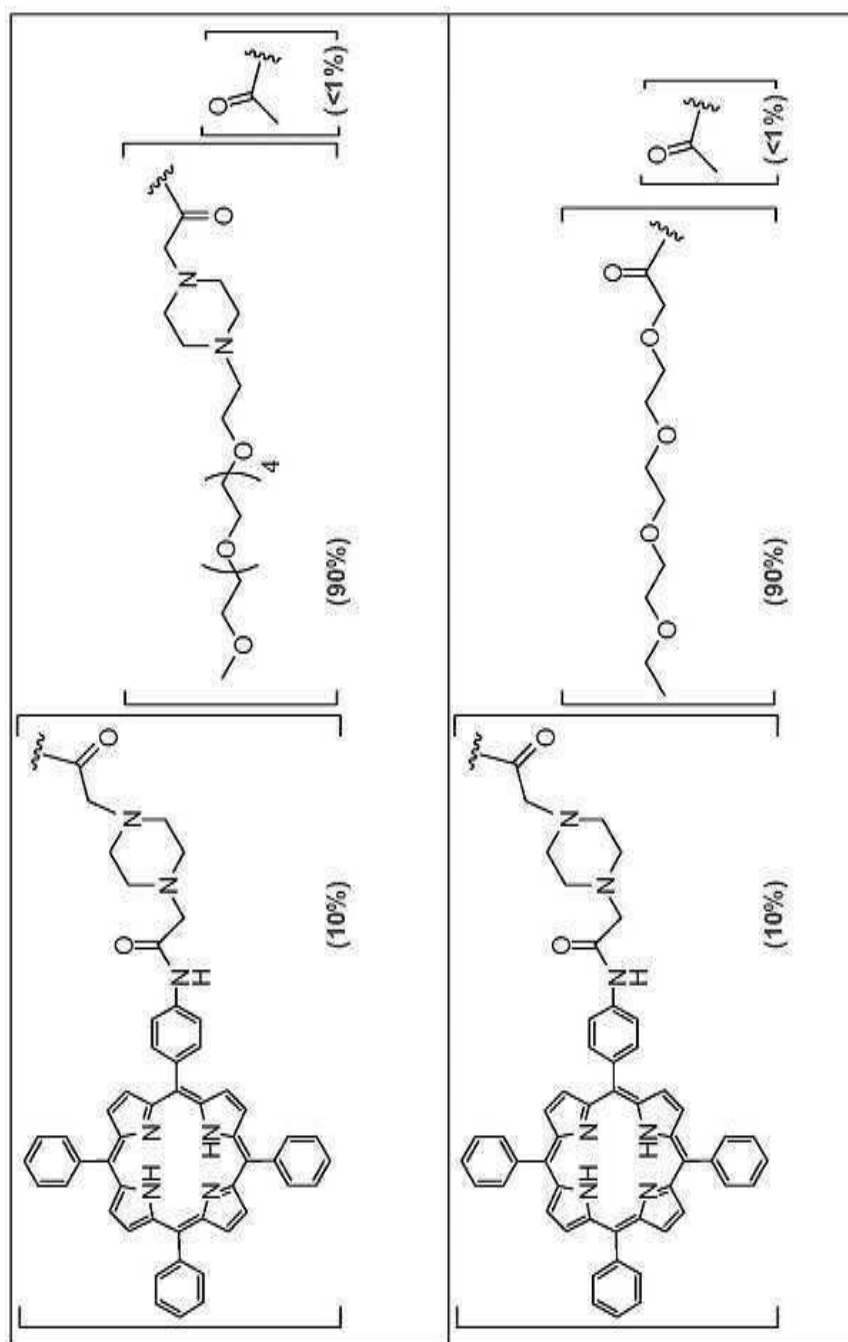
[0132]



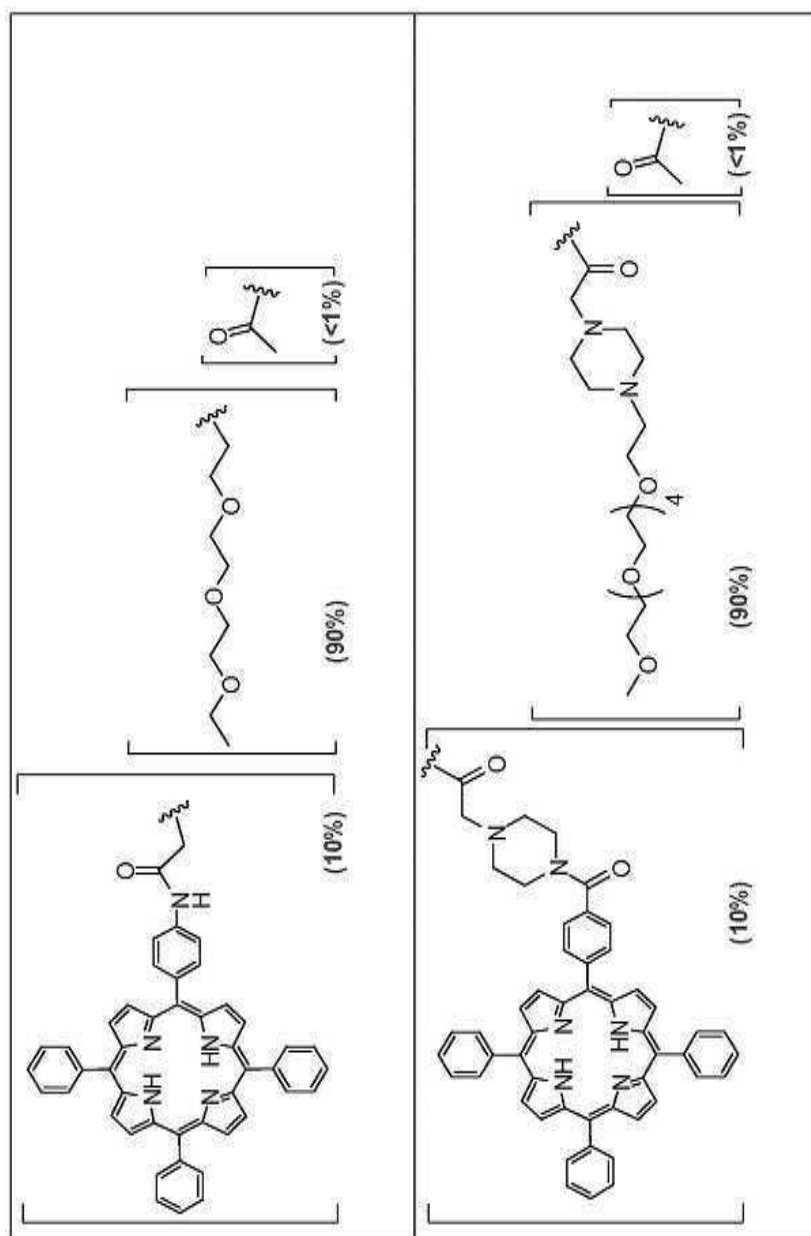
[0133]



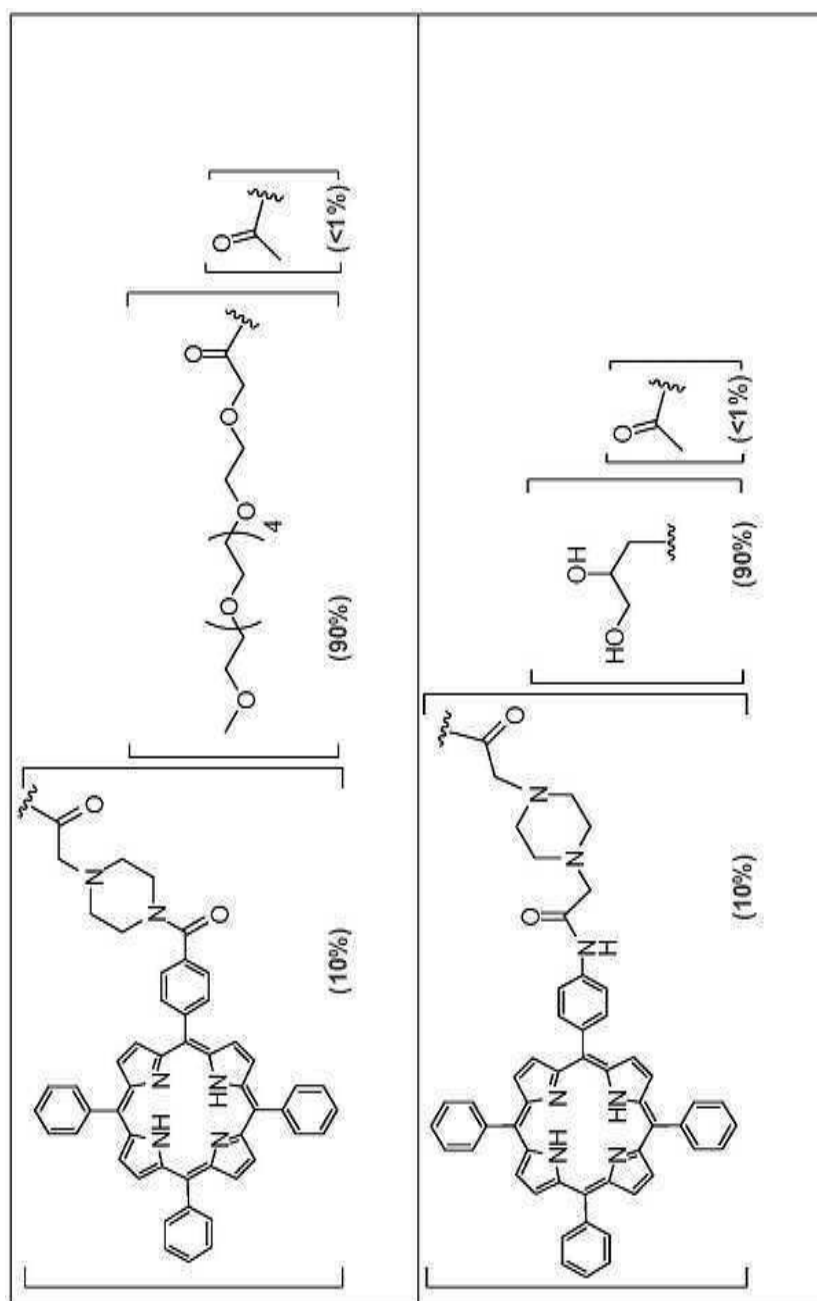
[0134]



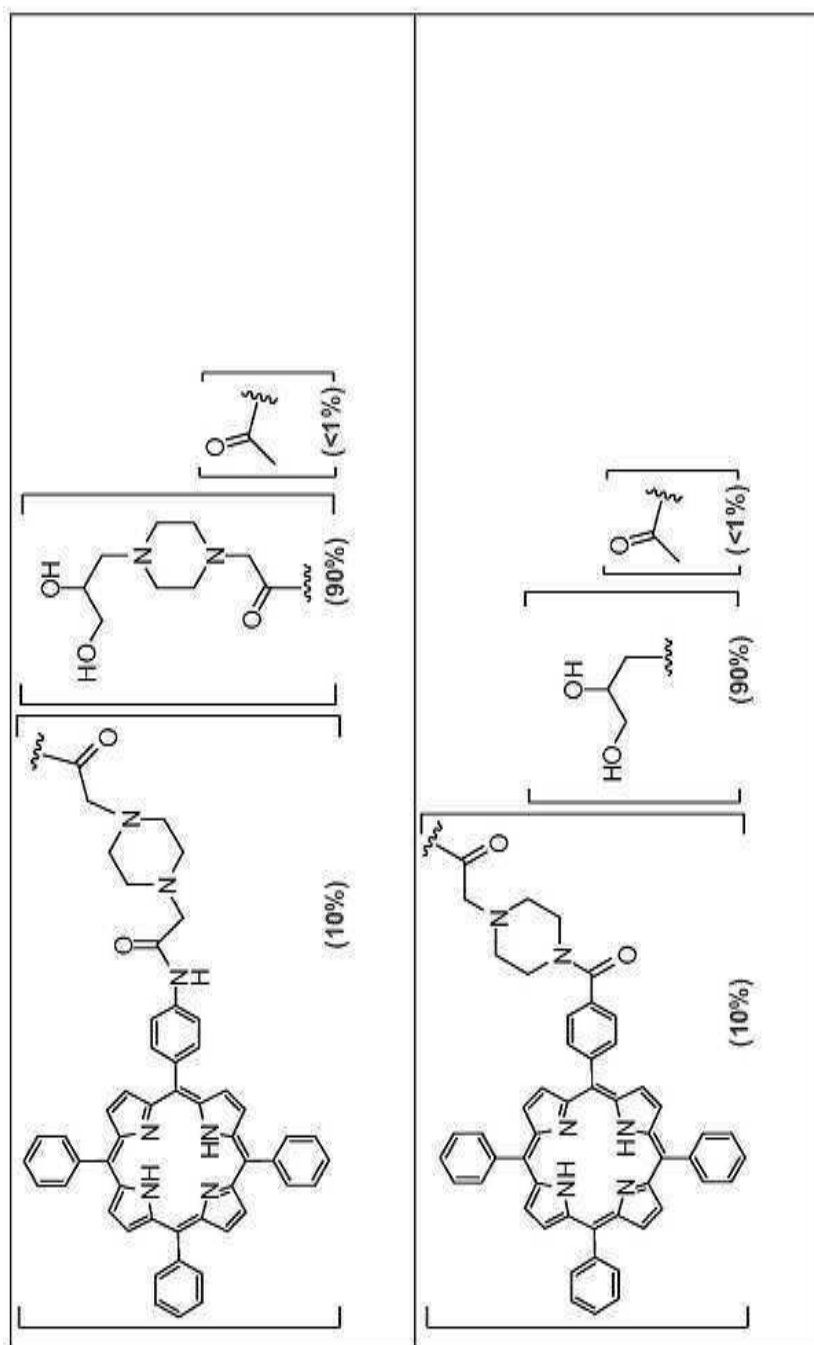
[0135]



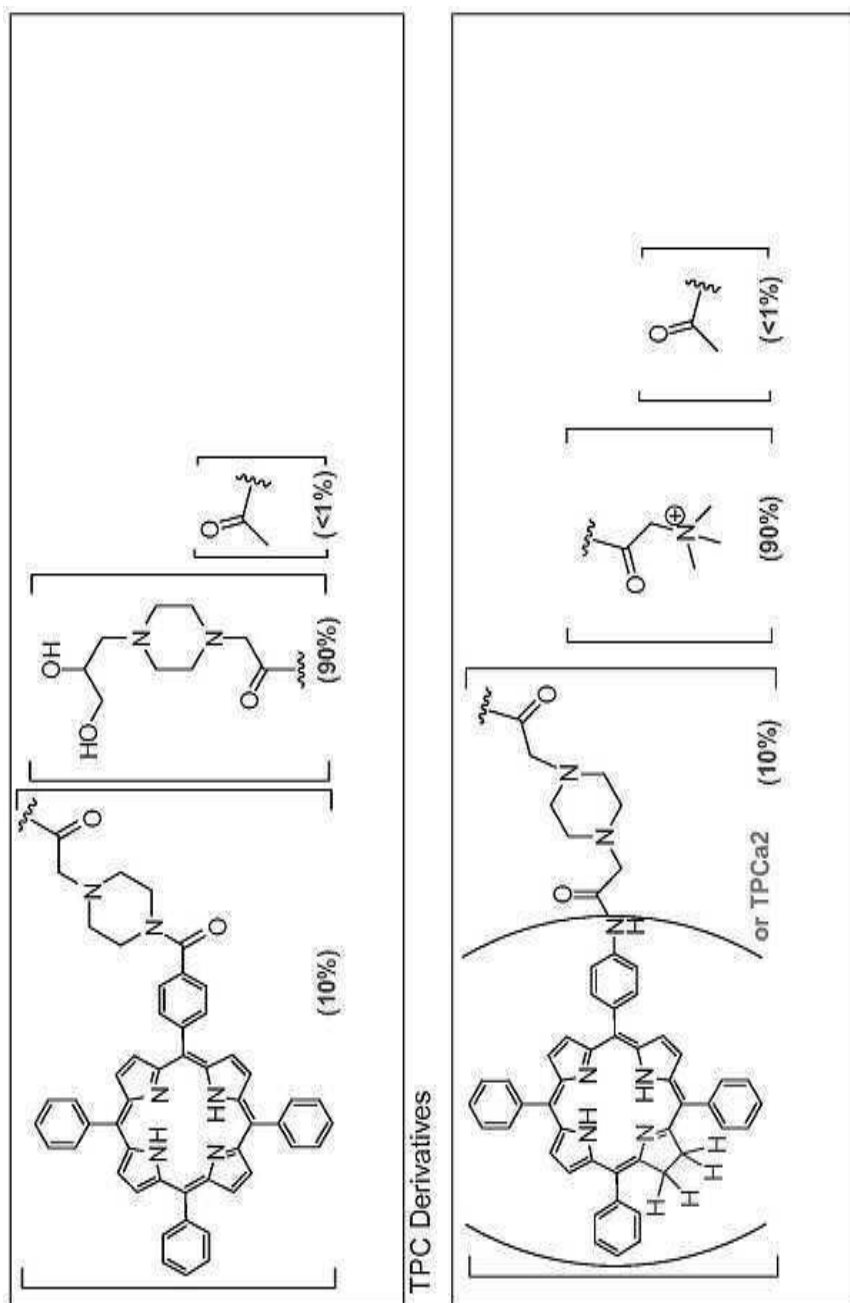
[0136]

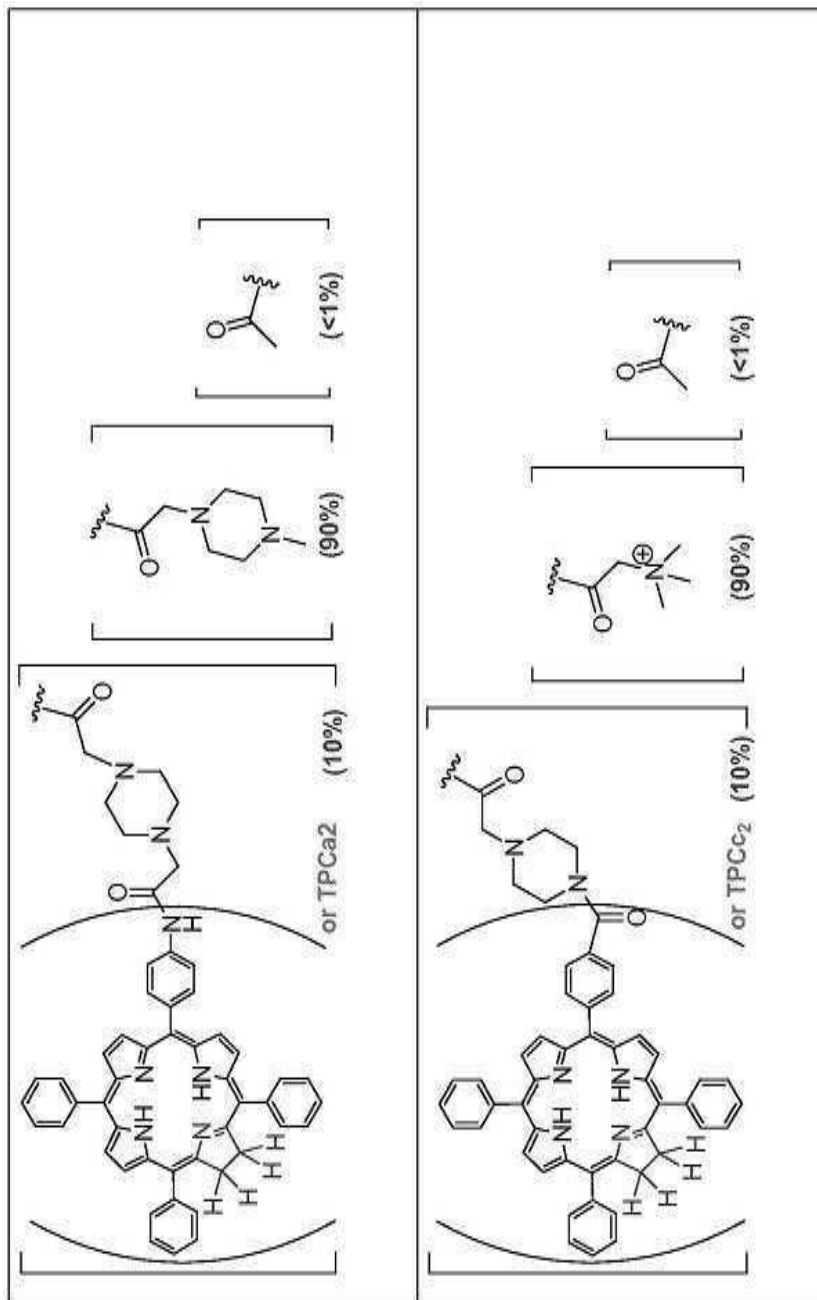


[0137]

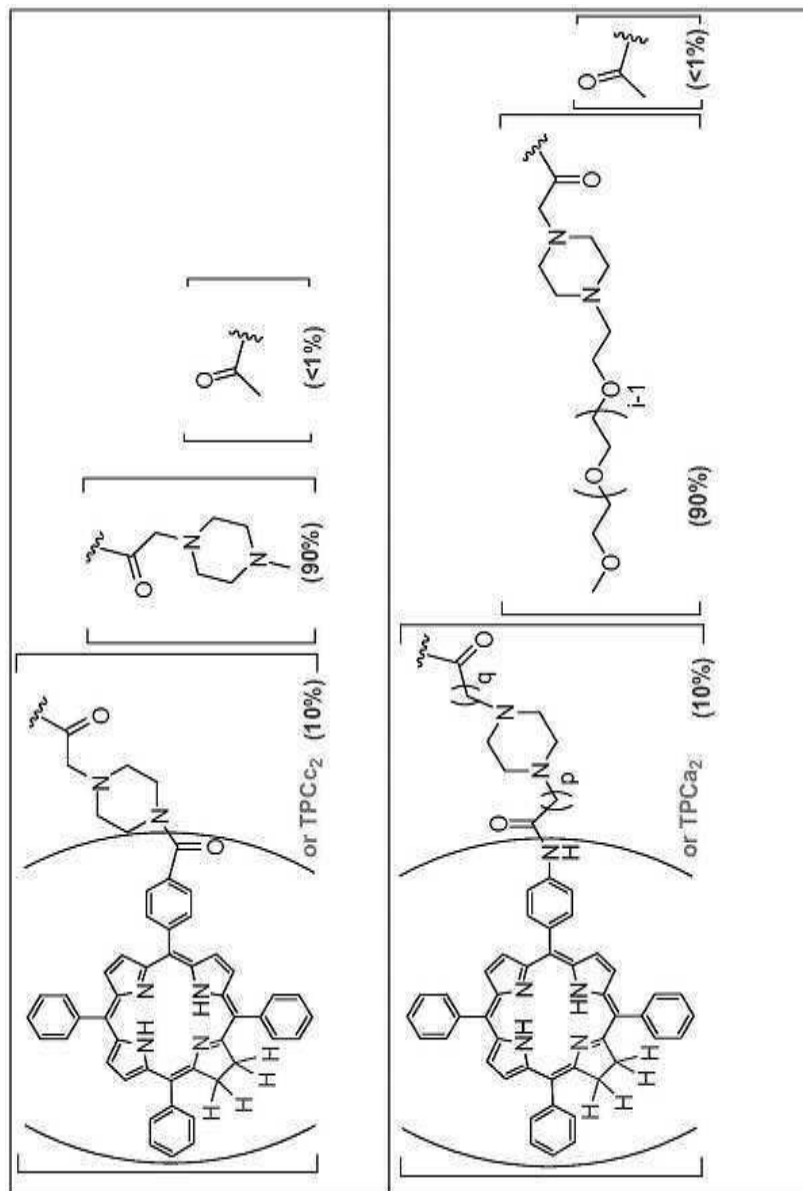


[0138]

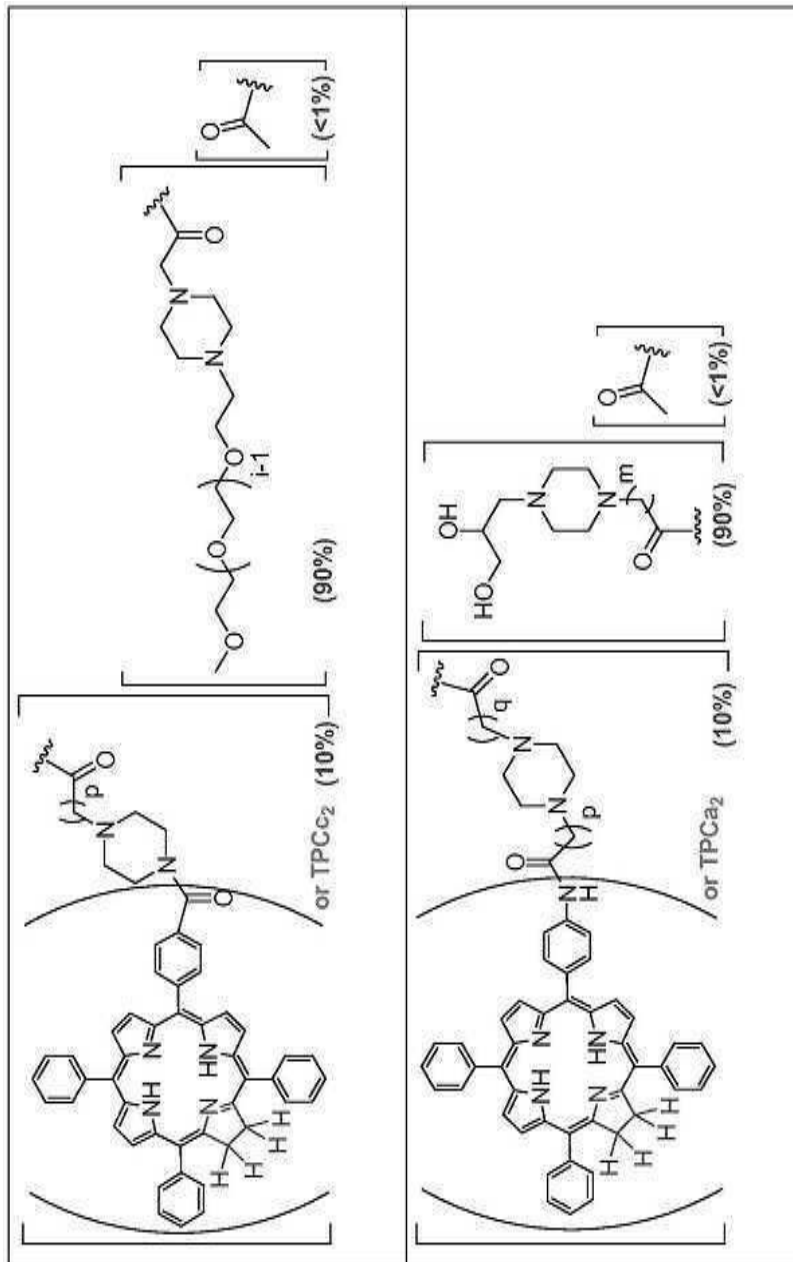




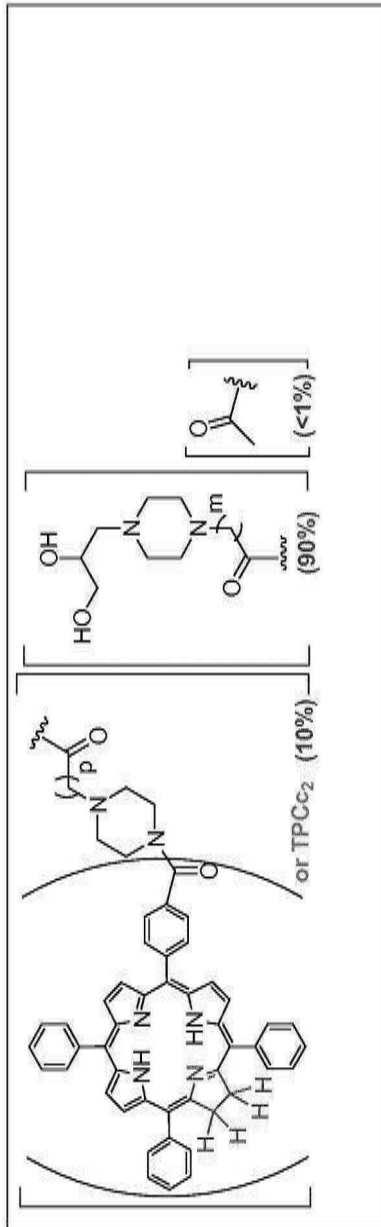
[0140]



[0141]



[0142]



[0143]

[0145] 또한, 본 발명의 특히 바람직한 화합물은 도 1에 나타난 바와 같이 R 기의 출현율을 나타내나, 이는 표시된 값의 양쪽 5% 까지 변할 수 있다. 각각의 경우, 부착된 광감제를 갖는 R 기는 낮게 표시된 출현율을 가진다.

[0146] 본 발명의 화합물은 본 명세서에 기재된 바와 같이 실시예에서 제조될 수 있다. 합성 방법은 당업자에게 익숙하고 하기 실시예에 기재된 기술분야의 표준 방법을 사용한다. 적절한 R 기를 제공하기 위해 페길화(PEGylation) 및 테길화 (TEGylation)를 기술분야의 표준 방법에 따라 수행할 수 있다. 또한, 본 발명은 본 명세서에 기재된 실시예 및 반응식에 기재된 바와 같이 본 발명의 화합물의 제조방법으로 확장한다.

[0147] 본 발명의 화합물은 낮은 독성을 가지므로 다양한 의료 적응증(medical indications)에 적합하다.

[0148] 본 발명의 화합물은 PCI 방법에서 사용하기에 특히 적합하다. 본 실시예에 예시된 바와 같이, 본 발명의 화합물은 놀랍게도 분자를 세포로 내재화시키는데 우수한 효능을 가지고 있음을 나타내었다. 실시예 3에서는 본 발명의 화합물의 효능이 광감제 단독으로 이룬 효능보다 상당히 더 우수하다는 것을 나타내었다 (이 경우, PCI에서 사용하기 위해 특별히 설계되고 암 치료를 위해 임상 개발 중에 있는 광감제 TPCS_{2a}를 사용하였다 (Berg et al. 2011, Photochem. Photobiol. Sci., 10, p1637-1651)). TPCS_{2a}와 비교하면, 본 발명의 화합물은 적어도 10 배 까지 더 활성적이었다, 즉 심지어 10 배 더 낮은 농도로 사용되었을 때 건류게이트는 TPCS_{2a}와 함께 관찰했던 것

보다 상당히 더 큰 형질주입의 향상을 가져왔다 (도 19 및 20 참조).

- [0149] 광화학 내재화(PCI)의 기본적인 방법은 WO 96/07432 및 WO 00/54802에 기재되고, 참조로 본 명세서에 포함된다. 요약하면, 내재화될 분자 및 광감제, 본 경우에 본 발명의 화합물의 일부로서 광감제는 세포와 접촉한다. 광감제 및 내재화될 분자는 세포 내에서 세포막-결합된 소구획(subcompartment)으로 흡수된다. 세포를 적당한 파장의 빛에 노출시킬 시, 광감제는 세포내 구획막(compartment membranes)을 파괴하는 반응성 종을 직접 또는 간접적으로 생성하는 것을 활성화시킨다. 이는 내재화된 분자를 세포질로 방출할 것을 허용한다.
- [0150] 이러한 방법은 만일 방법론이 조명 시간 또는 광감제 용량을 낮춰 과도한 독성 중 생성을 피하도록 적당히 조정된다면 광범위한 세포 파괴 또는 세포사를 야기하지 않는 방법으로 다른 막-불투과성 (또는 불완전 투과성) 분자를 세포의 세포질로 도입하기 위한 메커니즘으로서 광화학 효과를 사용한다.
- [0151] 이와 같이, 본 발명은 또한 상기 세포를 도입될 분자와 본 발명의 화합물과 접촉시키는 단계, 및 화합물의 광감제를 활성화시키는데 효과적인 파장의 빛으로 세포를 조사하는 단계를 포함하는, 분자를 세포의 세포질로 도입하는 방법을 제공한다. 일단 활성화되면, 상기 화합물을 함유하는 상기 세포 내에 세포내 구획은 이 구획에 함유된 분자를 세포질로 방출한다. 내재화하는 것이 바람직한 분자를 내재화시키기 위한 본 발명의 화합물의 용도도 본 발명의 일부를 형성한다.
- [0152] PCI는 많은 다른 유형의 분자를 세포로 형질주입시킬 수 있다. 예를 들어, 분자는 DNA 또는 안티센스 DNA; 올리고(데옥시)뉴클레오타이드; mRNA, siRNA, 이중가닥(ds)RNA, 단일가닥(ss)RNA 또는 안티센스 RNA와 같은 RNA; PNA, 당류; 단백질; 펩티드; 막 불투과성 약물; 기타 막 불투과성 분자, 또는 공유 또는 비공유 결합된 상기 언급된 분자들의 조합으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 도입될 분자는 PCI의 도움없이 현저하게 (즉, 세포질로) 내재화되지 않는다, 예를 들어, 이들의 내재화는 이들이 적용되는 50% 미만 (예를 들어, 30 또는 10% 미만)의 세포가 4시간 동안 세포질로 하나 이상의 분자를 내재화할 정도로 제한된다.
- [0153] 내재화될 분자는 다양한 결과를 이루기 위해, 예를 들어, 변경, 예를 들어 표적 유전자의 발현을 감소 또는 증가시키기 위해 또는 세포의 특성 또는 생존율에 영향을 미치기 위해 선택될 수 있다. 유전자 발현에 영향을 미치기 위해, 전이될 분자는 센스 또는 안티센스 올리고 또는 폴리-뉴클레오타이드, 예를 들어 플라스미드 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA 분자에서 유전자 서열일 수 있다. 이러한 방법은 암과 같은 질환 및 장애의 예방 또는 치료에 유용할 수 있고, 유전자 치료 적용에도 유용할 수 있다. 본 발명의 방법은 세포질로 내재화될 분자의 전좌(translocation)를 이룬다. 그러나, 세포질로 세포와 접촉된 각각의 모든 분자의 흡수가 이루어지지 않는다는 것을 이해할 것이다. 그러나, PCI 또는 본 발명의 화합물을 사용하지 않은 배경 수준에 비해 현저하고 개선된 내재화가 이루어질 수 있다.
- [0154] 바람직하게는, 본 발명의 방법은 이들의 효과가 이러한 세포의 발현된 생성물에서 또는 세포에 대한 효과에 의해 명백한 충분한 수준에서 분자의 내재화를 허용한다. 세포와 접촉될 분자의 적당한 농도는 이러한 목표를 이루기 위해 조정될 수 있다. 예를 들어, 몇몇 적용에서 표적 유전자 (또는 도입된 유전자)의 발현의 증가 또는 감소 또는 세포독성 분자의 도입 후 세포사를 이루는 것이 바람직할 수 있다. 감소 또는 세포사는 적어도 10%, 예를 들어 적어도 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 또는 90% 감소 (예를 들어, 표적 유전자에 의해 인코딩된 하나 이상의 단백질의 발현에서) 또는 24, 48, 72 또는 96 시간 (예를 들어, 24 내지 48 시간) 동안 세포와 함께 배양 후의 세포사일 수 있다. 발현의 증가는 비-내인성(non-endogenous) 분자가 사용될 때 영(zero)일 수 있는 현재 수준과 비교하여 평가될 수 있고, 감소에 대해 상기 언급된 것과 수치적으로 유사한 수준이 달성될 수 있다. 유사하게, (본 발명의) 화합물의 유형 및/또는 농도, 및 조사 시간은 상기 명시된 감소를 이루기 위해 조정될 수 있다.
- [0155] 발현된 생성물의 수준은 웨스턴 블롯팅과 같은 기술분야에서 알려진 표준 기술을 이용하여 세포에서 단백질의 수준을 측정함으로써 측정될 수 있다. 단백질의 감소 수준은 단백질의 반감기에 의존한다, 즉 기존의 단백질은 이의 반감기에 따라 제거될 것이다. 세포사는 임의의 적당한 수단에 의해 측정될 수 있다.
- [0156] 도입된 유전물질의 효과는 세포에 존재하는 mRNA의 발현 수준에 관하여도 측정될 수 있다, 예를 들어, 방법은 유전물질의 첨가 없이 동일한 시점에서 표적 또는 도입된 서열의 mRNA 수준에 비해, 24, 48, 72 또는 96 시간, 예를 들어 24 내지 48 시간 동안 세포와 함께 배양한 후 적어도 10%, 예를 들어, 적어도 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 또는 90% 증가 또는 감소의 mRNA 수준의 증가 또는 감소를 이루기 위해 수행될 수 있다. 이것은 혼성화와 같은 기술분야에서 알려진 표준 기술 또는 블롯팅 기술 및 RT-PCR을 이용하여 측정될 수도 있다.
- [0157] 용어 "세포(cell)"는 (곤충 세포들 및 균류 세포들을 포함하여) 모든 진핵세포들을 포함하는 것으로 본 명세서

에 사용된다. 따라서, 대표적인 "세포들(cells)"은 모든 유형의 포유류 및 비-포유류 동물 세포들, 식물 세포들, 곤충 세포들, 균류 세포들 및 원생동물들을 포함한다. 그러나, 바람직하게는, 세포들은 포유류, 예를 들어 고양이, 개, 말, 당나귀, 양, 돼지, 염소, 소, 마우스, 랫트, 토끼, 기니아 피그로부터의 세포이나, 가장 바람직하게는 인간으로부터의 세포이다.

- [0158] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "접촉하는(contacting)"은 세포 및 25-39℃, 바람직하게는 37℃에서 적당한 영양 배지에서 세포로 내재화하기에 적당한 조건 하에 서로 물리적 접촉으로 도입될 분자 및/또는 본 발명의 화합물을 함유하는 광감제를 가져오는 것을 나타낸다.
- [0159] 광감제를 활성화시키기 위한 세포의 "조사(Irradiation)"는 하기에 기재된 바와 같이 직접 또는 간접적으로 빛의 투여를 나타낸다. 따라서, 세포는 직접 (예를 들어, *in vitro* 단일 세포에) 또는 간접적으로 (예를 들어, 세포가 피부의 표면 아래 있거나 또는 다른 세포의 차단 없이 모두가 직접 조명되지 않는 세포층의 형태에 있을 때 *in vivo*) 광원으로 조명될 수 있다.
- [0160] 광감제를 활성화시키기 위한 빛 조사 단계는 기술분야에서 잘 알려진 기술 및 방법에 따라 발생할 수 있다. 빛의 파장 및 세기는 사용된 광감제에 따라 선택된다. 적당한 인공 광원은 청색 (450-475nm) 또는 적색 (620-750nm) 파장 빛을 이용하여 기술분야에서 잘 알려져 있다.
- [0161] 본 발명의 방법에서 세포가 빛에 노출되는 시간은 변할 수 있다. 세포질로 분자의 내재화의 효능은 세포 손상을 넘어 최대로 빛에 증가된 노출과 함께 증가하고, 이런 이유로 세포사는 증가한다.
- [0162] 조사 단계 동안 바람직한 시간 길이는 표적, 광감제 (본 발명의 화합물에서), 표적 세포 또는 조직에서 축적된 광감제의 양 및 광감제의 흡수 스펙트럼과 광원의 발광 스펙트럼 사이의 중첩과 같은 인자에 의존한다. 일반적으로, 조사 단계 동안 시간 길이는 초 내지 분 또는 여러 시간까지의 순서, 예를 들어 바람직하게는 60분까지, 예를 들어 0.25 또는 1 내지 30분, 예를 들어 0.5 내지 3분 또는 1 내지 5분 또는 1 내지 10분, 예를 들어 3 내지 7분, 바람직하게는 약 3분, 예를 들어 2.5 내지 3.5분이다. 또한, 짧은 조사 시간, 예를 들어 1 내지 60초, 예를 들어 10-50, 20-40 또는 25-35초가 사용될 수 있다.
- [0163] 적당한 빛 선량은 당업자에 의해 선택될 수 있으며, 사용된 광감제 (본 발명의 화합물에서) 및 표적 세포 또는 조직에서 축적된 광감제의 양에 의존할 것이다. 예를 들어, 광감제 포토프린(Photofrin) 및 프로토포피린 전구체 5-아미노레불린산 (5-aminolevulinic acid)으로 암의 광역학 치료에 일반적으로 사용된 빛 선량은 이상고열(hyperthermia)을 피하기 위해 200 mW/cm² 미만의 영향 범위에서 50-150 J/cm² 범위 내이다. 빛 선량은 가시 스펙트럼(visible spectrum)의 적색 영역에서 높은 흡광계수를 갖는 광감제를 사용할 경우 보통 낮다. PCI 방법의 경우, 낮은 선량, 예를 들어 75-150 mW/cm²의 영향 범위에서 5-25 J/cm² 범위 내의 빛 선량이 사용될 수 있다. 또한, 축적된 적은 광감제로 비-암성 조직의 치료의 경우, 필요한 빛의 총량은 암의 치료에서 보다 상당히 더 높을 것이다. 또한, 세포 생존율이 유지될 경우, 독소 종의 과도한 수준의 발생을 피할 것이고 관련 매개변수는 그에 맞춰 조정될 수 있다.
- [0164] 본 발명의 PCI 방법은 광화학 치료에 의하여, 즉 광감제의 활성화에 대한 독소 종의 발생을 통한 PDT 효과에 의해 일부 세포 사멸을 불가피하게 야기할 수 있다. 제안된 용도에 따라, 이 세포사는 중요하지 않을 수 있으며 실제로 일부 적용 (예를 들어, 암 치료)에 유리할 수 있다.
- [0166] 하나의 실시예에서, 본 발명은 상기 세포를 본 발명의 화합물과 접촉시키는 단계, 및 상기 세포의 죽음을 일으키는 활성 산소종을 생성하기 위해 화합물의 광감제를 활성화시키는데 효과적인 파장의 빛으로 세포를 조사하는 단계를 포함하는, 세포사를 이루는 방법을 제공한다. (PDT에 의해) 세포사가 이루어질 경우, 조사 단계의 시기, 세기 및 파장은 표적 세포의 세포사를 최적으로 이루기 위해 적당히 선택된다.
- [0167] 그러나, 본 발명의 어떤 실시예에서, 세포 독성 없이 유전자의 발현의 저해를 원할 경우 또는 세포사가 도입된 분자에 의해 대신 이루어진다면 세포사는 피한다. 예를 들어, 어떤 용도에서, 예를 들어 어떤 유전자 치료 방법에서 이것은 일반적인 세포 독성 없이 유전자 발현 또는 발현의 저해 또는 세포 생존율에 대한 효과를 이루는데 매우 유리하다. 본 발명의 방법은 살아있는 세포의 분획 또는 비율이 광감제 (본 발명의 화합물에서)의 농도와 관련하여 빛 선량을 선택함으로써 조절되도록 변형될 수 있다. 다시, 이러한 기술은 기술분야에서 알려져 있다.
- [0168] 생존 세포가 바람직한 적용에서, 실질적으로 모든 세포, 또는 상당 부분 (예를 들어, 세포의 적어도 50%, 더 바

람직하게는 적어도 60, 70, 80 또는 90%)은 죽지 않는다. PCI 치료 후의 세포 생존율은 MTS 시험과 같은 기술분야에서 알려진 표준 기술에 의해 측정될 수 있다.

[0169] 광감제의 활성화에 의해 유도된 세포사의 양과 상관없이, 어떤 적용에서는 PCI 효과가 명백한 개개의 세포들 중 일부가 단독의 광화학 치료에 의해 죽지 않도록 빛 선량을 조절하는 것이 중요하다 (비록 이들이 세포로 도입된 분자에 의해, 이들 분자가 세포독성 효과를 가지고 있다면 나중에 죽게될 수 있을 지라도).

[0170] 세포독성 효과는 세포독성 분자 (예를 들어, 젤로닌 또는 블레오마이신과 같은 세포독성 펩티드) 또는 물질, 예를 들어 유전자, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA 분자가 본 발명의 방법에 의해 종양 세포로 내재화되는 유전자 치료를 도입함으로써 이루어질 수 있다.

[0171] 본 발명의 화합물 및 방법은 *in vitro* 또는 *in vivo*, 예를 들어 유전자 치료 방법에서 특정 유전자 산물의 발현의 저해 또는 상승을 포함하는 다양한 목적을 위해, 인시츄(*in situ*) 처리 또는 생체외(*ex vivo*) 처리 다음에 신체로 처리된 세포를 투여하는데 사용될 수 있다.

[0172] 따라서, 본 발명의 다른 측면은 본 발명의 화합물 또는 컨주게이트 및 임의로 별도로 내재화될 분자를 함유하는 조성물 (예를 들어, 약학적 조성물)을 제공한다. 상기 조성물이 약학적 조성물일 경우, 이것은 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 희석제 또는 부형제를 함유한다.

[0173] 다른 측면에서, 본 발명은 치료에 사용하기 위한 상기 화합물 또는 조성물을 제공한다.

[0174] 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 본 발명의 화합물 또는 조성물 및 내재화될 분자를 포함하는 키트를 제공한다. 바람직하게는, 상기 키트 (또는 제품)는 예방접종을 위해, 하기에 더 상세히 기재된 바와 같이, 의학적인 치료, 바람직하게는 암의 치료에 동시, 별도 또는 순차적으로 사용된다.

[0175] 따라서, 다른 측면은 비정상적 또는 과도한 세포 성장이 명백하거나 또는 비정상적으로 상승된 또는 억제된 유전자 발현이 명백한 피험자에게서 질환, 장애 또는 감염의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 본 명세서에 정의된 바와 같은 화합물 또는 조성물 및 임의로 내재화될 분자를 제공하며, 특히 바람직하게는 상기 질환은 암이다. 본 발명의 화합물 또는 조성물 및 임의로 내재화될 분자를 투여함으로써 (본 명세서에 기재된 용도와 일치하는) 피험자에게서 질환, 장애 또는 감염의 예방 또는 치료 방법도 포함된다. 바람직하게는, 상기 예방 또는 치료는 본 명세서에 기재된 방법을 이용하여 이루어진다.

[0176] 이 방법은 PCI 방법을 이용하여 수행될 수 있으며, 또는 세포사가 최종 목표인 경우에는 PCI 또는 PDT 방법이 사용될 수 있다.

[0177] 따라서, PCI 방법은 상기 기재된 바와 같이, 즉 피험자의 세포를 도입될 분자 및 상기 화합물 또는 조성물과 접촉시키는 단계, 및 화합물의 광감제를 활성화시키는데 효과적인 파장의 빛으로 세포를 조사하는 단계에 의해 수행될 수 있다. 바람직하게는, 도입될 분자는 세포독성 분자, 바람직하게는 블레오마이신이다.

[0178] PDT 방법은 피험자의 세포를 상기 화합물 또는 조성물과 접촉시키는 단계, 및 상기 세포의 죽음을 일으키는 활성 산소종을 생성하기 위해 화합물의 광감제를 활성화시키는데 효과적인 파장의 빛으로 세포를 조사하는 단계에 의해 수행될 수 있다.

[0179] 대안적으로 기재하면, 본 발명은 질환, 장애 또는 감염의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에서, 세포로 본 명세서에 기재된 바와 같은 화합물 또는 조성물 및 임의로 내재화될 분자의 용도를 제공한다. 또한 본 발명은 상기 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에서 상기 화합물 또는 조성물을 제공하고, 상기 예방 또는 치료는 본 명세서에 기재된 바와 같다. 질환, 장애 또는 감염은 바람직하게는 비정상적 또는 과도한 세포 성장 또는 비정상적으로 상승된 또는 억제된 유전자 발현을 나타내고 및/또는 세포 성장의 감소 또는 하나 이상의 유전자의 발현의 억제 또는 상승으로부터 혜택을 받을 것이다.

[0180] 본 명세서에 언급된 바와 같이, 비정상적 또는 과도한 나이 및 동성(sex-matched) 정상 개인 또는 동일한 개인의 신체의 다른 정상 부분에서 정상으로 간주되는 것을 나타낸다. 따라서, 비정상적인 성장은 암, 양성 종양(benign tumours)을 나타낼 수 있고, 과도한 세포 성장은 광선 각화증(actinic keratosis), 사마귀(warts) 및 기태(moles) 등과 같은 피부병을 나타낼 수 있다. 방법이 적용될 수 있는 암은 두경부암, 담관암, 뇌암, 흑색종, 피부 전이 (다른 암으로부터), 폐암, 중피종(mesothelioma), 췌장암, 위암, 직장암, 항문암(anal cancer), 음경암, 외음암(vulva cancer) 및 식도암(oesophageal cancer)을 포함한다. 따라서, 약제는 암을 치료하는데 사용될 수 있다. 내재화될 분자가 사용되는 경우, 이것은 항암 화학요법제일 수 있다.

- [0181] 내재화될 분자가 유전자, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA 분자일 경우, 비정상적으로 상승된 또는 억제된 유전자 발현은 상기 피험자에서 하나 이상의 표적 유전자의 발현을 변경함으로써 치료될 수 있다. 바람직하게는, 상기 약제는 유전자 치료, 즉 비정상적 유전자 발현에 의해 특징을 나타내고 또는 하나 이상의 유전자의 억제로부터 혜택을 받을 질환, 장애 또는 감염의 예방 또는 치료를 위한 것이다. 상기 변경은 상기 발현의 하향 조절을 포함한다.
- [0182] PCI 방법이 사용되는 경우, 화합물 (또는 본 발명의 조성물) 및 내재화될 분자는 동시에 또는 순차적으로 환자 (또는 피험자)의 세포 또는 조직과 접촉될 수 있고, 상기 세포는 상기 화합물의 광감제를 활성화시키는데 효과적인 파장의 빛으로 조사되고, 조사는 상기 광감제를 함유하는 세포내 구획으로 상기 화합물 및 분자의 세포 흡수 전, 동안 또는 후에, 바람직하게는 임의의 세포내 구획으로 상기 전이 분자의 세포 흡수 전에 수행된다.
- [0183] 또한, 피험자에게 투여된 세포가 처리되는 방법이 고려된다. 따라서, 대안적인 측면에서, 본 발명은 상기 피험자에 상기 세포를 투여하는 것이 필요한 경우 (즉, 감염이 *in vitro* 또는 *ex vivo*에서 수행되는 경우), 상기 기재된 바와 같은 방법에 따라 *in vitro*, *in vivo* 또는 *ex vivo*에서 하나 이상의 세포로 본 발명의 화합물 (또는 조성물) 및 임의로 내재화될 분자를 도입하는 단계를 포함하는 피험자에게서 질환, 장애 또는 감염의 예방 또는 치료 방법을 제공한다. 따라서, 생성된 세포는 상기 기재된 바와 같이 치료에서 또는 특정 용도를 위해 사용될 수 있다.
- [0184] 본 명세서에 나타난 바와 같이, 피험자는 동물, 바람직하게는 포유류 동물, 예를 들어 소, 말, 양, 돼지, 염소, 토끼, 고양이, 개, 특히 바람직하게는 인간이다.
- [0185] 본 명세서에 정의된 바와 같이, "치료"는 치료 전에 증상에 관하여, 치료받고 있는 질환, 장애 또는 감염의 하나 이상의 증상을 감소, 완화 또는 제거하는 것으로 나타낸다. "예방"은 질환, 장애 또는 감염의 증상의 시작을 지연 또는 예방하는 것으로 나타낸다.
- [0186] 또한, 본 발명의 조성물은 본 발명의 방법에 의해 상기 세포의 세포질로 내재화된 분자를 함유하는 세포를 포함할 수 있다. 본 발명은 치료에서, 특히 암 또는 유전자 치료에서 사용하기 위한 이러한 조성물로 더 확장한다.
- [0187] 따라서, 본 발명의 또 다른 측면은 상기 세포의 세포질로 내재화된 분자를 함유하는 세포 또는 세포 집단을 제공하며, 세포는 본 발명의 방법에 의해 얻어질 수 있다.
- [0188] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 기재된 바와 같은 치료에서, 바람직하게는 암 또는 유전자 치료에서 사용하기 위한 조성물 또는 약제의 제조를 위한 이러한 세포 또는 세포 집단의 용도를 제공한다.
- [0189] 또한, 본 발명은 상기 환자에 세포 또는 본 발명의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 환자의 예방 또는 치료 방법, 즉 상기 기재된 바와 같은 세포에 분자를 도입하는 단계 및 이렇게 제조된 상기 세포를 상기 환자에 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 상기 방법은 암의 치료를 위해 또는 유전자 치료에서 (또는 하기 기재된 바와 같이 예방 접종을 위해) 사용된다.
- [0190] *In vivo*, 기술분야에서 보통 또는 표준의 임의의 투여 방법, 예를 들어, 주사, 주입, 국소투여, 경피 투여가 내부 및 외부 신체 표면 등에 사용될 수 있다. *in vivo* 사용의 경우, 본 발명은 고체 조직 뿐만 아니라 체액 위치를 포함하여, 화합물 또는 내재화될 분자를 함유하는 광감제가 위치하는 곳에 세포를 함유하는 임의의 조직에 대하여 사용될 수 있다. 광감제가 표적 세포에 의해 흡수되는 한, 모든 조직은 처리될 수 있고, 빛은 적당히 전달될 수 있다.
- [0191] 따라서, 본 발명의 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 희석제, 담체 또는 부형제를 이용하여 제약 기술분야에서 알려진 기술 및 방법에 따라 임의의 편리한 방법으로 제형화될 수 있다. 본 명세서에 나타난 바와 같이, "약학적으로 허용가능한"은 수용자에게 생리학적으로 허용가능한 뿐만 아니라 조성물의 기타 성분과 조합되는 성분을 나타낸다. 조성물의 성질 및 담체 또는 부형제 물질, 복용량 등은 선택 및 원하는 투여 경로, 치료의 목적 등에 따라 일상적인 방법으로 선택될 수 있다. 복용량도 마찬가지로 통상적인 방법으로 결정될 수 있으며, 분자의 성질, 치료 목적, 환자의 나이, 투여 방법 등에 의존할 수 있다. 광감제와 관련하여, 조사시 막을 파괴하려는 잠재력/능력도 고려하여야 한다.
- [0192] PCI 방법이 세포의 표면에서 항원을 제시하거나 또는 발현하기 위해 사용될 수 있는 것처럼, 본 발명의 화합물 및 조성물의 추가 용도는 예방접종 프로토콜에 있다. 따라서, PCI에 의해 세포의 세포질로 내재화될 분자의 수송 및 방출 후에, 세포의 외부, 즉 세포 표면 위에 제시될 수 있는 표면으로 수송될 수 있다. 이 방법은 면역 반응을 유도하고, 용이하게 하고 또는 증가시키기 위하여, 백신 성분, 즉 항원 또는 면역원을 표면 위에 제시하

기 위한 세포로 도입시킬 수 있는 예방접종 분야에서 특히 유용하다.

- [0193] 따라서, 본 발명은 세포, 바람직하게는 항원-제시 세포의 표면 위에서 항원 분자 (예를 들어, 항원) 또는 이의 일부를 발현하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 바와 같은 화합물 및 방법을 이용하여 PCI에 의해 세포의 세포질로 분자를 도입하는 단계를 포함하며, 상기 분자, 또는 이의 일부는 나중에 상기 세포의 표면 위에 제시된다.
- [0194] 대안적으로 표현하면, 본 발명은 상기 세포를 상기 항원 분자 및 본 명세서에 정의된 바와 같은 화합물과 접촉시키는 단계, 및 화합물의 광감제를 활성화시키는데 효과적인 파장의 빛으로 세포를 조사하는 단계를 포함하는 세포의 표면 위에 항원 분자 또는 이의 일부를 발현하는 방법을 제공하며, 상기 항원 분자는 세포의 세포질로 방출되며, 면역 반응을 자극하기에 충분한 크기의 항원 분자 또는 이의 일부는 세포의 표면 위에 제시된다.
- [0195] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "발현하는(expressing)"은 분자의 적어도 일부가 세포 주변의 환경에 노출되고 접근하기 쉽도록 상기 세포의 표면 위에 항원 분자 또는 이의 일부의 존재를 나타낸다. "표면" 위에서 발현은 발현될 분자가 세포막 및/또는 막에 존재하거나 또는 존재하는 것으로 야기될 수 있는 구성성분과 접촉하는 것으로 이루어질 수 있다.
- [0196] 이러한 항원 제시는 면역 반응, 바람직하게는 상기 항원 분자 또는 이의 일부를 포함 또는 함유하는 개체(entity)에 의해 차후의 도전에 대한 보호를 부여하는 면역 반응의 자극을 유리하게 야기할 수 있고, 그 결과 본 발명은 예방 접종 방법으로서 특히 유용함을 발견한다.
- [0198] 특히, 본 발명의 이 측면은 세포의 표면 위에서 항원 분자 또는 이의 일부를 발현하는 방법을 제공하며, 상기 방법은
- [0199] 상기 세포를 상기 항원 분자 및 본 발명의 화합물과 접촉시키는 단계, 여기서 상기 분자 및 상기 화합물은 상기 세포의 세포내 막-제한된 구획으로 각각 흡수되며; 및
- [0200] 상기 세포내 구획의 막이 파괴되어, 세포의 사멸 없이, 상기 분자를 세포의 세포질로 방출하도록, 화합물의 광감제를 활성화시키는데 효과적인 파장의 빛으로 상기 세포를 조사하는 단계를 포함하며,
- [0201] 상기 방출된 항원 분자 또는 이의 일부는 나중에 상기 세포의 표면 위에 제시된다.
- [0202] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "파괴된(disrupted)" 구획은 그것 안에 함유된 항원 분자의 방출을 허용하는데 충분한, 영구적으로 또는 일시적으로 구획의 막의 완전한 상태의 파괴를 나타낸다.
- [0204] 대안적인 관점에서, 본 발명의 이 측면은 피험자의 질환, 장애 또는 감염을 예방 또는 치료하기 위해, 바람직하게는 면역 반응을 발생 또는 자극하기 위해, 바람직하게는 예방접종 방법을 위해, 세포의 표면 위에서 항원 분자 또는 이의 일부를 발현하는데 사용하기 위한 화합물 또는 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 바람직하게는 항원 분자 및 본 발명의 화합물을 포함한다. 바람직하게는, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능하며, 또한 상기 기재된 바와 같은 약학적으로 허용가능한 부형제, 담체 또는 희석제를 함유한다. 바람직하게는, 상기 예방 또는 치료는 본 명세서에 기재된 방법을 이용하여 이루어진다.
- [0205] 다른 측면에서, 본 발명은 피험자의 질환, 장애 또는 감염을 예방 또는 치료하기 위해, 바람직하게는 면역 반응을 발생 또는 자극하기 위해, 바람직하게는 예방접종 방법을 위해, 세포의 표면 위에서 상기 항원 분자 또는 이의 일부를 발현하는데 사용하기 위한 약제의 제조에서 항원 분자 및/또는 본 발명의 화합물의 용도를 제공한다. 바람직하게는, 상기 예방 또는 치료는 본 명세서에 기재된 방법을 이용하여 이루어진다. 상기 항원 분자 및 본 발명의 화합물의 투여에 의한 상응하는 예방 또는 치료 방법도 제공된다.
- [0206] 본 발명의 또 다른 측면은 피험자의 질환, 장애 또는 감염을 예방 또는 치료하기 위해, 바람직하게는 면역 반응을 자극하기 위해, 세포의 표면 위에서 상기 항원 분자 또는 이의 일부를 발현하는데 동시, 별도 또는 순차적으로 사용하기 위한 조합 제제로서 항원 분자 및 본 발명의 화합물을 포함하는 제품을 제공한다.
- [0207] 본 발명의 또 다른 측면은 세포의 표면 위에서 항원 분자 또는 이의 일부를 발현하는데 사용하기 위한 키트를 제공하며, 상기 키트는
- [0208] 상기 항원 분자를 함유하는 제 1 용기; 및

- [0209] 본 발명의 화합물을 함유하는 제 2 용기를 포함한다.
- [0211] 본 발명에서, 항원 분자는 적당한 방법으로 면역 체계에 제시되는 경우, 분자 또는 이의 일부가 면역 반응을 자극할 수 있는 임의의 분자일 수 있다. 유리하게, 따라서 항원 분자는 개체를 함유하는 폴리펩티드와 같은 백신 항원 또는 백신 성분일 것이다.
- [0212] 많은 이러한 항원 또는 항원 백신 성분은 기술분야에서 알려져 있으며, 모든 종류의 세균 또는 바이러스 항원 또는 실제 항원 또는 원생동물 또는 고등 생물을 포함하여 임의의 병원성 종(pathogenic species)의 항원 성분을 포함한다. 전통적으로 백신의 항원 성분은 모든 생물 (살아있는, 죽은 또는 약화된), 즉 모든 세포 백신으로 구성되며, 또한 소단위(sub-unit) 백신, 즉 생물의 특정 항원 성분을 기준으로 한 백신, 예를 들어 단백질 또는 펩티드, 또는 심지어 탄수화물은 광범위하게 연구되고 문헌에 보고되었다. 이러한 "소단위"-계 백신 성분은 본 발명에 따른 항원 분자로서 사용될 수 있다.
- [0213] 그러나, 본 발명은 펩티드 백신 분야에서 특히 유용함을 발견한다. 따라서, 본 발명에 따른 바람직한 항원 분자는 펩티드이다 (짧고 긴 길이의 펩티드, 즉 펩티드, 올리고펩티드 또는 폴리펩티드, 및 단백질 분자 또는 이의 단편, 예를 들어 5-500, 예를 들어 10 내지 250의 펩티드, 예컨대 15 내지 75, 또는 8 내지 25 아미노산을 포함하는 것으로 본 명세서에 정의됨). 제시되거나 또는 발현된 항원 분자의 일부는 바람직하게는 세포 내에서 항원-처리 기작에 의해 발생된 부분을 포함한다. 그러나, 부분은 적당한 항원 설계 (예를 들어, pH 민감성 밴드)를 통해 또는 다른 세포 처리 수단을 통해 이루어질 수 있는 다른 수단에 의해 발생될 수 있다. 편리하게 이러한 부분은 면역 반응을 발생시키기에는 충분한 크기이며, 예를 들어, 펩티드의 경우 5 이상, 예를 들어 10 또는 20 이상의 아미노산 크기이다.
- [0214] AIDS/HIV 감염 또는 인플루엔자, 개 파보바이러스(canine parvovirus), 소 백혈병 바이러스(bovine leukaemia virus), 간염 등과 같은 바이러스 질환 및 감염의 치료에서 많은 펩티드 백신 후보는 문헌에 제시되었다 (참조, 예를 들어 Phanuphak et al., Asian Pac. J. Allergy. Immunol. 1997, 15(1), 41-8; Naruse, Hokkaido Igaku Zasshi 1994, 69(4), 81 1-20; Casal et al., J. Virol., 1995, 69(11), 7274-7; Belyakov et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95(4), 1709-14; Naruse et al., Proc. Natl. Sci. USA, 1994 91 (20), 9588-92; Kabeya et al., Vaccine 1996, 14(12), 1118-22; Itoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83(23) 9174-8). 유사하게, 세균성 펩티드는 실제로 다른 생물 또는 종으로부터 유래된 펩티드 항원일 수 있는 것처럼 사용될 수 있다.
- [0215] 병원성 생물로부터 유래된 항원 이외에, 펩티드도 암 또는 다발성 경화증과 같은 다른 질환에 대한 백신으로서 사용이 제시되었다. 예를 들어, 돌연변이체 종양유전자(oncogene) 펩티드는 세포독성 T-림프구의 자극에서 항원을 작용하는 암 백신으로서 전망이 밝다 (Schirmacher, Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 1995, 121, 443-451; Curtis Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers, 1997, 17, 316-327). 또한, 합성 펩티드 백신은 전이성 흑색종의 치료에 대해 평가되었다 (Rosenberg et al., Nat. Med. 1998, 4(3), 321-7). 다발성 경화증의 치료에 대한 T-세포 수용체 펩티드 백신은 Wilson et al., J. Neuroimmunol. 1997, 76(1-2), 15-28에 기재된다. 이러한 펩티드 백신 성분은 실제로 문헌에서 펩티드 백신으로서 기재되거나 또는 제시된 펩티드들 중 어느 것일 수 있는 것처럼, 본 발명의 항원 분자로서 사용될 수 있다. 따라서, 펩티드는 합성 또는 분리된 또는 다른 방법으로 생물로부터 유래될 수 있다.
- [0216] 본 발명의 방법, 용도 등에 적용된 세포는 이의 세포질로 투여 또는 수송된 분자의 표면 위에서 발현, 또는 제시될 수 있는 임의의 세포일 수 있다.
- [0217] 세포는 편리하게 면역 효과세포(immune effector cell), 즉 면역 반응에 관련된 세포이다. 그러나, 다른 세포들도 면역 체계에 항원을 제시할 수 있고, 이들도 본 발명의 범위 내에 있다. 따라서, 본 발명에 따른 세포는 유리하게 항원-제시 세포이다. 항원-제시 세포는 임의의 측면에 포함될 수 있거나 또는 체액성 (humoral) 및 세포-매개 면역을 포함하는 면역 반응의 "팔(arm)", 예를 들어 항체 생산의 자극, 또는 세포독성 또는 살해세포(killer cell)의 자극일 수 있고, 이들의 표면에서 "외부(foreign)" 항원을 발현하는 세포를 인식하고 파괴 (또는 다른 방법으로 제거)할 수 있다. 따라서, 용어 "면역 반응을 자극하는"은 이들을 자극하기 위한 모든 유형의 면역 반응 및 매커니즘을 포함한다.
- [0218] 세포독성 세포 또는 항체-생산 세포의 자극은 항원-제시 세포, 예를 들어 MHC 클래스 I 제시 (예를 들어, CD8⁺ 세포독성 T-세포의 활성화는 MHC-1 항원 제시가 필요하다)에 의한 특정 방법으로 자극될 세포에 제시될 항원이

필요하다.

- [0219] 항원-제시 세포는 기술분야에서 알려져 있으며, 문헌에 기재되어 있고, 림프구 (T 및 B 세포 둘 다), 수지상 세포, 대식세포 등을 포함한다. 다른 것들은 암 세포, 예를 들어 흑색종 세포를 포함한다.
- [0220] 세포독성 T-세포(cytotoxic T-cell, CTL)에 항원-제시 세포에 의한 항원 제시의 경우, 항원 분자는 항원-제시 세포의 세포질로 들어가는 것이 필요하다 (Germain, Cell, 1994, 76, 287-299). 본 발명은 세포질로 항원 분자의 전달의 효율적인 수단을 제공한다.
- [0221] 일단 광화학 내재화 방법에 의해 세포의 세포질로 방출되면, 항원 분자는 세포의 항원-처리 기작에 의해 처리될 수 있고, 그리고 적당한 방법, 예를 들어 클래스 I MHC에 의해 세포 표면 위에 제시될 수 있다. 이러한 처리는 항원의 분해, 예를 들어 펩티드로 단백질 또는 폴리펩티드 항원의 분해를 포함할 수 있고, 그 다음 펩티드는 제시를 위해 MHC의 분자와 혼성된다. 따라서, 본 발명에 따른 세포의 표면 위에서 발현되거나 또는 제시된 항원 분자는 내재화 (세포내 이입)되는 항원 분자의 일부 또는 단편일 수 있다.
- [0222] 항원은 세포내 이입으로 항원-제시 세포에 의해 흡수될 수 있고, 세포내 이입 소포(endocytic vesicles)에서 펩티드로 분해될 수 있다. 이러한 펩티드는 엔도솜 내 MHC 클래스 II 분자에 결합할 수 있고, 펩티드-MHC 클래스 II 복합체가 CD4+ T 헬퍼 세포에 의해 인식될 수 있는 세포 표면으로 수송될 수 있고, 면역 반응을 유도할 수 있다. 대안적으로, 세포질 내 단백질은 프로테아좀(proteasomes)에 의해 분해될 수 있고, 펩티드가 MHC 클래스 I 분자에 결합할 수 있는 TAP(transporter associated with antigen presentation)의 수단에 의해 소포체(endoplasmic reticulum)로 수송될 수 있으며, 세포 표면으로 수송될 수 있다 (Yewdell and Bennink, 1992, Adv. Immunol. 52: 1-123). 만일 펩티드가 외부 유래 항원이면, 펩티드-MHC 클래스 I 복합체는 CD8+ 세포독성 T-세포 (CTLs)에 의해 인식될 것이다. CTLs은 펩티드-MHC (HLA) 클래스 I 복합체에 결합함으로써 활성화되고, 증식을 시작하고 CTLs의 클론(clone)을 형성할 것이다. 세포 표면 위에서 동일한 펩티드-MHC 클래스 I 복합체와 함께 표적 세포 및 다른 표적 세포들은 CTL 클론에 의해 사멸될 수 있다. 만일 충분한 양의 항원이 세포질로 도입될 수 있다면 외부 항원에 대한 면역는 확립될 수 있다 (Yewdell and Bennink, 1992, supra; Rock, 1996, Immunology Today 17: 131-137). 이것은 그 중에서도 암 백신의 개발의 기반이 된다. 가장 큰 현실적인 문제들 중 하나는 충분한 양의 항원 (또는 항원의 일부)을 세포질로 도입하는 것이다. 이것은 본 발명에 따라 해결될 수 있다.
- [0223] 이러한 방법은 상기 기재된 바와 같이 *in vitro* 또는 *in vivo*에서 사용될 수 있다.
- [0224] 따라서, 본 발명의 다른 측면은 세포 표면 위에서 항원 분자 또는 이의 일부를 발현하는 항원-제시 세포를 제공하며, 세포는 상기 정의된 바와 같은 방법에 의해 얻어질 수 있다 (또는 얻어진다). 본 발명의 다른 측면은 이러한 세포의 집단 또는 배양물, 특히 이러한 세포의 생존할 수 있고 기능적으로 온전한 집단 또는 배양물을 제공하고, 또한 치료에서, 특히 면역 반응을 자극하기 위해, 특히 CTLs를 자극하기 위해, 이러한 세포 (또는 세포의 집단 또는 배양물)의 용도를 제공한다.
- [0225] 또한, 본 발명은 면역 반응을 자극하기 위해, 특히 CTLs를 자극하기 위해, 약제 (예를 들어, 백신 조성물)의 제조를 위한 이러한 세포 (또는 세포의 집단 또는 배양물)의 용도를 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0226] 본 발명은 지금 하기 도면을 참조하여 하기의 비-제한적인 실시예에서 더 상세히 기재할 것이다:

도 1은 본 발명의 특히 바람직한 화합물을 나타낸다 (TPC = 테트라페닐클로린).

도 2는 반응식 1을 나타낸다: 화합물 5의 합성에 대한 합성 경로. 시약 및 조건: (a) 프로피온산, 환류, 1 h (20%); (b) NaNO_2 (1.8 eq), TFA, rt, 3min. 67%); (c) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, conc. HCl, 60°C, 1 h (88%); (d) 브로모아세틸 브로마이드, Et_3N , CH_2Cl_2 , rt, 1 h (64%) (e) 피페라진, CH_2Cl_2 , rt, 1 h (94%).

도 3은 반응식 2를 나타낸다: N-변형된 키토산 유도체 (TPP-CS- TMA & TPP-CS-MP)의 합성. 여기서 A는 1st 배치 화합물(batch compounds)을 나타내고, B는 2nd 배치 화합물을 나타낸다. 시약 및 조건: (a) $\text{MeSO}_3\text{H}/\text{H}_2\text{O}$, 10°C-rt, 1 h, (90%); (b) TBDMSCl, 이미다졸, DMSO, rt, 24h (96%); (c) 브로모아세틸 브로마이드, Et_3N , CH_2Cl_2 , -20°C, 1 h (92%); (d) 화합물 5, 즉 TPP-NH-Pip (0.1 또는 0.25 eq), Et_3N , CHCl_3 , rt, 2h (92-90%); (e)

NMe₃ 또는 1-메틸 피페라진, CHCl₃, rt, 24h; (f) TBAF, NMP, 55°C, 24h 또는 conc. HCl/MeOH, rt, 24h.

도 4는 TPP_{p0.1}-CS-MP_{0.9} (18A)의 합성에서 모든 중간체 및 최종 화합물의 대표적인 FT-IR 스펙트럼 오버레이를 나타낸다: (A) TPP-NH-Pip 5; (B) BrA-DiTBDMSC-C 9; (C) TPP_{p0.1}-CH₂CO-DiTBDMSC-C 10A; (D) TPP_{p0.1}-DiTBDMSC-CS-MP_{0.9} 14A; (E) TPP_{p0.1}-CS-MP_{0.9} 18A.

도 5는 TPP_{p0.1}-CS-MP_{0.9} (18A)의 합성에서 모든 중간체 및 최종 화합물의 대표적인 ¹H NMR 스펙트럼 오버레이를 나타낸다: (A) DiTBDMSC-C 8; (B) BrA-DiTBDMSC-C 9; (C) TPP_{p0.1}-CH₂CO-DiTBDMSC-C 10A; (D) TPP_{p0.1}-DiTBDMSC-CS-MP_{0.9} 14A; (E) TPP_{p0.1}-CS-MP_{0.9} 18A.

도 6은 물:CHCl₃ 2상계(two phase system)에 용해된 화합물의 분배를 나타낸다. (A) TPP(*p*-NH₂)₁ 3 (B) TPPNH-Pip 5 (C) TPP_{p0.25}-CS-TMA_{0.75} 17A (D)TPP_{p0.25}-CS-MP_{0.75} 19A. 수상은 꼭대기에 나타난다.

도 7은 TPP_{p0.25}-CS-TMA_{0.75} (17B) & TPP_{p0.25}-CS-MP_{0.75} (19B)의 대표적인 최종 화합물의 고체 상태 ¹³C NMR 스펙트럼을 나타낸다.

도 8은 (I) 용매 내 TPP_{p0.25}-CS-TMA_{0.75} 17B의 ¹H NMR 스펙트럼: (A) DMSO-d₆: D₂O (98:2); (B) DMSO-d₆: D₂O (75:25); (C) DMSO-d₆: D₂O (50:50); (D) DMSO-d₆: D₂O (25:75); (E) DMSO-d₆: D₂O (0:100); (II) 공-용매 내 일정한 농도 (0.3mg/L)에서 TPP_{p0.25}-CS-TMA_{0.75} 17B의 UV-vis. 흡수 스펙트럼 오버레이: (A) DMSO: H₂O (100:0); (B) DMSO: H₂O (75:25); (C) DMSO: H₂O (50:50); (D) DMSO: H₂O (25:75); (E) DMSO: H₂O (0:100); (III) 공-용매 내 419 nm (3-3 slit)에서 여기될 때 일정한 흡광도 (0.85-0.90; 데이터 나타내지 않음)에서 TPP_{p0.25}-CS-TMA_{0.75} 17B의 UV-vis. 형광 방출 스펙트럼 오버레이: (A) DMSO: H₂O (100:0); (B) DMSO: H₂O (75:25); (C) DMSO: H₂O (50:50); (D) DMSO: H₂O (25:75); (E) DMSO: H₂O (0:100)를 나타낸다.

도 9는 (A) TPP-CS-TMA 분리된 나노입자의 SEM 영상 (B) TPP-CS-TMA 수지상 나노응집체의 SEM 영상 (C) TPP-CS 유도체의 접촉각의 그래프를 나타낸다.

도 10은 반응식 3을 나타낸다 - 화합물 1, 3, 20 및 21의 합성 반응식. 반응 조건: ((a) 프로피온산, 환류, 1 h, (20%); (b) NaNO₂ (1.8 eq.), TFA, rt, 3min.; (c) SnCl₂ · 2H₂O, conc. HCl, 60°C, 1 h, (54%); (d₁) *p*-톨루엔설폰닐히드라지드, K₂CO₃, 피리딘, 환류, 24h; (d₂) *o*-클로라닐, CH₂Cl₂, rt, (80%); (e) 클로로아세틸 클로라이드, Et₃N, CH₂Cl₂, rt, 2h, 인시츄-(f) 피페라진, CH₂Cl₂, rt, 12h, (61%). 화합물 20 및 21의 모든 유도체는 TPCa₁ 및 TPCa₂ 이성질체를 함유할 것이다. 그러나, TPCa₁ 구조만 반응식 및 구조 그림에 나타낸다.

도 11은 반응식 4를 나타낸다 - 화합물 22-28의 합성 반응식. 반응 조건: (a) 아세틸 클로라이드, MeOH, 환류, 24h, (87%); (b) BF₃ · Et₂O, CHCl₃, rt, *p*-클로라닐, 48h, (14%); (c) 2N KOH (in MeOH), THF:피리딘 (10:1), 환류, 24h (71%); (d) *p*-톨루엔설폰닐히드라지드, K₂CO₃, 피리딘, 환류, 24h; (d₂) *o*-클로라닐, CH₂Cl₂: MeOH (75:25), rt, (70%); (e) EDCI · HCl, HOBT, Et₃N, N-Boc-피페라진 5, DMF, rt, 24h (54%) (f) TFA, CH₂Cl₂, rt, 1 h (89%). 화합물 26-28의 모든 유도체는 TPCc₁ 및 TPCc₂ 이성질체를 함유할 것이다. 그러나, TPCc₁ 구조만 반응식 및 구조 그림에 나타낸다.

도 12는 반응식 5를 나타낸다 - 화합물 7-9의 합성. 시약 및 조건: (a) MeSO₃H/ H₂O, 10°C-rt, 1 h, (90%); (b) TBDMSCl, 이미다졸, DMSO, rt, 24h, (96%); (c) 브로모아세틸 브로마이드, Et₃N, CH₂Cl₂, -20°C, 1 h, (92%).

도 13은 반응식 6A 및 6B를 나타낸다. 시약 및 조건 (6A) : (a) 화합물 21, 즉 TPC-NH-Pip (0.1 eq), Et₃N, CHCl₃, rt, 2h (78%) (b) NMe₃ 또는 1-메틸 피페라진, CHCl₃, rt, 24h. 시약 및 조건 (6B) : (a) 화합물 28, 즉 TPC-CO-Pip (0.1 eq), Et₃N, NMP, 75°C, 12h (89%) (b) NMe₃ 또는 1-메틸 피페라진, CHCl₃, rt, 24h.

도 14는 CDCl_3 내 TPC-CO-Pip (28)의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸다. 2개의 이성질체를 나타낸다.

도 15는 CDCl_3 내 화합물 21 (TPC-NH-Pip)의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸다 (2개의 이성질체를 나타낸다).

도 16은 CDCl_3 내 화합물 29의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸다. 이 화합물은 TPCa_1 및 TPCa_2 이성질체를 함유한다.

도 17은 CDCl_3 내 화합물 34의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸다. 이 화합물은 TPCc_1 및 TPCc_2 이성질체를 함유한다.

도 18은 d_6 -DMSO/ D_2O 내 최종 전달체 화합물 (37, 38, 32 및 33)의 NMR 스펙트럼을 나타낸다.

도 19는 HCT116/LUC 세포에서 pEGFP-N1으로 형질주입을 나타낸다. 형질주입은 조명 후 48 h에 유세포 분석기로 측정하였다. 세포 생존은 MTT 어세이로 측정하였다. (a) 16A. $0.1 \mu\text{g/ml}$ TPP. (b) 16B. $0.1 \mu\text{g/ml}$ TPP. (c) 17A. $0.01 \mu\text{g/ml}$ TPP. (d) 19A. $0.01 \mu\text{g/ml}$ TPP. (e) TPCS_{2a} . $0.1 \mu\text{g/ml}$.

도 20은 HCT116/LUC 세포에서 pEGFP-N1으로 형질주입을 나타낸다. 형질주입은 조명 후 48 h에 유세포 분석기로 측정하였다. 세포 생존은 MTT 어세이로 측정하였다. (a) 화합물 37. $0.05 \mu\text{g/ml}$ TPC. (b) 화합물 38. $0.05 \mu\text{g/ml}$ TPC. (c) 화합물 32. $0.05 \mu\text{g/ml}$ TPC. (d) 화합물 33. $0.05 \mu\text{g/ml}$ TPC. (e) TPCS_{2a} . $0.1 \mu\text{g/ml}$.

도 21은 HCT116/LUC 세포에서 pEGFP-N1으로 형질주입을 나타낸다. 형질주입은 조명 후 48 h에 유세포 분석기로 측정하였다. 세포 생존은 MTT 어세이로 측정하였다. 화합물 54를 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 사용하였다.

도 22는 키토산-컨쥬게이트 및 블레오마이신으로 종양-보유 동물의 PCI 처리 후 *in vivo* 생체발광 영상을 나타낸다. 동물은 실시예 3의 물질과 방법 부문에 기재된 바와 같이 처리하였다. 각 동물의 처리 및 영상 시점 (광 감제 주입 다음날)을 표시하였다.

도 23은 화합물 37, 38 또는 33 및 블레오마이신으로 종양-보유 동물의 PCI 처리 후 종양의 성장을 나타낸다. 동물은 실시예 3의 물질과 방법에 기재된 바와 같이 처리하였다. PS: 광감제.

도 24는 반응식 7을 나타낸다 - 테길화(TEGylation) 및 페길화(PEGylation)에 대한 시약의 합성. 반응 조건: (a) KOH, p-TsCl, THF/ H_2O , rt, 12h; (b) 피페라진, CH_3CN , rt, 12h, (41%); (c) Swern 산화: $(\text{COCl})_2$, CH_2Cl_2 , DMSO, Et_3N , -78°C .

도 25는 반응식 8을 나타낸다 - DiTBDS-키토산의 테길화. 시약 및 조건: (a) MeSO_3H / H_2O , 10°C -rt, 1 h, (90%); (b) TBDMSCl, 이미다졸, DMSO, rt, 24h (96%); (c) TEG-OTs 42, Cs_2CO_3 , NMP, KI, 50°C , 24h; (d) HCl/ MeOH (30% v/v), rt, 24h; (e) 브로모아세틸 브로마이드, Et_3N , CH_2Cl_2 , -20°C , 1 h (92%), (f) TEG-Pip 46 Et_3N , CH_2Cl_2 , rt, 24h; (g) HCl/ MeOH (30% v/v), rt, 24h.

도 26은 반응식 9를 나타낸다 - 테길화된 키토산-TPP 컨쥬게이트의 합성. 시약 및 조건: (a) 브로모아세틸 브로마이드, Et_3N , CH_2Cl_2 , -20°C , 1 h (92%), (b) TPP-NH-Pip 5 (0.1 eq.), CH_2Cl_2 , Et_3N , rt, (c) TEG-PIP (화합물 46) (2 eq.), CH_2Cl_2 , Et_3N , rt, 24h (d) 30% (v/v) HCl in MeOH, rt, 12h; (e) 화합물 4 (0.25 eq.), NMP, 50°C , Cs_2CO_3 , 24h; (f) TEG-모노에틸에테르-토실레이트 (화합물 42), NMP, 50°C , KI, 24h (g) 30% (v/v) HCl in MeOH, rt, 12h.

도 27은 화합물 54의 ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$: D_2O , 96:4)을 나타낸다.

도 28은 화합물 32 (A) 및 38 (B) 및 오브알부민-특이적 (OVA 257-264) CD8+ T 세포 클론(clone)과 함께 설정되는 항원-특이적 T 세포 내 오브알부민 OVA 257-264 펩티드 항원과 함께 배양된 쥐의(murine) 일차 대식세포에서 IL-2 생성을 나타낸다. 활성화된 CD8+ T 세포로부터 IL-2 생성은 ELISA로 분석하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0227] 실시예 1 - *meso*-테트라페닐포피린-키토산계 나노전달체의 합성

[0229] 7 단계 과정에서, 출발물질로서 3,6-디-*O*-*tert*-부틸디메틸실릴-키토산 (DiTBDMS-CS) 및 5-(*p*-아미노페닐)-10,15,20-트리페닐포피린 [TPP(*p*-NH₂)₁]으로부터 광감제 *meso*-테트라페닐포피린 (TPP)과 결합된 고도의 수용성 키토산 나노전달체를 합성하였다. DiTBDMS-CS는 CH₂Cl₂에서 고도로 가용성이므로, 고도의 친유성 광감제는 정량적 반응에 도입되어 0.1 및 0.25 치환도를 제공할 수 있다. 이것은 최종 탈보호화된 전달체의 수용해도를 증가시키기 위하여 고분자 백본 위에 트리메틸암모늄일 (trimethylammoniumyl) 및 1-메틸피페라지닐 기를 도입하였다. 방법은 고도로 재현가능하고, 얻어진 물질은 고체 상태 NMR, FT-IR, 및 ¹H NMR로 완전히 특징지워질 수 있음을 나타내었다. UV-Vis, 형광 및 NMR 검사는 전달체가 반-고체 π -적층된 광감제의 코어와 함께 수용액에서 나노입자-유사 구조를 형성하는 역학 구조임을 나타내었다. 친유성 환경에서, 이러한 구조가 나타날 수 있고 따라서 광감제 부분은 세포막으로 삽입될 수 있을 것 같다.

[0231] 일반적인 물질 및 방법

[0232] 키토산 고분자는 Genis EHF, Iceland에 의해 제공되었으며, 합성에 사용되었다 [키토산 고분자 GO 30626-2 (95%DD, 95 cp)]. 모든 용매와 시약은 시판용으로 구입하였으며, 추가 정제없이 사용하였다. NMR 스펙트럼은 298 K에서 DRX 400 MHz Bruker NMR 분광계로 기록되었으며, 화학적 이동(chemical shifts)은 사용된 중수소화(deuterated) NMR 용매에 대하여 기록되었다 [¹H NMR: CDCl₃ (7.26 ppm), DMSO-d₆ (2.50 ppm); ¹³C NMR: CDCl₃ (77.16 ppm), DMSO-d₆ (39.52 ppm)]. 아세톤 피크 (2.22 ppm)는 용매로서 D₂O에 대해 내부 기준으로 사용되었다. 포피린의 페닐 고리 위에 있는 양성자 (*ortho*, *meta*, *para*)는 페닐 고리 위에 있는 치환기에 관하여 여가 아닌 포피린 고리계에 대해 이들의 위치에 관하여 확인되었다.

[0233] 화합물 17B 및 19B의 고체-상태 ¹³C NMR은 더럼 대학교(Durham University) 화학과로부터 얻었다. 이러한 스펙트럼은 ¹³C에 대해 100.56 MHz에서 작동하는 Varian VNMRs 분광계를 이용하여 얻었다. 교차-편광 매직-각 스피닝(Cross-polarization magic-angle spinning) 실험은 6 mm (회전자 o.d.) 프로브로 수행하였다. 스펙트럼은 1 ms 접촉 시간, 1.5 s 재순환 지연(recycle delay) 및 "TOSS" 스피닝 측파대 억압(spinning sideband suppression)과 함께 6.8 kHz의 회전 속도 (spin-rate)에서 기록되었다. 스펙트럼 기준은 아다만탄(adamantane)의 고주파 신호(high-frequency signal)를 38.5 ppm으로 맞춰 간접적으로 수행된 순수(neat) 테트라메틸실란의 외부 시료에 대하여다.

[0234] 질량 스펙트럼은 Bruker Autoflex III 또는 Bruker micrOTOF-Q11로 기록되었다. FT-IR 측정은 AVATAR 370 FT-IR 기기 (Thermo Nicolet Corporation, Madison, USA)로 수행되었다. 시료 (2-3mg)를 KBr과 함께 완전히 치대었다(kneaded). 시료를 Specac 압축기 (Specac Inc., Smyrna, USA)로 펠렛으로 압착하였다. 녹는점은 Buchi Melting Point B-540으로 기록하였다. 고분자 시료는 Spectra/Por Dialysis Membrane (MWCO: 3500)을 이용하여 투석하였다.

[0236] 흡수 및 정상-상태(steady-state) 형광 스펙트럼.

[0237] UV-Vis 측정은 Peltier Temperature Programmer가 장착된 Perkin-Elmer Lambda 25 UV-Vis 분광계로 기록되었다. 형광 방출 스펙트럼은 170-2200 nm (Spectrocell Corporation, Orelan, PA, USA)의 스펙트럼 범위 가진 세포를 이용하여, SPEX FluoroMax 분광계를 이용하여 얻어졌다. 10 mm 경로 길이를 갖는 석영 큐벳을 이용하여, 흡수 스펙트럼은 20℃에서 기록되었고, 형광 방출 스펙트럼은 주위 온도(ambient temperature)에서 기록되었다. 모든 형광 스펙트럼은 일정한 슬릿 너비(slits widths), 여기에 대해 1 nm 및 방출에 대해 1 nm로 기록되었고, 형광 스펙트럼은 양자 수율 연구를 위해 3개의 스캔을 평균하였다. 그러나, 도 5 (III) 형광 스펙트럼의 경우 여기에 대해 3 nm 및 방출에 대해 3 nm의 슬릿 너비로 얻어졌다.

[0238] 화합물 3, 5, 16A-19B (λ_{ex} = λ_{max} = 419 nm에서 모두 여기됨)의 형광 양자 수율은 하기 방정식을 이용한 정상-상태 비교 방법을 이용하여 무수 에탄올 (absolute ethanol)에서 표준 안트라센의 희석액 (Φ_F = 0.27, λ_{ex}

= 365.5 nm)에 대하여 측정되었다:

$$\Phi_X = \Phi_{ST} (\text{Grad}_X / \text{Grad}_{ST}) (\eta_X^2 / \eta_{ST}^2)$$

여기서, 첨자 ST 및 X는 각각 표준 및 시험을 나타내고, Φ 는 형광 양자 수율이며, Grad는 통합 형광 세기 (integrated fluorescence intensity) 대 흡광도의 플롯으로부터의 기울기이고, η 은 용매의 굴절률이다.

안정성 연구:

물리적 안정성 연구를 위해, **17A**를 H₂O (1 mg/mL)에 용해시키고, 30분 동안 초음파처리한 다음, (10분 동안 HERMLE Z-320 4000rpm으로 원심분리하고, 가만히 따른 다음(decanted), 알루미늄 호일로 포장하였다. UV-Vis 흡광도는 0-90일 동안 H₂O에서 λ_{max} = 419 nm에서 측정되었다.

¹H NMR에 의해 치환도(DS)의 측정.

TPP-NH-Pip의 치환도를 계산하기 위하여, 우리는 최종 화합물의 ¹H NMR을 사용하였다. 최종 화합물 **16A-19B**의 DS를 계산하기 위하여, 우리는 TPP 피크의 통합값(integration value) (TPP-NH-Pip 부분으로부터) 및 H-1 피크의 통합값 (키토산 부분으로부터)을 사용하였다. TPP의 적분 (방향족 영역으로부터 4개의 피크)을 검토하였고, H-1 기의 적분을 계산하였으며, 하기 방정식에서 사용하였다:

$$DS = \left(\int \text{Aromatic TPP peaks} / 27 \right) / \left(\int \text{H-1 peak} / 1 \right)$$

이 조건 하에, 고분자 백본은 부분적으로 HDO 피크에 의해 중첩되나 DS는 H-1 피크와 TPP 피크의 적분의 상대 비율로부터 우수한 정확성을 가지고 측정될 수 있다.

TPC-NH-Pip 및 TPC-CO-Pip의 DS를 계산하기 위하여, 우리는 중간체 화합물 **29 & 34**, 및 하기 방정식에서 TPC 피크의 통합값 (α -피롤 NH 피크 통합 뿐만 아니라 방향족 영역에서 TPC-NH-Pip 또는 TPC-CO-Pip로부터) 및 TBDMS 피크의 통합값 (키토산으로부터)을 사용하였다:

$$DS = \left(\int \text{Aromatic TPC peaks} + \alpha \text{ pyrrole NH peak} / 27 \right) / \left(\int \text{TBDMS peaks} / 30 \right)$$

다양한 키토산 유도체에 대해 테길화의 DS를 계산하기 위하여, 우리는 상응하는 ¹H NMR을 사용하였다. 우리는 키토산 백본에서 키토산의 H-1 피크의 통합값 및 (TEG의 말단 에틸 피크의) CH₃의 통합값을 고려하였다. 만일 치환도가 100%이면 -에틸 말단 삼중(triplet)에 대한 통합값은 3과 동일할 것이다. 따라서, 방정식은 하기와 같다:

$$DS (\%) = \left(\int \text{Ethyl peak (end triplet, CH}_3\text{)} / 3 \right) / \left(\int \text{H-1 peak} / 1 \right) * 100\%$$

SEM 및 타원편광분석기(Ellipsometry).

용액은 Class-100 무균실 환경(clean room environment)에서 종래의 스피너 (spinner)를 이용하여 본래의 실리콘 <100> 기판 (15 mm x 15 mm) 위에 1000 rpm으로 스핀-코팅하였다. 실리콘은 약 15 Å 두께의 자연 산화막 (native oxide) 층을 가진다. 또한, 10 μ L의 동일한 용액을 실리콘 기판 위에 직접 피젯팅하고 실온에서 자연건조시켰다. 코팅된 기판을 in-lens 검출기를 이용하여 10 keV 가속전압 및 2 mm 작동 거리에서 Zeiss LEO 1550

주사 전자 현미경으로 영상화하였다.

[0259] 물 접촉각(Water contact angle) 측정.

[0260] 물 접촉각은 KSV CAM 200 광 접촉각 미터 (KSV Instruments)를 이용하여 측정되었다. 5 μ l 탈이온수 방울을 실리콘 웨이퍼의 중앙에 떨어뜨리고, 물 접촉각을 Laplace & Young 방정식을 기준으로 하여 측정하였다. 측정은 실온 및 주위 습도 (ambient humidity)에서 수행하였다.

[0262] 합성

[0263] TPP-NH-Pip의 합성에 대해 도 2의 반응식 1 참조

[0264] Meso-테트라페닐포피린 (1). 문헌 방법에 따름 (Adler, *J Organic Chem* 1967, 32:476).

[0266] 5-(4-니트로페닐)-10,15,20-트리페닐포피린 [TPP(p-NO₂)₁] (2). 문헌 방법에 따름 (Luguya R *et al. Tetrahedron* 2004, 60:2757).

[0268] 5-(4-아미노페닐)-10,15,20-트리페닐포피린 [TPP(p-NH₂)₁] (3). 문헌 방법에 따름 (Luguya R *et al. Tetrahedron* 2004, 60:2757).

[0270] 5-(4 α -브로모아세틸아미도페닐)-10,15,20-트리페닐포피린 (4).

[0271] 화합물 3 (500mg, 0.793mmol)을 CH₂Cl₂ (15 mL)에 용해시키고 N₂ 대기 하에 교반하였다. 트리에틸아민 (0.24mL, 1.75mmol)을 가한 다음, rt에서 브로모아세틸 브로마이드 (0.097mL, 1.11 mmol)를 방울방울 가하고 1 h 동안 rt에서 계속 교반하였다. 반응 혼합물을 CH₂Cl₂ (45 mL)로 희석시키고, 물 (2 x 25 mL) 및 소금물 (20 mL)로 세척하였다. 유기층을 Na₂SO₄로 건조한 다음 진공 하에 농축시켰다. 조 생성물을, 용리액으로 CH₂Cl₂와 헥산을 사용하여, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여, 385mg (64%)의 원하는 생성물 4를 수득하였다. TLC (헥산/CH₂Cl₂ 3:7): R_f=0.17; FT-IR, ν cm⁻¹: 3313 (N-H), 3049,3019 (aryl C-H), 1687, 1594 (CONH), 1556, 1514, 1471, 1439, 1399, 1348, 1177, 1153, **964**, **798**, 726, **699**; ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.88-8.91 (m, 8H, β -pyrrole H), 8.41 (br s, 1H, TPPNHCO), 8.22-8.27 (m, 8H, tetraphenyl Ho), 7.91 (d, J = 8Hz, 2H, CONH-phenyl-Hm), 7.75-7.80 (m, 9H, triphenyl-Hm,p), 4.15 (s, 2H, COCH₂Br), -2.70 (br s, 2H, α -pyrrole NH) ppm; ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 163.78, 142.26, 139.20, 136.78, 135.25, 134.68, 131.23, 127.87, 126.83, 120.42, 120.38, 119.24, 118.34, 29.72 ppm; MS (ESI): *m/z* calcd. 4for C₄₆H₃₃BrN₅O ([M+H]⁺) 750.1863 found 750.1864; UV-vis (DMSO): λ_{max} : 417, 517, 542, 597, 650 nm.

[0273] 5-(4 α -피페라진아세틸아미도페닐)-10,15,20-트리페닐포피린 [TPP-NH-Pip] (5).

[0274] 화합물 4 (275mg, 0.366mmol) 및 과량의 피페라진 (158mg, 1.83mmol)을 CH₂Cl₂ (10 mL)에서 함께 혼합하고, N₂ 대기 하에 1 h 동안 rt에서 교반하였다. 반응 완료 후, 반응 혼합물을 CH₂Cl₂ (85 mL)로 희석시키고, 물 (2 x 40 mL) 및 소금물 (35 mL)로 세척하였다. 유기층을 Na₂SO₄로 건조한 다음 진공 하에 농축시켰다. 조 생성물을, 용리액으로 1:12 MeOH:CH₂Cl₂를 사용하여, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여, 자주색 고체로서 표제 화합물 5 (260mg, 94%)를 제공하였다. TLC (CH₂Cl₂/ MeOH, 9:1): R_f =0.15; FT-IR (KBr): ν 3442 (pip. NH), 3312 (aryl N-H), 3052, 3022 (aryl C-H), 2903, 2816 (aliphatic CH₂), 1691, 1596 (CONH), 1557, 1517,

1471, 1439, 1400, 1349, 1309, 1179, 1153, 1071, 1001, 965, 799, 728, 700 cm^{-1} ; ^1H NMR(CDCl_3): δ = 9.51 (br s, 1H, TPP-NHCO), 8.89-8.93 (m, 8H, β -pyrrole H), 8.23-8.26 (m, 8H, tetraphenyl Ho), 8.01 (d, J = 8.0 Hz, 2H, Pip-NH-phenyl-Hm), 7.75-7.81 (m, 9H, triphenyl-Hm,p), 3.31 (s, 2H, COCH₂-Pip.), 3.11 (t, 4H), 2.77 (br t, 4H), 2.60 (br s, 1H, piperazine NH), -2.71 (br s, α -pyrrole 2H) ppm; ^{13}C NMR (CDCl_3): δ = 168.75, 142.30, 138.26, 137.44, 135.33, 134.68, 131.26, 127.86, 126.83, 120.32, 119.66, 117.89, 62.87, 54.53, 46.24 ppm; MS (ESI): m/z calcd. for C₅₀H₄₂N₇O ([M+H]⁺) 756.3445 found 756.3467; UV-vis (DMSO): λ_{max} : 417, 517, 542, 597, 650 nm.

[0276] 도 3의 반응식 2 및 도 12의 반응식 5 참조

[0277] 키토산 메실레이트 (7). 우리의 이전에 발표된 방법에 따라 합성됨 (Song et al. *Carbohydrate Polymers* 2010, 81 :140).

[0279] 3,6-O-디-*tert*-부틸디메틸실릴 키토산 [DiTBDMS-CS] (8). 우리의 이전에 발표된 방법에 따라 합성됨 (Song et al. *Carbohydrate Polymers* 2010, 81 :140).

[0281] N-브로모아세틸-3,6-O-DiTBDMS-CS [BrA-DiTBDMS-CS] (9). DiTBDMS-CS 8 (1 g, 2.60mmol)을 N₂ 대기 하에 둥근 바닥 플라스크에서 건조 CH₂Cl₂ (15 mL)에 용해시켰다. 그 다음, 반응 혼합물을 얼음/소금 혼합물로 -20℃로 냉각시켰다. Et₃N (1.81 mL, 13mmol)을 가한 다음, 브로모아세틸 브로마이드 (0.91 mL, 10mmol)를 천천히 방울방울을 가하고 1 h 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 CH₂Cl₂로 희석시키고, 진공 하에 농축시켰다. 조 생성물을 아세토니트릴에서 교반하고, 여과한 다음 새로운 아세토니트릴로 세척하였다. 건조 물질을 CH₂Cl₂에 용해시키고 추출한 다음, 물과 소금물로 세척하고, Na₂SO₄로 건조한 다음, 진공 하에 농축시켰다. 옅은 노란색 분말의 생성물 9를 1.2g (92% 수율) 얻었다. FT-IR (KBr): ν 3402 (br, NH), 2957, 2931, 2886, 2858 (s, C-H TBDMS), 1682 (vs, C=O amide I), 1530 (vs, C=O amide II), 1473, 1391, 1362, 1311, 1259, 1101, 1005, 837, 777 (Si-C), 669 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ ppm: 4.40 (br s, H-1), 4.02-3.26 (m, H-2 GlcN, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6' 및 2H GluNH-C=OCH₂Br), 0.90 및 0.88 (br s, (CH₃)₃C), 0.13 및 0.07 (br s, (CH₃)₂Si) ppm.

[0283] (N-TPP-NH-Pip-아세틸)_{0.1}-(N-브로모아세틸)_{0.9}-DiTBDMS-CS [TPP_{0.1}-BrA_{0.9}-DiTBDMS-CS] (10A). 화합물 9 (700mg, 1.38mmol) 및 화합물 NH-pip-TPP 5 (105mg, 0.138mmol)를 N₂ 대기 하에 CH₂Cl₂에 용해시켰다. 5에 대하여 정확한 동물량의 Et₃N (19.3 μL , 0.130mmol)을 가하고, 반응 혼합물을 24h 동안 rt에서 교반하였다. 출발물질의 총 소비는 TLC로 확인하였다. 반응 혼합물을 CH₂Cl₂로 희석시키고 추출한 다음, 물과 소금물로 세척하였다. 유기층을 Na₂SO₄로 건조한 다음, 진공 하에 농축시켜 730 mg (92%)의 생성물 10A를 수득하였다. FT-IR (KBr): ν 3324 (br, NH), 2955, 2929, 2884, 2856 (s, C-H TBDMS), 1678 (vs, C=O amide I), 1600, 1524 (vs, C=O amide II), 1472, 1403, 1361, 1311, 1256, 1098, 1004, 966, 837, 801, 778, 701, 670, 550 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ ppm: 9.30(s, TPPNHCO), 8.85 (m, β -pyrrole H), 8.23-8.20 (m, phenyl-Ho & Pip-NHTPP-phenyl-Hm), 7.97 (d, J=8.0 Hz, RNTTP-phenyl-Ho), 7.79-7.73(m, triphenyl-Hm,p), 4.41 (br s, H-1), 4.13-3.50 (m, H-2 GlcN, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6' 및 2H GluNH-C=O, TPPNHCOCH₂pip, CH₂CONGlc 및 (CH₂)₂ of piperazine), 2.81-2.86 (m, piperazine-H), 0.92, 0.89 (br s, (CH₃)₃C), 0.14, 0.07(br s, (CH₃)₂Si), -2.77 (br s, α -pyrrole NH) ppm; UV-vis (DMSO): λ_{max} : 417, 517, 542, 597, 650 nm.

- [0285] **TPPp_{0.1}-BrA_{0.9}-DiTBDMS-CS (10B)**: 화합물 **10B** (1.3mg, 91%)는 중간체 **5** (180mg, 0.24mmol) 및 **9** (1.2g, 2.4mmol)를 사용하여 정확하게 상기 방법과 같이 제조하였다.
- [0287] **TPPp_{0.25}-BrA_{0.75}-DiTBDMS-CS (11A)**. 화합물 **9** (550mg, 1.09mmol) 및 화합물 NH-pip-TPP **5** (206mg, 0.273mmol)를 N₂ 대기 하에 CH₂Cl₂에 용해시켰다. **5**에 대하여 정확한 동몰량의 Et₃N (38 μ L, 0.27mmol)을 가하고, 반응 혼합물을 24h 동안 rt에서 교반하였다. 출발물질의 총 소비는 TLC로 확인하였다. 반응 혼합물을 CH₂Cl₂로 희석시키고 추출한 다음, 물과 소금물로 세척하였다. 유기층을 Na₂SO₄로 건조한 다음, 진공 하에 농축시켜 670mg (91%)의 생성물 **11A**를 수득하였다. FT-IR (KBr): ν 3317(br, NH), 2952, 2926, 2883, 2855 (s, C-H TBDMS), 1680 (vs, C=O amide I), 1598, 1520, 1471, 1440, 1402, 1361, 1309, 1254, 1096, 1002, **966**, **837**, **800**, **778**, 730, **701**, 667, 558 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ ppm: 9.30(s, TPPNHCO), 8.85 (m, β -pyrrole H), 8.22-8.20 (m, phenyl-Ho & Pip- NHTPP-phenyl-Hm), 7.97 (d, J=8.0 Hz, RNTTP-phenyl-Ho), 7.80-7.75(m, triphenyl-Hm,p), 4.40(br s, H-1), 4.06-3.63 (m, H-2 GlcN, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6' 및 2H GluNH-C=O, TPPNHCOCH₂pip, CH₂CONGlc 및 (CH₂)₂ of piperazine), 2.81-2.86 (m, piperazine-H), 0.92, 0.89(br s, (CH₃)₃C), 0.14, 0.10, 0.07 및 0.02(br s, (CH₃)₂Si), -2.77 (br s, α -pyrrole NH) ppm; UV-vis (DMSO): λ_{max} : 417, 517, 542, 597, 650 nm.
- [0289] **TPPp_{0.25}-BrA_{0.75}-DiTBDMS-CS (11B)**: 화합물 **11B** (1.35g, 92%)는 중간체 **5** (415mg, 0.55mmol) 및 **9** (1.1g, 2.18mmol)를 사용하여 정확하게 상기 방법과 같이 제조하였다.
- [0291] 화합물 **12A**, **12B**, **13A** 및 **13B**의 합성에 대해 일반적인 방법 A
- [0292] (N-TPP-NH-Pip-아세틸)_{0.1}-(N-(N,N,N-트리메틸암모늄일)아세틸)_{0.9}-DiTBDMS-CS [TPPp_{0.1}-DiTBDMS-CS-TMA_{0.9}] (**12A**). 화합물 **10A** (350mg, 0.61 mmol)를 N₂ 대기 하에 CH₂Cl₂에 용해시켰다. 과량의 트리메틸아민 용액을 가하고, 반응 혼합물을 24h 동안 rt에서 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하였다. 조 생성물을 고진공 하에 완전히 건조시켜 자주색 고체로서 조 생성물 **12A** (420 mg, 99%)를 수득하였다. FT-IR (KBr): ν 3426, 3021, 3011, 2962, 2855, 27.7, 2560, 2438, 1749, 1689, 1599, 1563, 1482, 1443, 1401, 1360, 1288, 1254, 1053, 1010, 966, 922, 901, 837, 797, 779, 744, 701, 671, 552 cm⁻¹.
- [0294] **TPPp_{0.1}-DiTBDMS-CS-TMA_{0.9} (12B)**. 일반적인 방법 A는 **10B** (600 mg, 1.04mmol) 및 NMe₃을 사용하여 조 고체로서 **12B** (720 mg, 99%)를 제공하였다.
- [0296] **TPPp_{0.25}-DiTBDMS-CS-TMA_{0.75} (13A)**. 일반적인 방법 A는 **11A** (300 mg, 0.44mmol) 및 NMe₃을 사용하여 조 고체로서 **13A** (340 mg, 98%)를 제공하였다. FT-IR (KBr): ν 3415, 3021, 3011, 2962, 2854, 1749, 1686, 1598, 1522, 1482, 1442, 1402, 1360, 1311, 1288, 1252, 1053, 1010, 966, 922, 901, 837, 798, 779, 744, 701, 671, 558 cm⁻¹.
- [0298] **TPPp_{0.25}-DiTBDMS-CS-TMA_{0.75} (13B)**. 일반적인 방법 A는 **11B** (600 mg, 0.89mol) 및 NMe₃을 사용하여 조 고체로서 **13B** (685 mg, 99%)를 제공하였다.
- [0300] 화합물 **14A**, **14B**, **15A** & **15B**에 대해 일반적인 방법 B

- [0301] (N-TPP-NH-Pip-아세틸)_{0.1}-(N-(N-메틸피페라지닐)아세틸)_{0.9}-DiTBDMS-CS [TPP_{0.1}-DiTBDMS-CS-MP_{0.9}] (14A). 화합물 10A (350mg, 0.61 mmol)를 N₂ 대기 하에 CH₂Cl₂에 용해시켰다. 과량의 1-메틸피페라진을 가하고, 반응 혼합물을 24h 동안 rt에서 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하였다. 그 다음, 조 생성물을 고진공 하에 완전히 건조시켜 상응하는 조 생성물 14A (425mg, 105%)를 수득하였다. FT-IR (KBr): ν 3378, 2950, 2930, 2884, 2854, 2798, 2694, 2608, 2477, 2223, 1678, 1617, 1519, 1461, 1394, 1371, 1293, 1253, 1168, 1092, 1051, 1003, 966, 939, 920, 837, 801, 779, 701, 671, 612 cm⁻¹.
- [0303] TPP_{0.1}-DiTBDMS-CS-MP_{0.9} (14B). 일반적인 방법 B는 10B (600 mg, 1.04mol) 및 1-메틸피페라진을 사용하여 조 고체로서 14B (710 mg, 102%)를 제공하였다.
- [0305] TPP_{0.25}-DiTBDMS-CS-MP_{0.75} (15A). 일반적인 방법 B는 11A (250 mg, 0.37mmol) 및 1-메틸피페라진을 사용하여 조 고체로서 15A (290 mg, 104 %)를 제공하였다. FT-IR (KBr): ν 3380, 2950, 2930, 2884, 2854, 2800, 2480, 1677, 1598, 1519, 1461, 1400, 1394, 1371, 1284, 1252, 1168, 1089, 1050, 1003, 966, 939, 920, 837, 801, 779, 732, 701, 671, 591 cm⁻¹.
- [0307] TPP_{0.25}-DiTBDMS-CS-MP_{0.75} (15B). 일반적인 방법 B는 11B (650 mg, 0.96mol) 및 1-메틸피페라진을 사용하여 조 고체로서 15B (735 mg, 102%)를 제공하였다.
- [0309] 화합물 16A, 17A, 18A & 19A (1st 배치 화합물)에 대해 일반적인 TBDMS 탈보호화 방법 C.
- [0310] TPP_{0.1}-CS-TMA_{0.9} (16A). 물질 12A (350mg, 0.50 mmol)를 MeOH (5-10 mL)에 용해한 다음 농축 HCl (2-3 mL)을 가하였다. 반응 혼합물을 12h 동안 rt에서 교반하였다. 과량의 탈이온수를 반응 혼합물에 가하고, 30분 동안 교반한 다음, 하루 동안 8% NaCl에 대해 투석하고, 3일 동안 탈이온수에 대해 투석하였다. 이 기간 동안, 용액의 색깔이 점점 암녹색에서 적색으로 변하였다. 그 다음 적색 용액을 동결건조시켜 갈색 스폰지-유사 물질을 수득하였다. 물질을 다시 탈보호화, 이온교환, 투석 및 동결건조하였다. 미량의 TBDMS를 제거하기 위하여, 동일한 조건을 이용하여 이 과정을 반복하여 갈색 스폰지 물질로서 16A (210mg, 89%)를 얻었다. FT-IR (KBr): ν 3419 (br, O-H), 3064 (C-H), 1683, 1558, 1506, 1488, 1473, 1403, 1296, 1153, 1112, 1068, 1032, 966, 911, 800, 730, 701, 618 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-d₆: D₂O 96:4) δ ppm: 8.81 (br m, β -pyrrole H), 8.12-8.16 (br m, phenyl-Ho & Pip-NHTPP-phenyl-Hm), 8.04 (br d, J=8.0 Hz, RNTPP-phenyl-Ho), 7.75-7.84(m, triphenyl-Hm,p), 4.66 (br s, H-1), 4.21 (br s, BrCH₂C=O), 3.83-3.54 (m, H-2 GlcNAc, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6'), 3.32 (s, ⁺N(CH₃)₃) ppm.
- [0312] TPP_{0.25}-CS-TMA_{0.75} (17A). 일반적인 방법 C는 13A (240 mg, 0.30 mmol) 및 conc. HCl/MeOH을 사용하여 자주색 고체로서 17A (120 mg, 71%)를 제공하였다. FT-IR (KBr): ν 3392, 3061, 2950, 1683, 1559, 1506, 1489, 1473, 1402, 1350, 1296, 1154, 1112, 1068, 1032, 966, 911, 800, 730, 701, 619 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO- d₆: D₂O 98:2) δ ppm: 8.81 (br m, β -pyrrole H), 8.12-8.16 (br m, phenyl-Ho & Pip- NHTPP-phenyl-Hm), 8.04 (br d, J=8.0 Hz, RNTPP-phenyl-Ho), 7.79-7.87(m, triphenyl-Hm,p), 4.50 (br s, H-1), 4.15 (br s, BrCH₂C=O), 3.27-3.65 (m, H-2 GlcNAc, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6'), 3.24 (s, ⁺N(CH₃)₃) ppm.
- [0314] TPP_{0.1}-CS-MP_{0.9} (18A). 일반적인 방법 C는 14A (350 mg, 0.52mmol) 및 conc. HCl/MeOH을 사용하여 자주색 고체

로서 **18A** (200 mg, 87%)를 제공하였다. FT-IR (KBr): ν 3419 (br, O-H), 3057 (C-H), 1683, 1558, 1474, 1403, 1296, 1234, 1154, 1112, 1068, 1032, **966**, 930, 911, **799**, 730, **701** cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 : D_2O 96:4) δ ppm: 8.83 (br m, β -pyrrole H), 8.13-8.19 (br m, phenyl-Ho & Pip-NHTPP-phenyl-Hm), 8.08 (br d, $J=8.0$ Hz, RNTTP-phenyl-Ho), 7.79-7.87(m, triphenyl-Hm, p), 4.48 (br s, H-1), 3.24-3.78 (m, H-2 GlcNAc, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6'), 3.92 (dd, $J=12\text{Hz}$, Pip- $\text{CH}_2\text{C=O}$), 2.30-2.67 (m, piperazine (CH_2) $_4$), 2.48 (br s, piperazine, N- CH_3) ppm.

[0316] **TPPp_{0.25}-CS-MP_{0.75} (19A)**. 일반적인 방법 C는 **15A** (200 mg, 0.26mmol) 및 1-메틸피페라진을 사용하여 자주색 고체로서 **19A** (80mg, 58%)를 제공하였다. FT-IR (KBr): ν 3392, 3056, 2947, 1683, 1558, 1520, 1489, 1472, 1458, 1400, 1349, 1309, 1248, 1154, 1068, 1031, 1001, 966, 911, 800, 729, 701, 658 cm^{-1} . ^1H NMR (DMSO- d_6 : D_2O 96:4) δ ppm: 8.83 (br m, β -pyrrole H), 8.14-8.20 (br m, phenyl-Ho & Pip-NHTPP-phenyl-Hm), 8.08 (br d, $J=8.0$ Hz, RNTTP-phenyl-Ho), 7.78-7.86(m, triphenyl-Hm, p), 4.50 (br s, H-1), 3.24-3.78 (m, H-2 GlcNAc, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6'), 3.92 (dd, $J=12\text{Hz}$, Pip- $\text{CH}_2\text{C=O}$), 2.28-2.67 (m, piperazine (CH_2) $_4$), 2.48 (br s, piperazine, N- CH_3) ppm.

[0318] 화합물 **16B**, **17B**, **18B** & **19B** (2nd 배치 화합물)에 대해 일반적인 TBDMS 탈보호화 방법 D. (대표적으로 화합물 **16B**).

[0319] **TPPp_{0.1}-CS-TMA_{0.9} (16B)**. 물질 **12B** (600mg, 0.86mmol)를 *N*-메틸-2-피롤리돈 (NMP) (5-10 mL)에 용해한 다음 과량의 테트라-*n*-부틸암모늄플루오라이드 (TBAF)를 가하였다. 반응 혼합물을 24h 동안 55°C에서 교반하고, 냉각시킨 후, 묶은 HCl로 산성화하고, 30분 동안 교반한 다음, 이틀 동안 탈이온수 내 8% NaCl (w/v)에 대해 투석하고, 3일 동안 탈이온수에 대해 투석하였다. 이 기간 동안, 용액의 색깔이 점점 회색에서 적색으로 변하였다. 그 다음 적색 용액을 동결건조시켜 갈색 스폰지-유사 물질을 수득하였다. 물질을 다시 탈보호화, 이온교환, 투석 및 동결건조하였다. 남아있는 미량의 TBDMS를 제거하기 위하여, 동일한 조건을 이용하여 이 과정을 반복하여 갈색 스폰지 물질로서 **16B** (350mg, 87%)를 얻었다. FT-IR (KBr): ν 3405, 2943, 2817, 1655, 1528, 1459, 1401, 1375, 1308, 1248, 1153, 1111, 1068, 1031, 966, 832, 799, 729, 702 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 : D_2O 96:4) δ ppm: 8.82 (br m, β -pyrrole H), 8.12-8.16 (br m, phenyl-Ho & Pip-NHTPP-phenyl-Hm), 8.04 (br d, $J=8.0$ Hz, RNTTP-phenyl-Ho), 7.75-7.84(m, triphenyl-Hm, p), 4.47 (br s, H-1), 4.04 (br s, $\text{BrCH}_2\text{C=O}$), 3.24-3.55 (m, H-2 GlcNAc, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6'), 3.19 (br s, $^+\text{N}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

[0321] **TPPp_{0.25}-CS-TMA_{0.75} (17B)**: 일반적인 방법 C는 **13B** (650 mg, 0.84mmol) 및 TBAF/NMP를 사용하여 자주색 고체로서 **17B** (400 mg, 87%)를 제공하였다. FT-IR (KBr): ν 3396, 2942, 2829, 1662, 1526, 1458, 1441, 1401, 1310, 1249, 1068, 1032, 1002, 966, 800, 730, 701 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 : D_2O 98:2) δ ppm: 8.81 (br m, β -pyrrole H), 8.12-8.16 (br m, phenyl-Ho & Pip-NHTPP-phenyl-Hm), 8.08 (br d, $J=8.0$ Hz, RNTTP-phenyl-Ho), 7.74-7.86(m, triphenyl-Hm, p), 4.51 (br s, H-1), 4.10 (br s, $\text{BrCH}_2\text{C=O}$), 3.26-3.55 (m, H-2 GlcNAc, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6'), 3.22 (br s, $^+\text{N}(\text{CH}_3)_3$) ppm; 고체-상태 ^{13}C NMR (100.56 MHz): δ 170.85, 164.68, 128.11, 119.45, 101.53, 75.39, 61.09, 55.47.

[0323] **TPPp_{0.1}-CS-MP_{0.9} (18B)**: 일반적인 방법 C는 **14B** (600 mg, 0.90mmol) 및 TBAF/NMP를 사용하여 자주색 고체로서 **18B** (315mg, 80%)를 제공하였다. FT-IR (KBr): ν 3396, 3315 (br, OH, NH), 2941, 1655 (vs, C=O amide I), 1534 (vs, C=O amide II), 1522, 1471, 1440, 1401, 1375, 1310, 1244, 1069, 1030, 1001, 966, 800, 729,

701 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 : D_2O 98:2) δ ppm: 8.81 (br m, β -pyrrole H), 8.13-8.19 (br m, phenyl-Ho & Pip-NHTPP-phenyl-Hm), 8.07 (br d, $J=8.0$ Hz, RNTTP-phenyl-Ho), 7.79-7.85(m, triphenyl-Hm, p), 4.48 (br s, H-1), 3.24-3.72 (m, H-2 GlcNAc, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6'), 3.92 (dd, $J=12\text{Hz}$, Pip- $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2.33-2.67 (m, piperazine (CH_2) $_4$), 2.48 (br s, piperazine, N- CH_3) ppm.

[0325] **TPP_{0.1}-CS-MP_{0.9} (19B):** 일반적인 방법 C는 **15B** (700 mg, 0.93mmol) 및 TBAF/NMP를 사용하여 자주색 고체로서 **19B** (415 mg, 85%)를 제공하였다. FT-IR (KBr): ν 3396, 3315 (br, OH, NH), 2941, 1655 (vs, C=O amide I), 1534 (vs, C=O amide II), 1522, 1471, 1440, 1401, 1375, 1310, 1244, 1069, 1030, 1001, 966, 800, 729, 701 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 : D_2O 95:5) δ ppm: 8.82 (br m, β -pyrrole H), 8.13-8.19 (br m, phenyl-Ho & Pip-NHTPP-phenyl-Hm), 8.07 (br d, $J=8.0$ Hz, RNTTP-phenyl-Ho), 7.79-7.87(m, triphenyl-Hm, p), 4.49 (br s, H-1), 3.24-3.78 (m, H-2 GlcNAc, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6'), 3.92 (dd, $J=12\text{Hz}$, Pip- $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2.30-2.67 (m, piperazine (CH_2) $_4$), 2.40 (br s, piperazine, N- CH_3) ppm; 고체-상태 ^{13}C NMR (100.56 MHz): δ 171.63, 138.74, 127.97, 119.74, 101.93, 75.54, 61.54, 55.42, 45.34 ppm.

[0327] 결과 및 토의

[0329] **친핵성 TPP 중간체 5.** 현재 연구에서, TPP 1은 대규모로 합성되었고, 출발물질로서 사용되었다. 모노-니트로 TPP($p\text{-NO}_2$) $_1$ **2** 기능성은 TFA 내 1.8 당량 NaNO_2 를 이용하여 위치선택적으로(regioselectively) 도입한 다음 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 로 환원시켜 모노-아미노포피린 TPP($p\text{-NH}_2$) $_1$ **3**을 얻었다. 이전에 보고된 방법은 환원 단계 전에 조 물질 **2**의 정제에 소비하는 시간을 피함으로써 단순화하였다. 그 다음, 이의 전체 수율 (54%)의 절충 없이 정제 후 아미노포피린 **3**을 얻었다.

[0330] 아미노포피린 TPP($p\text{-NH}_2$) $_1$ **3**은 약한 친핵성인 것으로 알려져 있고, SN^2 공격에 의해 이 화합물을 친전자성 BrA-DiTBDS-CS **9**에 결합하려는 시도는 가혹한 조건에서도 우리의 초기 연구에서 원하는 결과를 제공하지 않았다. 따라서, 이 광감제 유도체를 더 강력한 친핵체(nucleophile)로 변환하기 위하여, TPP($p\text{-NH}_2$) $_1$ 을 먼저 아실화시켜 브로모아실-TPP **4**를 제공한 다음 과량의 피페라진으로 친핵성 치환을 하여 친핵성 포피린 중간체 TPP-NH-Pip **5**를 제공하였다. 피페라진 모티프(motif)는 생리학적 조건 (수성 pH 7.4) 하에 양전하를 가진다. 피페라진 부분은 몇몇 잘 알려진 대사 반응을 포함하는 낮은 독성 및 생체내 변화(biotransformation)로 인해 스페이서로도 적합하다. TPP-NH-Pip의 합성에 대해 전체 합성 경로는 도 2의 반응식 1에 나타내었다.

[0332] **친전자성 키토산 중간체 9.** 키토산을 이전에 보고된 바와 같이 변형하여 DiTBDS-CS **8**을 얻었다. 히드록실 기의 보호화 후에, 생체고분자의 용해도는 급격하게 변하고, 고도의 친유성 부분과 함께 변형을 용이하게 하는 CH_2Cl_2 와 같은 통상의 유기 용매에서 잘 녹는다. 따라서, **8**을 2-브로모아세틸 브로마이드와 반응시켜 친전자성 중간체 BrA-DiTBDS-CS **9**를 제조하였다 (도 3의 반응식 2). 이 반응은 탈보호화 및 에스테르화와 같은 부반응을 피하기 위하여, 반응 시간, 온도 및 다른 시약의 당량비의 정확한 조절을 필요로 한다. 0°C에서 1.5h 동안 **8**과 브로모아세틸 브로마이드의 반응은 CH_2Cl_2 에 불용성인 물질을 야기하였고, FT-IR 분석은 1680 cm^{-1} 에서 아마이드 피크와 함께 1760 cm^{-1} 에서 에스터 피크를 나타내었다 (테이터는 나타내지 않음). 따라서, 부반응을 피하고 잘 녹는 물질을 얻기 위하여 반응을 정확하게 최적화하는 것이 필요하다. 이 반응에 대해 최적화된 조건은 정확히 4 당량의 브로모아세틸 브로마이드와 5 당량의 Et_3N 의 사용 및 1 h 동안 -20°C에서 반응 온도의 유지를 필요로 한다. 얻어진 중간체 **9**는 CH_2Cl_2 에 완전히 녹고, 정확한 구조는 ^1H NMR 및 FT-IR 분석으로 확인될 수 있다. 그 다음, 화합물 **9**는 키토산 전달체의 합성에서 주요 친전자성 중간체로서 사용되었다.

- [0334] **키토산의 TPP 유도체 (16A-19B).** 키토산 화합물의 총 8개 TPP 유도체는 4개 다른 화합물의 2개의 별도의 배치로 합성되었다. 방법의 재현성과 일관성을 확인하기 위하여, 첫 번째 배치 ("A"로 표지됨)는 80-200 mg 정도로 합성되었고, 두 번째 배치 ("B"로 표지됨)는 약간 크게 300-450 mg 정도로 합성되었다.
- [0335] BrA-DiTBDMS-CS **9**와 친핵성 TPP-NH-Pip **5** 중간체를 반응시켜 친유성 PS를 고분자 백본에 공유결합시켰다. 반응은 결과 물질의 치환도의 우수한 조절을 용이하게 할 정도로 정량적이었다. 예비 연구는 포피린의 높은 치환도 (DS)를 갖는 전달체가 수용액에서 불용성이므로 변형이 0.1 및 0.25 DS (글루코사민 단량체 단위 당)로 제한됨을 나타내었다. 따라서, TPP-NH-Pip **5**는 친전자성 키토산 중간체 **9**의 단량체 단위 당 0.1 또는 0.25 당량에서 조절된 방법으로 반응하여 각각 원하는 생성물 TPP_{p0.1}-BrA_{0.9}-DiTBDMS-CS (**10A/10B**) 또는 TPP_{p0.25}-BrA_{0.75}-DiTBDMS-CS (**11A/11B**)를 얻었다. 반응의 진행은 TLC로 관찰하였으며, 부반응을 피하기 위하여 **5**가 더 이상 존재하지 않았을 때 반응을 종결하였다. 이 물질의 ¹H NMR 분석은 키토산에 TPP의 공유 결합에서 정량적 반응과 일치하였다.
- [0336] 그 다음, 전달체의 수용해도를 향상시키고 세포내 이입 막(endocytic membrane)에 대한 친화도를 제공하기 위하여, 양이온성 부분을 TPP-치환된 키토산 백본에 도입하였다. 따라서, 화합물 **10A/10B** 및 **11A/11B**는 과량의 Me₃N (TMA)과 반응하여 각각 고정된 양전하를 갖는 TPP_{p0.1}-DiTBDMS-CS-TMA_{0.9} (**12A/12B**) 및 TPP_{p0.25}-DiTBDMS-CS-TMA_{0.75} (**13A, 13B**)를 제공하였다. 유사하게, 화합물 **10A/10B** 및 **11A/11B**는 과량의 1-메틸 피페라진 (MP)과 반응하여 각각 TPP_{p0.1}-DiTBDMS-CS-MP_{0.9} (**14A/14B**) 및 TPP_{p0.25}-DiTBDMS-CS-MP_{0.75} (**15A, 15B**)를 제공하였다. 조 물질은 최종 탈보호 단계에 직접 사용되었다.
- [0337] 마지막으로, 첫 번째 배치 **12A-15A**로부터의 조 물질은 rt에서 12h 동안 MeOH 내 conc. HCl로 탈보호화하고, 두 번째 배치 **12B-15B**로부터의 조 물질은 60°C에서 24h 동안 TBAF/NMP로 탈보호화하여 각각 최종 생성물 **16A-19A** 및 **16B-19B**를 제공하였다. 두 경우에, 첫 번째 탈보호화 단계 이후에 여전히 존재하는 약간의 미량의 TBDMS (1.5-7%)를 제거하기 위하여, 탈보호화 단계를 반복하였다. 이전에는 MeOH 내 conc. HCl과 함께 탈보호화가 사용되었으나, 최근에는 고분자 백본의 분해에 기여할 수 있는 고도의 산성 조건을 피하기 위하여 DiTBDMS 키토산 유도체의 더 온화한 TBAF/NMP 탈보호화가 도입되었다. 그러나, 후자 방법의 약점은 NMP 용매를 제거하기 위하여 장시간의 투석 공정이 요구된다는 것이다. 트리메틸암모늄 (Me₃N⁺) 유도체 [TPP_{p0.1}-CS-TMA_{0.9} (**16A, 16B**) 및 TPP_{p0.25}-CS-TMA_{0.75} (**17A, 17B**)]는 1-메틸-피페라진 유도체 [TPP_{p0.1}-CS-MP_{0.9} (**18A, 18B**), TPP_{p0.25}-CS-MP_{0.75} (**19A, 19B**)] 보다 물로 더 빠르게 용해하였다. 이것은 이전의 전달체 화합물에서 고정된 이온 전하의 존재에 기인할 수 있다.
- [0339] **나노전달체의 특성.**
- [0340] **FT-IR 분석:** 대표적인 최종 화합물 TPP_{p0.1}-CS-MP_{0.9} (**18A**)의 합성에서 여러 중간체의 FT-IR 스펙트럼의 비교는 **도 4**에 나타난다. 포피린 중간체 TPP-NH-Pip **5**에 대해 특징적인 피크 (**도 4A**)는 3310-3450 cm⁻¹ 영역에서 N-H 스트레칭 및 3022와 2816 cm⁻¹에서 방향족 및 지방족 C-H 스트레칭으로 설명된다. 1691 및 1595 cm⁻¹에서의 피크는 아마이드 결합과 일치하고, 966, 799 및 700 cm⁻¹에서 3개의 강한 피크는 TPP 고리계에 대해 특징적이다 (화살표로 나타냄).
- [0341] BrA-DiTBDMS-CS 중간체 **9**에서 주요 특징적인 피크는 2858-2957 cm⁻¹에서 Si-CH₃의 C-H 스트레칭을 나타내고, 1682 및 1530 cm⁻¹에서 아마이드 피크를 나타내는 것으로 관찰된다. 또한, 836 및 777 cm⁻¹에서의 피크는 Si-C 스트레칭 및 CH₃ 요동 (rocking)을 나타낸다 (이러한 마지막 2개의 피크는 **도 4B**에서 화살표로 표시된다).
- [0342] 중간체 TPP_{p0.1}-BrA_{0.9}-DiTBDMS-CS **10A** (**도 4C**)의 스펙트럼에서 특징적인 TPP 피크의 모양은 키토산 (**9**)에 포피린 (TPP-NH-Pip **5**)의 공유결합을 확인한다. 이것이 조 TPP_{p0.1}-DiTBDMS-CS-MP_{0.9} **14A**로 변환되었을 때 스펙트럼에서 관찰된 현저한 변화는 없었다. 그러나, TPP_{p0.1}-CS-MP_{0.9} **18A**를 제공하기 위해 물질의 최종 TBDMS 탈보호화는 명

백하게 특징적인 Si-CH₃ 피크가 없고 넓은 O-H 피크의 모양을 나타내는 반면, 특징적인 TPP 피크는 온전히 남아 있다 (도 4E).

[0344] ¹H 및 ¹³C (고체 상태) 핵자기 공명 분광기 (NMR) 분석:

[0345] ¹H NMR 분석: TPP_{p0.1}-CS-MP_{0.9} 18A의 합성에서 모든 중간체 및 최종 생성물의 ¹H NMR 스펙트럼의 오버레이의 대표적인 예는 도 5에 나타난다. TBDMS 보호화 후, 물질 (DiTBDMS-CS 8)은 CDCl₃에 완전히 녹고, 키토산 백본에 있는 각 양성자의 잘 분해된 피크도 나타난다 (도 5A). 0.90-0.89 (br s) 및 0.13-0.05 (br s)에서의 피크는 각각 (CH₃)₃C-Si 및 (CH₃)₂Si에 할당될 수 있다.

[0346] BrA-DiTBDMS-CS 9를 제공하기 위해 DiTBDMS-CS의 브로모아세틸화는 H-2 (GluN) 피크의 낮은장 이동(downfield shift)으로 표시된다. 또한, COCH₂Br 피크와 함께 모든 키토산 백본 피크 H-1 내지 H-6는 4.40-3.26 ppm에서 모이고, TBDMS 피크는 이들의 위치에서 현저한 변화를 나타내지 않는다 (도 5B).

[0347] TPP_{p0.1}-BrA_{0.9}-DiTBDMS-CS 10A 중간체의 ¹H NMR 스펙트럼 (도 5C)은 TPP 부분의 특징적인 피크가 방향족 영역 및 확인될 수도 있는 일반적으로 유리 염기 포피린의 코어에 있는 2개의 피롤릭 내부 아민 양성자와 관련된 -2.7에서의 피크 [도 5C에 나타내지 않음]에서도 나타날 수 있음을 확인한다. 또한, 피페라진 부분의 시클릭 -CH₂ 기의 절반에 할당될 수 있는 뚜렷한 피크 중 하나는 2.81-2.86 (m) ppm에서 관찰될 수 있고, 피페라진의 남아있는 시클릭 -CH₂ 기는 키토산 부분의 넓은 영역 (3.3-4.5 ppm) 아래에 들어간다.

[0348] TPP_{p0.1}-DiTBDMS-CS-MP_{0.9} 14A 스펙트럼에서, 1-메틸피페라진 부분의 N-CH₃에 대해 새로운 피크가 관찰되었다. 이 단계에서 정제를 수행하지 않음으로써, 스펙트럼은 과잉의 1-메틸피페라진을 나타낸다.

[0350] 최종 탈보호화 단계 후에, 우수한 수용해도를 갖는 물질이 얻어졌다. 최종 화합물 TPP_{p0.1}-CS-MP_{0.9} 18A의 ¹H NMR 스펙트럼에서, 1-메틸피페라진 피크와 함께 키토산 백본의 모든 피크는 명백하게 확인될 수 있다; 그러나, TPP 부분의 관찰할 수 있는 NMR 신호는 없다 (도 5E). 모든 탈보호화된 최종 화합물 (17A- 19B)에 대해 동일한 결과가 관찰되었다. d₆-DMSO에서, TPP 피크는 관찰될 수 있으나, 이 경우 키토산 백본 피크는 넓었고 명확하게 확인할 수 없었다. 전달체의 용해도는 이 용매에서도 나빴고, 가장 우수한 결과는 이러한 2개의 용매의 혼합물과 함께 얻어질 수 있음을 확인하였다 (차후의 토의 참조). TPP_{p0.1}-CS-MP_{0.9} 18A는 PS의 존재를 확인하는 어두운 적색을 가진다. 분배 실험은 고도의 친유성 PS 부분 TPP-NH₂ 및 TPP-NH-Pip가 2-상 H₂O/ CHCl₃ 계에서 수상으로 분배되지 않는 반면 (도 6), 최종 (극성) TPP-CS-TMA 및 TPP-CS-MP 전달체는 고도의 극성이다. 이들은 수상에 완전히 용해되고, 유기상으로 분배되지 않았다.

[0352] 고체 상태 ¹³C NMR 분석: 최종 전달체의 탄소 피크는 고체 상태 NMR에서 관찰될 수 있다 (도 7). 글루코사민과 COCH₂ 탄소의 C2-C6 탄소는 60-80 ppm 범위에서 관찰되며, C1 피크는 ~102 ppm에서 명백히 분석된다. 115-155 ppm 사이의 피크는 TPP 부분의 C_{meso} (~119), C_{m,p} (~128), C_β (~131), C_α (~138), C_i (~140) 및 C_a (~150)로서 할당될 수 있고, 이 할당은 TPP-NH-Pip 5의 용액 상태 ¹³C NMR 스펙트럼과 완전히 비교할 만하다. 카보닐 (CS-NH-C=O 및 TPP-NH-C=O)은 160-169 ppm에서 나타난다. N-(2-(N,N,N-트리메틸암모늄일) 아세틸) 유도체 TPP_{p0.25}-CS-TMA_{0.75} (17B)에서, 4차 메틸 탄소 (⁺N(CH₃)₃)는 55.5 ppm에서 강한 피크로 관찰될 수 있다. N-메틸-피페라지닐 유도체 TPP_{p0.25}-CS-MP_{0.75} (19B)에서, 메틸 탄소 (N-CH₃)는 45 ppm에서 관찰될 수 있고, 시클릭 메틸렌 (-CH₂-N) 탄소는 50-55 ppm 영역에서 글루코사민 신호와 함께 합병된다. 따라서, 고체 상태 ¹³C NMR은 공유결합된 PS를 갖는 전달체와 일치하였다.

[0354] **치환도 (DS) 및 변환 효율(conversion efficiency).** 하기 표 1은 최종 전달체 화합물에 대한 DS를 나타낸다. 목표는 반응 단계 "e" (도 3의 반응식 2)에서 화합물 5 및 9 사이의 당량비와 함께 DS를 조절하는 것이었다. 최종 DS는 2% 범위 이내 (0.1 또는 0.25)의 반응에서 당량을 기준으로 한 목표치와 일치하고, 이는 반응에서 100% 효율을 나타낸다. 이전에는, 키토산에 공유결합하는 다양한 친유성 부분을 연구하였다. 이것은 독소루비신 및 파클리탁셀과 같은 약물; 5 α -콜란산 (Cholanic acid), 5 β -콜란산, 데옥시콜린산(deoxycholic acid) 및 콜레스테롤과 같은 내인성 생체분자 및 클로린 e6 (Ce6) 및 프로토포피린 IX (PpIX)와 같은 광감제를 포함한다. 대부분의 경우, DS는 고도의 친유성 TPP에 대해 우리가 여기서 보고한 것보다 현저히 작다. 또한 이전의 연구자는 전환도가 증가함에 따라 결합 효율이 감소할 것이라고 관찰하였다. 현재의 과정은 유기용매에서 매우 가용성인 보호된 키토산을 사용함으로써 온화한 조건 하에 친유성 PS 부분과 효율적으로 조합될 수 있는 이점을 가진다. 2개의 배치 (A 및 B)에서 DS가 동일한 2% 범위 이내에서 일치하는 것처럼, 반응의 우수한 재현성도 확인된다.

표 1

[0355] TPP 변형된 키토산 전달체 16A-19B에 대한 치환도 (DS)

항목 (entry)	키토산 유도체	화합물	TPP-NH-Pip (사용된 당류 단위당 eq.)	DS* (당류 단위 당 결합된 TPP 부 분)
1.	TPP _{p0.1} -CS-TMA _{0.9}	16A	0.10	0.10
2.	TPP _{p0.1} -CS-TMA _{0.9}	16B	0.10	0.10
3.	TPP _{p0.25} -CS-TMA _{0.75}	17A	0.25	0.23
4.	TPP _{p0.25} -CS-TMA _{0.75}	17B	0.25	0.25
5.	TPP _{p0.1} -CS-MP _{0.9}	18A	0.10	0.09
6.	TPP _{p0.1} -CS-MP _{0.9}	18B	0.10	0.10
7.	TPP _{p0.25} -CS-MP _{0.75}	19A	0.25	0.25
8.	TPP _{p0.25} -CS-MP _{0.75}	19B	0.25	0.25

[0356] * ¹H NMR로 측정된 DS

[0358] 나노입자를 형성하기 위한 전달체의 자가 응집(self aggregation) 및 전달체 나노입자의 중첩풀림(unfolding)의 분석.

[0359] 방향족 포피린은 J (적색 편이(red-shifted)) 또는 H (청색 편이(blue-shifted)) 유형 응집체로서 정의된 π - π 적층계(stacking system)를 형성할 수 있다. 말단 치환기는 응집 메커니즘에 기여할 수 있다. 이 응집은 NMR, UV-Vis 및 형광분석기에 의해 관찰될 수 있다. 따라서, ¹H NMR에서 피크의 극도로 넓음과 피크의 손실은 카복시페닐-포피린 (TCPP) 응집체, p-설포네이토펜 및 페닐 meso-치환된 포피린 및 3 종류의 양이온성 포피린 (TOPyP, TMPyP 및 APP)에 대해 보고되었다. 고정화에 기인한 신호의 손실의 유사한 관찰은 n-부틸메타크릴레이트와 폴리(에틸렌 산화물) 거대 단량체의 분산 공중합에서 이루어졌다.

[0360] 현재의 연구에서, 최종 화합물 16A-19B의 D₂O 내 ¹H NMR에서, 방향족 영역에서 피크의 부족은 π - π 적층 및 소수성 상호작용 때문에 D₂O에서 TPP 부분의 응집을 암시하였다. DMSO-d₆: D₂O 혼합물에서, 대표적인 TPP_{p0.1}-CS-TMA_{0.9} 16B 화합물의 NMR 연구는 도 8에 나타낸다. 순수한 D₂O에서, TPP 부분의 피크는 보이지 않고, 단지 매우 약한 피크만 DMSO-d₆: D₂O (25:75) 혼합물에서 방향족 영역에서 관찰되며, 키토산 백본 피크가 관찰될 수 있다. DMSO-d₆ 함량이 DMSO-d₆: D₂O (50:50)로 더 증가하는 경우, 넓은 피크가 관찰될 수 있다 (도 8IC). DMSO-d₆ 함량이 혼합물 및 거의 순수한 d₆-DMSO (단지 2% D₂O v/v)에서 증가할수록 방향족 피크의 상대적 세기는 증가하고,

방향족 TPP 피크는 H-1 및 남아있는 키토산-백본 피크 및 $^+\text{NMe}_3$ 피크와 함께 명백하게 보인다 (도 8IA). 또한, 이것은 전달체가 이러한 조건 하에 완전히 펼쳐지는 것을 암시한다. 이 설명은 UV-Vis 및 형광 연구에 의해 더 뒷받침되었다 (도 8).

[0361] 물에 용해된 나노전달체는 417 nm에서 최대 흡수를 가진 $\pi-\pi$ 적층된 광감제에 대해 넓은 Soret 밴드를 나타낸다 (도 8II). 이 피크는 DMSO 함량이 증가하고 구조가 펼쳐지는 경우 점점 더 날카로워지고 약간 이동한다 (100% DMSO에서 420 nm로).

[0362] 순수한 물에서, 형광은 광감제 부분의 응집과도 일치하게 거의 완전히 소멸된다. 형광 세기는 극적으로 증가하나 DMSO 함량은 50%로 증가하는 것처럼 관찰된 100% DMSO 농도로 더 점진적인 증가와 함께 형광 세기의 급격한 증가가 있다 (도 8III).

[0363] 주사 전자 현미경에 의해 나노전달체 입자를 더 특징지우기 위한 시도가 있었다. 나노전달체 용액의 방울을 실리콘 웨이퍼 표면 위에 피펫팅하고, SEM으로 건조하였다 (도 9A,B). 어떤 시료에서, 10-200 nm의 크기 분산을 가진 나노입자는, 나노입자 현탁액을 건조할 때 일반적으로 관찰되는 것과 유사하게, 분리된 (도 9A), 무리를 이룬(clustered) 또는 수상돌기 구조로 결정화하는 것을 관찰할 수 있다. 입자 응집을 피하기 위하여, 시료의 스핀 코팅을 시도하였으나, 이 경우에는 특색없는 필름 및 적은 입자가 관찰되었다. 스핀 코팅 후 필름 두께는 분광타원편광분석기(spectroscopic ellipsometry)에 의해 10 nm 보다 상당히 작은 것으로 평가되었다. 그러나, 표면 위의 용액을 건조한 후 형성된 층의 최대 두께는 대략 100 nm로 측정되었다. 물 접촉각 측정은 상대적으로 소수성 필름 표면을 나타내었고, 필름의 소수성은 적용된 전달체 시료의 농도에 의존하였다 (도 9C). 이러한 결과는 코팅되었을 때 펼쳐진 역학 나노입자와 일치하고, 친수성 고분자 백본은 입자 코어로부터 소수성 광감제 부분을 노출하는 극성 이산화규소(silicone dioxide) 표면에 부착될 것이다.

[0364] 불용성 응집체의 형성을 야기하는 나노입자 응집 및 물리적 불안정성이 보통 관찰된다. TPP_{0.25}-CS-MP_{0.75} (17A)의 1 mg/ml 수용액의 물리적 안정성이 3개월 동안 관찰되었다. 이 화합물의 침전은 관찰되지 않았다.

[0366] 형광 양자 수율.

[0367] 본 명세서에서, TPP(*p*-NH₂)₁, TPP-NH-Pip 및 TPP의 키토산 유도체 (16A-19B)의 형광 양자 수율은 DMSO에서 연구되었다 (419 nm에서 여기됨). TPP(*p*-NH₂)₁의 양자 수율은 TPP-CS-TMA & TPP-CS-MP 유도체 뿐만 아니라 이의 유도체 TPP-NH-Pip의 양자 수율보다 적었다. 이것은 이의 유도체와 비교하여 TPP(*p*-NH₂)₁의 높은 정도의 여기 상태 종결을 설명하였다. Φ_F 는 중간체 TPP-NH-Pip에 대해 얻어진 값 주위의 작은 변동 ± 0.004 을 가진 모든 전달체 화합물 (16A-19B)에 대해 거의 동일하다.

[0368] 그러나, TPP(*p*-NH₂)₁의 Φ_F 값 (0.0002)은 몇몇 문헌 발표된 데이터에 비해 더 낮다. Bhaumik et.al. (*J Org Chem* 2009, 74:5894)은 DMF에서 418 nm에서 여기되었을 때 이것을 0.05로 보고하였다. 이들은 650 nm의 우리의 현재 결과와 다른 664 nm에서 최대 형광 방출을 보고하였다. 표준으로 TPP가 사용된 반면, 우리는 표준으로 안트라센을 사용하였다. 현재의 연구에서 낮은 Φ_F 는 광감제의 자가-결합 (self-association)에 기인할 수 있다. 하기 표 2는 TPP 변형된 키토산 전달체 16A-19B의 형광 양자 수율 (Φ_F)을 나타낸다.

표 2

[0369]

항목	키토산 유도체	화합물	λ_{abs}^* (nm)	λ_{em}^* (nm)	양자 수율 (Φ_F)
1.	TPP(<i>p</i> -NH ₂) ₁	3	419	651	0.0002
2.	TPP-NH-Pip	5	419	651	0.0036
3.	TPP _{0.1} -CS-TMA _{0.9}	16A	419	651	0.0032
4.	TPP _{0.1} -CS-TMA _{0.9}	16B	419	651	0.0034
5.	TPP _{0.25} -CS-TMA _{0.75}	17A	419	651	0.0036
6.	TPP _{0.25} -CS-TMA _{0.75}	17B	419	651	0.0032

7.	TPP _{0.1} -CS-MP _{0.9}	18A	419	651	0.0036
8.	TPP _{0.1} -CS-MP _{0.9}	18B	419	651	0.0033
9.	TPP _{0.25} -CS-MP _{0.75}	19A	419	651	0.0036
10.	TPP _{0.25} -CS-MP _{0.75}	19B	419	651	0.0033

[0370] * 모든 데이터는 실온에서 DMSO에서 모았다.

[0371] λ - 파장

[0373] 결론

[0374] 우리는 DiTBDMS 키토산이 *meso*-테트라페닐포피린과 결합된 키토산계 나노전달체의 매우 효율적인 합성에 사용될 수 있음을 보여주었다. 이러한 전달체의 합성은 완전히 재현가능하였고, 방법은 고도의 친유성 광감제에 대해 친화도의 정확한 조절을 허용하였다. NMR, 형광, 및 UV-Vis 연구는 광감제 부분의 자가-결합과 일치하였다. 전달체는 극성이고, 우수한 수용해도 및 물리적 안정성을 나타낸다. DMSO에서, 광감제는 자가-결합으로부터 해리됨으로써 형광성이 된다. 수용액에서, 전달체는 양이온성 기 및 응집된 (π - π 적층된) 친유성 TPP 부분으로 구성된 코어 주위의 외부 껍질을 형성하는 고분자 백본을 가진 나노입자-유사 구조로 모일 것이다. 양이온성 기 및 고분자 백본은 액체에서 상대적으로 자유롭게 움직이므로, NMR로 관찰될 수 있다. 이와 반대로, TPP 코어는 매우 제한된 움직임을 갖는 반-고체이므로, 고체 상태 NMR에서만 검출될 수 있다. 이 구조는 동적 평형에서 펼쳐지고, NMR에 의해 TPP의 검출을 허용하는 DMSO에서 우세하게 되는 형태인 형광성이다. 전달체가 세포 또는 세포내 이입 막과 접촉할 경우, 구조는 펼쳐지고, 친유성 부분은 PDT 및 PCI 효과를 야기하는 여기 및 광감작을 허용하는 세포내 이입 막으로 삽입된다.

[0376] 실시예 2 - TPC-키토산계 나노전달체의 합성

[0378] 일반적인 물질 및 방법은 적절한 경우 실시예 1과 같다.

[0380] 합성

[0381] TPC-NH-Pip의 합성에 대해 도 10의 반응식 3 참조

[0382] **Meso-테트라페닐포피린 (1)**. 화합물 1 (TPP)은 *Journal of Organic Chemistry* 1967, 32, 476에 기재된 방법에 의해 제조되었다.

[0384] **5-(4-아미노페닐)-10,15,20-트리페닐포피린 [TPP(*p*-NH₂)₁] (3)**. 화합물 3은 *Tetrahedron* 2004, 60, 2757의 문헌 방법에 따라 제조되었다.

[0386] **5-(4-아미노페닐)-10,15,20-트리페닐클로린: TPC(*p*-NH₂)₁ (20)**. 화합물 3 (1.5 g, 2.38 mmol)을 N₂ 및 어두운 분위기 하에서 피리딘에 용해시켰다. K₂CO₃ (2.96 g, 21.5 mmol) 및 *p*-톨루엔설포닐히드라지드 (0.887 g, 4.77 mmol)를 가하고, 결과의 반응 혼합물을 환류 온도로 가열하였다. 2, 4, 6 및 8h의 간격 후에 추가 양의 *p*-톨루엔설포닐히드라지드 (0.887 g, 4.77 mmol)를 가하였다. 24h 동안 환류 온도에서 계속 교반하였다. 반응 혼합물을 EtOAc:H₂O (2:1, 900 mL)의 1:1 혼합물에 가하고 1 h 동안 환류하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 유기상을 분리하고 2N HCl (3 x 200 mL)로 세척한 다음, 물 (2 x 100 mL) 및 포화 NaHCO₃ 수용액 (2 x 150 mL)으로 세척하였다. 유기상을 Na₂SO₄로 건조한 다음, 진공 하에 농축시켜 1.3g의 조 혼합물을 제공하였다. 조 생성물의 가시

스펙트럼의 분석은 클로린과 박테리오클로린 (각각 651 및 738에서 밴드)의 혼합물로 되는 것으로 나타났다. 또한, ^1H NMR 스펙트럼에 의한 분석은 미량의 출발 포피린 물질이 남아있지 않음을 나타내었다.

[0387] 상기 반응 단계로부터 얻어진 조 물질 (1.3g) (클로린/박테리오클로린 혼합물)을 CH_2Cl_2 (100 mL)에 용해시켰다. *ortho*-클로라닐 (420 mg, 2.7 mmol)을 실온에서 유기용액에 교반하면서 일 인분 가한 다음, 반응의 진행을 UV-vis로 동시에 관찰하였다. 박테리오클로린 (738nm)의 피크가 완전히 감소한 직후, 반응 혼합물을 5% 아황산수소 나트륨(sodium bisulfite) 수용액 (2 x 125 mL)으로 세척한 다음, 물 (100 mL), 5% NaOH (2 x 150 mL), 및 마지막으로 물 (150 mL)로 세척하였다. 유기상을 Na_2SO_4 로 건조한 다음, 진공 하에 농축시켜 오로지 갈색 고체로서 표제 클로린 화합물 **20** (1.2 g, 80%)만 제공하였다. 화합물 **3**은 하나 이상의 이성질체로 존재하는 것처럼 보인다.

[0388] TLC (헥산/ CH_2Cl_2 3:7): R_f =0.23, ^1H NMR (CDCl_3): δ = 7.86-8.66 (m, 14H, β -pyrrole-H & phenyl-Ho), 7.63-7.73 (m, 9H, triphenyl-H_{m,p}), 7.00 (d, J=8Hz, 2H, NH_2 -phenyl-H_m), 4.14-4.23 (m, 4H, chlorin β -pyrrole- CH_2), 3.95 (br s, 2H, NH_2), -1.38 및 -1.46 (br s, 2H, α -pyrrole-NH) ppm; MS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{44}\text{H}_{34}\text{N}_5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 632.2809, found 632.2792.; UV-vis (DMSO): λ_{max} : 422, 524, 553, 600, 652 nm.

[0390] **중간체 TPC-NH-pip (21)의 합성.** 화합물 **20** (600mg, 0.95 mmol)을 CH_2Cl_2 (15 mL)에 용해시키고, N_2 대기 하에서 교반하였다. Et_3N (0.32 mL, 2.27 mmol)을 가한 다음, 실온에서 클로로아세틸 클로라이드 (0.092mL, 1.15 mmol)를 방울방울 가하고 실온에서 계속 교반하였다. 2h 후, 인시츄에서 과량의 피페라진 (0.328 g, 3.8 mmol)을 가하고, 밤새도록 계속 교반하였다. 반응 혼합물을 CH_2Cl_2 (85 mL)로 희석시키고, 추출한 다음, 물 (3 x 35 mL) 및 소금물 (35 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 로 건조한 다음, 여과하고 진공 하에 농축시켰다. 그 다음, 조 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다. 원하는 생성물을 용리액으로 $\text{MeOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (8:92)에서 분리하여 갈색 고체로서 표제 중간체 **21** (440 mg, 61%)을 제공하였다.

[0391] TLC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$, 9:1): R_f =0.15; ^1H NMR (CDCl_3): δ = 9.34, 9.39 (s, 1H, TPC-NH), 7.86-8.65 (m, 16H, β -pyrrole-H, phenyl-Ho & R-NHTPC-phenyl-Ho,_m), 7.66-7.73 (m, 9H, triphenyl-H_{m,p}), 4.18-4.19 (br s, 4H, chlorin β -pyrrole- CH_2), 3.30 (s, 2H, ArNHCOCH_2 -pip), 3.17 (br m, 4H, piperazine ring- CH_2), 2.81 (br m, 4H, piperazine ring- CH_2), -1.37 (br s, 2H, α -pyrrole-NH); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ = 168.37, 167.48, 152.61, 143.14, 142.22, 140.86, 139.20, 138.32, 137.19, 136.99, 135.33, 134.64, 133.98, 133.01, 132.37, 132.12, 131.96, 128.17, 127.69, 126.81, 123.56, 123.38, 122.79, 122.08, 119.22, 117.94, 112.41, 111.65, 62.63, 53.50, 45.59, 35.90 ppm; UV-vis (DMSO): λ_{max} : 421, 521, 549, 598, 651 nm.

[0393] 도 11의 반응식 4 참조

[0394] **tert-부틸 피페라진-1-카복실레이트 (22)의 합성.** 피페라진 (6g, 69.6 mmol)을 CH_2Cl_2 (120 mL)에 용해시켰다. 용액을 0°C로 냉각시키고, CH_2Cl_2 (80 mL) 내 Boc_2O (7.6 g, 34.8 mmol)를 방울방울 가하였다. 반응 혼합물을 실온으로 데우고, 24h 동안 계속 교반하였다. 침전물을 여과하여 제거하고, CH_2Cl_2 (2 x 20 mL)로 세척한 다음, 모아진 여과액을 분리하고, 물 (3x 40mL), 소금물 (30 mL)로 세척한 다음, Na_2SO_4 로 건조하고 진공 하에 농축하여 백색 고체로서 표제 화합물 **22** (6.5 g, 50%)를 제공하였다.

[0395] Mp 44-46°C (lit. mp 46-47°C); ^1H NMR (CDCl_3): δ = 3.32 (t, J=4Hz, 4H), 2.74 (t, J=4Hz, 4H), 1.39 (s, 9H); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ = 154.85, 80.00, 79.52, 45.96, 44.45, 28.45 ppm; MS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 187.1441 found 187.1412.

- [0397] ***p*-(메톡시카보닐)벤즈알데히드 (23)의 합성.** 4-카복시벤즈알데히드 (4 g, 26.6 mmol)를 60 mL의 무수 MeOH에 현탁시키고 N₂ 하에서 교반하였다. 반응 혼합물을 0℃로 냉각시키고, 아세틸 클로라이드 (9.5 mL, 133 mmol)를 방울방울 가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 12h 동안 교반하였다. MeOH을 진공 하에 제거하고, 조 혼합물을 EtOAc (120 mL)로 희석하였다. 유기상을 1N NaOH 수용액 (5 x 30mL) 및 소금물 (2 x 25 mL)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조한 다음, 여과하고 진공 하에 농축시켰다. 조 고체를 EtOAc 및 석유 에테르를 이용하여 재결정화한 다음, 백색 고체로서 에스터 **23** (3.8 g, 87%)을 제공하였다.
- [0398] TLC (헥산:CH₂Cl₂, 3:7): R_f = 0.36; Mp: 61-63℃ (lit. mp 59-64℃); ¹H NMR (CDCl₃): δ = 10.06 (s, 1 H, CHO), 8.15 (d, J=8.4 Hz, 2H), 7.91 (d, J=8.4 Hz, 2H), 3.92 (s, 3H) ppm; ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 191.66, 166.07, 139.21, 135.13, 130.23, 129.55, 52.62 ppm.
- [0400] **5-(4-메톡시카보닐페닐)-10,15,20-트리페닐포피린 TPP(*p*-CO₂Me)₁ (24)의 합성.** 문헌 방법에 따름 (*J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 4236-4237).
- [0402] **5-(4-카복시페닐)-10,15,20-트리페닐포피린 TPP(*p*-CO₂H)₁ (25)의 합성.**
- [0403] 화합물 **24** (1.2g, 1.78 mmol)를 THF:피리딘의 혼합물 (10:1, 100mL)에 용해시켰다. 2N 메탄올릭 KOH (120 mL)를 가하고, 반응 혼합물을 24h 동안 환류하였다. 그 다음, 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 포화 시트르산 수용액으로 중화시켰다. 이어서, MeOH 및 THF의 제거가 완료될 때까지 반응 혼합물을 진공 하에 농축하였다. 조 혼합물을 CH₂Cl₂ (150 mL) 및 물 (120 mL)로 희석한 다음, 수상을 CH₂Cl₂ (3 x 50 mL)로 추출하였다. 모아진 유기상을 물 (2 x 40 mL) 및 소금물 (35 mL)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조한 다음, 진공 하에 농축시켰다. 조 혼합물을 MeOH:CH₂Cl₂ (용리액으로 100:0 내지 96:4)를 이용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 자주색 고체로서 표제 산 **25** (0.83 g, 71%)를 제공하였다.
- [0404] TLC (CH₂Cl₂:MeOH 95:5): R_f = 0.54; ¹H NMR (DMSO-d₆): δ = 8.84 (br s, 8H, β-pyrrole-H), 8.33-8.39 (m, 4H, R-COTPP-phenyl-Ho,m), 8.21-8.23 (m, 6H, triphenyl-Ho), 7.81 -7.88 (m, 9H, triphenyl-Hm,p), -2.92 (s, 2H, NH) ppm; MS (ESI): m/z calcd. for C₄₅H₃₁N₄O₂ ([M+H]⁺) 659.2442, found 659.2420.
- [0406] **5-(4-카복시페닐)-10,15,20-트리페닐클로린 TPC(*p*-CO₂H)₁ (26)의 합성.**
- [0407] 화합물 **25** (600 mg, 0.9mmol) 및 무수 K₂CO₃ (1.13 g, 8.2mmol)를 N₂ 및 어두운 분위기 하에서 피리딘 (42 mL)에 용해시켰다. 톨루엔-4-설폰닐히드라지드 (340 mg, 1.8 mmol)를 가한 다음, 혼합물을 환류 온도에서 교반하였다. 2, 4, 6, 8 및 10h 반응의 간격 후에 3mL의 피리딘 내 톨루엔-4-설폰닐히드라지드 (340mg, 1.8 mmol)의 추가 양을 가하였다. 24h 동안 환류 온도에서 계속 교반하였다. 실온으로 냉각시킨 후, EtOAc (500 mL) 및 탈이온화된 H₂O (250mL)을 가하고, 반응 혼합물을 1 h 동안 다시 환류시켰다. 실온으로 냉각시킨 후, 유기상을 분리하고 2N HCl (2 x 150 mL)로 세척한 다음, 물 (2 x 150mL)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조한 다음, 진공 하에 농축시켜 565mg의 조 혼합물을 제공하였다. 조 생성물의 가시 스펙트럼의 분석은 클로린과 박테리오클로린 (각각 651 및 738에서 밴드)의 혼합물로 되는 것으로 나타났다. 또한, ¹H NMR 스펙트럼에 의한 분석은 미량의 출발 포피린 물질이 남아있지 않음을 나타내었다.
- [0408] 상기 반응 단계로부터 얻어진 조 물질 (클로린/박테리오클로린 혼합물, 565mg)을 CH₂Cl₂ : MeOH (75:25)의 혼합물에 완전히 용해시켰다. *ortho*-클로라닐 (180 mg, 0.7 mmol)을 실온에서 유기용액에 교반하면서 일 인분 가한 다음, 반응의 진행을 UV-vis로 동시에 관찰하였다. 박테리오클로린 (738nm)의 흡수 피크가 감소한 직후, 유기상

을 5% 아황산수소나트륨(sodium bisulfite) 수용액 (2 x 150 mL)으로 세척한 다음, 물 (100 mL), 5% NaOH 수용액 (2 x 150mL) 및 마지막으로 물 (120mL)로 세척하였다. 만일 에멀전이 관찰되었으면, 유기상을 포화 시트르산 수용액으로 세척하였다. 유기상을 Na₂SO₄로 건조한 다음, 여과하고, 진공 하에 농축시켜 오로지 갈색 고체로서 표제 클로린 화합물 **26** (420mg, 70%)만을 제공하였다. 화합물 **9**는 하나 이상의 이성질체로 존재한다.

[0409] TLC (CH₂Cl₂: MeOH, 95:5): R_f = 0.54, ¹H NMR (DMSO-d₆): δ = 7.91-8.58 (m, 16H, β-pyrrole-H, phenyl-Ho & R-COTPC-phenyl-Ho,m), 7.68-7.77 (m, 9H, triphenyl-Hm,p), 4.12-4.13 (m, 4H, chlorin β-pyrrole-CH₂), -1.53 및 -1.60 (2 brs, 2H, α-pyrrole-NH); ¹H NMR (CDCl₃): δ = 7.87-8.60 (m, 16H, β-pyrrole-H, phenyl-Ho & R-COTPC-phenyl-Ho,m), 7.64-7.74 (m, 9H, triphenyl-Hm,p), 4.16-4.18 (m, 4H, chlorin β-pyrrole-CH₂), -1.39 및 -1.49 (2 br s, 2H, α-pyrrole-NH) ppm; MS (ESI) calcd. for C₄₅H₃₃N₄O₂ ([M+H]⁺) 661.2598, found 661.2566; UV-vis (DMSO): λ_{max}: 420, 520, 547, 599, 651 nm.

[0411] **중간체 tert-부틸 N-[피페라진-1-카복실레이트]-5-(4-카복시페닐)-10,15,20-트리페닐클로린 (27)의 합성.** 클로린 화합물 **26** (500 mg, 0.76 mmol) 및 tert-부틸 피페라진-1-카복실레이트 **22** (155 mg, 0.83 mmol)를 N₂ 및 어두운 분위기 하에서 DMF (4 mL)에 용해시켰다. 반응 혼합물에, EDCI-HCl (174mg, 0.91 mmol) 및 HOBT (123 mg, 0.91 mmol)를 가한 다음, 실온에서 Et₃N (0.26 mL, 1.82 mmol)을 가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새도록 교반한 다음, 교반하면서 물 (100 mL)에 천천히 부었다. 고체 물질을 여과하여 제거하고, 많은 물로 세척한 다음, 잘 건조하였다. 조 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (CH₂Cl₂:MeOH 100:0 내지 99:1)로 정제하여, 갈색 고체로서 표제 아마이드 화합물 **27** (340 mg, 54%)을 제공하였다.

[0412] TLC (CH₂Cl₂:MeOH 99:1): R_f = 0.74; ¹H NMR (CDCl₃): δ = 7.74-8.59 (m, 16H, β-pyrrole-H, phenyl-Ho & R-COTPC-phenyl-Ho,m), 7.65-7.72 (m, 9H, triphenyl-Hm,p), 4.16-4.17 (m, 4H, chlorin β-pyrrole-CH₂), 3.78-3.86 (br m, 4H, piperazine ring-CH₂), 3.63 (br m, 4H, piperazine ring-CH₂), 1.53 (s, 9H, boc-(CH₃)₃), -1.39 및 -1.47 (2 brs, 2H, α-pyrrole-NH) ppm.

[0414] **중간체 TPC-CO-pip (28)의 합성.** 화합물 **27** (320 mg, 0.39 mmol)을 N₂ 및 어두운 분위기 하에서 CH₂Cl₂ (8 mL)에 용해시켰다. CH₂Cl₂:TFA (1:1, 4 mL)를 가하고 1 h 동안 rt에서 교반하였다. 반응 혼합물을 CH₂Cl₂ (40 mL)로 희석시키고, 물 (2 x 15 mL), 포화 NaHCO₃ 수용액 (2 x 15 mL) 및 소금물 (15mL)로 세척하였다. 유기층을 Na₂SO₄로 건조하고 진공 하에 농축시켰다. 그 다음, 조 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (용리액으로 CH₂Cl₂:MeOH 100:0 내지 92:8)로 정제하여, 갈색 고체로서 표제 중간체 **28** (250mg, 89%)을 제공하였다.

[0415] TLC (CH₂Cl₂:MeOH, 9:1): R_f = 0.35, ¹H NMR (CDCl₃): δ = 7.74-8.59 (m, 16H, β-pyrrole-H, phenyl-Ho & R-COTPC-phenyl-Ho,m), 7.64-7.72 (m, 9H, triphenyl-Hm,p), 4.16-4.17 (m, 4H, chlorin β-pyrrole-CH₂), 3.73-3.90 (br m, 4H, piperazine ring-CH₂), 3.04 (br m, 4H, piperazine ring-CH₂), -1.40 및 -1.47 (2 brs, 2H, α-pyrrole-NH) ppm; MS (ESI) calcd. for C₄₉H₄₂N₆O ([M+2H]⁺/2) 365.1705, found 365.1707; UV-vis (DMSO): λ_{max}: 420, 520, 546, 599, 651 nm.

[0417] **키토산 메실레이트 염 (7).** 우리의 이전에 발표된 방법에 따라 합성됨 (Carbohydrate Polymers 2010, 81 :140-144).

[0419] **N-브로모아세틸-3,6-O-DiTBDMs-CS (BrA-DiTBDMs-CS, 9).** DiTBDMs-CS **8** (1 g, 2.60mmol)을 N₂ 대기 하에 둥근 바닥 플라스크에서 건조 CH₂Cl₂ (15 mL)에 용해시켰다. 반응 혼합물을 얼음/소금 혼합물로 -20℃로 냉각시켰다. Et₃N (1.81 mL, 13mmol)을 가한 다음, 브로모아세틸 브로마이드 (0.91 mL, 10mmol)를 천천히 방울방울 가하고 1 h 동안 계속 교반하였다. 반응 혼합물을 CH₂Cl₂로 희석시키고, 진공 하에 농축시켰다. 조 생성물을 아세토니트릴에서 교반하고, 여과한 다음 새로운 아세토니트릴로 세척하였다. 건조 물질을 CH₂Cl₂에 용해시키고 추출한 다음, 물과 소금물로 세척하고, Na₂SO₄로 건조한 다음, 진공 하에 농축시켜, 옅은 노란색 분말의 표제 브로모 화합물 **9** (1.2g, 92%)를 얻었다.

[0420] FT-IR (KBr): ν 3402 (br, NH), 2957, 2931, 2886, 2858 (s, C-H TBDMS), 1682 (vs, C=O amide I), 1530 (vs, C=O amide II), 1473, 1391, 1362, 1311, 1259, 1101, 1005, **837, 777 (Si-C)**, 669 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ ppm: 4.40 (br s, H-1), 4.02-3.26 (m, H-2 GlcN, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6' 및 2H GluNH-C=OCH₂Br), 0.90 및 0.88 (br s, (CH₃)₃C-Si), 0.13 및 0.07 (br s, (CH₃)₂Si) ppm.

[0422] 도 13의 반응식 6A 참조

[0423] 중간체 29의 합성

[0424] **(N-TPC-NH-Pip-아세틸)_{0.1}-(N-브로모아세틸)_{0.9}-DiTBDMs-CS (TPC_{NP0.1}-BrA_{0.9}- DiTBDMs-CS, 29).** 화합물 **9** (800 mg, 1.58 mmol) 및 화합물 TPC-NH-Pip **21** (120 mg, 0.158 mmol)을 N₂ 및 어둠 속에서 CH₂Cl₂ (25 mL)에 용해시켰다. **21**에 대하여 정확한 동몰량의 Et₃N (22 μ L, 0.158mmol)을 가하고, 반응 혼합물을 24h 동안 rt에서 교반하였다. 출발물질의 총 소비는 TLC로 확인하였다. 반응 혼합물을 CH₂Cl₂ (55 mL)로 희석시키고, 물 (2 x 25 mL) 및 소금물 (25 mL)로 세척하였다. 유기상을 Na₂SO₄로 건조한 다음, 진공 하에 농축시켜 화합물 **29** (700 mg, 78%)를 제공하였다.

[0425] ¹H NMR (CDCl₃): δ = 9.21, 9.25 (s, TPCNHCO), 7.86-8.60 (m, β -pyrrole-H, phenyl-Ho & R-NHTPC-phenyl-Ho,m), 7.65-7.73 (m, triphenyl-Hm,p), 3.35-4.50 [br m, chitosan (H-1, H-2 GlcN, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6' 및 2H GluNH-C=O, CH₂CONGlc), TPCNHCOCH₂-pip, piperazin ring-CH₂ 및 chlorin β -pyrrole-CH₂], 2.77-2.83 (m, piperazine ring-CH₂), 0.88-0.89 [br s, (CH₃)₃C-Si], 0.02-0.13 [(br m, (CH₃)₂Si], -1.44 (br s, 2H, α -pyrrole-NH) ppm.

[0427] 도 13의 반응식 6B 참조

[0428] 중간체 34의 합성

[0429] **(N-TPC-CO-Pip-아세틸)_{0.1}-(N-브로모아세틸)_{0.9}-DiTBDMs-CS (TPCcp_{0.1}-BrA_{0.9}- DiTBDMs-CS, 34).** 화합물 **9** (800 mg, 1.58 mmol)를 N₂ 및 어둠 속에서 NMP (25 mL)에 용해시켰다. TPC-CO-Pip **28** (125 mg, 0.173 mmol) 및 NaHCO₃ (0.29 g, 3.45 mmol)를 실온에서 가하였다. 반응 혼합물을 75℃에서 가열하고 밤새도록 교반한 다음, 냉각시키고, 교반하면서 물에 부었다. 고체를 여과하여 제거하고, 많은 물로 세척한 다음, 흡입 하에 건조하였다. 얻어진 고체를 CH₂Cl₂에 용해시키고 여과한 다음, Na₂SO₄로 건조하고, 용매를 진공 하에 제거하여, 갈색 고체로서 화합물 **34** (810mg, 89%)를 제공하였다.

[0430] ¹H NMR (CDCl₃): δ = 7.75-8.60 (m, β -pyrrole-H, phenyl-Ho & R-COTPC-phenyl-Ho,m), 7.64-7.71 (m, triphenyl-Hm,p), 3.38-4.5 [br m, chitosan (H-1, H-2 GlcN, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6' 및 2H GluNH-C=O, CH₂CONGlc), piperazin ring-CH₂ 및 chlorin β -pyrrole-CH₂], 2.76-2.84 (m, piperazin ring-CH₂), 0.89-0.92 [br s, (CH₃)₃C-Si], 0.02-0.10 [(br m, (CH₃)₂Si)], -1.40 및 -1.48 (br s, α -pyrrole-NH) ppm.

[0432] 화합물 30 & 35에 대해 일반적인 방법 A

[0433] (N-TPC-NH-Pip-아세틸)_{0.1}-(N-(N,N,N-트리메틸암모늄일)아세틸)_{0.9}-DiTBDMS-CS (TPC_{NP0.1}-DiTBDMS-CS-TMA_{0.9}, 30). 화합물 29 (350mg, 0.61 mmol)를 N₂ 및 어둠 속에서 CH₂Cl₂ (15 mL)에 용해시켰다. 과량의 트리메틸아민 용액을 가하고, 반응 혼합물을 24h 동안 rt에서 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하였다. 조 생성물을 고진공 하에 완전히 건조하여 갈색 고체로서 조 생성물 30 (355 mg, 94%)을 수득하였다. 조 화합물을 다음 단계에 사용하였다.

[0435] (N-TPC-CO-Pip-아세틸)_{0.1}-(N-(N,N,N-트리메틸암모늄일)아세틸)_{0.9}-DiTBDMS-CS (TPC_{cp0.1}-DiTBDMS-CS-TMA_{0.9}, 35). 일반적인 방법 A는 34 (350 mg, 0.61 mol) 및 트리메틸아민 용액을 사용하여 조 고체로서 35 (360 mg, 94%)를 제공하였다. 조 화합물을 다음 단계에 사용하였다.

[0437] 화합물 31 & 36에 대해 일반적인 방법 B

[0438] (N-TPC-NH-Pip-아세틸)_{0.1}-(N-(N-메틸피페라지닐)아세틸)_{0.9}-DiTBDMS-CS (TPC_{NP0.1}-DiTBDMS-CS-MP_{0.9}, 31). 화합물 29 (350mg, 0.61 mmol)를 N₂ 및 어둠 속에서 CH₂Cl₂ (15 mL)에 용해시켰다. 과량의 1-메틸피페라진 용액을 가하고, 반응 혼합물을 24h 동안 실온에서 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하였다. 조 생성물을 고진공 하에 완전히 건조하여 상응하는 조 생성물 31 (330 mg, 89%)을 수득하였다. 조 화합물을 다음 단계에 사용하였다.

[0440] (N-TPC-CO-Pip-아세틸)_{0.1}-(N-(N-메틸피페라지닐)아세틸)_{0.9}-DiTBDMS-CS (TPC_{cp0.1}-DiTBDMS-CS-MP_{0.9}, 36). 일반적인 방법 B는 34 (250 mg, 0.38 mol) 및 1-메틸피페라진을 사용하여 조 고체로서 36 (265 mg, 93%)을 제공하였다. 조 화합물을 다음 단계에 사용하였다.

[0442] 최종 생성물 (32, 33, 37 & 38)의 합성

[0443] 일반적인 방법 C를 따라 최종 탈보호화를 이루었다:

[0444] 화합물 (30/ 31/ 35/ 36)을 N₂ 및 어둠 속에서 MeOH에 용해시켰다. 반응 혼합물을 5분 동안 N₂로 퍼징(purging)하여 탈기한 다음, 0°C로 냉각시키고, 4 mL의 conc. HCl을 가하였다. 반응 혼합물을 실온으로 데우고, 12h 동안 교반한 다음, 진공 하에 완전히 농축시켰다. 조 잔여물을 다시 N₂ 및 어둠 속에서 MeOH에 용해시키고 탈기하였다. 반응 혼합물을 0°C로 냉각시키고, 2 mL의 conc. HCl을 가하였다. 반응 혼합물을 실온으로 데우고, 12h 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 희석한 다음, 1h 동안 5% NaCl 수용액을 가하여 이온 교환하고, 24h 동안 8% NaCl 수용액에 대해 투석한 다음 3일 동안 탈이온수에 대해 투석하였다. 이어서 맑은 갈색 용액을 밤새도록 동결건조하여 갈색 솜털 물질로서 최종 생성물 (각각 32/ 33/ 37/ 38)을 제공하였다.

[0446] TPC_{NP0.1}-CS-TMA_{0.90} (32). 일반적인 방법 C는 30 (325 mg, 0.52 mmol) 및 conc. HCl/MeOH을 사용하여 갈색 고체로서 32 (175 mg, 85%)를 제공하였다.

[0447] ¹H NMR (DMSO-d₆: D₂O 98:2): δ = 7.83-8.62 (m, β-pyrrole-H, phenyl-Ho & R-NHTPC-phenyl-Ho,m), 7.69-7.77 (m, triphenyl-Hm,p), 4.52 (br s, H-1), 4.11-4.14 (m, -CH₂CONGlc 및 chlorin β-pyrrole-CH₂), 3.26-3.67 (br m, partially overlapped with HDO peak, H-2 GlcNAc, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6', 2H GluNH-C=O, TPCNHCOCH₂-pip, piperazine ring-CH₂) 3.24 (s, ⁺N(CH₃)₃) ppm; UV-vis (DMSO): λ_{max}: 421, 520, 549, 599, 651 nm.

- [0449] **TPC_{NP0.1}-CS-MP_{0.90} (33)**. 일반적인 방법 C는 **31** (300 mg, 0.45 mmol) 및 conc. HCl/MeOH을 사용하여 갈색 고체로서 **33** (165 mg, 84%)을 제공하였다.
- [0450] ¹H NMR (DMSO-d₆: D₂O 98:2): δ = 7.83-8.62 (m, β-pyrrole-H, phenyl-Ho & R-NHTPC-phenyl-Ho,m), 7.66-7.75 (m, triphenyl-Hm,p), 4.50 (br s, H-1), 4.10-4.14 (m, chlorin β-pyrrole-CH₂), 2.92-3.55 (m, partially overlapped with H₂O peak, H-2 GlcNAc, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6', 2H GluNH-C=O, CH₂CONGlc, TPCNHCOCH₂-pip), 2.33-2.63 (m, partially overlapped with DMSO-d₆ peak, piperazine ring-CH₂, piperazine-N-CH₃) ppm; UV-vis (H₂O): λ_{max}: 412, 430, 531, 560, 611, 664 nm; UV-vis (DMSO): λ_{max}: 421, 521, 548, 596, 651 nm.
- [0452] **TPC_{cp0.1}-CS-TMA_{0.90} (37)**. 일반적인 방법 C는 **35** (300 mg, 0.48 mmol) 및 conc. HCl/MeOH을 사용하여 갈색 고체로서 **37** (170 mg, 89%)을 제공하였다.
- [0453] FT-IR (KBr): ν 3353, 3061, 2950, 1683, 1580, 1473, 1440, 1376, 1291, 1154, 1112, 1067, 1032, 970, 911, 794, 703 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-d₆: D₂O 98:2): δ = 7.89-8.62 (m, β-pyrrole-H, phenyl-Ho & R-COTPC-phenyl-Ho,m), 7.67-7.76 (m, triphenyl-Hm,p), 4.50 (br s, H-1), 4.06-4.16 (m, CH₂CONGlc 및 chlorin β-pyrrole-CH₂), 3.26-3.75 (m, partially overlapped with H₂O peak, H-2 GlcNAc, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6', 2H GluNH-C=O, piperazine ring-CH₂), 3.24 (s, ⁺N(CH₃)₃) ppm; UV-vis (DMSO): λ_{max}: 420, 520, 547, 599, 651 nm.
- [0455] **TPC_{cp0.1}-CS-MP_{0.90} (38)**. 일반적인 방법 C는 **36** (240 mg, 0.38 mmol) 및 conc. HCl/MeOH을 사용하여 갈색 고체로서 **38** (85 mg, 52%)을 제공하였다.
- [0456] FT-IR (KBr): ν 3349, 2927, 1644, 1580, 1461, 1440, 1374, 1285, 1070, 1043, 985, 945, 794719, 703 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-d₆: D₂O 98:2): δ = 7.86-8.63 (m, β-pyrrole-H, phenyl-Ho & R-COTPC-phenyl-Ho,m), 7.67-7.76 (m, triphenyl-Hm,p), 4.50 (br s, H-1), 4.08-4.14 (m, chlorin β-pyrrole-CH₂), 2.92-3.55 (m, partially overlapped with H₂O peak, H-2 GlcNAc, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6', 2H GluNH-C=O, CH₂CONGlc) 2.27-2.63 (m, partially overlapped with DMSO-d₆ peak, piperazine ring-CH₂, piperazine-N-CH₃) ppm; UV-vis (DMSO): λ_{max}: 421, 520, 547, 599, 651 nm.
- [0458] **화합물 32, 33, 37 및 38의 TPP 유사체**
- [0459] 최종 화합물 **32, 33, 37 및 38**에 대해 하기 일반적인 TBDMS 탈보호화 방법 D가 사용되는 경우, 뜻밖의 결과 (TBAF/NMP에 의해 TPC 화합물의 TPP 화합물로의 역-산화(Back-oxidation))를 관찰하였다.
- [0461] **실시예: 화합물 32의 TPP 유사체 (TPP_{NP0.1}-CS-TMA_{0.9})**
- [0462] 물질 **30** (600mg, 0.86mmol)을 *N*-메틸-2-피롤리돈 (NMP) (5-10 mL)에 용해한 다음, 과량의 테트라-*n*-부틸암모늄 플루오라이드 (TBAF)를 가하였다. 반응 혼합물을 55°C에서 24h 동안 교반하고, 냉각시킨 다음, 묽은 HCl로 산성화하고, 30분 동안 교반한 다음 이를 동안 탈이온수 내 8% NaCl (w/v)에 대해 투석하고, 3일 동안 탈이온수에 대해 투석하였다. 이 기간 동안, 용액의 색깔이 점점 회색에서 적색으로 변하였다. 그 다음 적색 용액을 동결건조시켜 갈색 스폰지-유사 물질을 수득하였다. 물질을 다시 탈보호화, 이온교환, 투석 및 동결건조하였다. 그러

나, 놀랍게도 역-산화로 인해 화합물은 이들의 TPP 유사체로 역변환하였으며, (650 nm에서 특징적인 피크가 거의 완전히 감소한 바와 같이) UV-Vis에 의해 확인되었다. (데이터를 나타내지 않음).

결과

하기 표 3은 최종 전달체 화합물에 대한 DS를 나타낸다. 표 4는 TPC 변형된 키토산 전달체의 형광 양자 수율 (Φ_F)을 나타낸다. 도 14는 TPC-CO-Pip (28)의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸다. 2개의 이성질체를 나타낸다. 도 15-17은 각각 화합물 21, 29 및 34에 대해 동등한 스펙트럼을 나타낸다. 도 18은 d_6 -DMSO/ D_2O 내 최종 전달체 화합물 37, 38, 32 및 33의 NMR 스펙트럼을 나타낸다.

표 3

항목	키토산 유도체	화합물	TPC-NH-Pip (사용된 당류 단위 당 eq.)	TPC-CO-Pip (사용된 당류 단위 당 eq.)	DS (당류 단위 당 결합된 TPP 부분)
1.	TPC _{NP0.1} -CS-TMA _{0.9}	32	0.10	-	0.10*
2.	TPC _{NP0.1} -CS-MP _{0.9}	33	0.10	-	0.10*
3.	TPC _{CP0.1} -CS-TMA _{0.9}	37	-	0.11	0.13**
4.	TPC _{CP0.1} -CS-MP _{0.9}	38	-	0.11	0.13**

* 중간체 29의 ^1H NMR에 의해 측정된 DS

** 중간체 34의 ^1H NMR에 의해 측정된 DS

표 4

항목	키토산 유도체	화합물	λ_{abs}^* (nm)	λ_{em}^* (nm)	양자 수율 (Φ_F)
1.	TPC(<i>p</i> -NH ₂) ₁	20	420	653	0.00246
2.	TPC-NH-Pip	21	420	653	0.01355
3.	TPC _{NP0.1} -CS-TMA _{0.9}	32	420	653	0.01383
4.	TPC _{NP0.1} -CS-MP _{0.9}	33	420	653	0.01353
5.	TPC(<i>p</i> -COOH) ₁	26	420	653	0.01331
6.	TPC-CO-Pip	28	420	653	0.01366
7.	TPC _{CP0.1} -CS-TMA _{0.9}	37	420	653	0.01270
8.	TPC _{CP0.1} -CS-MP _{0.9}	38	420	653	0.01275

* 모든 데이터는 실온에서 DMSO에서 모았다.

λ - 파장

실시예 3 - In vitro 및 in vivo 연구

물질

HCT116/LUC 인간 결장암 세포주 (유전자 인코딩 루시페라제와 함께 영원히 형질주입됨)는 Dr. Mohammed Amarzguoui, siRNAsense, Oslo, Norway에 의해 친절히 제공되었다. MTT (3-[4,5-디메틸티아졸-2-일]-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드)는 Sigma-Aldrich (MO, USA; cat. no. M 2128)로부터 구입하였으며, 5 mg/ml의 농도

로 PBS에 용해시키고, 여과하여 멸균한 다음, 4℃에서 저장하였다. 플라스미드 *pEGFP-N1*는 Clontech Laboratories Inc. (CA, USA; Cat. No. 6085-1)로부터 구입하였으며, ELIM Biopharmaceuticals, Inc. (CA, USA) (lot# 1002)에 의해 생산되었고, 멸균수에서 2 mg/ml의 농도로 제공되었다. 이 저장 용액을 분액하고 -20℃에서 유지하였다. 폴리-L-리신 HBr (MW 15000-30000)은 Sigma-Aldrich (MO, USA; cat. no. P 7890)로부터 구입하였다. 폴리-L-리신 HBr을 증류수에 녹이고 희석한 다음, 여과하여 멸균하고, -20℃에서 저장하였다.

[0477] ***In vitro* 연구**

[0478] **세포 배양.**

[0479] HCT116/LUC는 습한 환경에서 37℃ 및 5% CO₂에서 10% 우태아혈청 (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria), 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신 (Sigma-Aldrich, MO, USA)으로 보충된 DMEM 배지 (Lonza, Veviers, Belgium)에서 배양되었다.

[0481] **세포의 처리.**

[0482] HCT116/LUC 세포 (형질주입 측정에 대해 웰 당 1.5×10^5 세포, MTT 어세이에 대해 웰 당 3.75×10^5 세포)를 6-웰 (형질주입) 및 24-웰 (MTT) 플레이트 (Nunc, Roskilde, Denmark)에 씨딩하고, 24 h (5% CO₂, 37℃) 동안 배양하였다. 광감제 TPCS_{2a} 또는 키토산 컨쥬게이트 (16A, 16B, 17A, 19A, 37, 38, 32 또는 33)를 세포에 가한 다음, 세포를 18 h (5% CO₂, 37℃) 동안 배양하였다. 세포를 세포 배양 배지로 3번 세척한 다음, 플라스미드 복합체를 함유하는 배지에서 4 h (5% CO₂, 37℃) 동안 배양하였다. 그 다음, 세포를 한번 세척하였다. 새로운 배지를 첨가한 후, 세포를 다른 빛 선량으로 조명하였다. 배양의 48 h 후, EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)의 발현을 유세포 분석기로 분석하였다. 세포 생존은 병렬 실험으로 MTT 어세이로 측정되었다.

[0483] 세포를 LumiSource® (PCI Biotech, Oslo, Norway)로부터의 빛에 노출시켰다. LumiSource®는 주로 420-435 nm의 영역에서 피크 파장을 가진 청색 빛을 방출하는 길게 늘어선 4 조명관(light tubes) (4 x 18 W Osram L 18/67, Blue)을 제공한다.

[0486] ***플라스미드/폴리-L-리신 복합체의 제조.**

[0487] 전하비(charge ratio) 2.2를 가진 플라스미드/폴리-L-리신 복합체는 플라스미드 DNA 및 폴리-L-리신 용액의 조임스러운 혼합에 의해 형성되었다. 2.5 µl의 DNA (저장 용액 2 µg/µl)를 47.5 µl의 물로 희석하고, 6.92 µl의 폴리-L-리신 (1 µg/µl)은 43.08 µl의 물로 희석하였다. 혼합 후, 용액을 30분 동안 실온에서 배양한 다음, 배양 배지로 1 ml의 최종 부피로 희석하고, 세포에 가하였다 (웰 당 1 ml).

[0489] **형질주입의 측정.**

[0490] 세포를 100 µl의 트립신 (Trypsin- EDTA, Sigma-Aldrich, MO, USA)에서 트립신화하고, 500 µl의 배양 배지에 재현탁한 다음, 세포-여과기 캡(Cell-Strainer Cap)을 가진 5 ml 폴리스티렌 둥근-바닥 튜브 (50 µm 메시 나일론 여과기(mesh nylon filter))를 통해 여과하고, BD LSR 유세포 분석기 (Becton Dickinson, CA, USA)에서 분석하였다. EGFP는 488 nm에서 여기 후 425-475 nm 여과기를 통해 측정되었으며, 요오드화 프로피듐(propidium iodide) (Calbiochem Corporation, CA, USA)는 561 nm에서 여기 후 600-620 nm 여과기를 통해 측정되었다. 요오드화 프로피듐 (1 µg/ml)을 사용하여 생존할 수 있는 세포들로부터 죽은 세포들을 구별하였고, 펄스-처리를 수행하여 단일 세포들로부터 한 쌍의 세포를 구별하였다. 각 시료에 대해 10000 결과들을 모았고, BD FACSDiva Software (Becton Dickinson, CA, USA)로 데이터를 분석하였다.

[0492] **세포 생존의 측정.**

[0493] 세포 생존은 살아있는, 신진대사로 활성적인 세포에서 존재하는 미토콘드리아 탈수소효소 (mitochondrial dehydrogenases)에 의해 자주색, 불용성 포마잔 생성물로 수용성 테트라졸륨 염 (MTT)의 환원을 기준으로 한 방법에 의해 측정되었다. 0.125 mg의 MTT를 함유하는 0.5 ml의 배지를 세포에 가한 다음, 37℃, 5% CO₂에서 2 h 동안 배양하였다. 결과의 포마잔 결정은 웰 당 500 μ l의 DMSO (Sigma-Aldrich, MO, USA)를 가하여 용해하였다. 플레이트를 PowerWave XS2 Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, VT, USA)로 판독하였다. 세포 생존은 대조군의 백분율로서 계산되었다 (빛이 없는 병렬 실험).

[0495] **In vivo 연구**

[0496] **동물.** Hsd:무흉선 누드(Athymic nude)-Foxn1^{nu} 암컷 마우스를 노르웨이 라듐 병원 (Norwegian Radium Hospital)의 동물학과에서 사육하였다. 마우스는 특정 병원균이 없는 조건 하에 두었다. 물과 먹이를 무제한으로 제공하였다. 마우스를 포함하여 모든 절차는 동물 보호에 관한 국가윤리위원회의 지침 하에, 노르웨이 라듐 병원에서 동물 관리 위원회에 의해 승인된 프로토콜에 따라 수행되었다.

[0497] 마우스는 실험에 포함될 때 22-25 g (5-8 주령)이었다. HCT116/LUC 세포는 이식하기 전에 습한 환경에서 37℃ 및 5% CO₂에서 배양하였다. 1.5×10^6 세포를 각 마우스의 오른쪽 엉덩이에 피하 주사하였다. 종양 크기는 2개의 수직 직경 (perpendicular diameters)을 측정하여 주 당 2 또는 3번 측정하였다. 종양 부피는 하기 식을 이용하여 계산하였다:

[0498]
$$V = (W^2 \times L)/2$$

[0499] 여기서, W 는 측정된 종양의 너비이고, L 은 측정된 종양의 길이 직경이다.

[0501] **처리**

[0502] 키토산을 PBS (화합물 37) 및 3% Tween 80 (화합물 38 및 33)에서 1.25 mg/ml TPC로 희석하였다. 종양이 60-100 mm³의 부피에 도달하였을 때, 88-100 μ l를 꼬리 정맥에 정맥 주사하였다 (최종 용량 5 m/kg). TPCS_{2a}를 3% Tween 80에서 1.25 mg/ml로 희석하고, 종양이 60-100 mm³의 부피에 도달하였을 때, 88-100 μ l를 꼬리 정맥에 정맥 주사하였다 (최종 용량 5 m/kg). 광감제의 주사 후 96 h에 종양을 90 mW/cm²의 조도 및 15 J/cm²의 빛 선량에서 652 nm 다이오드 레이저(diode laser) (Ceramoptec GmbH, Bonn, Germany)로 조명하였다. PCI + 블레오마이신 처리를 받은 동물에 대해, 100 μ l 내 1500 IU 블레오마이신 (유럽 단위)을 복강내 주사하였다. 종양을 90 mW/cm²의 조도에서 652 nm 다이오드 레이저 (Ceramoptec GmbH, Bonn, Germany)로 BLM 주사 후에 30분 조명하였다. 동물은 호일의 구멍이 종양 면적보다 2 mm 더 큰 직경으로 만들어진 종양 면적을 제외하고 알루미늄 호일로 덮었다.

[0504] **In Vivo 영상 시스템.**

[0505] 생체발광은 IVIS Lumina 100 Series (Caliper Life Sciences, MA, USA)로 측정하였다. 동물을 마취시키고 (졸레틸(Zoletil)), 200 μ l의 D-루시페린 (Caliper Life Sciences) (PBS 내 20 mg/ml)으로 복강내 주사하였다. D-루시페린 주사 후 10 분에 영상을 촬영하였다. 생체발광은 PS 주사 후 11일부터 약 일주일에 한 번 측정하였다. 종양이 > 1000mm³ 부피에 도달하였을 때 또는 동물이 통증이나 비정상적인 행동의 징후를 보였을 때 동물을 희생하였다.

[0506] 데이터는 Living Image 4.2 Software (Caliper Life Sciences)로 분석하였다.

[0507] TPP-키토산 컨쥬게이트 16A 및 16B의 생물학적 효과는 컨쥬게이트가 유전자 전달을 향상시키기 위해 광화학 내재화에서 광감제로서 사용된 실험에서 시험하였다. 실험의 세부 사항은 물질 및 방법에 기재된다. 도 19 ((a) 및 (b))에서 알 수 있는 바와 같이, 컨쥬게이트 16A 및 16B는 형질 주입의 실질적인 향상이 낮은 빛 선량에서 이미 관찰될 수 있었던 PCI에 대해 우수한 광감제였다. 효과는 PCI에서 사용하도록 특별히 설계되고 암 치료를

위해 임상 개발 중에 있는 광감제 TPCS_{2a}와 함께 얻어진 효과에 비해 향상되었다 (Berg et al. 2011, supra). 따라서, TPCS_{2a}와 함께 형질주입의 유사한 수준은 심지어 높은 빛 선량을 사용할 때에도 이루어지지 않았다 (도 19 (e)).

[0508] 유사한 실험은 TPP-키토산 17A 및 19A와 함께 수행되었다 (도 19(c) 및 (d)). 이러한 컨쥬게이트는 16A 및 16B 보다 훨씬 더 강하다는 것을 알 수 있다. 따라서, TPCS_{2a}와 비교하여, 이들은 심지어 10배 더 낮은 농도에서 사용되었을 때 이러한 컨쥬게이트가 TPCS_{2a}와 함께 관찰되었던 것보다 형질주입의 실질적으로 더 큰 향상을 제공하였다는 점에서, 적어도 10배 이상 활성적이었다. 이것은 키토산 컨쥬게이트에서 광감제 분자의 근접은 이러한 종결(quenching) 효과의 대상이 되지 않는 유리 광감제 분자보다 덜 효과적인 컨쥬게이트를 만드는 광감작 효과의 종결을 야기할 것이라고 예상했었던 점에서 매우 놀라웠다. 따라서, 광감제-키토산 컨쥬게이트는 이들을 PCI 및 관련 방법에 사용하기에 특히 잘 적합하게 하는 어떤 알려지지 않은 방법으로 세포내 이입 막과 함께 상호작용하는 것처럼 보인다.

[0509] 도 20에서 알 수 있는 바와 같이, 유사한 결과는 TPC-키토산 컨쥬게이트 (화합물 37, 38, 32 및 33)와 함께 얻어졌으며, TPP-컨쥬게이트와 비교하여 이들은 *in vivo*에서 사용될 때 더 우수한 조직 투과를 허용하는 적색 빛과 함께 조명에 의해서도 활성화될 수 있는 이점을 가진다. 이것은 *in vivo*에서 더 큰 병변 (예를 들어, 더 큰 종양)의 치료에서 중요한 특징이나, 단지 피상적인 광화학 효과를 가지는 것을 원하는 경우, 예를 들어 원하는 효과가 피부의 상층(upper layers)에 있을 경우의 예방접종 방법에서는 불리한 점이다.

[0510] 도 21에서 알 수 있는 바와 같이, 유사한 결과는 또한 화합물 54와 함께 얻어졌으며, 이는 PEG-함유 컨쥬게이트가 PCI 효과를 유도하는데 효과적이라는 것을 나타낸다.

[0511] 또한, TPC-컨쥬게이트는 컨쥬게이트가 PDT- 및 PCI-계 치료 방법에서 활성적인지 조사하기 위해, *in vivo* 실험으로 조사하였다. 도 22는 컨쥬게이트 38 및 33 단독으로 또는 세포독성 항암제 블레오마이신과 함께 처리된 조명된 종양-보유 마우스의 그림을 나타낸다 (세부사항은 물질 및 방법 참조). 비처리된 동물 및 TPCS_{2a} + 블레오마이신으로 주사된 동물을 대조군으로 사용하였다. 종양의 크기가 루시페린의 주사 후 생체발광의 영상화에 의해 관찰될 수 있을 정도로, 사용된 암세포는 루시페라제를 발현하기 위해 영원히 형질주입되었다. 도 22에 나타난 바와 같이, 비처리된 대조군 및 TPCS_{2a} + 블레오마이신으로 주사된 동물 (각각 8 및 7)은 광감제의 주사 후 11 및 15일에 (조명 후 7 및 11일 후) 강한 형광을 나타내었으며, 이는 종양에서 다량의 살아있는 암세포의 존재를 나타낸다. 이러한 동물에서, 종양은 동물이 15일 후에 인도적인 이유로 희생당할 정도로 크게 성장하였다. 이와 반대로, 키토산 컨쥬게이트로 처리된 동물의 경우, 11일에 하나의 동물 (동물 3)에서만 단지 약한 형광이 있었고, 순수한 광화학 처리 (PCI 단독, PDT 처리와 유사한) 및 PCI + 블레오마이신 조합 처리 둘 다 종양에서 암세포의 양을 강하게 감소시켰음을 나타낸다. PCI 단독으로 처리된 동물 (동물 3 및 5)에서 형광은 15일 내지 20일 동안 증가하였으며, 이는 PCI 광화학 단독 처리가 모든 종양 세포를 죽이는데 충분하지 않음을 나타낸다. 이와 반대로, PCI + 블레오마이신으로 처리된 동물 (동물 4 및 6)은 20일에도 본질적으로 형광이 나타나지 않았으며, 이는 이 조합이 PCI 단독보다 현저하게 더 효과적이었음을 나타내고, 키토산 컨쥬게이트는 강한 광화학 내재화 효과를 유도하였고; 암 치료를 위해 임상 개발 중인 광감제 TPCS_{2a}에 의해 유도되었던 것보다 훨씬 더 강함을 나타낸다.

[0513] 도 23에서, 처리된 동물에서 종양 성장의 곡선은 도 22에 나타난 영상화 결과를 확인하는 것을 (화합물 37 키토산 컨쥬게이트도 포함하여) 나타내고, 이는 화합물 38 + 블레오마이신 또는 33 + 블레오마이신으로 처리된 동물에서 종양이 완전히 근절되는 것처럼 보이는 것으로 나타낸다. 이러한 결과는 다시 키토산 컨쥬게이트가 TPCS_{2a}보다 PCI에 대해 훨씬 더 효과적인 물질이라는 것을 나타낸다 (블레오마이신과의 조합은 이 실험에서 종양 성장에 대해 효과가 없었다.). 또한, 처리 일정으로 블레오마이신의 첨가는 시험된 모든 3개의 키토산 컨쥬게이트에 대해 치료 효과를 현저하게 개선시킴을 알 수 있으며 (광화학 처리 단독과 비교하여), 이는 이러한 컨쥬게이트에 의해 강한 광화학 내재화 효과의 유도를 나타낸다. 이 향상된 효능은 광감제-고분자 컨쥬게이트를 설계하는 주요 이유가 소위 EPR 효과 때문에 더 우수한 치료 선택성을 얻는 것이라는 것 때문에 매우 놀랍다. 그러나, 어떤 것은 이 잠재적으로 향상된 선택성이 소분자 광감제에 대해서 보다 조직을 통해 훨씬 더 느린 확산을 야기하여 컨쥬게이트의 큰 분자량 때문에 더 낮은 효능을 따를 것이고, 이로써 종양 세포에서 광감제의 더 낮은 농도로, 종양 내 모든 세포로 광감제를 전달하는데 어려움이 있다는 것을 예상해야 한다. 이것은 본 발명에 기재된

키토산 컨쥬게이트와 함께 명백하게 없는 경우였다.

[0515] 실시예 4

[0517] 일반적인 물질 및 방법은 적절한 경우 실시예 1과 같다.

[0519] 도 24의 반응식 7 참조

[0520] 트리에틸렌글리콜 모노메틸 에테르 토실레이트 (40)의 합성

[0521] (2-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)에틸 4-메틸벤젠설포네이트로도 명명됨)

[0522] 트리에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르 **39** (4.87 mL, 30.43 mmol)를 THF (25 mL)에 용해시켰다. 수산화 칼륨 (3.7g, 65.95mmol)의 수용액 (25 mL)을 가하고, 결과의 혼합물을 0℃로 냉각시켰다. 그 다음, THF (50mL)에 용해된 *p*-톨루엔설포닐 클로라이드 (6.86g, 48.77 mmol)를 30분 동안 적하 깔대기(dropping funnel)를 통해 방울방울 가하였다. 반응 혼합물을 0℃에서 2h 이상 동안 교반한 다음, rt에서 밤새도록 교반하였다. 반응 혼합물을 진공 하에 농축시켜 THF를 제거하고, EtOAc (40 mL) 및 물 (30 mL)로 희석하고, EtOAc (2 x 75 mL)로 추출하였다. 모아진 유기상을 Na₂SO₄로 건조하고, 여과한 다음, 진공 하에 농축하여 회색-흐린 기름진(gray-cloudy oily) 물질로서 화합물 **40** (7.13g)을 제공하였다.

[0523] FT-IR: 2878, 1598, 1453, 1356, 1177, 1097 cm⁻¹; ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7.80 (d, *J*=8Hz, 2H), 7.34 (d, *J*=8Hz, 2H), 4.16 (t, 2H, CH₂OTs), 3.67-3.70 (m, 2H, -CH₂-CH₂OTs), 3.58-3.62 (m, 6H, TEG OCH₂s), 3.37 (s, 3H, OCH₃), 2.44 (s, 3H, Ar-CH₃) ppm; ¹³C NMR (400MHz, CDCl₃): δ = 144.91, 133.19, 129.94, 128.12, 72.05, 70.90, 70.71, 69.36, 68.83, 59.17, 21.78 ppm.

[0525] (트리에틸렌글리콜 모노에틸 에테르 토실레이트)(42)의 합성

[0526] (2-(2-(2-에톡시에톡시)에톡시)에틸 4-메틸벤젠설포네이트로도 명명됨)

[0527] 트리에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르 **41** (4.9 mL, 28.1 mmol)를 THF (30 mL)에 용해시켰다. 수산화 칼륨 (3.7g, 65.95mmol)의 수용액 (25 mL)을 가하였다. 그 다음, 반응 혼합물을 0℃로 냉각시켰다. 그 다음, THF (50mL)에 용해된 *p*-톨루엔설포닐 클로라이드 (6.86g, 48.77 mmol)를 30분 동안 적하 깔대기를 통해 방울방울 가하였다. 반응 혼합물을 0℃에서 2h 이상 동안 교반한 다음, rt에서 밤새도록 교반하였다. 반응 혼합물을 진공 하에 농축시켜 THF를 제거하고, EtOAc (40 mL) 및 물 (30 mL)로 희석하고, EtOAc (2 x 75 mL)로 추출하였다. 모아진 유기상을 Na₂SO₄로 건조하고, 여과한 다음, 진공 하에 농축하여 회색-흐린 기름진 물질로서 화합물 **42** (6.83 g)를 제공하였다.

[0528] FT-IR: 2870, 2975, 1598, 1453, 1358, 1177, 1110 cm⁻¹; ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7.77 (d, *J*=8Hz, 2H), 7.31 (d, *J*=8Hz, 2H), 4.13 (t, 2H, CH₂OTs), 3.64-3.67 (m, 2H, -CH₂CH₂OTs), 3.52-3.59 (m, 8H, TEG OCH₂s), 3.49 (q, *J*=8Hz, 2H, -OCH₂CH₃), 2.42 (s, 3H, Ar-CH₃), 1.17 (t, *J*=8Hz, 3H, -OCH₂CH₃) ppm.

[0529] 메톡시 폴리에틸렌글리콜 토실레이트(44)의 합성

[0530] 폴리에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르 **43** (5 g, 14.29 mmol, 평균 MW: 350Da)을 THF (50 mL)에 용해시켰다. 수산화 칼륨 (1.76 g, 31.44 mmol)의 수용액 (25 mL)을 가하였다. 그 다음, 반응 혼합물을 0℃로 냉각시켰다. 그 다음, THF (50mL)에 용해된 *p*-톨루엔설포닐 클로라이드 (3.27g, 17.14 mmol)를 30분 동안 적하 깔대기를 통해 방울방울 가하였다. 반응 혼합물을 0℃에서 2h 이상 동안 교반한 다음, rt에서 밤새도록 교반하였다. 반응 혼합물을 진공 하에 농축시켜 THF를 제거하고, EtOAc (40 mL) 및 물 (30 mL)로 희석하고, EtOAc (2 x 75 mL)로 추출하였다. 모아진 유기상을 Na₂SO₄로 건조하고, 여과한 다음, 진공 하에 농축하여 회색-흐린 기름진 물질로서 화합

물 44 (5.91 g)를 제공하였다.

[0531] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 7.74 (d, $J=8\text{Hz}$, 2H), 7.29 (d, $J=8\text{Hz}$, 2H), 4.11 (br t, 2H, CH_2OTs), 3.49-3.65 (m, 28H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OTs}$ & PEG OCH_2), 3.32 (s, 3H, OCH_3), 2.39 (s, 3H, Ar- CH_3) ppm.

[0533] **트리에틸렌글리콜 모노에틸에테르 피페라진 (46)의 합성**

[0534] **(1-(2-(2-(2-에톡시에톡시)에톡시)에틸)피페라진 (46)으로도 명명됨) (TEG-Pip)**

[0535] 피페라진 (10.4 g, ~120 mmol)을 질소 대기 하에 아세트니트릴 (150 mL)에 용해시켰다. 아세트니트릴 (30 mL)에 용해된 화합물 42 (5 g, 15.04 mmol)를 방울방울 가하였다. 결과의 혼합물을 rt에서 12h 동안 교반하고, 진공 하에 농축시켜 아세트니트릴을 제거하였다. 조 생성물을 용리액으로 MeOH: CH_2Cl_2 (8:92)를 이용하여 플래시 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 무색의 액체로서 순수한 화합물 46 (1.52g, 41%)을 제공하였다.

[0536] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 3.54-3.64 (m, 10H, TEG OCH_2), 3.50 (q, $J=8\text{Hz}$, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 3.43 (s, 1H, NH), 2.88 (t, 4H, Piperazine ring- CH_2), 2.55 (t, 2H, OCH_2-CH_2 -Piperazine), 2.46 (br m, 4H, Piperazine ring- CH_2), 1.18 (t, $J=8\text{Hz}$, 3H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$) ppm; ^{13}C NMR: 70.76, 70.70, 70.47, 69.92, 68.86, 66.73, 58.47, 54.89, 50.55, 45.99, 15.25 ppm; MS (ESI) calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 247.2016, found 247.2014.

[0538] **2-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)아세트알데히드 (45)의 합성**

[0539] 옥살릴 클로라이드 (5 mL, 58.24 mmol)를 질소 대기 하에 CH_2Cl_2 (75 mL)에 용해시켰다. 결과의 혼합물을 드라이 아이스/아세톤 혼합물을 이용하여 -78°C 로 냉각시킨 후, CH_2Cl_2 (15 mL)에 희석된 DMSO (5 mL)를 방울방울 조심스럽게 가하였다. 완전히 첨가한 후, 반응 혼합물을 10분 이상 동안 교반하고, CH_2Cl_2 (30 mL)에 희석된 트리에틸렌글리콜 모노메틸 에테르 39 (5 mL, 31mmol)를 방울방울 가하였다. 완전히 첨가한 후, 반응 혼합물을 15분 동안 교반하였다. 그 다음, CH_2Cl_2 (20 mL)에 희석된 Et_3N (20 mL, 143 mmol)을 20분 동안 방울방울 가하고, 30분 이상 동안 -78°C 로 교반한 다음, rt로 도달시켰다. 그 다음, 하얀 "유백색(milky)"의 반응 혼합물을 물 (2 x 45 mL) 및 소금물 (40 mL)로 세척하였다. 유기상을 Na_2SO_4 로 건조하고, 여과한 다음, 진공 하에 농축하였다. 결과의 조 생성물을 용리액으로 MeOH/ EtOAc (0:100-10:90)를 이용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 45 (2.40g)를 제공하였다. ^1H NMR 분석은 화합물 47이 약간의 분리할 수 없는 불순물로 오염되었음을 나타내었다.

[0540] FT-IR: 3436, 2879, 1734, 1454, 1353, 1108, 1028 cm^{-1} ; ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.73 (s, 1 H, CHO), 4.16 (s, 2H), 3.54-3.76 (m, 10H), 3.38 (s, 3H) ppm. (생성물은 출발물질로 오염되었다. 생성물은 약 50%이다.)

[0542] **2-(2-(2-에톡시에톡시)에톡시)아세트알데히드 (47)의 합성**

[0543] 사용된 출발물질이 트리에틸렌글리콜 모노메틸 에테르 (39) 대신 트리에틸렌글리콜 모노에틸 에테르 (41)인 것을 제외하고는, 상기 화합물에 대해 사용된 것과 동일한 방법을 사용하였다. 화합물 47 (수율: 2.34g, ~42%)은 약간의 분리할 수 없는 불순물로 오염되었다.

[0544] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.67 (s, 1 H, CHO), 4.10 (s, 2H), 3.52-3.69 (m, 10H), 3.45 (q, 2H), 1.15 (t, 3H) ppm. (생성물은 출발물질로 오염되었다. 생성물은 약 42%이다.)

- [0546] 3,6-디-O-TBDMS-키토산의 직접 N-변형에 의한 키토산의 테길화(TEGylation)
- [0547] 도 25의 반응식 8 참조.
- [0548] N-(2-(2-(2-에톡시에톡시)에톡시)에틸아미노 키토산 TEG_{0.41}-CS (49a)의 합성
- [0549] DiTBDMS-키토산 **8** (300 mg, 0.77 mmol)을 NMP (5 mL)에 용해시키고, 반응 바이알에서 50℃로 가열하였다. Cs₂CO₃ (1 g, 3.07 mmol) 및 촉매량의 요오드화 칼륨 (potassium iodide)을 가하였다. 그 다음, 반응 바이알을 밀봉하고, 반응 혼합물을 2h 동안 교반한 다음, 주사기를 통해 화합물 **42** (767 mg, 2.31mmol)를 가하였다. 반응 혼합물을 48h 동안 교반한 다음, 냉각시키고, 얼음물에 부은 다음, 얻어진 침전물을 여과하여 제거하고, 진공 오븐을 이용하여 건조하였다. 조 생성물 **48a** (270 mg)를 노란색 분말로 얻었으며, 하기 기재된 바와 같이 다음 탈보호화 단계에서 사용하였다.
- [0550] 히드록실 기의 탈보호화 (실릴기의 제거)를 위해, 조 화합물 **48a**를 MeOH (15 mL)에 현탁시켰다. 농축 HCl (2 mL)을 rt에서 천천히 가하고, 결과의 혼합물을 12h 동안 교반한 다음, 진공 하에서 농축하였다. 얻어진 조 생성물을 다시 MeOH (15 mL)에 현탁시키고, 농축 HCl (2mL)을 가한 다음 12h 동안 교반하고, NaCl 수용액 (5%, 35mL)으로 희석하고 이온교환한 다음, 3일 동안 탈이온수에 대해 투석하였다. 투석의 완료 후, 수용성 물질을 동결건조하여 백색의 점착성(white sticky) 물질로서 **49a** (125mg)를 제공하였다.
- [0551] FT-IR: 3418, 2874, 1712, 1631, 1536, 1378, 1077 cm⁻¹; ¹H NMR (400MHz, D₂O) δ = 4.68 및 4.27 (s, 1H, chitosan H-1 & H-1', 3.14-3.97 (br m, 10H, chitosan H-2 내지 H-6, TEG (~ 41% DS) OCH₂'s 및 O-CH₂CH₃), 2.96-3.14 (br m, 1H, H-2 & H-2'), 1.21 (t, 1.24 H (~ 41% DS) TEG O-CH₂CH₃) ppm.
- [0553] N-(2-(2-(2-에톡시에톡시)에톡시)에틸아미노 키토산 TEG_{0.27}-CS (49b) (27% DS)의 합성
- [0554] 화합물 **49b**는 트리에틸렌 글리콜 토실레이트 (**42**) 시약의 1.5 당량을 3 당량 대신 사용한 것을 제외하고는, 상기 기재된 바와 같은 동일한 방법을 이용하여 제조되었다. 화합물 **49b** (27mg)는 백색의 점착성 물질로서 얻어졌다.
- [0555] FT-IR: 3417, 2876, 1602, 1382, 1259, 1078, 599 cm⁻¹; ¹H NMR (400MHz, D₂O: DC1, 95:5) δ = 5.13 and 4.95 (s, 1H, chitosan H-1 & H-1', 3.24-3.99 (br m, 12H, chitosan H-2 to H-6, H-2', TEG (27% DS) OCH₂'s 및 O-CH₂CH₃), 1.21 (t, 0.89 H, TEG O-CH₂CH₃) ppm.
- [0557] N-아세틸브로모-3,6-O-diTBDMS-키토산 (9)의 합성
- [0558] DiTBDMS-키토산 **8** (3g, 7.70mmol) (Ingolfur Magnusson에 의해 미리 합성됨)을 질소 대기 하에 CH₂Cl₂ (30 mL)에 용해시켰다. 반응 혼합물을 -20℃로 냉각시키고, 주사기를 이용하여 트리에틸아민 (5.30ml, 38mmol)을 가하였다. 10분의 교반 후, CH₂Cl₂ (2.5 mL)에 희석된 브로모 아세틸브로마이드 (2.65ml, 30.51mmol)를 주사기를 이용하여 방울방울 가하였다. 반응 혼합물을 -20℃에서 1시간 동안 교반한 다음, CH₂Cl₂ (70 mL)로 희석하고 즉시 진공 하에 농축하였다. 그 다음, 두꺼운 갈색 물질을 가루로 뺀고, 아세토니트릴 (3 x 35 mL)로 세척하고 건조한 다음, CH₂Cl₂ (40 mL)에 재-용해시키고, 분별 깔때기에 넣고 물 (2 x 25 mL)과 소금물 (35mL)로 세척하였다. 유기상을 Na₂SO₄로 건조하고, 여과한 다음, 진공 하에 농축하여 갈색 고체 물질로서 브로모아실 중간체 **9** (2.57g)를 제공하였다.
- [0559] FT-IR (KBr): ν 3404 (br, NH), 2956-2858 (s, C-H TBDMS), 1682 (vs, C=O amide I), 1530 (vs, C=O amide II), 1473, 1391, 1362, 1311, 1259, 1101, 1005, **837, 777 (Si-C)**, 669 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ ppm: 4.40 (br s, 1H, H-1), 3.26-4.02 (m, 8H, H-2 GlcN, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6' 및 GluNH-C=OCH₂Br), 0.90 및 0.88 (br s, 18H, (CH₃)₃C-Si), 0.13 및 0.07 (br s, 12H, CH₃-Si) ppm.

[0561] *N*-아세틸 브로모-3,6-*d*TBDMS-키토산에 대한 친핵성 치환에 의한 키토산의 폐길화(PEGylation)

[0562] *N*-(아세틸 피페라진-TEG)-키토산 (51)

[0563] (i) 아세틸 브로모키토산 **9** (200 mg, 0.397 mmol)를 질소 대기 하에 CH₂Cl₂ (25 mL)에 용해시켰다. CH₂Cl₂ (10 mL)에 희석된 화합물 **46** (204 mg, 0.828 mmol)을 rt에서 방울방울 가하였다. 결과의 혼합물을 10분 동안 교반한 다음, 트리에틸아민 (115 μL, 0.828 mmol)을 가하였다. rt에서 24h 동안 계속 교반하고, 출발물질 **46**의 총 소비는 MeOH:CH₂Cl₂ (1:9)에서 TLC로 검사하여 확인하였다. 그 다음, 반응 혼합물을 분별 깔때기에 넣고, 유기상을 물 (2 x 35mL)과 소금물 (35mL)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조한 다음, 여과하고 진공 하에 농축시켜 조 액체로서 화합물 **50** (214 mg)을 제공하였으며, 다음 탈보호화 단계에서 사용하였다.

[0564] (ii) 히드록실 기의 탈보호화 (실릴기의 제거)를 위해, 조 화합물 **50**을 MeOH (15 mL)에 현탁시켰다. 농축 HCl (2 mL)을 rt에서 천천히 가하고, 결과의 혼합물을 12h 동안 교반한 다음, 진공 하에서 농축하였다. 얻어진 조 생성물을 다시 MeOH (15 mL)에 현탁시키고, 농축 HCl (2mL)을 가한 다음 12h 동안 교반하고, NaCl 수용액 (5%, 35mL)으로 희석하고 이온교환한 다음, 3일 동안 탈이온수에 대해 투석하였다. 투석의 완료 후, 수용성 물질을 진공 하에 건조하여 맑은 황색의 점착성 물질로서 **51** (112mg)을 제공하였다.

[0565] ¹H NMR (400MHz, D₂O) δ = 4.63 (s, 1H, chitosan H-1), 2.74-3.76 (m, 30H, chitosan H-2 to H-6, GlcNHCOCH₂-Pip-TEG, TEG OCH₂'s & O-CH₂CH₃, piperazine ring-CH₂'s), 1.21 (t, 3 H, TEG O-CH₂CH₃) ppm; DS= 100%.

[0567] *N*-아세틸-피페라진 테트라페닐포피린 (TPP-NH-Pip) (5)의 합성

[0568] 이것은 상기 실시예 1 및 반응식 1에 기재된 바와 같이 수행되었다.

[0570] TPP-NH-CO-CH₂-TBDMS-키토산 (55)의 합성

[0571] 도 26의 반응식 9 참조.

[0572] DiTBDMS-키토산 (100mg, mmol)을 55°C에서 NMP (10mL)에 용해시켰다. 탄산 세슘(Cesium carbonate) (500mg, 1.54mmol)을 가하고, 반응 혼합물을 15분 동안 교반한 다음, 화합물 **4** (72.2mg, 0.096mmol)를 가하였다. 촉매량의 요오드화 칼륨을 가하고 24h 동안 계속 교반한 다음, 촉매량의 DMAP를 가하고 24h 동안 교반한 다음, 냉각시키고 물에 부었다. 침전물을 여과하여 제거하고, 진공 오븐에서 건조하여 조 고체로서 화합물 **55**를 제공하였다. 그러나, 적색의 수용액을 관찰하였으며, 이는 약간의 화합물이 물에 폐기되었음을 나타낸다. 이것은 NMP 때문일 수 있다; 따라서, 이 단계에서는 투석이 유용할 수 있다.

[0573] ¹H NMR (400MHz, D₂O) δ ppm: 8.84-8.86 (br m, β-pyrrole H), 8.68 (s, TPPNHCO), 8.21-8.22 (m, tetraphenyl-Ho), 7.99 (d, *J* = 8.0 Hz, RNHTPP-phenyl-H_m), 7.72-7.79 (m, triphenyl-H_{m,p}), 2.72-4.80 (m, chitosan H-2-H6, TPPNHCOCH₂), 0.89-0.90 (br s, (CH₃)₃C-Si), 0.05-0.07 (br s, 12H, CH₃-Si). -2.78 (s, α-pyrrole NH); (DS of TPP-NHCOCH₂ = ~ 5%).

[0575] TPPp_{0.1}-BrA_{0.9}-DiTBDMS-CS (52)의 합성

[0576] 화합물 **9** (800 mg, 1.587 mmol)를 실온에서 질소 대기 하에 CH₂Cl₂ (40 mL)에 용해시켰다. TPP-NH-Pip **5** (120mg, 0.158mmol)를 가한 다음, 트리에틸아민 (30 μL, 0.216mmol)을 가하였다. 반응 혼합물을 rt에서 24h 동안 교반하였다. 출발물질 **5**의 완전한 소비는 TLC (MeOH: CH₂Cl₂, 1:9)로 확인하였다. 반응 혼합물을 CH₂Cl₂ (75 mL)로 희석하고, 물 (2 x 35mL)과 소금물 (25 mL)로 세척한 다음, Na₂SO₄로 건조하고, 여과한 다음, 진공 하에

농축하여 자주색 고체로서 **52** (수율: 716 mg)를 제공하였다.

[0577] ^1H NMR (CDCl_3) δ ppm: 9.31 (s, TPPNHCO), 8.84-8.86 (m, β -pyrrole H), 8.20-8.23 (m, tetraphenyl-Ho), 7.97 (d, $J = 8.0$ Hz, RNHTPP-phenyl-Hm), 7.74-7.79 (m, triphenyl-Hm,p), 4.43 (br s, H-1), 3.50-4.14 (m, chitosan H-2 GlcN, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6' 및 H-2 GluNHCO, $\text{TPPNHCOCH}_2\text{-Pip}$, $-\text{CH}_2\text{CONGlc}$ 및 Piperazine ring- CH_2 's), 2.81-2.86 (m, piperazine ring- CH_2 's), 0.91, 0.87 (br s, $(\text{CH}_3)_3\text{C-Si}$), 0.07, 0.14 (br s, $\text{CH}_3\text{-Si}$), -2.77 (br s, α -pyrrole NH) ppm; (DS of TPP-NH-Pip $\approx$ 10%).

[0579] **TPP-결합된 DiTBDMS-CS의 데킬화 및 탈보호화**

[0580] **데킬화된 N -(TPP-NH-CO- CH_2)-키토산 (**57**)의 합성**

[0581] (i) 조 화합물 **55** (350mg, 0.833mmol)를 반응 바이알에서 50°C 에서 NMP (10mL)에 용해시켰다. Cs_2CO_3 (1.09 g, 3.33mmol)을 가하고, 반응 혼합물을 30분 동안 교반한 다음, 화합물 **42** (1.108g, 4.16mmol) 및 촉매량의 요오드화 칼륨을 가하였다. 12h 동안 계속 교반한 다음, 반응 혼합물을 냉각시키고, 물 (30mL)로 희석하고 3일 동안 탈이온수에 대해 투석한 다음 동결건조하여 화합물 **56**을 제공하였으며, 다음 탈보호화 단계에서 사용하였다.

[0582] (ii) 조 화합물 **56**을 MeOH (15 mL)에 현탁시켰다. 농축 HCl (2 mL)을 rt에서 천천히 가하고, 결과의 혼합물을 12h 동안 교반한 다음, 진공 하에서 농축하였다. 얻어진 조 생성물을 다시 MeOH (15 mL)에 현탁시키고, 농축 HCl (2mL)을 가한 다음 12h 동안 교반하고, NaCl 수용액 (5%, 35mL)으로 희석하고 이온교환한 다음, 3일 동안 탈이온수에 대해 투석하였다. 투석의 완료 후, 수용성 물질을 부분적으로 진공 하에 건조하여 갈색 고체로서 **57** (115mg)을 제공하였다.

[0584] **데킬화된 TPP-NH-Pip-키토산 $\text{TPPp}_{0.1}\text{-CS-TEG}_{0.9}$ (**54**)의 합성**

[0585] (i) 화합물 **52** (400 mg, 0.799 mmol)를 질소 대기 하에 CH_2Cl_2 (35mL)에 용해시켰다. 화합물 **46** (394 mg, 1.56 mmol)을 가한 다음, Et_3N (222 μL , 1.56 mmol)을 가하고, 반응 혼합물을 rt에서 24h 동안 교반하였다. 그 다음, 출발물질 **46**의 완전한 소비를 위하여, TLC를 검사하고 Et_3N (222 μL , 1.56 mmol)을 가한 다음 12h 이상 동안 계속 교반하였다. 그 다음, 반응 혼합물을 진공 하에 농축하여 조 물질로서 **53** (417mg)을 제공하였으며, 다음 탈보호화 단계에서 사용하였다.

[0586] (ii) 조 화합물 **53**을 MeOH (15 mL)에 현탁시켰다. 농축 HCl (2 mL)을 rt에서 천천히 가하고, 결과의 혼합물을 12h 동안 교반한 다음, 진공 하에서 농축하였다. 얻어진 조 생성물을 다시 MeOH (15 mL)에 현탁시키고, conc. HCl (2mL)을 가한 다음 12h 동안 교반하고, NaCl 수용액 (5%, 35mL)으로 희석하고 이온교환한 다음, 3일 동안 탈이온수에 대해 투석하였다. 투석의 완료 후, 수용성 물질을 동결건조하여 자주빛 적갈색(purple-red-brown) 고체로서 최종 화합물 **54** (252 mg)를 제공하였다.

[0587] FT-IR: 3431, 2869, 1665, 1529, 1442, 1308, 1109, 1070, 1029, 800, 701, 559 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO-d_6 : D_2O 96:4) δ ppm: 8.83 (br m, β -pyrrole H), 8.15-8.22 (m, tetraphenyl-Ho), 8.11(d, $J = 8.0$ Hz, RNHTPP-phenyl-Hm), 7.80-7.88 (m, triphenyl-Hm,p), 4.55 (br s, H-1), 2.54-3.65 (br m, partially overlapped with HDO peak, chitosan H-2 GlcN, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6' 및 H-2 GluNHCO, $\text{TPPNHCOCH}_2\text{-pip}$, CH_2CONGlc , piperazine ring- CH_2 's, TEG OCH_2 's 및 TEG OCH_2CH_3), 1.09 (t, TEG OCH_2CH_3) ppm.; (TPP-NH-Pip의 DS = $\sim$ 10% 및 TEG의 DS = $\sim$ 90%).

[0589] 구조 데이터는 NMR, FT-IR 및 질량 분석으로 확인하였다 (데이터는 나타내지 않음). 화합물 **54**의 대표적인 NMR 스펙트럼은 도 27에 나타내었다.

[0591] 실시예 5

[0593] *In vitro* T 세포 활성화 어세이

[0594] 키토산-컨쥬게이트 32 및 38이 MHC 클래스 I-제한 항원-제시 및 CD8+ T 세포 활성화에 미치는 영향을 시험하기 위하여, 쥐과의(murine) 일차 대식세포를 컨쥬게이트 32 및 38 및 오브알부민-특이적 (OVA 257-264) CD8+ T 세포 클론(clone)과 함께 설정되는 항원-특이적 T 세포 내 오브알부민 OVA 257-264 펩티드 항원과 함께 배양하였다. 활성화된 CD8+ T 세포로부터 IL-2 생성은 ELISA로 분석하였다.

[0595] 골수 유래 대식세포(Bone-marrow derived macrophages, BMDMs)는 오브알부민-특이적 T 세포 하이브리도마와 함께 설정되는 항원-특이적 T 세포 내 항원-제시 세포(antigen-presenting cells, APCs)로서 사용되었다. BMDMs는 20% L-292 세포주 상층액으로 보충된 배지에서 적어도 5일 동안 마우스 골수 세포를 배양하여 생성되었다.

[0596] 웰 당 30,000 APCs는 0.05 μ g/ml의 TPC 농도를 제공하는 컨쥬게이트의 농도에서 키토산-컨쥬게이트 32 및 38과 함께 또는 없이 96-웰 플레이트에서 밤새도록 배양하였다. 다음날 APCs를 4h 동안 2 μ g/ml의 항원 펩티드 (Anaspec으로부터 OVA 257-264)와 함께 배양하였다 (3회 모두 자극).

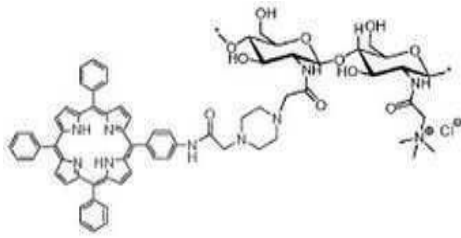
[0597] 세포를 세척하고, 다른 선량의 청색광 (0; 30, 60, 90, 180 sec)에 노출시킨 다음, 웰 당 100,000 오브알부민-특이적 T 세포를 가하고, APCs와 함께 밤새도록 공-배양하였다. CD8+ T 세포 클론 RF33.70 (OVA 257-264의 MHC I-제한 인식)를 사용하였다.

[0598] CD8+ T 세포 및 APCs의 밤새도록 공-배양 후, 세포 배양물로부터 상층액을 수확하였다. 표준 마우스 IL-2 ELISA를 이용하여 활성화된 T 세포로부터 인터루킨 (IL)-2 생성에 대해 상층액을 분석하였다 (IL-2 ELISA DuoSet, RnD Systems, T 세포 배양물의 각 웰로부터 2회 분석, 25 μ l의 희석되지 않은 상층액은 각 ELISA 웰에서 분석하였다).

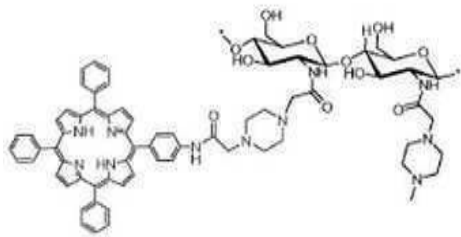
[0599] 결과 (도 28)는 컨쥬게이트 둘 다와 함께 CD8+ 항원-특이적 T 세포에 의한 IL-2 생성이 조명된 세포에서 현저히 증가되었음을 나타내었다 (예를 들어, 화합물 32 컨쥬게이트에 대해 2배 증가, 도 28A). 조명된 대조군에서, 항원 없이 컨쥬게이트와 함께 배양된 세포는 이러한 증가를 나타내지 않았다 (데이터를 나타내지 않음). 이것은 관찰된 효과가 항원-의존적이고, 광화학 처리의 몇몇 비특이적인 효과에 기인하지 않는다는 것을 설명하며, 이는 관찰된 IL-2 생성의 증가의 원인으로 APCs의 표면에 대한 항원 펩티드의 향상된 제시를 설명한다.

도면

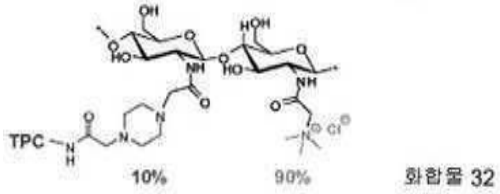
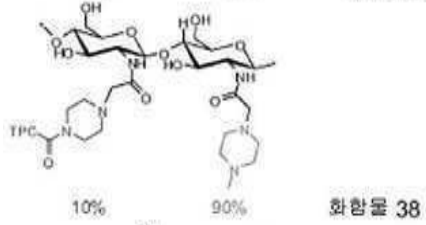
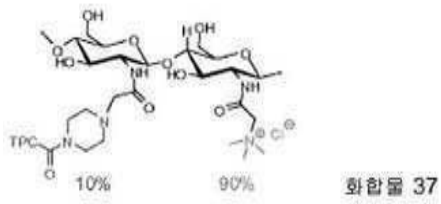
도면1a



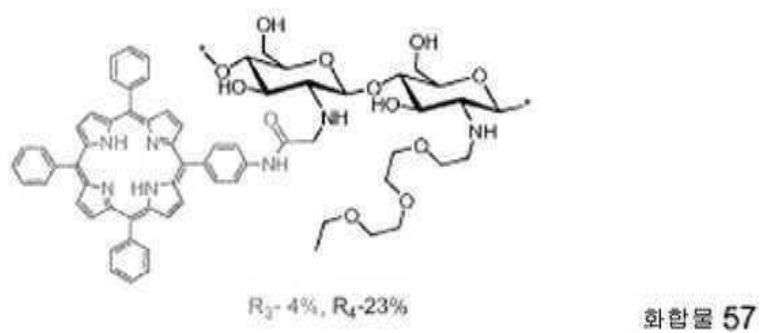
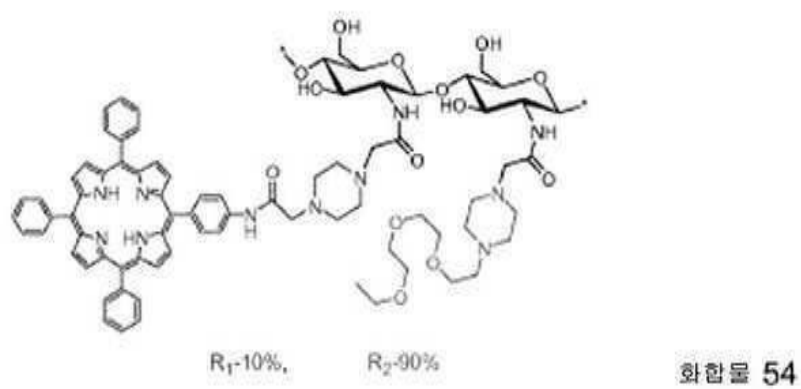
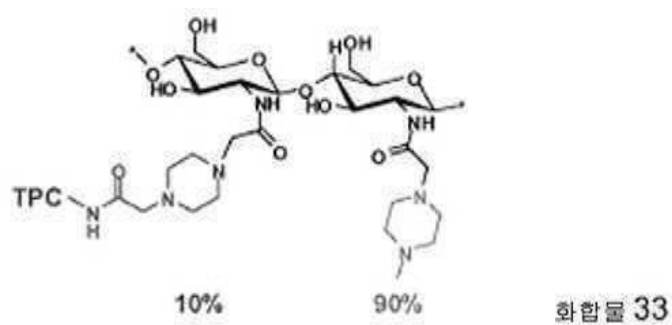
화합물 16A, 16B - 10%, 90%
화합물 17A, 17B - 25%, 75%



화합물 18A, 18B - 10%, 90%
화합물 19A, 19B - 25%, 75%

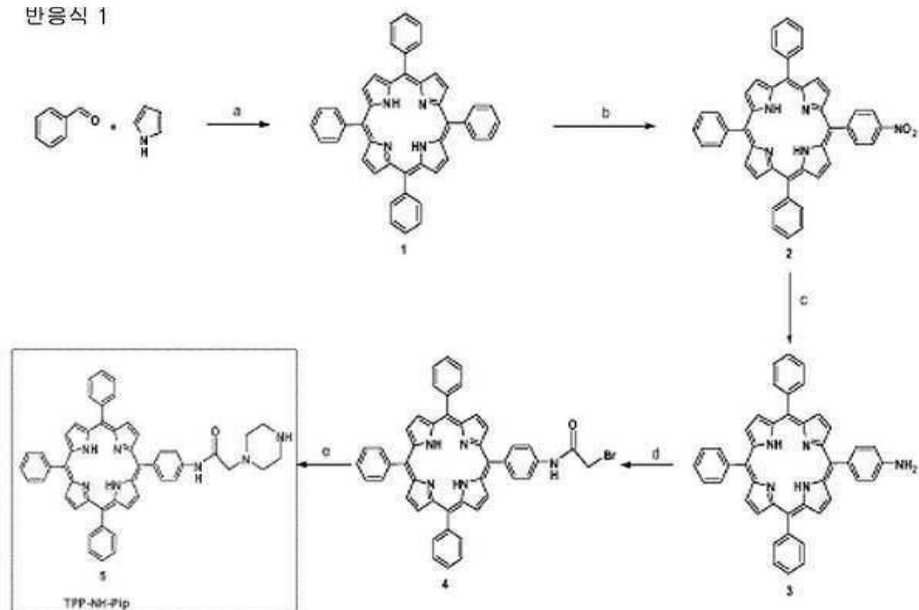


도면1b



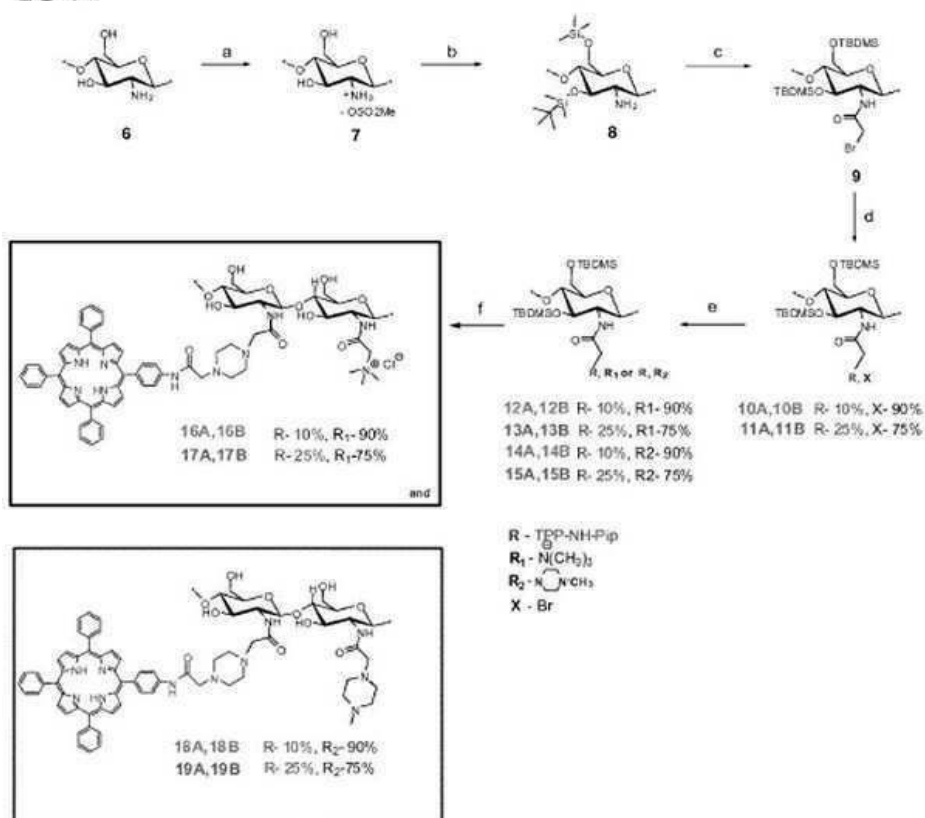
도면2

반응식 1

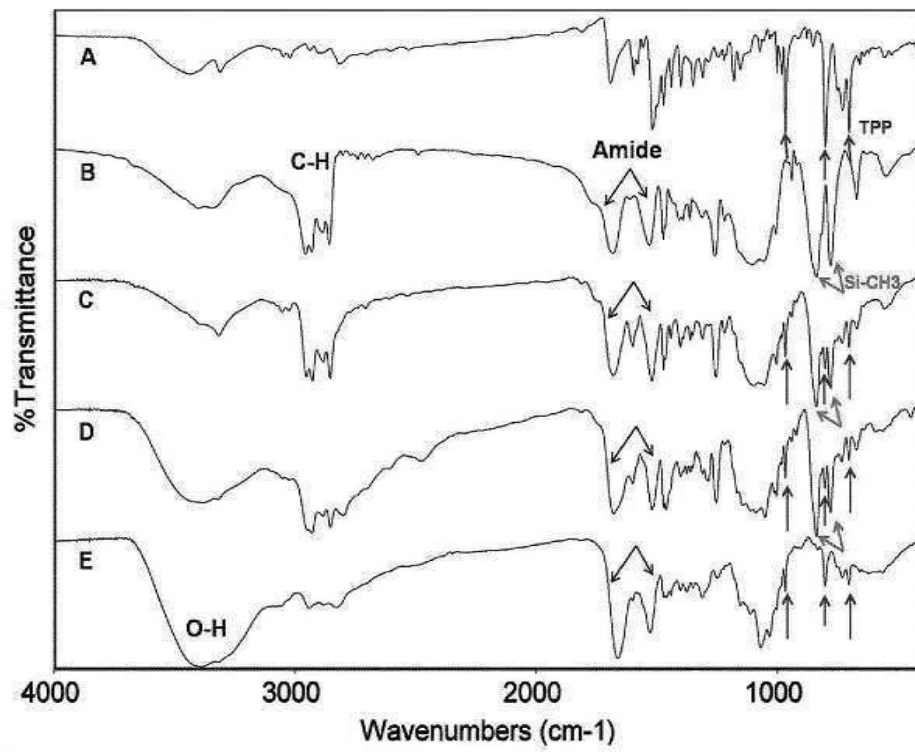


도면3

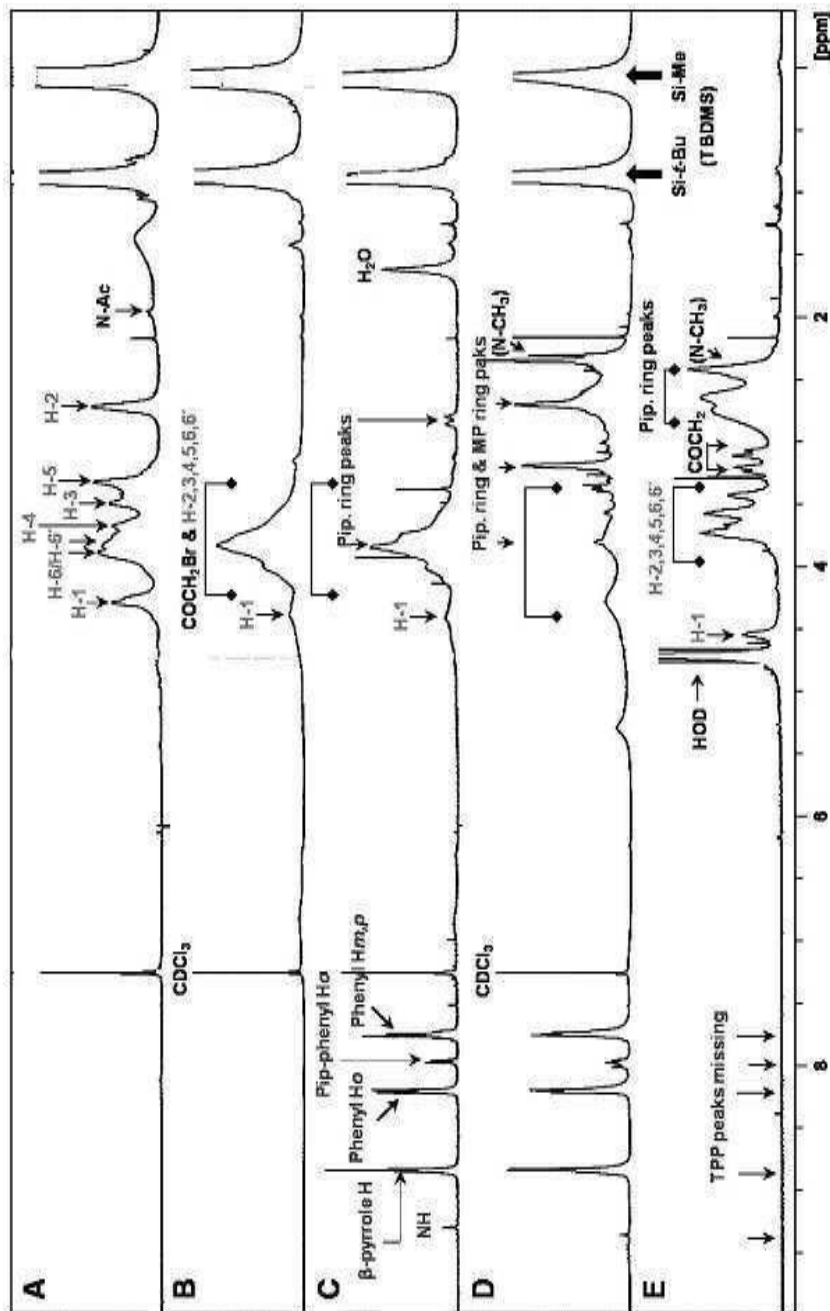
반응식 2



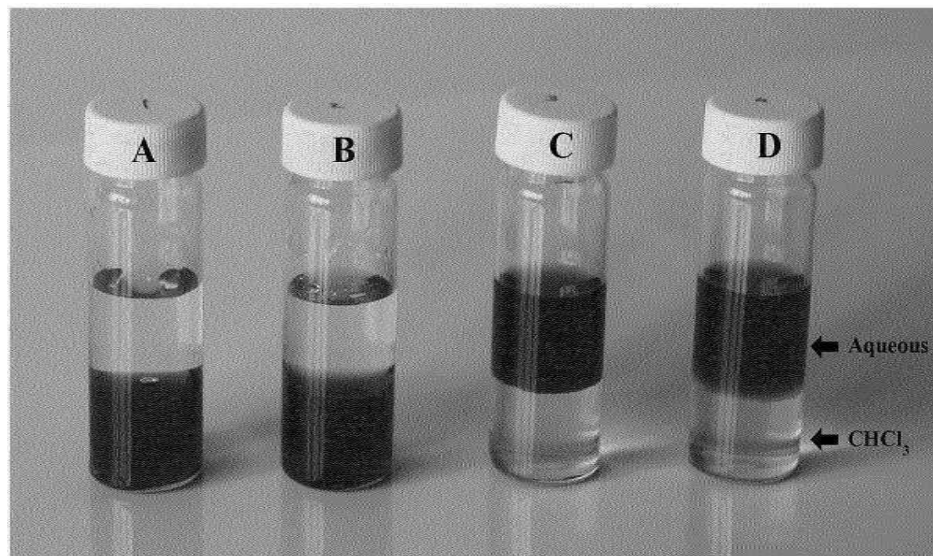
도면4



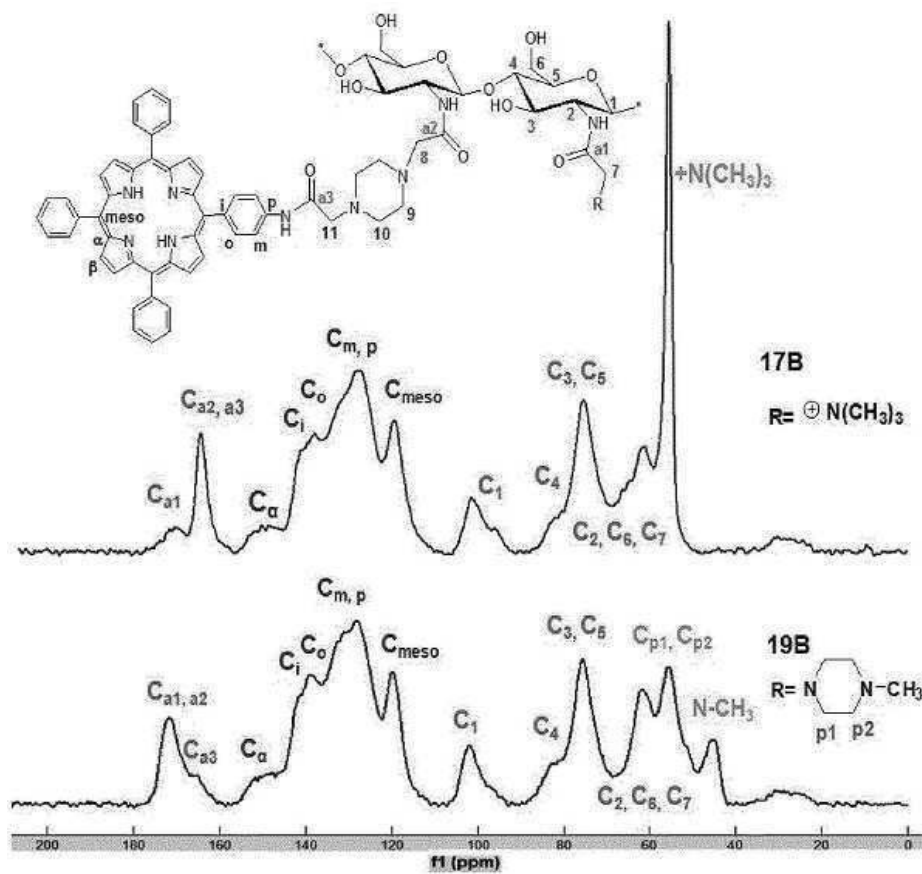
도면5



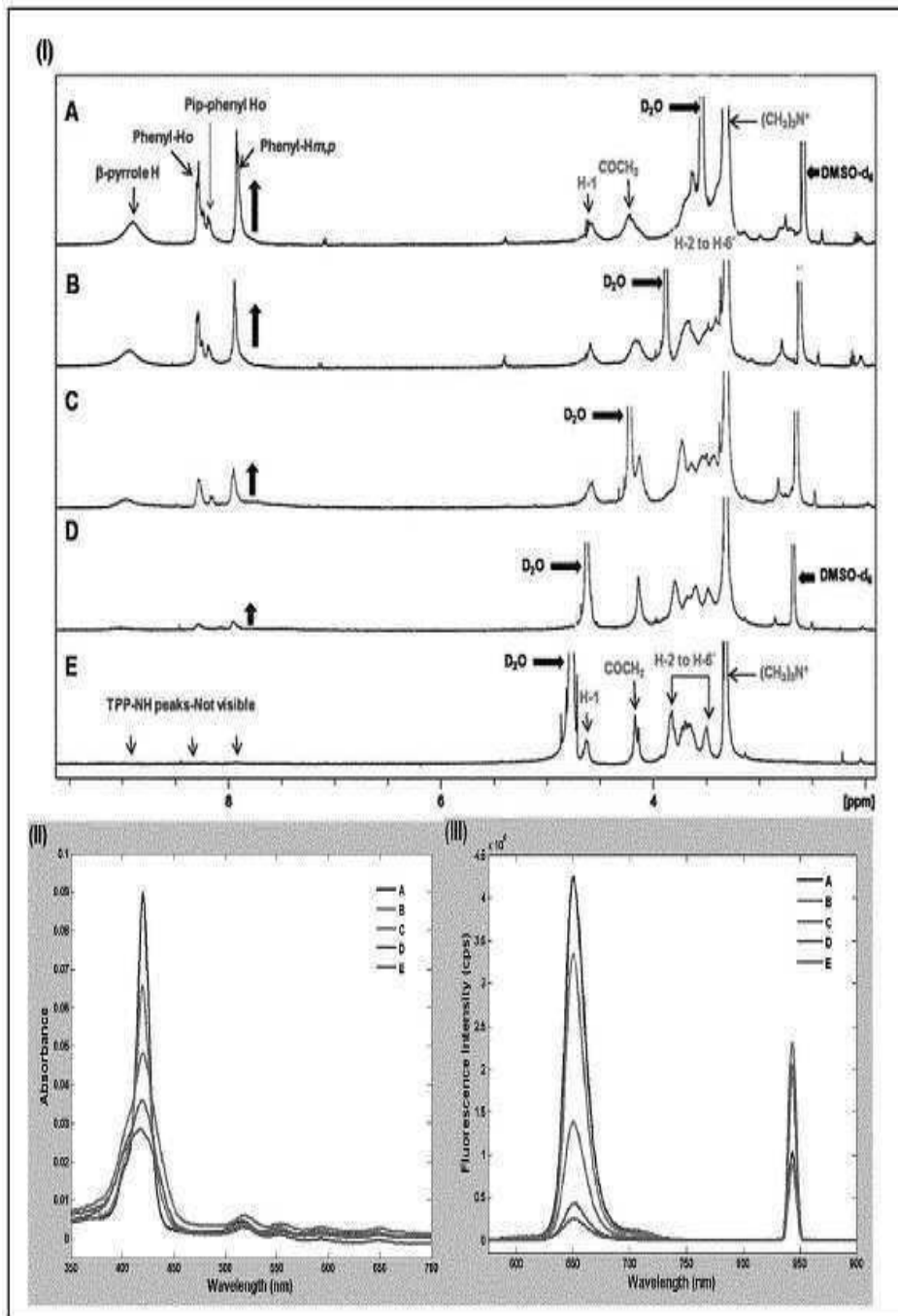
도면6



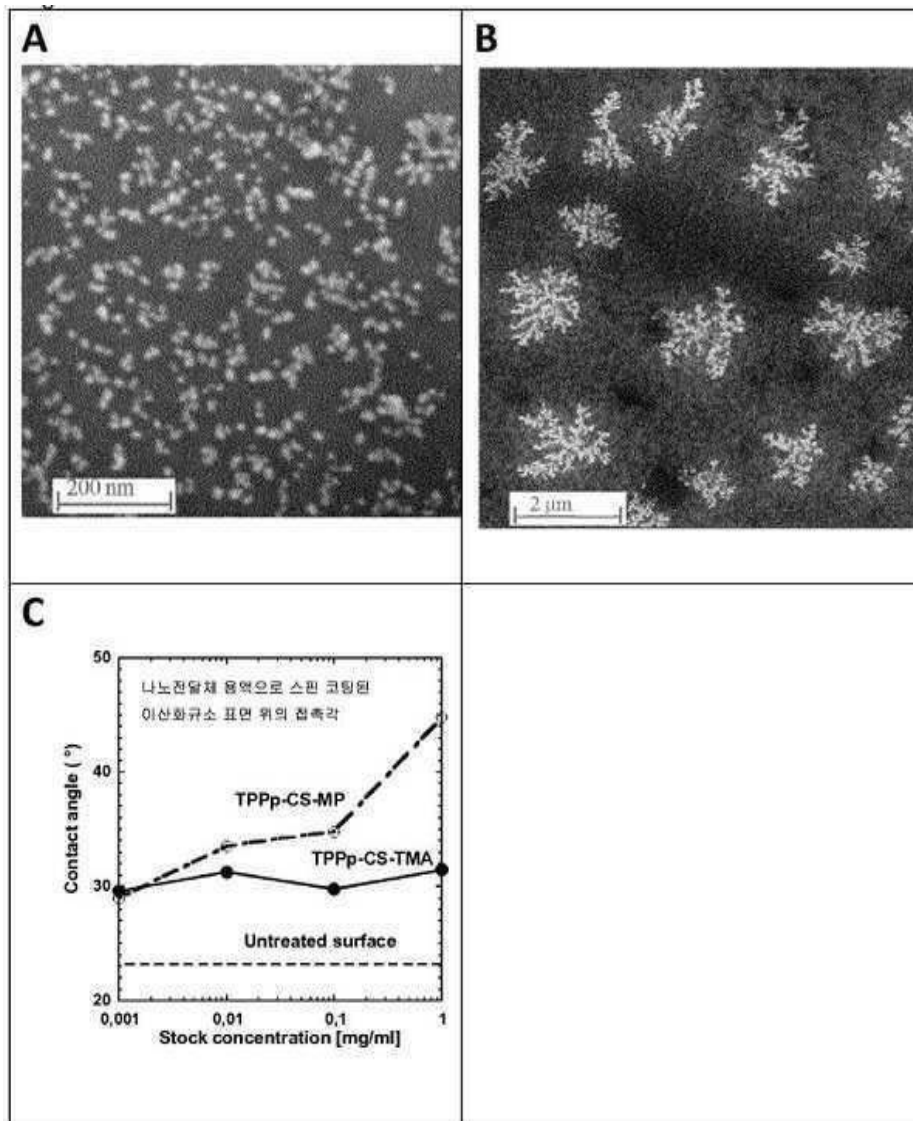
도면7



도면8

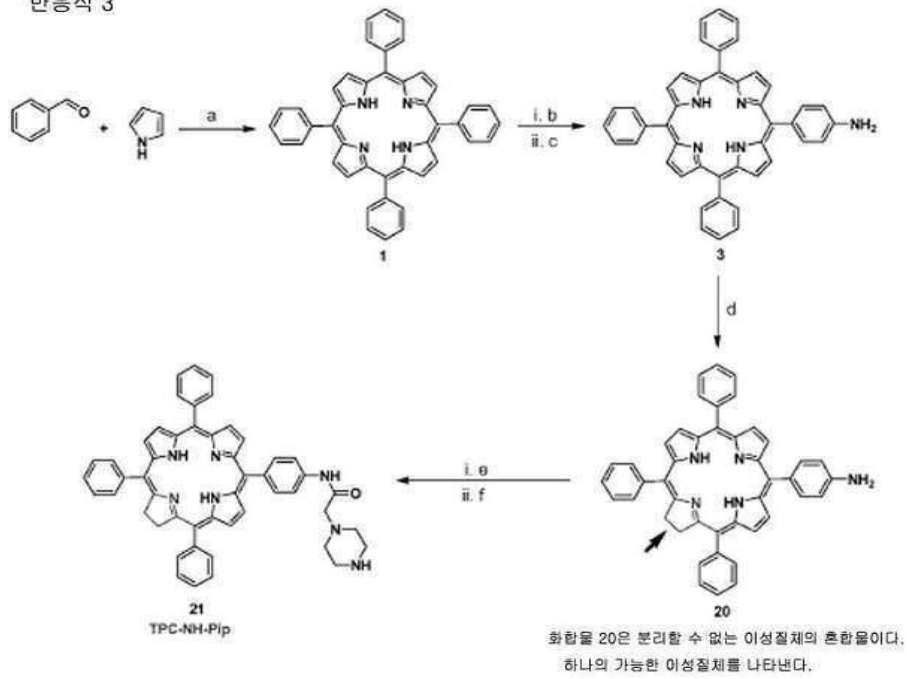


도면9



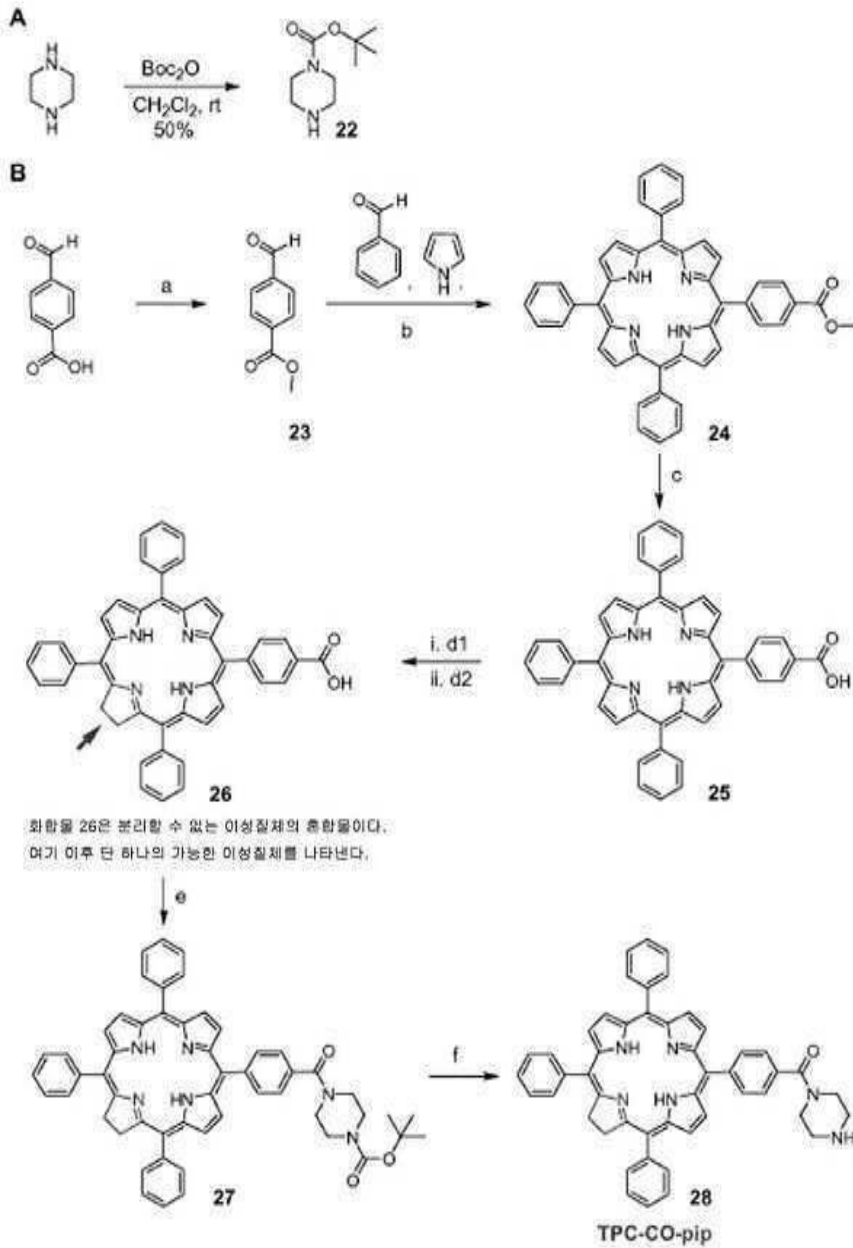
도면10

반응식 3



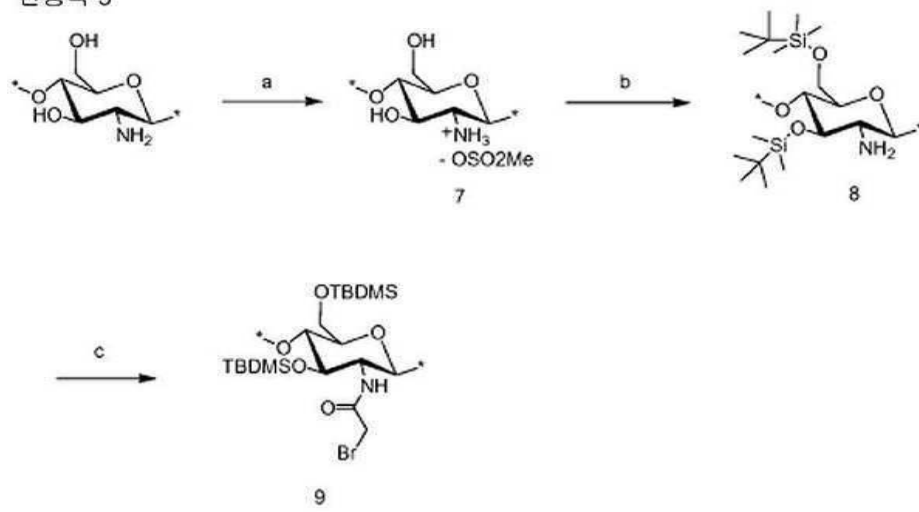
도면11

반응식 4



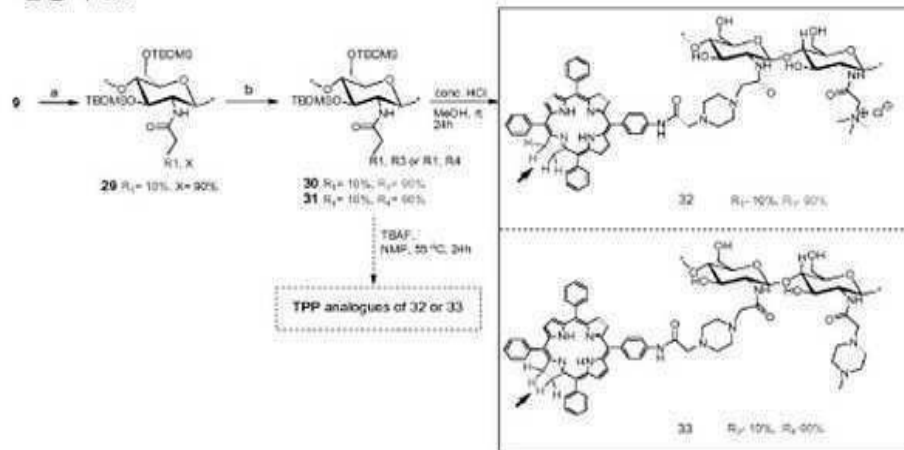
도면12

반응식 5



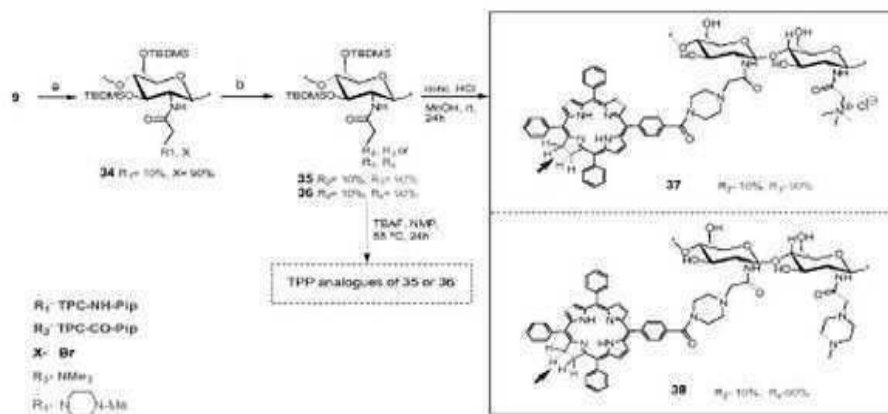
도면13

반응식 6A



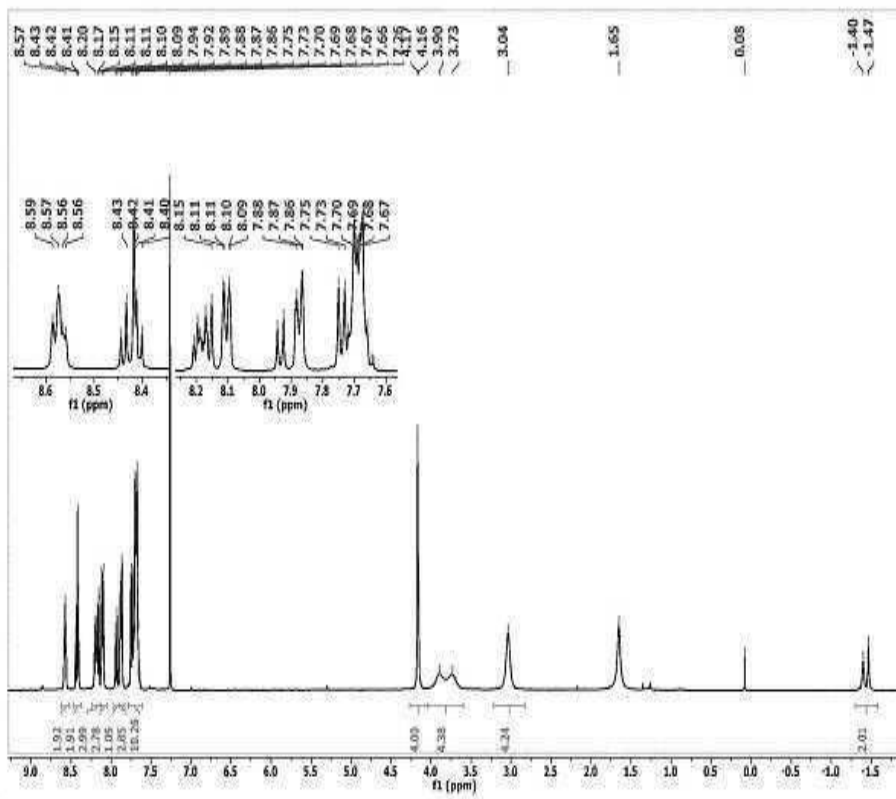
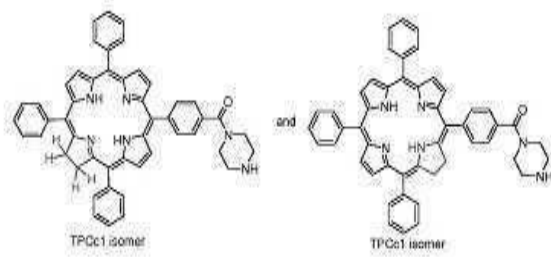
화합물 32 & 33은 TPCa1 및 TPCa2 이성질체의 유도체이다.
TPCa1 이성질체의 구조만 구조 그림에 나타낸다.

반응식 6B

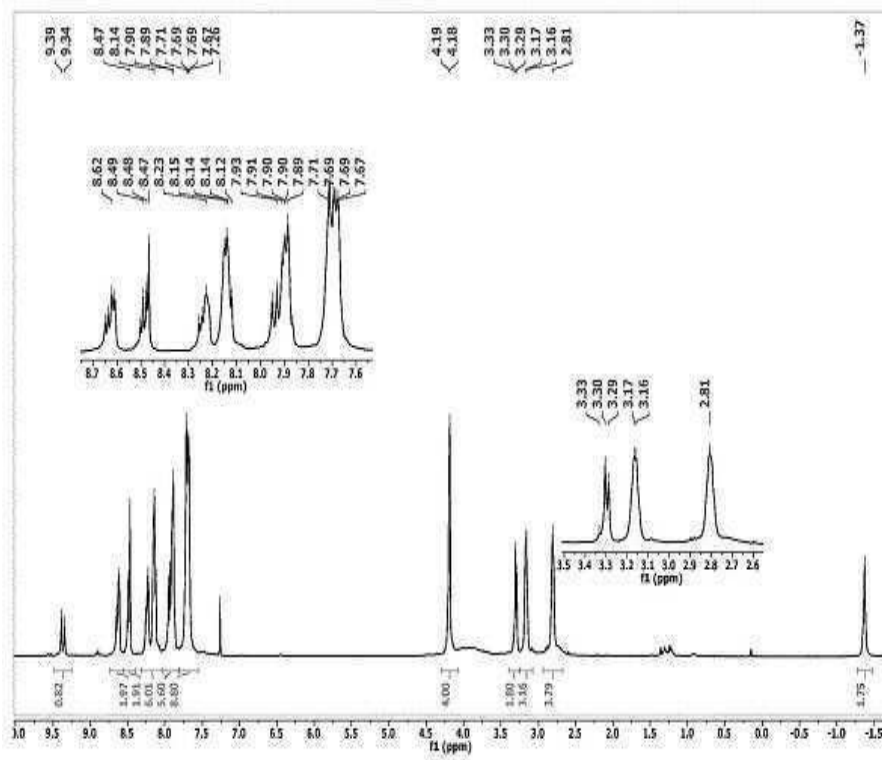
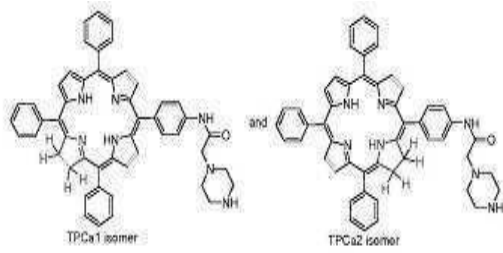


화합물 37 & 38은 TPCc1 및 TPCc2 이성질체의 유도체이다.
TPCc1 이성질체의 구조만 구조 그림에 나타낸다.

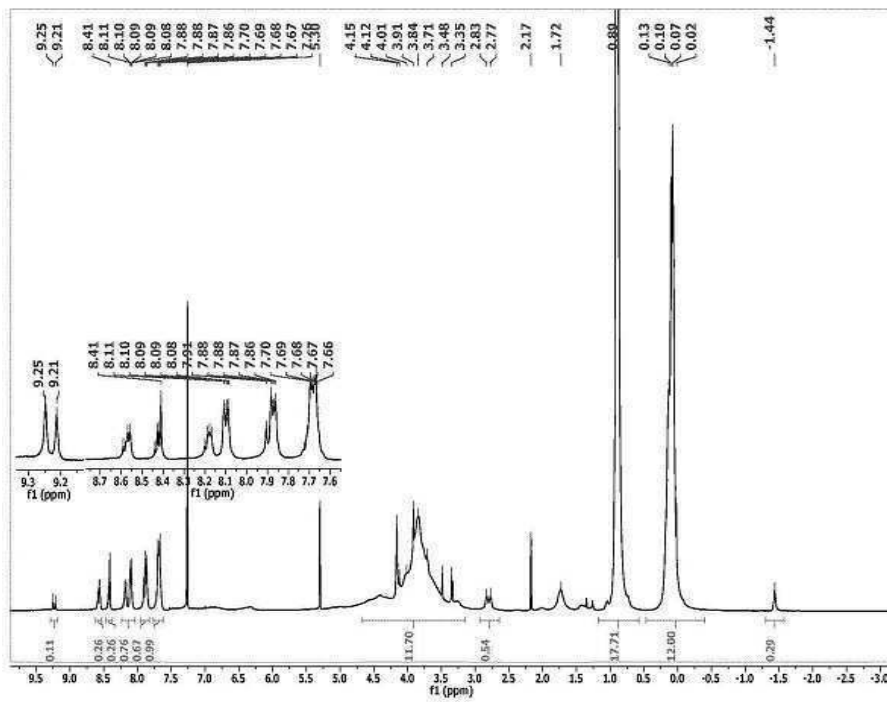
도면14



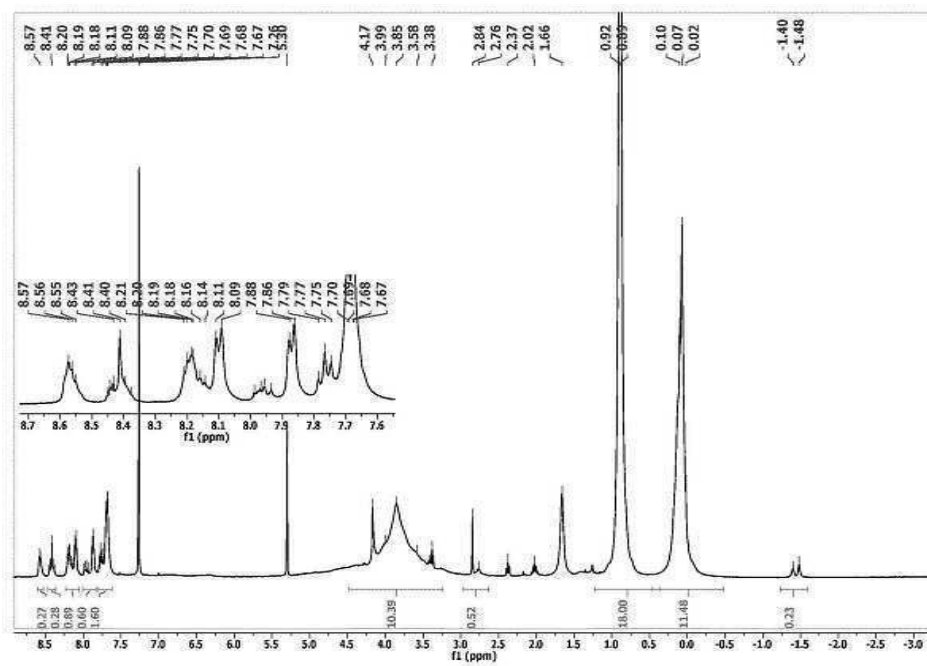
도면15



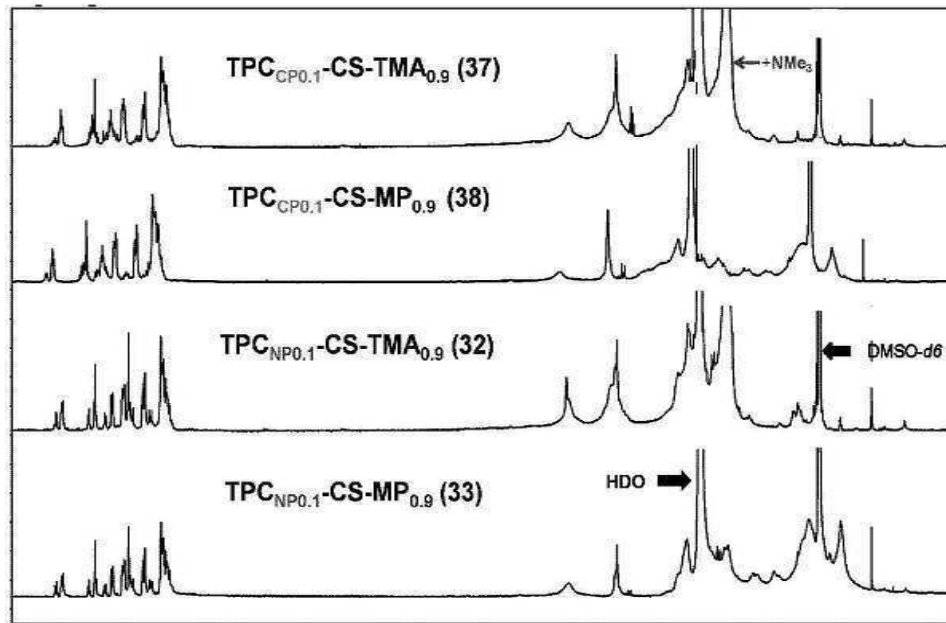
도면16



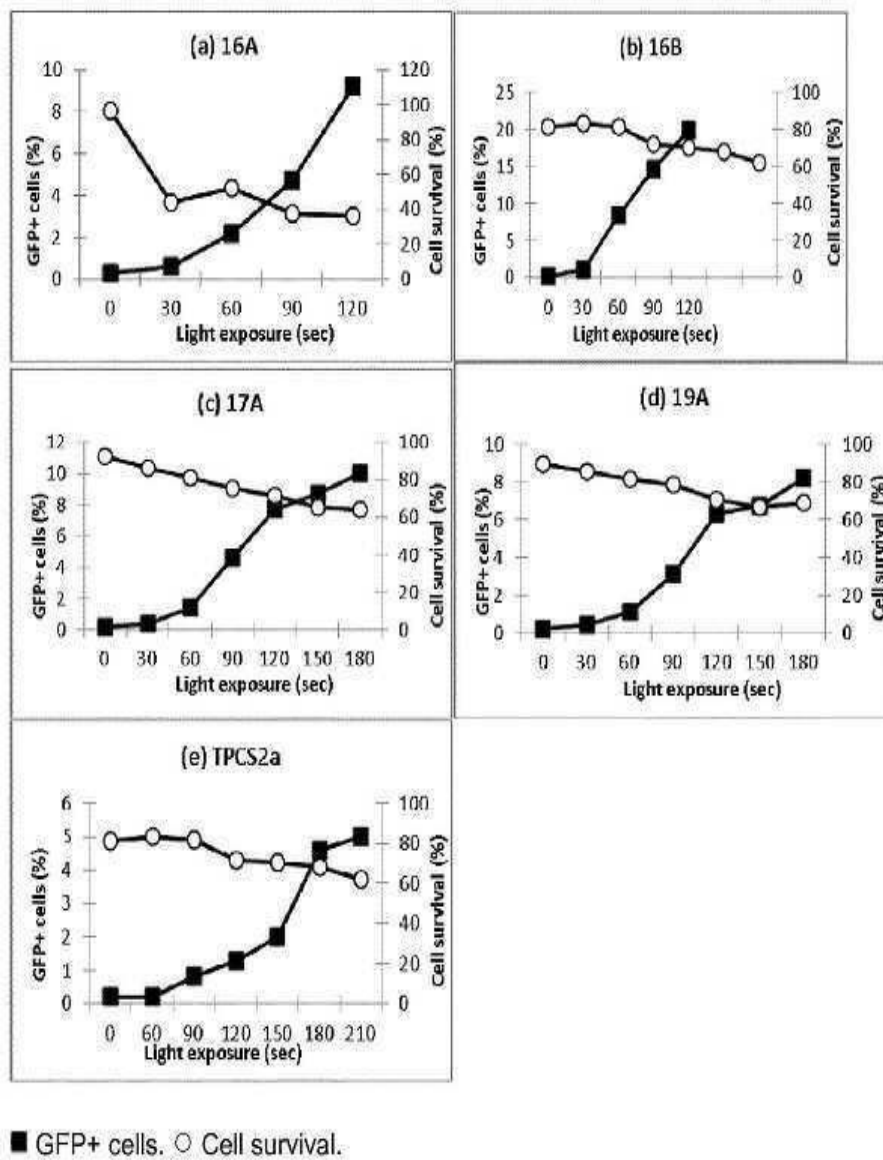
도면17



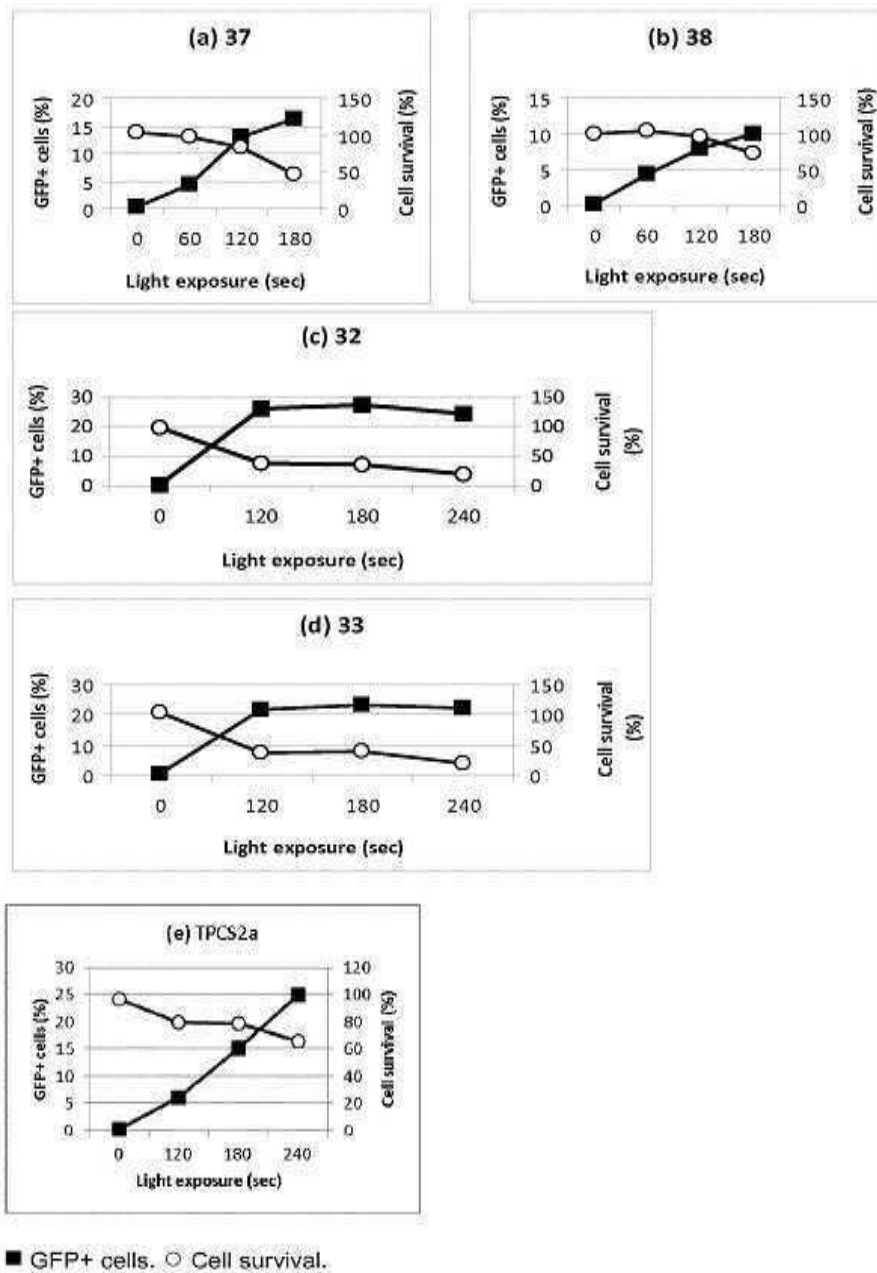
도면18



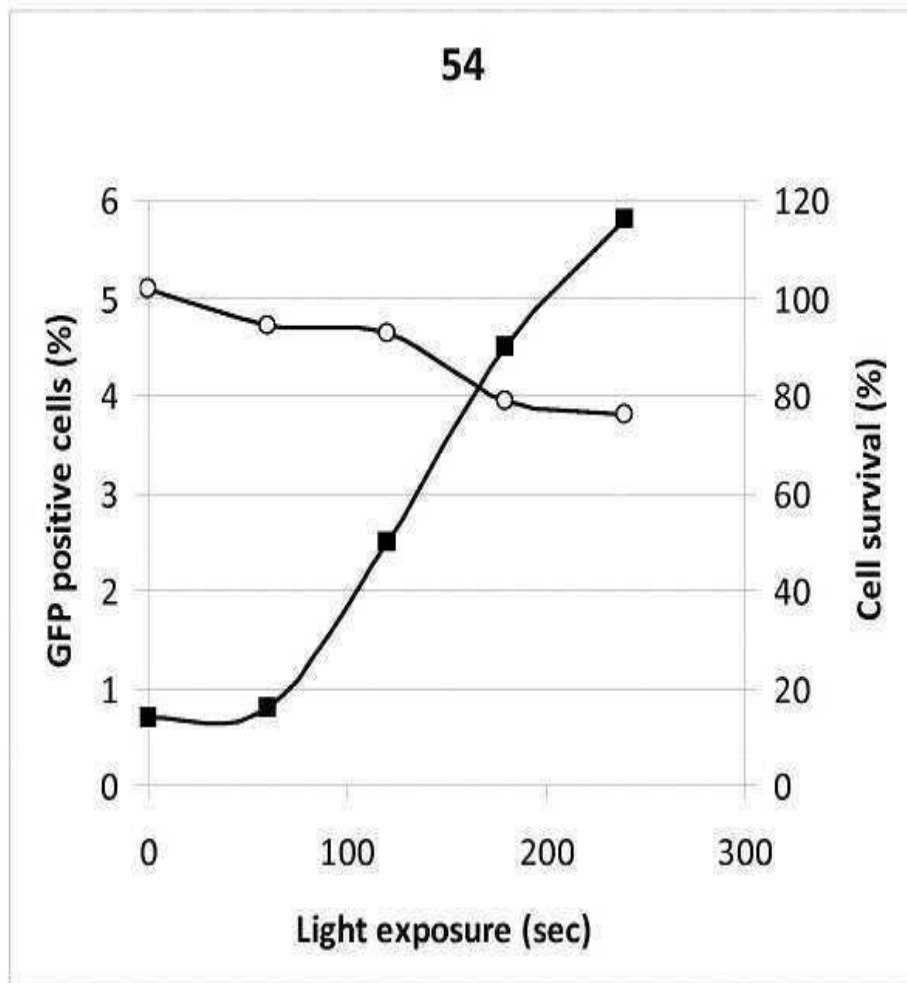
도면19



도면20

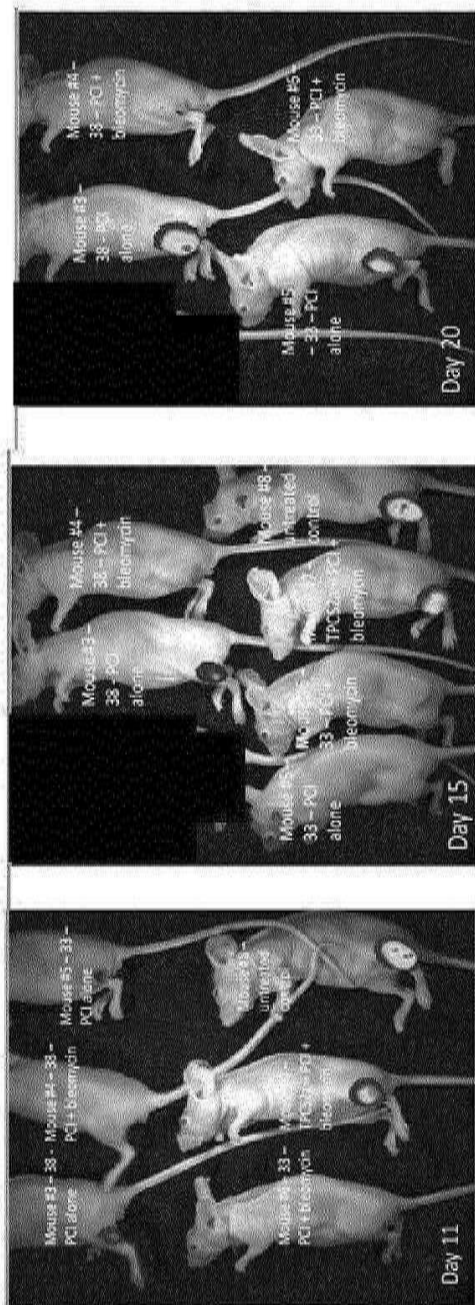


도면21

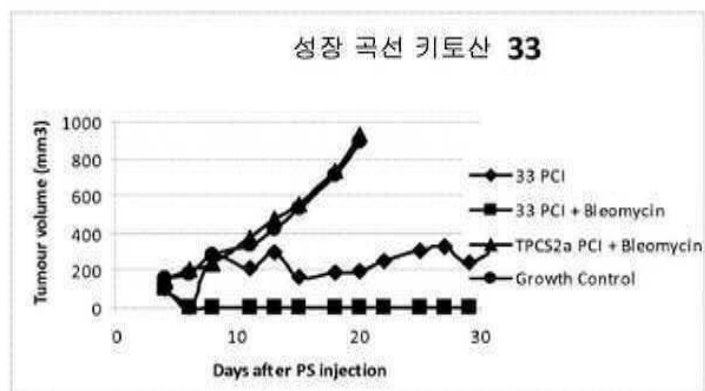
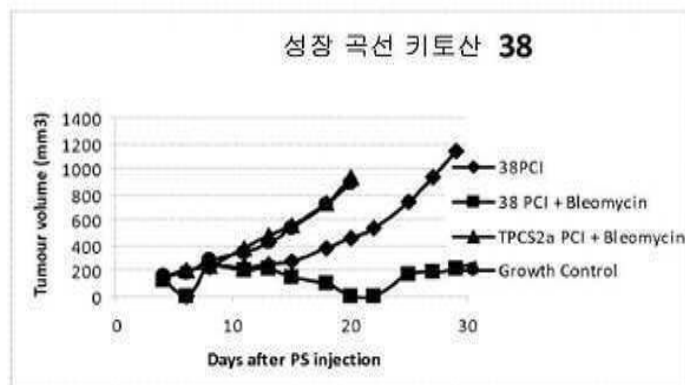
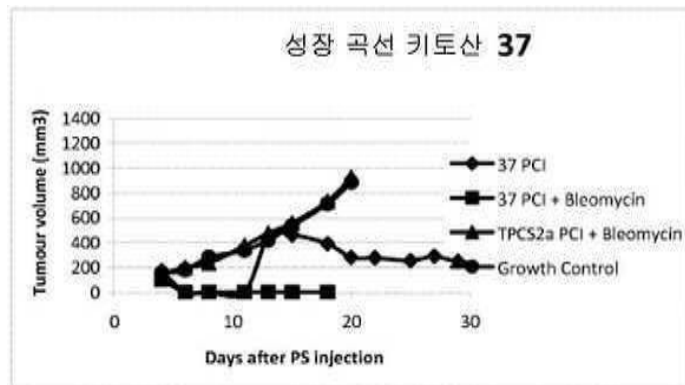


■ GFP positive cells. ○ Cell survival

도면22

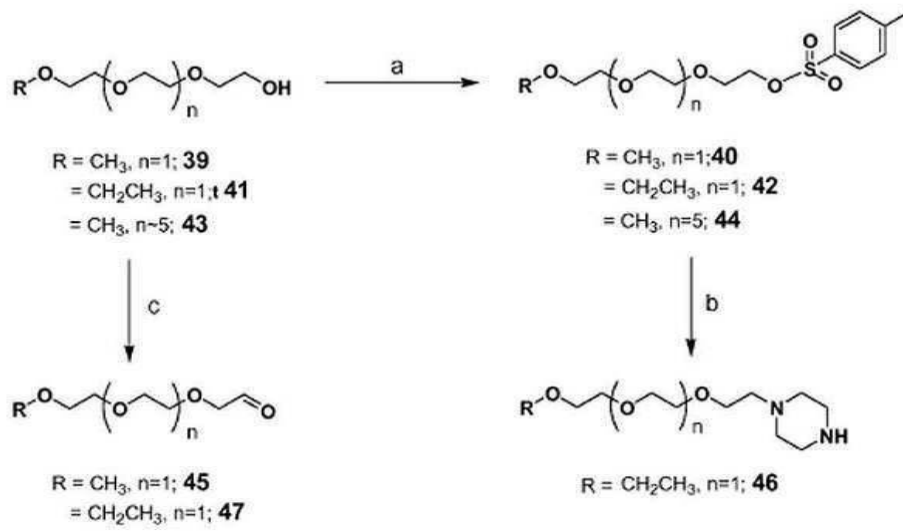


도면23



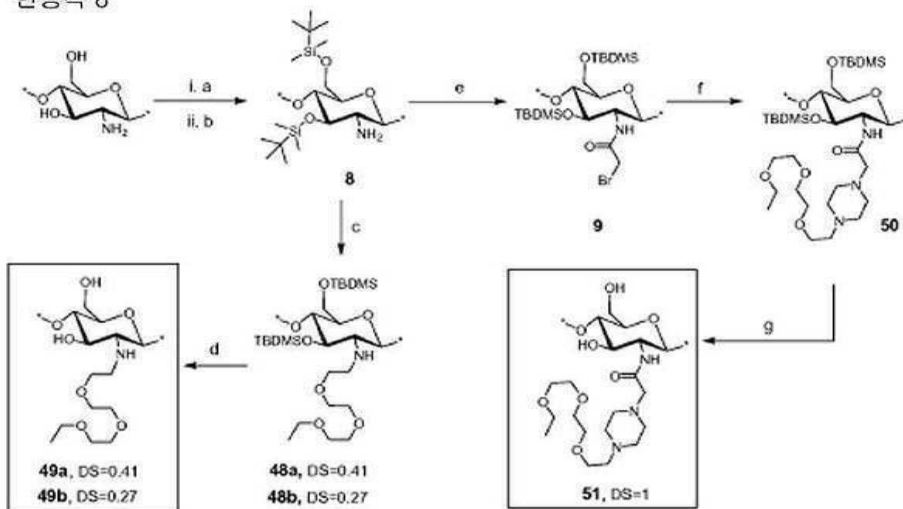
도면24

반응식 7

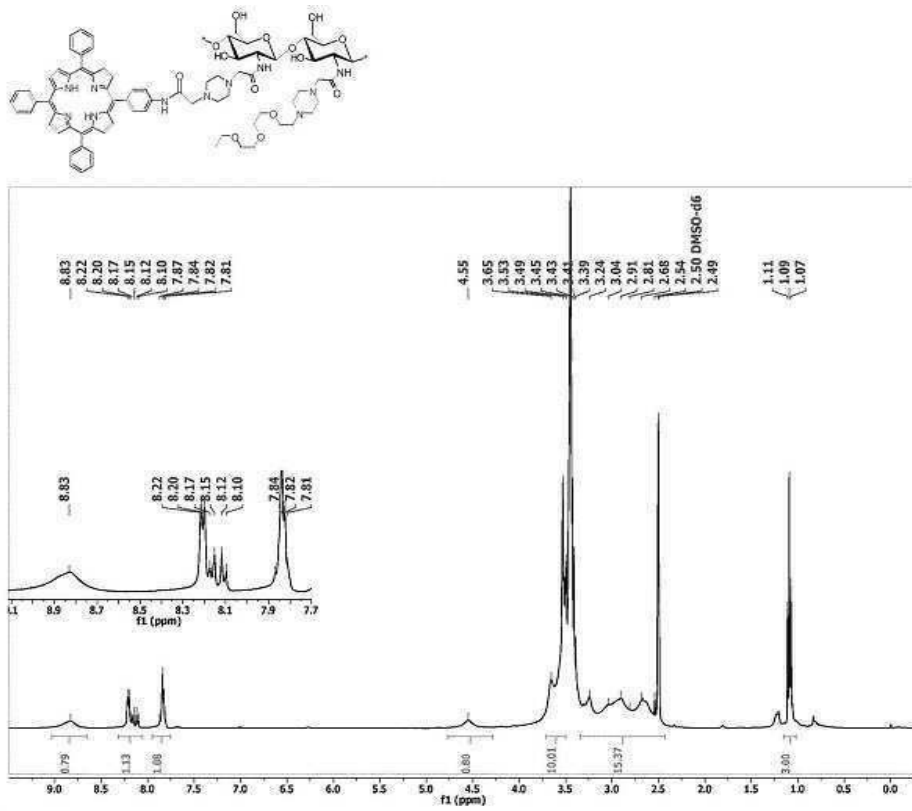


도면25

반응식 8

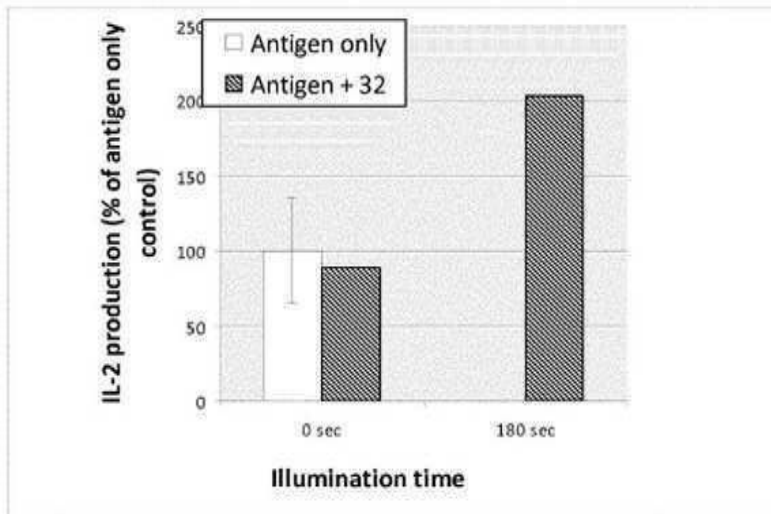


도면27



도면28

A



B

