



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2012년06월21일  
(11) 등록번호 10-1157007  
(24) 등록일자 2012년06월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C08G 65/332 (2006.01) C08G 65/00 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2006-7008804  
(22) 출원일자(국제) 2004년11월05일  
심사청구일자 2009년11월03일  
(85) 번역문제출일자 2006년05월04일  
(65) 공개번호 10-2006-0117936  
(43) 공개일자 2006년11월17일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2004/036850  
(87) 국제공개번호 WO 2005/047366  
국제공개일자 2005년05월26일  
(30) 우선권주장  
60/517,794 2003년11월06일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
JP06135889 A\*  
JP10087815 A\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
넥타르 테라퓨틱스  
미국 94158 캘리포니아주 샌프란시스코 사우스  
미션 베이 불리바드 455 스위트 100  
(72) 발명자  
해리스 밀턴 제이  
미국 35801 앨라배마주 헌즈빌 하이랜드 플라자  
3119  
코즈로브스키 안토니  
미국 35811 앨라배마주 헌즈빌 페어팩스 드라이  
브 2209  
귀 리홍  
미국 35803 앨라배마주 헌즈빌 사우스허스트 드  
라이브 2805  
(74) 대리인  
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 35 항

심사관 : 김장강

(54) 발명의 명칭 **카르복시산 작용기화 중합체 제조 방법**

**(57) 요약**

카르복시 작용기를 가지는 수용성, 비펩티드성 중합체, 특히 카르복시산 작용기화 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 중합체의 제조방법 및 이들 방법의 생성물이 개시된다. 일반적으로, 에스테르 시약 R(C=O)OR' (R'은 3차 기이고 R은 작용기 X를 함유함)을, 수용성, 비펩티드성 POLY-Y (Y는 X와 반응하여 공유결합을 형성하는 작용기 임)와 반응시켜 중합체의 3차 에스테르를 형성하고, 이후 이를 수용액중 강염기로 처리하여 중합체의 카르복실레이트염을 형성한다. 보통, 이러한 카르복실레이트염은 이후 수용액중 무기산으로 처리하여 카르복실레이트염을 카르복시산으로 전환함으로써, 카르복시산 작용기화 중합체를 형성한다.

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

하기를 포함하는, 수용성, 비(非)펩티드성 중합체의 활성화 카르복실산 유도체의 제조방법:

- i) 3차 에스테르 시약 R(C=O)OR' (R'은 3차 기이고 R은 작용기 X를 함유함)을, 수용성, 비펩티드성 POLY-Y (Y는 X와 반응하여 공유결합을 형성하는 작용기임)와 반응시켜 중합체의 3차 에스테르를 형성하고;
- ii) 중합체의 3차 에스테르를 수용액 중 강염기로 처리하여 중합체의 카르복실레이트염을 형성하고;
- iii) 중합체의 카르복실레이트염을 수용액 중 무기산으로 처리하여 카르복실레이트염을 카르복시산으로 전환시킴으로써 카르복시산으로 작용기화된 중합체를 형성하고;
- iv) 카르복시산으로 작용기화된 중합체를 추가로 유도화하여, 아실 할리드, 아실 수도(pseudo)할리드, 중성염, 에스테르, 무수물, 아마이드, 이미드, 또는 하이드라지드를 가지도록 유도된 중합체를 얻음.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

제 1 항에 있어서, X가 이탈기이고 Y 는 히드록시기인 방법.

**청구항 4**

제 1 항에 있어서, 상기 강염기가 알칼리 금속 히드록시드인 방법.

**청구항 5**

제 1 항에 있어서, 상기 강염기와외 처리가 pH 약 11 내지 13의 반응을 도모함에 효과적인 방법.

**청구항 6**

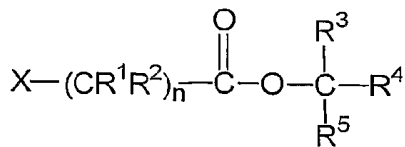
제 1 항에 있어서, 상기 무기산이, 수용액 중 비친핵성 음이온을 생성하는 산인 방법.

**청구항 7**

제 6 항에 있어서, 상기 산이, 황산, 질산, 인산 및 염산으로 이루어진 군에서 선택되는 방법.

**청구항 8**

제 1 항에 있어서, 3차 에스테르 시약이 하기의 구조를 가지는 방법:



(식 중, X는 이탈기이고;

R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 각각 수소, 알킬, 시클로알킬, 알콕시, 아릴, 아르알킬 및 헤테로사이클로부터 독립적으로 선택되고;

R<sup>3</sup> 내지 R<sup>5</sup> 각각은, 저급 알킬, 아릴, 아르알킬 및 시클로알킬로부터 독립적으로 선택되고, 여기에서 임의의 R<sup>3</sup> 내지 R<sup>5</sup> 는 연결되어 고리 또는 고리계를 형성할 수 있고;

수소를 제외한 임의의 R<sup>1</sup> 내지 R<sup>5</sup>는, 저급 알킬, 저급 알콕시, C3-C6 시클로알킬, 할로, 시아노, 옥소 (케토), 니트로 및 페닐로부터 선택되는 기로 치환 가능하고; 그리고,

n은 1 내지 약 24 임).

**청구항 9**

제 8 항에 있어서, n이 1 내지 6 인 방법.

**청구항 10**

제 9 항에 있어서, n이 1 또는 2 인 방법.

**청구항 11**

제 10 항에 있어서,  $R^1$  및  $R^2$  각각은 독립적으로 수소 또는 비치환 저급 알킬이고,  $R^3$  내지  $R^5$  의 각각은, 독립적으로 비치환 저급 알킬 또는 페닐인 방법.

**청구항 12**

제 11 항에 있어서,  $R^1$  및  $R^2$  각각은 독립적으로 수소 또는 메틸이고,  $R^3$  내지  $R^5$  의 각각은 독립적으로 메틸, 에틸 또는 페닐인 방법.

**청구항 13**

제 12 항에 있어서,  $R^1$  및  $R^2$  각각이 수소이고 n은 1인 방법.

**청구항 14**

제 13 항에 있어서, 3차 에스테르 시약이 t-부틸 할로아세테이트인 방법.

**청구항 15**

제 1 항에 있어서, 중합체가, 폴리(알킬렌 글리콜), 폴리(올레핀성 알코올), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(히드록시알킬메타크릴아미드), 폴리(히드록시알킬메타크릴레이트), 폴리(사카라이드), 폴리( $\alpha$ -히드록시아세트산), 폴리(아크릴산), 폴리(비닐 알코올), 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리(N-아크릴로일모르폴린), 및 그 공중합체 또는 3원 중합체로 이루어진 군에서 선택되는 방법.

**청구항 16**

제 15 항에 있어서, 중합체가 폴리(에틸렌 글리콜)인 방법.

**청구항 17**

제 16 항에 있어서 폴리(에틸렌 글리콜)이 선형이며, 한 말단은 상기 작용기 Y로, 그리고 나머지 말단은 다른 작용기 Y' 또는 캡핑기로 종결된 방법.

**청구항 18**

삭제

**청구항 19**

제 1 항에 있어서, 상기 유도체가 에스테르인 방법.

**청구항 20**

제 1 항에 있어서, 상기 중합체를 생물 활성 분자 상의 작용기로 반응시킴에 의해, 상기 중합체를 상기 분자로 공액시킴을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 21**

제 20 항에 있어서, 중합체는 에스테르를 가지도록 유도되고, 상기 분자상의 작용기가 친핵성기인 방법.

**청구항 22**

제 21 항에 있어서, 상기 친핵성기가 아미노기, 히드록시기 또는 티올인 방법.

**청구항 23**

하기를 포함하는, 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 의 활성화된 카르복시산 유도체의 제조방법:

- i) 3차 에스테르 시약 R(C=O)OR' (R'은 3차 알킬기이고 R은 작용기 X를 함유함)을, 중합체 PEG-Y (Y는 X와 반응하여 공유결합을 형성하는 작용기임)와 반응시켜 PEG 3차 에스테르를 형성하고;
- ii) PEG 3차 에스테르를 수용액 중 강염기로 처리하여 PEG 카르복실레이트염을 형성하고;
- iii) PEG 카르복실레이트염을 수용액 중 무기산으로 처리하여 카르복실레이트염을 카르복시산으로 전환시킴으로써 PEG 카르복시산을 형성하고;
- iv) PEG 카르복시산을 추가로 유도화하여, 아실 할리드, 아실 수도(pseudo)할리드, 중성염, 에스테르, 무수물, 아마이드, 이미드, 또는 하이드라지드를 가지도록 유도화된 PEG 를 얻음.

**청구항 24**

삭제

**청구항 25**

제 23 항에 있어서, X 가 이탈기이고 Y 는 히드록시기인 방법.

**청구항 26**

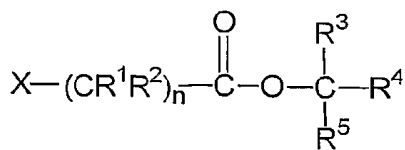
제 23 항에 있어서, 상기 강염기가 알칼리 금속 히드록시드인 방법.

**청구항 27**

제 23 항에 있어서, 상기 산이, 황산, 질산, 인산 및 염산으로 이루어진 군에서 선택되는 방법.

**청구항 28**

제 23 항에 있어서, 3차 에스테르 시약이 하기의 구조를 가지는 방법:



(식 중, X는 이탈기이고;

R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 각각 수소, 알킬, 시클로알킬, 알콕시, 아릴, 아르알킬 및 헤테로사이클로부터 독립적으로 선택되고;

R<sup>3</sup> 내지 R<sup>5</sup>의 각각은, 저급 알킬, 아릴, 아르알킬, 및 시클로알킬로부터 독립적으로 선택되고, 여기에서 임의의 R<sup>3</sup> 내지 R<sup>5</sup>는 연결되어 고리 또는 고리계를 형성할 수 있고;

수소를 제외한 임의의 R<sup>1</sup> 내지 R<sup>5</sup>는, 저급 알킬, 저급 알콕시, C3-C6 시클로알킬, 할로, 시아노, 옥소 (케토), 니트로 및 페닐로부터 선택되는 기로 치환 가능하고; 그리고,

n은 1 내지 약 24 임).

**청구항 29**

제 28 항에 있어서, n이 1 내지 6 인 방법.

**청구항 30**

제 29 항에 있어서, n이 1 또는 2 인 방법.

**청구항 31**

제 28 항에 있어서,  $R^1$  및  $R^2$  각각은 독립적으로 수소 또는 비치환 저급 알킬이고,  $R^3$  내지  $R^5$  의 각각은, 독립적으로 비치환 저급 알킬 또는 페닐인 방법.

**청구항 32**

제 28 항에 있어서,  $R^1$  및  $R^2$  각각이 수소이고 n은 1인 방법.

**청구항 33**

제 32 항에 있어서, 3차 에스테르 시약이 t-부틸 할로아세테이트인 방법.

**청구항 34**

제 23 항 또는 제 33 항에 있어서, 폴리(에틸렌 글리콜)이 선형이며, 한 말단은 상기 작용기 Y로, 그리고 나머지 말단은 다른 작용기 Y' 또는 캡핑기로 종결된 방법.

**청구항 35**

제 23 항 또는 제 33 항에 있어서, PEG가 약 100 내지 약 100,000 Da의 분자량을 가지는 방법.

**청구항 36**

제 35 항에 있어서, PEG가 약 300 내지 약 60,000 Da의 분자량을 가지는 방법.

**청구항 37**

삭제

**청구항 38**

제 23 항에 있어서, 상기 유도체가 에스테르인 방법.

**청구항 39**

제 23 항에 있어서, 상기 PEG를 생물 활성 분자 상의 작용기로 반응시킴에 의해, 상기 PEG를 상기 분자로 공액시킴을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 40**

삭제

**청구항 41**

삭제

**청구항 42**

삭제

**청구항 43**

삭제

**청구항 44**

삭제

- 청구항 45  
삭제
- 청구항 46  
삭제
- 청구항 47  
삭제
- 청구항 48  
삭제
- 청구항 49  
삭제
- 청구항 50  
삭제
- 청구항 51  
삭제
- 청구항 52  
삭제
- 청구항 53  
삭제
- 청구항 54  
삭제
- 청구항 55  
삭제
- 청구항 56  
삭제
- 청구항 57  
삭제
- 청구항 58  
삭제
- 청구항 59  
삭제
- 청구항 60  
삭제

명세서

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 카르복시 작용기를 지니는 수용성, 비(非)펩티드성 중합체, 특히 카르복시산 작용기화된 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 중합체 제조 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 친전자성기로 활성화된 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 유도체는 생물 활성 분자의 친핵성기, 예컨대 아미노기로 결합시키기에 유용하다. 특히, 활성 에스테르 및 PEG 의 기타 카르복시산 유도체는 PEG 를 아미노산을 지니는 단백질에 부착시키기 위해 사용되어 왔다.

[0003] 말단 카르복시메틸기를 갖는 PEG 분자는, 예를 들어 Martinez 등, 미국 특허 제 5,681,567 호, Veronese 등, *Journal of Controlled Release* **10**: 145-154 (1989), 및 Buckmann 등, *Makromol. Chem.* **182** (5): 1379-1384 (1981) 에 기술되었다. 미국 특허 제 5,672,662 호 (Harris 등) 는 말단 프로피온산 또는 부타노산 부분을 갖는 PEG 유도체를 개시한다. 이러한 카르복시-말단 PEG 를 단백질 또는 아미노기를 지니는 기타 분자의 공액에 적합한 활성 에스테르를 제조하기 위해 사용한다.

[0004] 그러나, 카르복시-작용기화된 중합체의 제조와 관련된 지속되는 문제는 요망되는 중합체 생성물을 충분한 고농도 수준으로 수득하는 어려움이다. 예를 들어, 상기 언급된 Veronese 등 및 Buckmann 등은 mPEG 카르복시산을 합성하는 방법을 사용하고, 이는 mPEG-OH 와  $\alpha$ -할로 에틸 에스테르의 염기-촉매 반응에 의해 mPEG-OH 를 mPEG 카르복시산의 에틸 에스테르로 전환 후, 에스테르의 염기-촉진 가수분해를 포함한다. 그러나, 이러한 방법은 오로지 약 85% 순도의 mPEG 산을 제공하며, 그 주요 오염물은 침전, 결정화 또는 추출과 같은 전형적인 정제법을 사용하여 mPEG 카르복시산으로부터 분리될 수 없는, mPEG-OH 이다. mPEG-OH 의 제거는 제조용 이온 교환 컬럼 크로마토그래피의 사용을 필요로하며, 이는 시간이 소모되고 고가이다. 시판되는 PEG 카르복시산은 흔히 잔여량의 PEG-OH 를 함유하고, 이는 이러한 물질에 기초한 바이오콘주게이트 (bioconjugate) 또는 유도체의 제조를 복잡하게 한다.

[0005] 미국 특허 제 5,278,303 호, 제 5,605,976 호 및 제 5,681,567 호는 3차 알킬 할로아세테이트를 사용하여 3차 알킬 에스테르-작용기화된 PEG 를 제조하고, 이후 산, 바람직하게는 트리플루오로아세트산 (TFA) 으로 가수분해시켜 출발 물질 (PEG 알코올) 을 포함하지 않거나, 거의 포함하지 않는 PEG 카르복시산의 제조를 보고한다.

[0006] 보호기의 사용에 대한 다양한 논문은 3차 알킬 에스테르, 예컨대 t-부틸 에스테르가 에틸 에스테르와 같은 1차 알킬 에스테르를 가수분해시키기 위해 전형적으로 사용되는 약염기 가수분해에 안정적인 것에 주목한다. 강염기 가수분해는 카르복시산기의 절단을 초래할 수 있다. 예를 들어, T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3<sup>rd</sup> edition, 1999, p. 406; 또는 P. J. Kocienski, *Protecting Groups*, 1994, p. 125 참조. 따라서, 이러한 3차 알킬 에스테르는 통상적으로 산, 전형적으로 TFA 로 절단된다.

[0007] 그러나, 트리플루오로아세트산의 사용은 정제 및 제품 안정성 문제를 초래할 수 있다. 트리플루오로아세트산, 특히 상기 인용된 특허에 제시된 TFA 의 양은 최종 카르복시-작용기화된 중합체로부터 완전히 제거하기 어렵다. 잔여 트리플루오로아세트산은 산-촉진된 자동산화에 의해 초래되는 중합체의 분해에 기인한 열악한 제품 안정성을 초래한다. 예를 들어, M. Donbrow, "Stability of the Polyoxyethylene Chain", in *Nonionic Surfactants: Physical Chemistry*, M. J. Schick, ed., Marcel Dekker, 1987, pp.1011 이하 참조. 상기 논문은 산이 히드로퍼옥시드의 형성 및 히드로퍼옥시드 파열을 촉진시키고, 폴리옥시에틸렌 사슬의 절단을 초래하는 것으로 보고한다.

[0008] 미국 특허 제 5,605,976 호는 중합체 생성물로부터 유기 물질을 분리시키기 위한 방법으로서 증류를 제안하지만, 증류 과정을 사용하여 매우 낮은 용점을 갖는 화합물 조차도 고분자량 중합체로부터 제거하기 어렵고, 그 난이도는 중합체의 분자량이 증가할 수록 증가한다.

[0009] 당업계에는, 높은 수율 및 상당량의 오염물, 특히 상당량의 중합체 출발 물질이 없는, 카르복시산 작용기화된 중합체를 제조하기 위한 대안적인 방법에 대한 필요가 있다. 당업계에서는 또한, 최종 중합체 생성물로부터 제거하기 어렵거나, 제품 안정성 문제를 초래하는 시약을 이용하지 않는 대안적인 합성 방법에 대한 필요가 있다.

**발명의 상세한 설명**

[0010] **발명의 개요**

[0011] 한 측면에서는, 본 발명은 카르복시기로 작용기화된 수용성, 비펩티드성 중합체 제조 방법을 제공하며, 그 방법은 하기를 포함한다:

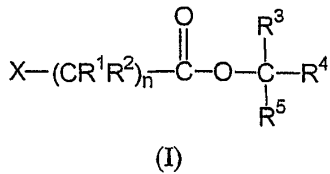
[0012] (i) 에스테르 시약  $R(C=O)OR'$  ( $R'$  은 3차기이며,  $R$  은 작용기  $X$  를 포함함) 을 수용성, 비펩티드성 중합체 POLY-Y ( $Y$  는  $X$  와 반응하여 공유결합을 형성하는 작용기임) 와 반응시켜 중합체의 3차 에스테르를 형성함; 및

[0013] (ii) 중합체의 3차 에스테르를 수용액 중, 알칼리 금속 히드록시드와 같은 강염기로 처리하여, 중합체의 카르복실레이트염을 형성함. 상기 방법은 추가적으로 하기 단계 (iii) 이 포함될 수 있다: 중합체의 카르복실레이트염을 수용액 중 무기산으로 처리하여, 카르복실레이트염을 카르복실산으로 전환시킴에 따라 카르복실산 작용기화된 중합체를 형성함. 이 후, 카르복시산 작용기화된 중합체는 적절한 용매, 바람직하게는 염화용매로, 수용액으로부터 추출될 수 있다.

[0014] 하나의 구현예에서는,  $X$  는 할라이드 또는 설포네이트 에스테르와 같은 이탈기이며,  $Y$  는 히드록실기이다.  $Y$  가 히드록시기인 경우, 반응 (i) 은 바람직하게 염기, 예를 들어,  $R'O\bar{M}^+$  형태의 염기 ( $M^+$  은 양이온임) 의 존재 하에서 수행된다.

[0015] 반응 (ii) 의 강염기로의 처리는 바람직하게 약 11 내지 13 의 반응 pH 를 도모하기에 효과적이다. 단계 (iii) 의 무기산, 예를 들어, 광물산은 바람직하게 수용액 중 비친핵성 음이온을 제조하는 산이다. 바람직한 산은 황산, 질산, 인산, 및 염산을 포함한다. (iii) 의 산 처리는 바람직하게 약 1 내지 3 의 반응 pH 를 도모하기에 효과적이다.

[0016] 반응 (i) 에 사용된 3차 에스테르 시약은 바람직하게 하기 구조 (I) 을 갖는다:



[0017] 구조 (I) 에서,  $X$  는 이탈기이며, 각  $R^1$  및  $R^2$  는 독립적으로 수소, 알킬, 시클로알킬, 알콕시, 아릴, 아르알킬, 및 헤테로사이클로부터 선택된다. 바람직하게는,  $(CR^1R^2)_n$  기는 동일한 탄소 원자에 부착된 2개의 헤테로원자를 포함하지 않는다; 예를 들어, 동일한 탄소 원자 상의  $R^1$  및  $R^2$  는 바람직하게는 모두 알콕시가 아니다. 각각의  $R^3-R^5$  는 독립적으로 저급 알킬, 아릴, 아르알킬 및 시클로알킬로부터 선택되며, 여기서  $C^3-C^5$  중 임의의 것은 결합되어 고리 또는 고리계, 예컨대 아다만틸을 형성할 수 있다. 수소를 제외한  $R^1$  내지  $R^5$  의 임의의 것은 저급 알킬, 저급 알콕시, C3-C6 시클로알킬, 할로, 시아노, 옥소 (케토), 니트로 및 페닐로부터 선택되는 기로 치환될 수 있다. 변수  $n$  은 1 내지 약 24 이며, 바람직하게는 1 내지 6, 더욱 바람직하게는 1 내지 4, 그리고 가장 바람직하게는 1 또는 2 이다. 하나의 구현예에서는,  $n$  은 1 이다.

[0019] 구조 (I) 의 선택된 구현예에서는, 각  $R^1$  및  $R^2$  는 독립적으로 수소 또는 비치환 저급 알킬, 바람직하게는 수소 또는 메틸이며,  $R^3$  내지  $R^5$  의 각각은 독립적으로 비치환된 저급 알킬 또는 페닐, 바람직하게는 메틸, 에틸 또는 페닐이다. 하나의 구현예에서는, 각  $R^1$  및  $R^2$  은 H 이며  $n$  은 1 이다.

[0020] 구조 (I) 의 이탈기  $X$  는 바람직하게 할라이드 또는 설포네이트 에스테르이다. 하나의 구현예에서는, 3차 에스테르 시약은 3차 알킬 할로아세테이트, 예컨대 t-부틸 할로아세테이트이다.

[0021] 수용성, 비펩티드성 중합체는 바람직하게 폴리(알킬렌 글리콜), 폴리(올레핀성 알코올), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(히드록시알킬메타크릴아미드), 폴리(히드록시알킬메타크릴레이트), 폴리(사카리드), 폴리( $\alpha$ -히드록시아세트산), 폴리(아크릴산), 폴리(비닐 알코올), 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리(N-아크틸로일모르폴린), 및 그의 공중합체 또는 삼원중합체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서는, 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜)이다. 폴리(에틸렌 글리콜)은 선형이고 한 말단은 작용기  $Y$  로, 그리고 다른 한 말단은

또 다른 작용기 Y' 또는 캡핑기, 예컨대 메톡시기로 종결될 수 있다. 대안적으로, 폴리(에틸렌 글리콜)은 분지형, 포크형 또는 다중팔 (multiarmed) 일 수 있다.

- [0022] 상기 방법은 추가적으로 카르복시산 작용기화된 중합체의 카르복시산을, 활성화 카르복시산 유도체, 예를 들어, N-석시니미딜 에스테르, o-, m-, 또는 p-니트로페닐 에스테르, 1-벤조트리아졸릴 에스테르, 이미다졸릴 에스테르, 또는 N-설포석시니미딜 에스테르와 같은 활성화 에스테르로 전환하는 것을 포함한다. 상기 중합체는 이어서 생물 활성 분자 상에서, 카르복시산 유도체를 작용기, 바람직하게는 친핵성기 예컨대 히드록시, 티올 또는 아미노기와 반응시킴으로써, 생물 활성 분자와 공액될 수 있다. 바람직하게는, 친핵성기는 아미노기이다.
- [0023] 상기 방법의 바람직한 구현예에서는, 상기에 언급된 바와 같이, 중합체가 PEG 중합체이다. 이러한 측면에서, 본 발명은 카르복시기로 작용기화된 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 를 제조하는 방법을 제공하며, 그 방법을 하기를 포함한다:
- [0024] (i) 3차 에스테르 시약  $R(C=O)OR'$  ( $R'$  은 3차 알킬기이며,  $R$  은 작용기  $X$  를 포함함) 를 중합체 PEG-Y ( $Y$  는  $X$  와 반응하여 공유 결합을 형성하는 작용기임) 와 반응시켜 PEG 3차 에스테르를 형성함; 및
- [0025] (ii) PEG 3차 에스테르를 수용액 중, 알칼리 금속 히드록시드와 같은 강염기로 처리하여 PEG 카르복실레이트 염을 형성함. 상기 방법은 추가적으로, PEG 카르복실레이트염을 수용액 중, 무기산으로 처리하여 카르복실레이트염을 카르복시산으로 전환시킴으로써 PEG 카르복시산을 형성하는 (iii) 을 포함한다. 상기 방법의 바람직한 구현예는 상기 기술된 것에 상응한다. 상기 방법은 추가적으로, 상기에 기술된 바와 같이, PEG-카르복시산을 활성화 에스테르와 같은 활성화 카르복시산 유도체로 전환시키는 것, 및 카르복시산 유도체를 분자 상의 작용기와 반응시켜, 중합체를 생물 활성 분자에 공액시키는 것을 포함한다.
- [0026] 하나의 구현예에서는, 폴리(에틸렌 글리콜)은 선형이고, 한 말단은 작용기  $Y$  로, 그리고 다른 한 말단은 또 다른 작용기  $Y'$  또는 캡핑기, 예컨대 메톡시기로 종결될 수 있다. PEG 의 분자량은 바람직하게는 약 100 Da 내지 약 100 kDa 의 범위일 수 있고, 더욱 바람직하게는 약 300 Da 내지 약 40, 50, 또는 60 kDa 의 범위에 있을 수 있다. 다른 구현예에서는, PEG 가 하기에 추가로 기술된 바와 같이 분지형, 포크형, 다중팔이다.
- [0027] 관련된 측면으로는, 본 발명은 여기에 개시된 방법에 의해 제조된, 카르복시산 작용기화된 중합체를 포함하는 단리된 중합체 생성물을 제공하며, 상기 생성물은 5 중량% 미만의 출발 물질을 포함한다; 즉, POLY-Y 또는 PEG-Y 중합체 (나머지는 실질적으로 카르복시산 작용기화된 중합체로 이루어짐). 바람직하게는, 단리된 중합체 생성물은 2 중량% 미만, 더욱 바람직하게는 1 중량% 미만, 가장 바람직하게는 0.5 중량% 미만의 POLY-Y 또는 PEG-Y 중합체를 포함한다. 추가적인 바람직한 구현예에서는, 단리된 중합체 생성물이 0.4 중량% 미만, 더욱 바람직하게는 0.3 중량% 미만, 가장 바람직하게는 0.2 중량% 미만의 POLY-Y 또는 PEG-Y 중합체를 포함한다.
- [0028] 추가의 바람직한 측면에서는, 단리된 중합체 생성물이 저분자량 유기산의 양을 실질적으로 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서는, 단리된 중합체 생성물이 트리플루오로아세트산과 같은 단량체성 유기 카르복시산의 양을 실질적으로 포함하지 않는다.
- [0029] 본 발명의 중합체 생성물의 하나의 구현예에서는, 카르복시산 작용기화된 중합체는 PEG 카르복시산이다. 예를 들어, 카르복시산 작용기화된 중합체는  $mPEG-CH_2-COOH$  일 수 있고, 5 중량% 미만, 바람직하게는 2% 미만, 더욱 바람직하게는 0.5 중량% 미만, 그리고 가장 바람직하게는 0.2 중량% 미만의  $mPEG-OH$  를 포함한다. 바람직하게는, 상기 생성물은 트리플루오로아세트산의 양을 실질적으로 포함하지 않는다.
- [0030] 생성물의 또 다른 바람직한 구현예에서는, 카르복시산 작용기화된 중합체는  $HOOC-CH_2-PEG-CH_2-COOH$  이며, 5 중량% 미만, 바람직하게는 2 중량% 미만, 더욱 바람직하게는 0.5 중량% 미만, 그리고 더욱 바람직하게는 0.2 중량% 미만의  $HO-PEG-OH$  를 포함한다. 바람직하게는, 상기 생성물은 트리플루오로아세트산의 양을 실질적으로 포함하지 않는다.
- [0031] 상기 생성물의 추가적인 구현예에서는, 카르복시산 작용기화된 중합체는  $PEG-(CH_2-COOH)_x$  ( $x$  는 3 내지 8 임) 로 표시되는, 다작용성 분지형 또는 다중팔 카르복시산 작용기화된 PEG 이며, 5 중량% 미만, 바람직하게는 2 중량% 미만, 더욱 바람직하게는 0.5 중량% 미만, 가장 바람직하게는 0.2 중량% 미만의  $PEG-(OH)_x$  를 포함한다.

- [0032] 바람직하게는, 상기 생성물은 트리플루오로아세트산의 양을 실질적으로 포함하지 않는다.
- [0033] 본 발명은 추가적으로, 3차 에스테르 시약  $R(C=O)OR'$  ( $R'$  은 3차 알킬기이고
- [0034]  $R$  은 작용기  $X$  를 포함함) 을 중합체 PEG-Y ( $Y$  는  $X$  와 반응하여 공유결합을 형성하는 작용기임) 와 반응시켜 PEG 3차 에스테르를 형성하는 반응에 의해, 카르복시기로 작용기화된 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 중합체를 제조하는 방법의 개선을 제공한다. 상기 개선은 수용액 중, PEG 3차 에스테르를 강염기, 바람직하게는 알칼리 금속 히드록시드로 처리하여 PEG 카르복실레이트염을 형성하는 것을 포함한다. 강염기는 바람직하게 수용액 중, 약 11 내지 13 의 반응 pH 를 도모하기에 효과적인 것이다.
- [0035] 개선된 방법은 추가적으로, 수용액 중, PEG 카르복실레이트염을 무기산으로 처리하여, 카르복실레이트염을 카르복시산으로 전환시킴으로써 PEG 카르복시산을 형성하는 것을 포함할 수 있다. 무기산은 바람직하게 황산, 질산, 인산 및 염산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 광물산이다.
- [0036] 본 발명의 상기 및 기타 목적 및 특징은 하기의 본 발명의 상세한 설명을, 포함된 그림과 함께 읽음으로써 더 완전히 명백해질 것이다.
- [0037] 본 발명은 이제 더 완전히 기술될 것이다. 그러나, 본 발명은 여러 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에 기술된 구현예에 제한되는 것으로 해석해서는 않된다; 그보다, 이러한 구현예는 본 개시가 면밀하고 완전하며, 본 발명의 범위를 당업자에게 완전히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공된다. 본 발명은 본 설명에 기술된 특정 중합체, 합성 기법, 활성제 등에 한정되지 않으며, 이는 이러한 것은 첨부된 청구의 범위에 의해 구현된 바와 같은 본 발명의 범위 내에서 변화할 수 있기 때문이다. 여기서 사용되는 용어는 오로지 특정 구현예를 기술하기 위한 것이며, 제한하려는 의도는 아니다.
- [0038] I. 정의
- [0039] 본 발명을 기술하고 청구하는 데에 있어서, 하기의 용어가 하기에 기술된 정의에 따라 사용될 것이다.
- [0040] 본 명세서에서 사용되는 단수 형태는 문맥이 달리 명시하지 않는 한, 복수의 형태를 포함한다.
- [0041] 여기서 사용되는 "비펩티드성" 은 펩티드 결합이 실질적으로 없는 중합체를 가리킨다. 그러나, 상기 중합체는 골격의 구간을 따라 위치한 소수의 펩티드 결합, 예를 들어 약 50 단량체 단위 당 약 1 펩티드 결합 이하를 포함할 수 있다.
- [0042] 여기서 사용되는 "PEG" 또는 "폴리에틸렌 글리콜" 은 임의의 수용성 폴리(에틸렌 옥사이드)를 포함하는 것을 의미한다. 전형적으로, 본 발명의 용도를 위한 PEG 는 하기 구조 2개 중 하나를 포함할 것이다:  $-O(CH_2CH_2O)_m-$  또는  $-CH_2CH_2O(CH_2CH_2O)_m-CH_2CH_2-$  ( $m$  은 일반적으로 3 내지 약 3000 임). 보다 넓은 의미로는, "PEG" 는  $-CH_2CH_2O-$  인 소단위의 대부분, 즉, 50% 초과를 포함하는 중합체를 가리킨다.
- [0043] 전체 PEG 의 구조 및 말단기는 변화할 수 있다. PEG 는 일반적으로, 전형적으로 1~20 탄소로 구성된 탄소-함유기인 말단 산소 상에서 말단-캡핑기를 함유할 수 있으며, 바람직하게는 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 아르알킬, 시클로알킬, 헤테로시클로, 및 상기 중 임의의 치환된 형태로부터 선택된다. 말단-캡핑기는 또한 실란일 수 있다. 가장 바람직한 것은 알킬(알콕시) 또는 아르알킬(아르알콕시) 캡핑기, 예컨대 메틸, 에틸 또는 벤질이다.
- [0044] 말단-캡핑기는 또한 유리하게는 검출가능한 라벨을 함유할 수 있다. 이러한 라벨은, 한정되지 않으며, 형광물질, 화학발광물질, 효소 라벨에 사용되는 부분, 비색 (예를 들어, 염료), 금속 이온, 방사성 부분 등을 포함한다.
- [0045] 다른 ("비-말단-캡핑된") 말단은 전형적으로, 추가적인 화학적 개질이 수행될 수 있는 히드록시, 아민 또는 황산화기이다.
- [0046] 본 발명의 용도를 위한 특이적 PEG 형태는 다양한 분자량, 구조 또는 형상 (예를 들어, 분지형, 선형, 포크형, 다중팔) 을 갖는 PEG 를 포함한다.
- [0047] "다작용" 중합체는 3 개 이상의 작용기를 가지며, 이는 동일하거나 상이할 수 있다. 다작용 중합체는 전형적으로 약 3~100 작용기, 또는 3~50 작용기, 또는 3~25 작용기, 또는 3~15 작용기, 또는 3 내지 10 작용기를 포함하거나, 또는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 작용기를 포함할 것이다.
- [0048] "2작용" 중합체는 그에 함유된 2개의 작용기를 가지며, 이는 동일(즉, 호모2작용)하거나 또는 상이(즉, 헤테

로2작용)할 수 있다.

- [0049] "분자 질량" 또는 "분자량" 은, 전형적으로 크기 배제 크로마토그래피, 빛산란 기법, 또는 1,2,4-트리클로로벤젠에서의 고유 속도 측정에 의해 측정되는 중합체의 평균 분자 질량을 나타낸다. 달리 명시되지 않는 한, 분자량은 여기서 수평균 분자량 ( $M_n$ ) 으로 표시되며, 이는  $\sum NiMi/\sum Ni$  ( $Ni$  는 분자량  $Mi$  를 갖는 중합체의 수 (또는 그러한 분자의 몰수)) 로 정의된다.
- [0050] 본 발명의 중합체, 또는 본 발명에 사용된 것은, 전형적으로 복합분산물이다; 즉, 중합체의 수평균 분자량 및 중량 평균 분자량은 동일하지 않다. 중량 평균 분자량 ( $M_w$ ) 대 수평균 분자량 ( $M_n$ ) 의 비율로 나타내는 다중분산 값은 일반적으로 낮으며; 즉, 약 1.2 미만, 바람직하게는 약 1.15 미만, 더욱 바람직하게는 약 1.10 미만, 더 더욱 바람직하게는 약 1.05 미만, 여전히 가장 바람직하게는 약 1.03 미만, 그리고 가장 바람직하게는 약 1.025 미만이다.
- [0051] "활성 카르복시산" 은 특히 친핵성 공격에 대해, 모(母)카르복시산 보다 더 반응성인 카르복시산의 작용성 유도체를 나타낸다. 활성 카르복시산은 산 할라이드 (예컨대 산 클로리드), 무수물 및 에스테르를 포함하나 그에 한정되지는 않는다.
- [0052] 더욱 일반적으로, 용어 "활성" 또는 "반응성" 이 특정 작용기와 함께 사용되는 경우, 반응하기 위해 강한 촉매 또는 비현실적인 반응 조건을 필요로 하는 기 (즉, "비반응성" 또는 "불활성" 기) 에 반해, 분자 상에서 친전자체 또는 친핵체와 쉽게 반응하는 작용기를 나타낸다.
- [0053] 용어 "보호기" 또는 "보호성기" 는 특정 반응 조건 하에서 분자 내의 특정 화학적 활성 작용기의 반응을 방지하거나 막는 부분을 나타낸다. 보호기는 보호되는 화학적 반응기의 유형 및 사용될 반응 조건, 및 분자 내의 부가적인 반응기 또는 보호기가 존재한다면, 그의 존재에 따라 변화할 것이다. 당업계에 알려져 있는 보호기는, Greene, T. W. 등, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York, NY (1999) 에서 찾을 수 있다. 여기서 사용되는 용어 "작용기" 또는 그의 임의의 동의어는 그의 보호된 형태를 포함하는 것을 의미한다.
- [0054] 여기서 사용되는 용어 "스페이서 (spacer)" 또는 "스페이서 부분" 은 수용성 중합체 일부 및 친전자체와 같은 상호연결 부분을 연결하기 위해 사용되는 원자 또는 원자단을 나타낸다. 전형적인 스페이서는 알킬렌 (탄소-탄소), 에테르, 아미노, 아마이드, 에스테르, 카르바메이트, 우레아 및 케토로 부터 선택되는 결합, 및 그의 조합을 포함한다. 스페이서는 상기 열거된 헤테로원자-함유 결합의 하나 이상의 유형과 번갈아 일어나거나 그의 측면에 위치하는, 짧은 알킬렌 부분을 포함할 수 있다. 다양한 예는 하기를 포함한다.
- CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -C(O)OCH<sub>2</sub>-, -OC(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-,  
 -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-, 및  
 -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-.
- [0055]
- [0056] 본 발명의 스페이서 부분은 가수분해적으로 안정적이며 생리학적으로 가수분해가능하거나 효소적으로 분해가능한 결합 (예를 들어 에스테르 결합) 을 포함할 수 있다.
- [0057] "알킬" 은 전형적으로 약 1 내지 20 원자 길이 범위의 탄화수소 사슬을 의미한다. 이러한 탄화수소 사슬은 필수적은 아니나, 바람직하게는 포화되고, 분지형이거나, 바람직하게는 선형 (비분지형) 이다. 예시적인 알킬기는 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 2-메틸부틸, 2-메틸프로필 (이소부틸), 3-메틸펜틸 등을 포함한다. 여기서 사용되는 "알킬" 은 3개 이상의 탄소 원자가 인용된 경우 시클로알킬을 포함한다.
- [0058] "저급 알킬" 은 1 내지 6 탄소 원자를 포함하는 알킬기를 나타내며, 메틸, 에틸, n-부틸, i-부틸, t-부틸로 예시된다.
- [0059] "시클로알킬" 은 바람직하게는 3 내지 약 12 개, 더욱 바람직하게는 3 내지 약 8개의 탄소 원자로 이루어진, 가교, 융합 또는 스파이로 환형 화합물을 포함하는 포화 또는 불포화 환형 탄화수소 사슬을 나타낸다.
- [0060] 여기서 사용된 "알케닐" 은 2 내지 15 개의 탄소 원자를 가지며, 에테닐, n-프로페닐, 이소프로페닐, n-부테닐, 이소부테닐, 옥테닐, 데세닐, 테트라데세닐 등과 같은, 하나 이상의 2중 결합을 포함하는 분지형 또는 비분지형 탄화수소기를 나타낸다.
- [0061] 여기서 사용되는 용어 "알키닐" 은 2 내지 15 개의 원자를 가지며, 에티닐, n-프로피닐, 이소펜티닐, n-부티닐, 옥티닐, 데시닐 등과 같은, 하나 이상의 3중 결합을 함유하는 분지형 또는 비분지형 탄화수소기를 나타낸

다.

- [0062] "알콕시" 는 -OR 기 (여기서, R 은 알킬 또는 치환된 알킬, 바람직하게는 C1-C20 알킬 (예를 들어, 메톡시, 에톡시, 프로폭시 등), 더욱 바람직하게는 저급 알킬 (즉 C1-C6) 임) 를 나타낸다.
- [0063] "아릴" 은 단일 고리 (예를 들어 페닐) 또는 2개의 축합 또는 융합 고리 (예를 들어, 나프틸) 을 갖는 치환 또는 비치환 1가 방향족 라디칼을 나타낸다. 다중 아릴 고리 또한 비융합될 수 있다 (예를 들어, 비페닐). 상기 용어는, 푸릴, 피롤, 피리딜 및 인돌과 같은, 고리 내에 하나 이상의 질소, 산소, 또는 황 원자를 갖는 방향족 고리기인, 헤테로아릴기를 포함한다.
- [0064] "아르알킬" 은 아릴기로 추가로 치환된 알킬, 바람직하게는 저급 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, 더욱 바람직하게는 C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>)알킬 치환체를 나타내며; 예는 벤질 및 펜에틸이다. "아르알콕시" 는 -OR (R 은 아르알킬임) 형태의 기를 나타내며; 하나의 예는 벤질옥시이다.
- [0065] "헤테로사이클" 은 고리, 바람직하게는 5- 내지 7- 원 고리를 나타내며, 그의 고리 원자는 탄소, 질소, 산소 및 황으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, 상기 고리는 3 내지 6 개의 탄소 원자를 포함한다. 방향족 헤테로사이클 (헤테로아릴) 의 예는 상기에 제공되어 있으며; 비방향족 헤테로사이클은, 예를 들어, 피롤리딘, 피페리딘, 피페라진 및 모르폴린을 포함한다.
- [0066] "비치환된" 기 또는 부분은 수소 원자가 비수소 원자 또는 기로 대체된 것이며, 바람직하게는 비방해성 (non-interfering) 치환체이다.
- [0067] "비방해성 치환체" 는 분자에 존재하는 경우, 전형적으로 분자 내에 포함된 다른 작용기와 비반응성인 기이다. 상기는 저급 알킬, 알케닐, 알키닐; 저급 알콕시; C3-C6 시클로알킬; 할로, 예를 들어, 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도; 시아노; 옥소 (케토); 니트로; 및 페닐을 포함하나, 그에 한정되지는 않는다.
- [0068] "3차기" 는 -CR<sub>3</sub> 형태의 기 (각 R 은 탄소 원자를 통해 C 에 결합된 무기 부분임) 이다. 각 R 은 예를 들어, 치환 또는 비치환된, 알킬, 시클로알킬, 아릴, 또는 아르알킬일 수 있다. 3차기의 예는 t-부틸 (각 R 은 메틸); 트리페닐메틸 (트리틸) (각 R 은 페닐임); 및 디메톡시트리틸 (DMT) (2개의 R' 는 p-메톡시페닐이며 하나는 페닐임) 을 포함한다. 또한 포함되는 것은 하나 이상의 R' 이 아다만틸과 같은, 고리 또는 고리계를 형성하는 기이다.
- [0069] "3차 에스테르" 는 그 알코올 부분으로서 3차기를 갖는 에스테르이다; 즉, R'-(C=O)-OCR<sub>3</sub> (즉, CR<sub>3</sub> 는 상기에 정의된 "3차기" 이며, R' 은 에스테르의 산 부분임).
- [0070] 여기서 사용되는 "카르복시기" 는 -C(=O)OH (카르복시산) 또는 -C(=O)O<sup>-</sup>M<sup>+</sup> (M<sup>+</sup> 는 양전하를 가진 이온, 예컨대 알칼리 금속 이온 (카르복실레이트기) 임) 를 나타낸다.
- [0071] "저분자량" 유기산은 약 400 미만, 바람직하게는 약 300 미만, 및 더욱 바람직하게는 약 200 미만의 분자량을 갖는 산성 유기 화합물을 나타낸다. 상기 용어는 전형적으로 비중합체성 및 비올리고머성 산을 나타내고, 일반적으로 시약으로 사용되는 산을 나타낸다. 예는 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트산 (TFA), 및 p-톨루엔설폰산을 포함한다.
- [0072] "친전자체" 는 친전자성 중심 (즉, 전자-추구 (electron-seeking) 또는 친핵체와 반응할 수 있는 중심) 을 갖는 원자 또는 원자단이다.
- [0073] "친핵체" 는 친핵성 중심 (즉, 친전자성 중심을 추구하거나 친전자체와 반응할 수 있는 중심) 을 갖는 원자 또는 원자단을 나타낸다.
- [0074] "생리학적으로 절단가능한" 또는 "가수분해가능한" 또는 "분해가능한" 결합은 생리학적 조건 하에서 물과 반응하는 (즉, 가수분해된) 비교적 약한 결합이다. 결합이 물에 가수분해되는 경향은 2개의 중심 원자를 연결하는 결합의 일반적인 유형에만 의존하는 것이 아니라, 이러한 중심 원자에 부착된 치환체에도 의존한다. 적절한 가수분해적 불안정한 또는 약한 결합은, 카르복실레이트 에스테르, 포스페이트 에스테르, 무수물, 아세탈, 케탈, 아실옥시알킬 에테르, 이민 및 오르소에스테르를 포함하나, 그에 한정되지는 않는다.
- [0075] "효소 분해가능한 결합" 은 하나 이상의 효소에 의해 분해될 수 있는 결합이다.
- [0076] "가수분해적 안정적" 연결 또는 결합은 물에 충분히 안정적인, 전형적으로 공유 결합인 화학적 결합을 나타낸

다; 즉, 이는 연장된 시간에 걸쳐, 생리학적 조건 하에서 감지될 수 있을 만한 정도의 가수분해가 일어나지 않는다. 일반적으로, 가수분해적 안정적인 결합은 생리적 조건 하에서 1일 당 약 1~2% 미만의 가수분해 속도를 나타내는 것이다. 가수분해적으로 안정적인 연결은 탄소-탄소 결합, 에테르, 아민 및 아마이드를 포함한다. 대표적인 화학적 결합의 가수분해 속도는 대부분의 화학 교본에서 찾을 수 있다.

[0077] 열거된 성분의 "실질적으로 없는 양" 을 포함하는 생성물은 열거된 성분의 양을 포함하지 않거나, 통상적인 생성물 분석에 의해 검출될 수 없는 양을 포함하고/하거나 생성물의 특성 또는 안정성에 검출가능한 효과를 갖지 않는다. 예를 들어, 특정 물질에 고의로 또는 계획적으로 노출시키거나 접촉시키지 않은 생성물은 그 물질의 양을 실질적으로 포함하지 않는 것으로 간주된다.

[0078] 여기서 사용되는 용어 "약물", "생물 활성 분자", "생물 활성 부분", 및 "생물 활성제" 각각은 생물체의 물리적 또는 생화학적 특성에 영향을 줄 수 있는 임의의 물질을 의미하며, 그 생물체는 바이러스, 박테리아, 곰팡이, 식물, 동물 및 인간으로부터 선택될 수 있다. 특히, 여기서 사용되는 생물 활성 분자는 인간 또는 다른 동물의 질병의 진단, 치유, 완화, 치료 또는 예방을 위해, 또는 달리는 인간 또는 동물의 신체적 또는 정신적 안녕을 개선시키기 위한 목적인, 임의의 물질을 포함한다. 생물 활성 분자의 예는 펩티드, 단백질, 효소, 소분자 약물, 염료, 지질, 뉴클레오사이드, 올리고뉴클레오타이드, 폴리뉴클레오타이드, 핵산, 세포, 바이러스, 리포솜, 마이크로입자 및 마이셀을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 본 발명의 용도를 위해 적합한 생물 활성제의 종류는 항생제, 항진균제, 항바이러스제, 항염증제, 항종양제, 심장혈관 제제, 항불안 증 제제, 호르몬, 성장 인자, 스테로이드제 등을 포함하나 그에 한정되지는 않는다. 음식물, 음식물 보조제, 영양분, 영양보충제, 약물, 백신, 항체, 비타민, 및 기타 이로운 제제 또한 포함된다.

[0079] 용어 "공역체" 는 분자 (예를 들어, 생물 활성 분자) 의, 반응성 중합체 분자 (바람직하게는 폴리(에틸렌 글리콜)) 로의 공유 결합의 결과로서 형성된 것을 나타낸다.

[0080] "약학적으로 허용되는 부형제" 또는 "약학적으로 허용되는 담체" 는 본 발명의 조성물에 포함될 수 있고 환자에게 심각한 독성학적 부작용을 초래하지 않는 부형제를 나타낸다.

[0081] 여기서 사용되는 "약리학적 유효량", "생리학적 유효량" 및 "치료적 유효량" 은 목적되는 수준의 활성제를 제공하기 위해 필요한 약학적 제제에 존재하는 중합체-활성제 공역체 및/또는 혈류 또는 목적 조직 내의 공역체의 양을 의미하는 것을 가리킨다. 정확한 양은 다양한 요인, 예를 들어, 특정 활성제, 약학적 제제의 성분 및 물리적 특성, 목적되는 환자 집단, 환자 고려사항 등에 의존하며, 여기에 제공되어 있고 적절한 문헌에 있는 정보를 바탕으로 당업자에 의해 쉽게 측정될 수 있다.

[0082] 용어 "환자" 는 생물 활성제 또는 그의 공역체의 투여에 의해 예방되거나 치료될 수 있는 상태를 앓고 있거나 그에 걸리기 쉬운, 생존하는 생물을 나타내며, 이는 인간 및 동물 모두를 포함한다.

[0083] II. 카르복시산 작용기화된 중합체의 제조 방법

[0084] A. 개요

[0085] 본 발명은 일 측면에서, 카르복시기, 즉 카르복실레이트염 또는 카르복시산으로 작용기화된 수용성, 비펩티드성 중합체의 제조 방법을 제공한다. 상기 방법은, 3차 에스테르 시약 R(C=O)OR' (식에서, R' 은 상기 정의된 바와 같은 3차 기이고, R 은 작용기 X 를 포함함) 을 수용성, 비펩티드성 중합체 POLY-Y (식에서, Y 는 X 와 반응하여 공유 결합을 형성하는 작용기임) 와 반응시켜서 POLY-R-(C=O)OR' 로 표시할 수 있는 중합체의 3차 에스테르를 생성하는 것과 관계된다. POLY 와 R 사이의 결합의 성질은 Y 및 X 작용기에 의존한다.

[0086] 반응의 출발 물질은 POLY-Y, 또는 중합체가 폴리에틸렌 글리콜인 경우 PEG-Y 로 표시되며, 다양한 배열의 하나 이상의 작용기 Y 를 포함할 수 있다. 그 예에는, 하기에 논의되는 바와 같이 다수의 히드록시기를 포함하는 선형, 분지형, 및 다중팔 PEG 가 포함된다. 반응의 생성물, 즉 카르복시-작용기화된 중합체는 출발 물질의 작용기 Y 의 개수와 동일한 (또는 출발 물질이 기존의 카르복시기를 갖는 경우, Y 보다 많음) 개수의 카르복시기를 함유한다.

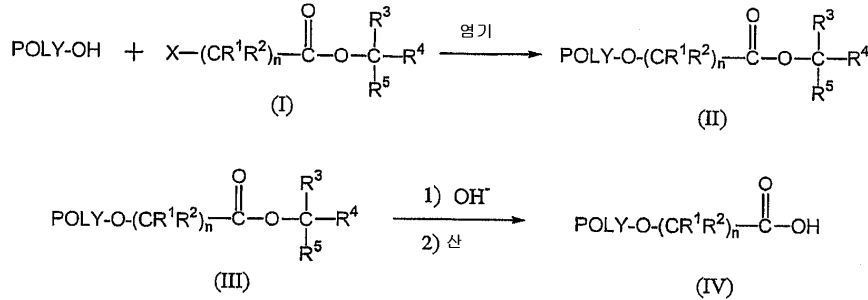
[0087] 바람직하게, 중합체의 작용기 Y 는 히드록시기, 또는 다른 친핵성 기이고, 3차 에스테르 시약의 작용기 X 는 Y 와 대체가능한 이탈기이다. 다른 가능한 작용기의 조합은 하기에 기재되어 있다.

[0088] 일단 3차 에스테르 기가 중합체에 부착되면, 수용액 중의 염기 가수분해에 의해 카르복실레이트로 전환되고, 바람직하게는 뒤이은 산성화에 의해 카르복시산이 생성된다. 놀랍게도, 초기 친핵성 치환 반응에 이용되는 염기의 존재 하에서는 안정한 3차 에스테르가, 염기-촉진된 가수분해에 의해 제거될 수 있음이 밝혀졌다.

상술한 바와 같이, t-부틸 에스테르와 같은 3차 알킬 에스테르는 염기 가수분해에 저항성이 있다고 통상 생각된다.

[0089] 하기 일반 반응식은 본 발명의 방법의 바람직한 구현예를 나타내며, 여기서 Y 는 히드록시 및 X 는 이탈기이고, 에스테르 시약은 (I) 로 나타낸 구조를 가진다.

**반응식 I**



[0090]

B. 반응 성분

[0091] 바람직한 에스테르 시약 (I) 에서, 각각 상기 정의된 바와 같이, 각 R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup> 는 독립적으로 H, 저급 알킬, 시클로알킬, 알콕시, 아릴, 아르알킬, 및 헤테로사이클 중에서 선택되고; 각 R<sup>3</sup>-R<sup>5</sup> 는 독립적으로 저급 알킬, 아릴, 및 아르알킬 중에서 선택된다. 바람직하게, (CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>n</sub> 기는 동일 탄소 원자에 부착된 2 개의 헤테로원자를 함유하지 않는다; 예컨대, 동일 탄소 원자 상의 R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup> 는 바람직하게 둘다 알콕시가 아니다. 수소를 제외하고 R<sup>1</sup> 내지 R<sup>5</sup> 중 임의의 것은 상기 정의된 바와 같은 비방해성 치환기로 치환될 수 있다.

[0092] 바람직하게, 각 R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup> 는 독립적으로 수소 또는 비치환 저급 알킬이고, 각 R<sup>3</sup> 내지 R<sup>5</sup> 는 독립적으로 비치환 저급 알킬 또는 페닐이다. 선택된 구현예에서, 각 R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup> 는 독립적으로 수소 또는 메틸, 더욱 바람직하게는 수소이고, 각 R<sup>3</sup> 내지 R<sup>5</sup> 는 독립적으로 메틸, 에틸, 또는 페닐이다.

[0093] 변수 n 은 1 내지 약 24, 바람직하게 1 내지 약 12 이다. 선택된 구현예에서, n 은 1 또는 2, 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 1 내지 6, 1 내지 7, 1 내지 8, 1 내지 9, 1 내지 11, 1 내지 12, 1 내지 13, 1 내지 14, 1 내지 15, 1 내지 16, 1 내지 17, 1 내지 18, 1 내지 19, 1 내지 20, 1 내지 21, 1 내지 22, 1 내지 23, 또는 1 내지 24 이다. 추가적으로 선택된 구현예에서, n 은 1 내지 6; 바람직하게는, n 은 1 내지 4; 더욱 바람직하게, n 은 1 또는 2 이다. n 이 1 초과인 경우, -(CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>n</sub>- 부분은 바람직하게 2 이하, 더욱 바람직하게는 1 이하의 R<sup>1</sup> 또는 R<sup>2</sup> 의 비수소 구현예를 포함한다.

[0094] 추가 구현예에서, n 은 1 이고, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup> 는 독립적으로 수소 또는 메틸이다. 그러한 한 구현예에서, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup> 모두가 수소인 경우, 생성물 (IV) 는 카르복시메틸기를 함유한다.

[0095] 바람직하게, 에스테르 시약(II) 상의 작용기 X 는 할로, 예컨대 클로로 또는 브로모, 또는 설포네이트 에스테르, 예컨대 p-톨루엔술포닐(토실), 메탄술포닐(메실), 트리플루오로술포닐, 또는 트리플루오로에틸술포닐(트레실) 등의 이탈기이다. 그러나, 중합체 상의 작용기와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는 다른 작용기 또한 이용가능하다. 바람직하게, 중합체 상의 작용기는 친핵성 기, 예컨대 아민, 히드라지드 (-C(=O)NHNH<sub>2</sub>), 또는 티올이고, 에스테르 시약 상의 작용기 X 는 친전자성 기이다. 상술한 바와 같은 이탈기에 더하여, 친전자성 기에는, 이미드 에스테르, 오르소에스테르, 카르보네이트, 이소시아네이트, 이소티오시아네이트, 알데하이드, 케톤, 티온, 알케닐, 아크릴레이트, 메타크릴레이트, 아크릴아미드, 술폰, 말레이미드, 디설파이드, 요오도, 에폭시, 티오설포네이트, 실란, 알콕시실란, 할로실란, 및 포스포르아미데이트를 포함하는 카르복시 에스테르가 포함된다. 이들 기의 더 구체적 예에는, 석시니미딜 에스테르 또는 카르보네이트, 이미다졸릴 에스테르 또는 카르보네이트, 벤조트리아졸 에스테르 또는 카르보네이트, p-니트로페닐 카르보네이트, 비닐 술폰, 클로로에틸술폰, 비닐피리딘, 피리딜 디설파이드, 요오도아세트아미드, 글리옥살, 및

디온이 포함된다. 다른 활성화된 카르복시산 유도체, 및 임의의 상기 부분의 수화물 또는 보호된 유도체 (예, 알데하이드 수화물, 헤미아세탈, 아세탈, 케톤 수화물, 헤미케탈, 케탈, 티오케탈, 티오아세탈) 또한 포함된다. 바람직한 친전자성 기에는, 석시니미딜 카르보네이트, 석시니미딜 에스테르, 말레이미드, 벤조트리아졸 카르보네이트, 글리시딜 에테르, 이미다조일 에스테르, p-니트로페닐 카르보네이트, 아크릴레이트, 알데하이드, 및 오르소피리딜 디설파이드가 포함된다.

[0097] 일반적으로, 시약 상의 작용기 X 는, 작용기 Y 가 시약의 t-부틸 에스테르 부분과 반응하는 것 보다 중합체 상의 작용기 Y 와 훨씬 더 쉽게 반응하도록 선택된다. 중합체성 작용기 Y 가 친핵체, 예컨대 히드록시일 경우, X 는 가장 적합하게는 할로 또는 설포네이트 에스테르와 같은 우수한 이탈기이다.

[0098] 바람직한 에스테르 시약에는, t-부틸 할로아세테이트, 예컨대 t-부틸 브로모아세테이트, t-부틸 클로로아세테이트, 및 t-부틸 요오도아세테이트가 포함된다. 그러한 t-부틸 할로아세테이트는, 예컨대 Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo 에서 시판 중이다.

[0099] 반응식 I 에서, POLY-OH 는 수용성, 비펩티드성 중합체, 예컨대, mPEG-OH 이다. 일반적으로, 중합체는 후술되는 바와 같이, 임의의 이용가능한 기하학적 배열 (예컨대, 선형, 분지형, 포크형 등) 을 갖는 임의의 수용성, 비펩티드성 중합체일 수 있다. 단순성을 위해, 상기 반응식은 단일 히드록시기를 갖는 중합체를 이용한다. 그러나, 당업자라면 이해할 수 있듯이, 중합체는 하나 이상의 히드록시기, 예컨대 1 내지 약 25 개 히드록시기 (예, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 히드록시기) 를 포함할 수 있다. 또한, 히드록시기는 3차 에스테르 시약 상의 작용기 X 와 반응성인 임의의 친핵성 작용기로 대체될 수 있다. 그러한 친핵성 작용기로는, 티올, 아민, 및 안정화된 카르보음이온이 포함된다.

[0100] C. 반응 공정

[0101] 상기 예시적 반응식 I 의 뒷줄에 나타난 공정의 제 1 단계의 경우, 성분들을 바람직하게는 적절한 유기 용매, 예컨대 t-부탄올, 벤젠, 톨루엔, 자일렌, 테트라히드로푸란 (THF), 디메틸포름아미드(DMF), 디메틸술폰(DMSO) 등에 용해시킨다.

[0102] 반응식 I 로 나타난 본 발명의 구현예에 나타난 바와 같이, 중합체성 히드록시기를 3차 에스테르 시약과 반응시키는 것은 통상적으로 염기의 존재 하에 진행된다. 염기의 예에는, 포타슘 t-부톡사이드, 부틸 리튬, 소듐 아미드, 및 소듐 하이드라이드가 포함된다. 다른 강 염기 또한 사용가능하다.

[0103] 반응은 통상적으로 약 0-120°C, 바람직하게 약 20-80°C, 더욱 바람직하게 약 25-50°C 의 온도에서 진행되지만, 반응 조건은 중합체 및 반응하는 작용기에 따라 다를 것이다. 하기 실시예에 나타난 바와 같이, 히드록시-함유 PEG 와 t-부틸 브로모아세테이트의 반응은 실온 내지 약 45°C 의 온도에서 효과적으로 진행되었다.

[0104] 반응 시간은 통상적으로 약 0.5 시간 내지 약 24 시간; 예컨대 약 1 내지 20, 3 내지 18, 4 내지 12, 또는 6 내지 8 시간이다. 히드록시화 중합체와 t-부틸 브로모아세테이트의 반응의 통상적인 반응 시간은, 하기 실시예에 나타난 바와 같이, 12 내지 20 시간 범위이다. 표준 방법에 의해 반응의 완료 여부를 모니터링할 수 있다. 바람직하게, 반응은 질소 또는 아르곤 등의 불활성 기체 하에 진행된다.

[0105] 반응에 바람직하게는 물 과량의 에스테르 시약 (예, 2배, 3배, 6배, 10배, 또는 20배, 약 30배 이하의 물 과량) 을 사용하여, 중합체 출발 물질의 완전한 전환이 이루어지도록 한다. 상기 반응 단계 후, 유기 용매를 통상적으로 증발 또는 증류에 의해 제거한다.

[0106] 에스테르-함유 생성물 (III) 을 공정의 제 2 단계에서 물, 바람직하게는 증류수 또는 탈이온수에 용해하는데, 위 단계에서, 에스테르-함유 중합체가 수용액 중의 히드록시드와 같은 강 염기로 처리됨으로써 염기-촉진성 가수분해된다. 염기 가수분해는 통상적으로 약 9 이상의 pH, 바람직하게는 약 10 이상, 더욱 바람직하게는 약 11 이상 (예, 약 11 내지 약 13) 의 pH 에서 진행된다. 따라서, 상기 염기는 수용액에서 상기 범위의 pH 를 생성하기에 충분히 강한 염기이다. 일 구현예에서, pH 를 약 12 내지 약 12.5 범위가 되도록 조절한다. 바람직하게, pH 를 상기 범위내로 유지하기 위해 반응 전반에 걸쳐서 필요한 만큼 염기를 첨가한다. 염기는 또한 임의의 잔류 에스테르 시약을 가수분해하기에 효과적이다.

[0107] 염기는 가수분해 이후 단계에서 산으로 중화될 때 고수용성 염을 생성해야한다. 바람직한 것은 알칼리 금속 히드록사이드, 예컨대 소듐 히드록사이드 (NaOH) 또는 포타슘 히드록사이드 (KOH) 이다.

[0108] 증류수 또는 탈이온수, 또는 검출가능하지 않은 수준의 칼슘 및 마그네슘 이온과 같은 2가 양이온을 함유한

물의 사용 또한 바람직하다. 염기 가수분해 단계는 통상적으로 약 0-50℃, 바람직하게는 약 10-30℃ 의 온도에서 수행된다. 반응 시간은 통상 약 12 내지 36 시간, 예컨대 약 18 내지 24 시간이다.

[0109] 염기 가수분해에 의해 생성된 중합체 카르복실레이트염은 염으로서 분리 및 저장되거나, 바람직하게는 후술하는 바와 같이 산으로 처리하여 카르복시산으로 직접 전환될 수 있다. 일반적으로 카르복시산은 카르복실레이트염에 비하여 추가적 유도체화에 더 적합하다.

[0110] 카르복실레이트염-함유 중합체를 수성산으로 처리하여 염을 유리산 형태로 전환한다. 상기 산은 바람직하게는 수용액에서 비친핵성 음이온을 생성하는 것이다. 광물산 (즉, 무기산) 예컨대 황산, 질산, 인산, 염산 등이 바람직하다. 통상적으로, 충분한 산을 첨가하여 용액의 pH 를 약 1-3, 더욱 바람직하게는 약 2-3 으로 조절하는데, 이는 중합체 카르복실레이트염을 유리산 형태로 전환하는 것 뿐만 아니라 용액 내에 잔류하는 임의의 염기를 중화 (및 자유로운 수용성 염으로 전환) 하기에 효과적이다. 산성화 단계는 통상적으로 약 0℃ 내지 약 50℃, 바람직하게는 약 10℃ 내지 약 30℃ 의 온도에서 수행된다.

[0111] 그후 카르복시산-함유 중합체를 바람직하게는 디클로로메탄 또는 클로로포름과 같은 할로젠화 용매를 이용하는 종래의 유기 추출 단계에 의해 분리한다. 중합체 생성물은 유기상으로 추출되는 반면, 임의의 가수분해된 시약 및 과량의 광물산 또는 이의 염은 수성상에 남아있다. 따라서, 중합체 생성물로부터 광물산의 분리는 비교적 간단하다.

[0112] 유기 추출물을 건조 및 농축하고, 이어서 중합체 생성물을 표준 방법에 의해 정제한다. 예를 들어, 중합체를 침전에 이어 여과 및 건조함으로써 분리할 수 있다. 침전용 용매의 선택은 중합체의 성질에 따라 다르며, PEG 중합체의 경우, 하기 실시예에 기술한 바와 같이 에틸 에테르가 침전용 용매로 적당하다. 에틸 아세테이트 또는 에탄올 등의 용매를 이용한 재결정화 또한 정제에 이용할 수 있다.

[0113] D. 반응 생성물

[0114] 본 발명의 방법을 이용하여, 카르복시-작용기화된 중합체가 고순도, 통상 약 95 중량% 이상, 바람직하게는 약 96 중량%, 97 중량%, 또는 98 중량% 이상, 더욱 바람직하게는 약 99 중량% 이상, 가장 바람직하게는 약 99.5 중량% 이상의 순도로 생성된다. 선택된 구현예에서, 중합체 생성물은 약 99.6 중량%, 99.7 중량%, 99.8 중량%, 또는 99.9 중량% 이상의 목적하는 카르복시-작용기화된 중합체를 함유한다. 따라서, 본원에 개시된 합성 방법의 생성물은 5 중량% 미만, 바람직하게는 4 중량%, 3 중량%, 또는 2 중량% 미만, 더욱 바람직하게는 1% 미만, 가장 바람직하게는 0.5% 미만의 출발 중합체 (예, mPEG-OH, PEG 디올, 또는 다작용성 PEG 폴리올) 또는 기타 중합체성 불순물을 함유한다. 선택된 구현예에서, 생성물은 0.4 중량%, 0.3 중량%, 0.2 중량% 또는 0.1 중량% 미만의 중합체성 출발 물질 (예, mPEG-OH) 또는 기타 중합체성 불순물을 함유한다.

[0115] "생성물" 또는 "중합체 생성물" 은 추출, 침전 및 용매 제거와 같은 일상적인 후처리 공정을 포함하는 상술한 합성 공정을 수행함으로써 수득되는 물질을 의미한다. 하기 실시예에 나타내었듯이, 본원에 개시된 방법의 생성물을 함유하는 반응 혼합물은 염소화 용매를 이용한 추출 및 그에 뒤이은 에틸 에테르로부터 생성물의 침전에 의해 후처리되었다. 이들 생성물의 이온 교환 크로마토그래프 분석은, 검출가능한 양의 출발 물질 또는 기타 중합체성 불순물이 존재함이 없이, 본질적으로 100% 의 목적하는 PEG-카르복시산 생성물을 보여주었다. 따라서, 상술한 순도를 갖는 중합체 생성물은 출발 물질과 같은 중합체성 불순물을 제거할 필요없이 수득된다. 상기 생성물은 후술한 바와 같이, 종종 추가적인 유도체화 및/또는 공액에 직접 이용가능하다. 상기 공정의 추가적 이점은, 고가이면서 잔류량의 중합체성 히드록시 화합물 또한 빈번하게 함유하는 경향이 있는 시판중인 중합체성 카르복시산을 사용할 때와는 달리, mPEG-OH 와 같은 저렴한 출발 물질로부터 출발하여, mPEG 카르복시산과 같은 고순도의 중합체성 카르복시산을 제공한다는 점이다.

[0116] 상술한 바와 같이, 본원에 개시된 합성 공정에 사용되는 시약은 중합체성 생성물로부터 쉽게 제거된다. 특히, TFA 와 같은 저분자량의 유기산은 공정에 사용되지 않는다. 따라서, 본 발명의 카르복시-함유 중합체 생성물은, 그러한 시약을 사용하는 가수분해 공정에 의해 제조된 중합체성 카르복시산에서라면 흔히 발생하는 TFA 와 같은 미량의 저분자량의 유기산을 함유하지 않는다. 따라서, 본 생성물은 상술한 바와 같은 잔류 산의 존재와 관계되는 안정성의 감소라는 불이익의 폐해가 없다. 예를 들어, 하기 실시예 4 에 기재된 중합체는 -20℃ 에서 8개월 저장한 후에도 분해의 징조가 보이지 않았다 (GPC 분석에 의함).

[0117] III. 적절한 수용성, 비펩티드성 중합체

[0118] 다양한 비펩티드성, 수용성 중합체 중 임의의 것을 본 발명에 이용할 수 있다. 상기 중합체는 비독성이면서 생체적합성이 있어야 하는데, 이는 부작용을 일으키지 않고 생 조직 또는 유기체와 공존할 수 있어야 함을

의미한다. 적절한 중합체의 예에는, 본원에 그 전체가 인용 포함된 미국특허번호 5,629,384 에 기재된 바와 같은, 폴리(알킬렌 글리콜), 에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리(올레핀성 알코올), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(히드록시알킬메타크릴아미드), 폴리(히드록시알킬메타크릴레이트), 폴리(사카리드), 폴리( $\alpha$ -히드록시아세트산), 폴리(아크릴산), 폴리(비닐 알코올), 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리(N-아크릴로일모르폴린), 및 이의 공중합체, 삼원중합체, 및 혼합물이 포함되나 이에 한정되지 않는다.

[0119] 중합체의 분자량은 목적하는 용도, 중합체 구조의 배열, 분지화 정도 등에 따라 가변적이다. 일반적으로, 분자량이 약 100 Da 내지 약 100,000 Da 인 중합체가 본 발명에 유용하며, 바람직하게는 약 200 Da 내지 약 60,000 Da, 더욱 바람직하게는 약 300 Da 내지 약 40,000 Da 이다. 예시적인 중합체 구현예의 분자량은 약 200 Da, 350 Da, 550 Da, 750 Da, 1,000 Da, 2,000 Da, 3,000 Da, 4,000 Da, 5,000 Da, 7,500 Da, 10,000 Da, 15,000 Da, 20,000 Da, 25,000 Da, 30,000 Da, 35,000 Da, 40,000 Da, 50,000 Da, 55,000 Da, 및 60,000 Da 이다.

[0120] 중합체는 바람직하게 친핵성 치환 반응에서 본원에 기재된 바와 같은 이탈기를 갖는 3차 에스테르 시약과 반응할 수 있는 하나 이상의 히드록시기를 함유한다. 그러나, 3차 에스테르 시약의 작용기와 반응할 수 있는 다른 작용기 또한 이용가능하다. 이에, 아민, 하이드라지드 ( $-C(=O)NHNH_2$ ), 및 티올과 같은 다른 친핵성 기; 및 친전자성 기, 예컨대 이미드 에스테르, 오르소에스테르, 카르보네이트, 이소시아네이트, 이소티오시아네이트, 알데하이드, 케톤, 티온, 알케닐, 아크릴레이트, 메타크릴레이트, 아크릴아미드, 술폰, 말레이미드, 디설파이드, 요오도, 에폭시, 설포네이트, 티오설포네이트, 실란, 알콕시실란, 할로실란, 및 포스포르아미데이트를 포함한 카르복시산 에스테르가 포함된다. 이들 기의 더 구체적 예로는, 석시니미딜 에스테르 또는 카르보네이트, 이미다졸릴 에스테르 또는 카르보네이트, 벤조트리아졸 에스테르 또는 카르보네이트, p-니트로페닐 카르보네이트, 비닐 술폰, 클로로에틸술폰, 비닐피리딘, 피리딜 디설파이드, 요오도아세트아미드, 글리옥살, 디온, 메실레이트, 토실레이트, 및 트레실레이트가 포함된다. 또한, 다른 활성화 카르복시산 유도체, 및 임의의 상기 부분의 수화물 또는 보호된 유도체 (예, 알데하이드 수화물, 헤미아세탈, 아세탈, 케톤 수화물, 헤미케탈, 케탈, 티오케탈, 티오아세탈) 도 포함된다. 바람직한 친전자성 기에는, 석시니미딜 카르보네이트, 석시니미딜 에스테르, 말레이미드, 벤조트리아졸 카르보네이트, 글리시딜 에테르, 이미다졸릴 에스테르, p-니트로페닐 카르보네이트, 아크릴레이트, 트레실레이트, 알데하이드, 및 오르소피리딜 디설파이드가 포함된다.

[0121] 작용기는 중합체 상의 친핵성 기가 3차 에스테르 시약 상의 친전자성 기와 반응하거나, 또는 그 반대가 되도록 선택된다. 두 작용기 사이의 반응은 바람직하게는 친핵체에 의한 이탈기의 대체 반응이나, 예컨대 축합 또는 부가 반응일 수도 있다.

[0122] 중합체는 바람직하게 히드록시기와 같은 하나 이상의 친핵성 기를 포함한다. 인용의 용이성을 위해, 히드록시기가 하기에 논의되나, 다른 작용기도 사용가능하다. 중합체는 또한 동일 분자내에 상이한 작용기를 함유할 수 있다. 바람직하게, 이들은 유사한 작용성을 가지는데, 예컨대 히드록시기 및 아미노기와 같이 둘다 친핵성일 수 있다.

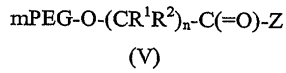
[0123] 바람직하게, 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) (즉, PEG) 중합체이다. 상기 나타낸 바와 같이, 용어 PEG 는, 선형, 분지형 또는 다중팔 형태 (예, 포크형 PEG 또는 폴리올 코어에 부착된 PEG) 를 포함하는 임의의 여러 기하학적 배열 또는 형태를 지닌 폴리(에틸렌 글리콜), 펜던트 PEG, 또는 내부에 분해가능한 결합을 지닌 PEG 를 포함한다.

[0124] 중합체가 지닌 히드록시기 (및/또는 다른 작용기) 의 수와 위치는 다양할 수 있다. 통상적으로, 중합체는 1 내지 약 25 개 히드록시기, 바람직하게 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 개 히드록시기를 함유한다. 선형 중합체, 예컨대 선형 PEG 중합체는 통상적으로 중합체 사슬의 말단에 각각 위치한 1 또는 2 개의 히드록시기를 함유한다. PEG 중합체가 단작용성인 경우 (즉, mPEG), 그 중합체는 단일 히드록시기를 함유한다. PEG 중합체가 이작용성인 경우, 그 중합체는 두 개의 히드록시기를, 각 중합체 사슬 말단에 하나씩 함유하거나, 또는 단일 히드록시기 및 상이한 작용기를 반대편 말단에 함유한다. 다중팔 또는 분지형 중합체는 매우 많은 수의 히드록시기를 포함할 수 있다.

[0125] 다중팔 또는 분지형 PEG 분자는, 예컨대 본원에 그 전체가 인용 포함된 미국특허번호 5,932,462 에 기재되어 있다. 일반적으로, 다중팔 또는 분지형 중합체는, 바람직하게 가수분해적으로 안정한 연결 구조를 포함하는 중앙 분지점으로부터 연장된 2 이상의 중합체 "팔" 을 보유한다. 분지형 PEG 중합체의 예는, 메톡시 폴리(에틸렌 글리콜) 2치환 라이신이다.

- [0126] 다른 다중팔 구현예에서, 중합체는 폴리올 또는 폴리아민으로부터 유래된 중앙 코어 분자를 포함하는데, 상기 중앙 코어 분자는, 다중팔 중합체 구조를 형성하기 위하여 중합체 팔을 코어 분자에 공유 결합시키기에 적합한 다수의 부착 지점을 제공한다. 원하는 중합체 팔 개수에 따라, 폴리올 또는 폴리아민은 통상적으로 3 내지 약 25 개, 바람직하게 3 내지 약 10 개, 가장 바람직하게는 3 내지 약 8 개 (예, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8) 히드록시 또는 아미노기를 포함한다.
- [0127] 다중팔 중합체는, 예를 들어 본원에 인용 포함된 미국 공동특허출원 번호 2002/0156047 및 2002/0156047 에 추가적으로 개시되어 있다.
- [0128] PEG 중합체는 대안적으로 포크형 PEG 를 포함할 수 있다. 일반적으로, 포크 구조의 중합체는 중합체 내의 가수분해적으로 안정한 분지점으로부터 연장된 공유 결합을 통해 2 이상의 작용기에 부착되는 중합체 사슬을 갖는 것을 특징으로 한다. 그 내용이 본원에 인용 포함된 미국특허번호 6,362,254 는 본원에 사용될 수 있는 각종 포크형 PEG 구조를 개시하고 있다.
- [0129] PEG 중합체는 또한, PEG 사슬의 말단이 아닌 PEG 골격의 길이를 따라 공유 결합된 반응성 기(예, 히드록시 기)를 갖는 펜던트 PEG 분자일 수 있다. 펜던트 반응성기는 알킬렌기와 같은 연결 잔기를 통해 또는 직접 PEG 골격에 부착될 수 있다.
- [0130] 상이한 중합체가 동일한 중합체 골격에 혼입될 수 있다. 예를 들어, 상술한 분지형 구조의 PEG 분자 하나 이상을 상이한 중합체 유형으로 대체할 수 있다.
- [0131] 중합체는 중합체 골격 내의 하나 이상의 가수분해적으로 안정하거나 분해가능한 결합을 이용하여 제조될 수도 있다. 예를 들어, PEG 는 가수분해되기 쉬운 중합체 골격 내의 에스테르 결합을 이용하여 제조될 수 있다. 혼입될 수 있는 기타 가수분해적으로 분해가능한 결합에는, 카보네이트, 이민, 포스페이트 에스테르, 하이드라존, 아세탈, 오르소에스테르, 및 포스포르아미데이트 결합 등이 있다.
- [0132] 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 PEG 란 용어는 상술한 모든 또는 임의의 변형체를 포함한다. 일반적으로 바람직한 PEG 구조에는 선형 단관능성, 분지형 단관능성, 및 선형, 분지형 또는 포크형 이관능성 또는 삼관능성 PEG 가 포함된다.
- [0133] 말단-캡핑된 폴리(에틸렌 글리콜) 출발 물질, 예컨대 mPEG (메톡시-PEG) 또는 bPEG (벤질옥시-PEG) 가 검출가능한 양의 PEG 디올 불순물을 함유함으로써 종종 분석 또는 분리하기 어려운 부산물로 이어질 수 있으므로, 하나의 바람직한 구현예에서, PEG 출발 물질은 미국 공동특허 번호 6,448,369 에 기재된 바와 같은 디올이 없는 벤질옥시-PEG 이다.
- [0134] IV. 카르복시산 작용기화된 중합체의 추가적 유도체화 및 공액
- [0135] A. 개요
- [0136] 필요에 따라, 본 발명에 따라 제조된 카르복시산 작용기화된 중합체를 당업계에서 공지된 방법론을 이용하여 추가로 개질하여 카르복시산의 유용한 반응성 유도체를 생성할 수 있다. 그러한 유도체의 제조는, 예컨대 잔류 출발 물질 중합체 및/또는 TFA 와 같은 잔류 시약을 함유한 선행 기술에 의한 생성물에 비하여, 본 발명의 고순도의 카르복시산 작용기화된 중합체에 의해 촉진된다. 그러한 오염물의 존재 및 양은 매우 가변적이어서 생성물의 재현가능성을 박탈시키기 때문에, 상기기는 특히 약학적 제품에 있어서 상당히 유리하다.
- [0137] 따라서, 카르복시산 작용기화된 중합체를 제조하는 본 발명의 방법은, (i) 카르복시산을 개질하여 반응성 유도체를 생성하는 단계 및 (ii) 반응성 유도체를, 상당하는 반응성 작용기를 지닌 약리학적 관련 분자에 공액되는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 단계 (i) 및 (ii) 를 그 자리에서 수행할 수 있는데, 여기서 카르복시산을 당업계에 알려진 다수의 활성화 시약 중 하나를 이용하여 활성화 유도체로 전환한 후, 즉시 공액시킬 분자와 반응시킨다.
- [0138] 카르복시산은 유도체화되어, 예컨대 아실 할리드, 아실 수도(pseudo)할리드, 예컨대 아실 시아나이드, 아실 이소시아네이트, 및 아실 아지드, 중성염, 예컨대 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속염 (예, 칼슘, 소듐, 또는 바륨 염), 에스테르, 무수물, 아미드, 이미드, 하이드라지드 등을 형성할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 산은 에스테르화되어 활성 에스테르, 예컨대 N-석시니미딜 에스테르, o-, m-, 또는 p-니트로페닐 에스테르, 1-벤조트리아졸릴 에스테르, 이미다졸릴 에스테르, 또는 N-설포석시니미딜 에스테르를 형성한다.

[0139] 일 구현예에서, 추가로 유도체화된 중합체는 하기 구조를 갖는 PEG 중합체이다:



[0140]

[0141] [식에서,  $R^1$ ,  $R^2$  및  $n$  은 상술한 바와 같다]. 부분  $Z$  는 바람직하게는 할로, 아미노, 치환된 아미노, -NCO, -NCS,  $N_3$ , -CN, 및 -OR' (식에서, R' 는 N-석시니미딜, 니트로페닐, 벤조트리아졸릴, 이미다졸릴, N-설포석시니미딜, N-프탈이미딜, N-글루타르이미딜, N-테트라히드로프탈이미딜, N-노르보르넨-2,3-디카르복시이미딜, 및 히드록시-7-아자벤조트리아졸릴 중에서 선택됨) 로 이루어진 군에서 선택된다.

[0142] 본 발명의 방법에 의해 제조된 카르복시-함유 중합체, 또는 이의 반응성 유도체는, 생물학적 활성 분자, 특히 아미노, 히드록시, 또는 메르캅토 (티올) 기와 같은 친핵성 작용기를 지닌 생물학적 활성 분자와 공액체를 형성하는 데 사용될 수 있다.

[0143] 흔히, 공액 대상 분자는 단백질이다. 단백질은 반응성 아미노산, 예컨대 라이신, 히스티딘, 아르기닌, 아르파르트산, 글루탐산, 세린, 트레오닌, 타이로신, 시스테인, N-말단 아미노기, 및 C-말단 카르복시산을 통해 공액된다. 글리코실화 단백질 상의 탄수화물 잔기 또한 공액 부위로써 이용될 수 있다. 활성화된 카르복시산과의 반응을 위하여, 가장 적절한 기는, N-말단 아미노기, 라이신, 히스티딘, 및 아르기닌 상의 아미노-함유 측쇄, 세린, 트레오닌, 및 타이로신 상의 히드록시-함유 측쇄, 및 시스테인 상의 티올 측쇄이다.

[0144] 본 발명의 카르복시-함유 중합체의 바람직한 공액 방법은, 공액 대상 분자의 친핵성 기와 반응하는 활성화된 카르복시산 유도체를 사용하지만, 말단 카르복시기를 임의의 다양한 작용기를 함유하도록 유도체화하는 것 또한 가능하다. 예를 들어, 일 구현예에서, 상기 구조 (V) 의 잔기  $Z$  는 -NHR<sub>6</sub> 구조를 갖는데, 여기서 R<sub>6</sub> 은 반응성 작용기 (예, 알데하이드, 말레이미드, 메르캅토, 히드록시, 아미노 등) 를 함유하는 유기 기이고, 상기 작용기(들)은 알킬렌 사슬 (예, C1-6) 및, 임의의 추가적 연결자, 예컨대 단쇄 PEG 및 다른 알킬렌 사슬 (예, 알킬렌-PEG-알킬렌) 에 의해 질소 원자로부터 분리된다.

[0145] B. 대표적인 공액 방법

[0146] 이러한 중합 공액체는, 활성화 중합체, 예컨대 활성화 PEG를 생물 활성제에 공유 부착시키는 공지된 기술을 사용하여 형성할 수 있다. 예를 들어, Poly(ethylene glycol): Chemistry and Biological Applications, J. M. Harris 및 S. Zalipsky, editors, American Chemical Society, Washington, DC (1997) 또는 Bioconjugate Techniques, G. T. Hermanson, Academic Press (1996) 참조. 일반적으로, 공액 반응은 실온 또는 실온 근처에서, 포스페이트 또는 아세테이트 완충액과 같은 완충액 중에서 전형적으로 수행되며, 조건은 수행되는 특정 반응에 의존할 것이다. 전형적으로 중합체성 시약의 초과량을 활성제와 조합시킨다. 그러나, 일부 경우에는, 중합체성 시약 및 활성제 상에 반응성 기의 화학량론적 양을 가지는 것이 바람직하다.

[0147] 공액 반응의 진행은 SDS-PAGE, MALDI-TOF 질량 분석기, 또는 임의의 다른 적합한 분석법에 의해 모니터 될 수 있다. 형성된 공액체 또는 남아있는 비공액 중합체 양에 대해 안정상태가 도달되었을 때, 반응이 완결된 것으로 간주한다. 필요하다면, 여분의 시약, 비공액 반응물(예, 활성제), 원치 않는 다중-공액 중 및/또는 미반응 중합체를 분리시키기 위해 반응 혼합물을 공지된 방법으로 정제한다.

[0148] 예를 들어, 다른 분자량을 가지는 공액체는 겔 여과 크로마토그래피를 사용하여 분리할 수 있다. 분획은 여러 다른 방법, 예를 들어, (i) 단백질 함량에 대한 280 nm 에서의 OD, (ii) BSA 단백질 분석, (iii) PEG 함량에 대한 요오드 시험 (Sims 등, Anal. Biochem. 107: 60-63, 1980), 또는 (iv) 바륨 요오드로 염색 후 SDS-PAGE 로 분석할 수 있다.

[0149] 위치 이성질체(즉, 분자의 다른 위치에 중합체가 부착된 동일 또는 실질적으로 동일한 분자량의 공액체)의 분리를 역상 HPLC 또는 이온 교환 크로마토그래피로 수행할 수 있다.

[0150] 공액 생성물은 저장을 위해 잔여 완충액과 함께 또는 잔여 완충액 없이 냉동건조시킬 수 있다. 일부 예에서, 소듐 아세테이트와 같은 공액에 사용되는 완충액을 암모늄 카보네이트 또는 암모늄 아세테이트와 같은 휘발성 완충액으로 교환하는 것이 바람직한데, 이는 냉동건조시 쉽게 제거할 수 있기 때문이다. 대안적으로, 냉동건조된 공액체가 제형 완충액으로 재구성 및 최종적으로 포유류에 투여하기 위해 적합한 형태를 가지도록, 제형 완충액을 사용하여 완충액 교환 단계를 사용할 수 있다.

[0151] C. 대표적인 공액용 제제

- [0152] 본 발명의 방법으로 형성된 중합체에의 커플링에 사용되는 생물 활성제는 하기의 임의의 하나 이상일 수 있다. 적합한 제제는 예를 들어 하기에서 선택할 수 있다: 수면제 및 진정제, 정신활성제, 정신안정제, 호흡기 약물, 진경약, 근육이완제, 항파킨슨제(도파민 안타고니스트), 진통제, 항염증제, 항불안제(불안완화제), 식욕억제제, 항편두통제, 근육수축제, 항감염제(항생제, 항바이러스제, 항진균제, 백신) 항관절염제, 항말라리아제, 항구토제, 항간질제, 기관지확장제, 사이토킨, 성장 인자, 항암제, 항혈전제, 혈압강하제, 심혈관계, 항부정맥제, 항산화제, 항천식제, 피임약을 포함하는 호르몬제, 교감신경 흥분제, 이노제, 지방조절제, 항안드로젠제, 구충제, 응고제, 종양제, 항종양제, 저혈당제, 영양제 및 보충제, 성장 보조제, 항장염제, 백신, 항체, 진단제 및 대조제.
- [0153] 더 구체적으로, 활성제는 수 개의 구조 계열 중 하나에 속할 수 있는데, 이는 작은 분자, 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 항체, 다당류, 스테로이드, 뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 지방, 전해질 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 바람직하게 본 발명의 카복실-함유 중합체 커플링용 활성제는 천연 아미노, 히드록실 또는 티올기를 포함하고 또는 이러한 기들 중 하나를 함유하도록 개질된다.
- [0154] 활성제의 구체적인 예는 하기를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다: 아스파라기나아제, 암독소비르(DAPD), 안타이드, 베카플러민, 칼시토닌, 시아노비린, 데닐루킨 디프티톡스, 에리트로포이에틴(EPO), EPO 아고니스트(예, 약 10-40 아미노산 길이어고, WO 96/40749 에 기재된 바와 같이 특정 핵심 서열을 포함하는 펩티드), 도르나제 알파, 에리트로포이에시스 촉진 단백질(NESP), 응고 인자, 예컨대 인자 V, 인자 VII, 인자 VIIa, 인자 VIII, 인자 IX, 인자 X, 인자 XII, 인자 XIII, 폰 빌레브란트(von Willebrand) 인자; 세레다아제, 세레자임, 알파-글루코시다아제, 콜라겐, 사이클로스포린, 알파 디펜신, 베타디펜신, 엑세딘-4, 과립구 콜로니 촉진 인자(GCSF), 트롬보포이에틴(TPO), 알파-1 단백질효소 억제제, 엘카토닌, 과립구 대식세포 콜로니 촉진 인자(GM-CSF), 피브리노겐, 필그라스티프, 성장호르몬, 인간 성장호르몬(hGH), 성장호르몬 방출 호르몬(GHRH), GRO-베타, GRO-베타 항체, 뼈 모르포겐성 단백질, 예컨대 뼈 모르포겐성 단백질-2, 뼈 모르포겐성 단백질-6, OP-1; 산성 섬유모세포 성장 인자, 염기성 섬유모세포 성장 인자, CD-40 리간드, 헤파린, 인간 세럼 알부민, 저 분자량 헤파린(LMWH), 인터페론, 예컨대 인터페론 알파, 인터페론 베타, 인터페론 감마, 인터페론 오메가, 인터페론 타우, 컨센서스 인터페론; 인터루킨 및 인터루킨 수용체, 예컨대 인터루킨-1 수용체, 인터루킨-2, 인터루킨-2 용합 단백질, 인터루킨-1 수용체 안타고니스트, 인터루킨-3, 인터루킨-4, 인터루킨-4 수용체, 인터루킨-6, 인터루킨-8, 인터루킨-12, 인터루킨-13 수용체, 인터루킨-17 수용체; 락토페닌 및 락토페닌 단편, 루테닌화 호르몬 방출 호르몬(LHRH), 인슐린, 프로-인슐린, 인슐린 동족체(예, 미국 특허 제 5,922,675에 기재된 모노-아실화 인슐린), 아밀린, C-펩티드, 소마토스타틴, 옥트레오티드 포함 소마토스타틴 동족체, 바소프레신, 난포 촉진 호르몬(FSH), 인플루엔자 백신, 인슐린-유사 성장 인자(ICGF), 인슐린트로핀, 대식세포 콜로니 촉진 인자(M-CSF), 플라스미노겐 활성제, 예컨대 알테플라아제, 유로키나아제, 레테플라아제, 스트렙토키나아제, 파미데플라아제, 라노테플라아제 및 테네테플라아제; 신경 성장 인자(NGF), 오스테오프로테게린, 혈소판-유도 성장 인자, 조직 성장 인자, 전환 성장인자-1, 혈관 내피 성장 인자, 백혈병 억제 인자, 케라티노사이트 성장 인자(KGF), 글리알 성장인자(GGF), T 세포 수용체, CD 분자/항원, 종양 괴사 인자(TNF), 단핵구 화학유인물질 단백질-1; 내피 성장 인자, 부갑상선 호르몬(PTH), 글루카곤-유사 펩티드, 소마토트로핀, 타이모신 알파 1, 타이모신 알파 1 IIb/IIIa 억제제, 타이모신 베타 10, 타이모신 베타 9, 타이모신 베타 4, 알파-1 안티트립신, 포스포디에스테라아제(PDE) 화합물, VLA-4(초후기 항원-4), VLA-4 억제제, 비스포스포네이트, 호흡기 세포융합바이러스 항체, 남성성유증 막 조절기(CFTR) 유전자, DNA 분해효소(Dnase), 살균/투과성 증가 단백질(BPI), 및 항-CMV 항체. 대표적인 단일클론 항체는 하기를 포함한다: 에타너셉트(IgG1의 Fc 부분에 연결된 인간 75 kD TNF 수용체의 세포외 리간드-결합 부분으로 이루어진 이량체 용합 단백질), 아브시시맵, 아펠리오모맵, 바실릭시맵, 다클리주맵, 인플릭시맵, 이브리투모맵 티우엑세탄, 미투모맵, 무로모맵-CD3, 요오드 131 토시투모맵 공액체, 올리주맵, 리툽시맵 및 트라스투주맵(헤르셉틴).
- [0155] 중합체 공유 부착에 적합한 부가적인 제제는 하기를 포함한다: 아미포스틴, 아미오다론, 아미노카프로산, 아미노히푸레이트 소듐, 아미노글루테티미드, 아미노레불린산, 아미노살리실산, 암사크린, 아나그렐리드, 아나스트로졸, 아스파라기나아제, 안트라사이클린, 벡사로텐, 비칼루타미드, 블레오마이신, 부세렐린, 부솔판, 카베르골린, 카펙시타빈, 카보플라틴, 카무스틴, 클로람부신, 실라스타틴 소듐, 시스플라틴, 클라드리빈, 크로드로네이트, 사이클로포스파미드, 시프로테론, 시타라빈, 캄토테신, 13-시스 레티노산, 울트랜스 레티노산; 다카바진, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데페록사민, 텍사메타손, 디클로페낙, 디에틸스티베스트롤, 도세탁셀, 독소루비신, 에피루비신, 에스트라무스틴, 에토포시드, 엑세메스탄, 펙소페나딘, 플루다라빈, 플루드록코티손, 플루오로우라실, 플루옥시메스테론, 플루타미드, 겐시타빈, 에피네프린, L-도파,

히드록시우레아, 이다루비신, 이포스파미드, 이마티닙, 이리노테칸, 이트라코나졸, 고세렐린, 레트로졸, 류코보린, 레바미솔, 리시노프릴, 로보티록신 소듐, 로무스틴, 메클로레타민, 메드록시프로게스테론, 메게스트롤, 멜팔란, 머캅토푸린, 메타라미놀 비타르트레이트, 메토티렉세이트, 메토클로프라미드, 맥실레틴, 미토마이신, 미토탄, 미토잔트론, 날록손, 니코틴, 닐루타미드, 옥트레오티드, 옥살리플라틴, 파미드로네이트, 펜토스타틴, 필카마이신, 포르피머, 프레드니손, 프로카바진, 프로클로페라진, 온단세트론, 팔티트렉세드, 시롤리무스, 스트렙토조신, 타크롤리무스, 타목시펜, 테모졸로미드, 테니포시드, 테스토스테론, 테트라히드로카나비놀, 탈리도미드, 티오구아닌, 티오데파, 토포테칸, 트레티노인, 발루비신, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신, 비노렐빈, 돌라세트론, 그라니세트론; 포르모테롤, 플루티카손, 류프롤리드, 미다졸람, 알프라졸람, 암포테리신 B, 포도필로톡신, 뉴클레오시드 항바이러스제, 아로일 히드라존, 수마트립탄; 마크롤리드, 예컨대 에리트로마이신, 올레안도마이신, 트롤레안도마이신, 록시트로마이신, 클라리트로마이신, 다베르신, 아지트로마이신, 플루리트로마이신, 디리트로마이신, 조사마이신, 스피로마이신, 미테마이신, 류코마이신, 미오카마이신, 로키타마이신, 안다지트로마이신 및 스위놀리드 A; 플루오로퀴놀론, 예컨대 시프로플록사신, 오플록사신, 레보플록사신, 트로바플록사신, 알라트로플록사신, 목시플로시신, 노르플록사신, 에녹사신, 그레파플록사신, 가티플록사신, 로메플록사신, 스파르플록사신, 데마플록사신, 페플록사신, 아미플록사신, 플레록사신, 토수플록사신, 프롤리플록사신, 이르록사신, 과주플록사신, 클리나플록사신 및 시타플록사신; 아미노글리코시드, 예컨대 겐타마이신, 네틸마이신, 파라메신, 토브라마이신, 아미카신, 카나마이신, 네오마이신 및 스트렙토마이신, 반코마이신, 테이코플라닌, 람플라닌, 미데플라닌, 콜리스틴, 담토마이신, 그라미시딘, 콜리스티메테이트; 폴리미신, 예컨대 폴리믹신 B, 카프레오마이신, 바시트라신, 페넬스; 페니실린 G, 페니실린 V 와 같은 페니실리네이즈-민감 제제를 포함하는 페니실린; 메티실린, 옥사실린, 클록사실린, 디클록사실린, 플록사실린, 나프실린과 같은 페니실리네이즈-내성 제제; 암피실린, 암목시실린 및 헤타실린, 실린 및 갈람피실린과 같은 그람 음성 미생물 활성제; 카르베니실린, 티카르실린, 아즐록실린, 메즐록실린 및 피페라실린과 같은 항슈도모날 페니실린; 세프포독심, 세프프로질, 세프트부텐, 세프티족심, 세프트리악손, 세팔로틴, 세파피린, 세팔렉신, 세프라드린, 세폭시딘, 세파만들, 세포졸린, 세팔로리딘, 세파클로르, 세파드록실, 세팔로글리신, 세푸록심, 세포라니드, 세포탁심, 세파트리진, 세파세트릴, 세페핌, 세픽심, 세포니시드, 세프페라존, 세포테탄, 세프메타졸, 세프타지미드, 로라카르베프 및 목살락탐과 같은 세팔로스포린, 아스트레오남과 같은 모노박탐; 및 카르바페넴, 예컨대 이미페넴, 메로페넴, 펜타미딘, 이세티오우에이트, 알부테롤 설페이트, 리도카인, 메타프로테레놀 설페이트, 베클로메타손, 디프레오이네이트, 트리암시놀론 아세트아미드, 부데소니드 아세트오니드, 프루티카손, 이프라트로피움 브로마이드, 플루니솔리드, 크로몰린 소듐 및 에르고타민 타르트레이트; 탁산, 예컨대 파클리탁셀; SN-38 및 티르포스틴.

[0156] 상기의 대표적인 생물 활성제는, 적용가능한 이들의 동족체, 아고니스트, 안타고니스트, 억제제, 이성질체 및 그의 약학적으로 허용가능한 염 형태를 포함하는 것을 의미한다. 펩티드 및 단백질과 관련하여, 본 발명은 합성, 재조합, 천연, 글리코실화 및 비-글리코실화 형태뿐 아니라, 그 생물 활성 단편도 포함하는 것을 의도한다. 상기 생물 활성 단백질은, 생성된 변이 단백질이 최소한 특정 정도의 부모(천연)의 활성을 지니는 한에서, 부가적으로 하나 이상의 아미노산 치환된(예, 시스테인), 삭제된 변이체 등을 포함하는 것을 의미한다.

[0157] V. 약학적 조성물 및 투여 방법

[0158] 본 발명은 또한 본원에서 제공한 공액체를 약학적 부형제와 조합으로 함유하는 약학적 제제를 포함한다. 대표적인 부형제는 비제한적으로 탄수화물, 향균제, 항산화제, 계면활성제, 완충제 및 그 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함한다.

[0159] 탄수화물, 예컨대 당, 유도당, 예컨대, 알디톨, 알돈산, 에스테르화 당 및/또는 당 중합체가 부형제로 존재할 수 있다. 특정 탄수화물 부형제는 예를 들어 하기를 포함한다: 단당류, 예컨대 과당, 말토오스, 갈락토오스, 포도당, D-만노오스, 소르보오스 등; 이당류, 예컨대 락토오스, 수크로스, 트레할로오스, 셀로비오스 등; 다당류, 예컨대 라피노오스, 멜레지토스, 말토덱스트린, 텍스트란, 녹말등; 및 알디톨, 예컨대 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 락시티톨, 자일리톨, 소르비톨 (글루시톨), 피라노실 소르비톨, 미오이노시톨 등.

[0160] 부형제는 또한 하기와 같은 무기 염 또는 완충제를 포함할 수 있다: 시트르산, 소듐 클로라이드, 포타슘 클로라이드, 소듐 설페이트, 포타슘 니트레이트, 1염기성 소듐 포스페이트, 2염기성 소듐 포스페이트 및 그 조합.

[0161] 제제는 또한 미생물의 성장을 예방 또는 방해하는 항균제를 포함할 수 있다. 본 발명에 적합한 항균제의 비제한적 예는 하기를 포함한다: 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드, 벤질 알코올, 세틸피리디늄

클로라이드, 클로부타놀, 페놀, 페닐에틸 알코올, 페닐수은 니트레이트, 티메르솔 및 그 조합.

- [0162] 항산화제 또한 제제에 존재할 수 있다. 사용되는 항산화제는 산화, 따라서 공액체 또는 제제의 다른 성분의 변질을 방지하기 위해 사용된다. 본 발명에서 사용되는 적합한 항산화제는 예를 들어, 하기를 포함한다: 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔, 부틸화 히드록시톨루엔, 차인산, 모노티오글리세롤, 프로필 갈레이트, 소듐 비셀파이트, 소듐 포름알데히드 설폭실레이트, 소듐 메타비셀파이트, 및 그 조합.
- [0163] 계면활성제가 부형제로써 존재할 수 있다. 대표적인 계면활성제는 하기를 포함한다: 폴리 소르베이트, 예컨대 "Tween 20" 및 "Tween 80" 및 플루로닉, 예컨대 F68 및 F88(둘 다 BASF Mount Olive, New Jersey 에서 시판됨); 솔비탄 에스테르; 지질, 예컨대 인지질, 예컨대 레시틴 및 다른 포스파티딜콜린, 포스파타딜 에타놀 아민(바람직하게 리포솜 형태는 아님), 지방산, 지방 에스테르; 스테로이드, 예컨대 콜레스테롤, 및 킬레이트 화제, 예컨대 EDTA, 아연 및 다른 이러한 적합한 양이온.
- [0164] 산 또는 염기는 부형제로써 제제 중에 존재할 수 있다. 사용할 수 있는 비제한적인 산의 예는 하기로 이루어진 군에서 선택된 산을 포함한다: 염산, 아세트산, 인산, 시트르산, 말산, 락트산, 포름산, 트리클로로아세트산, 질산, 퍼클로로산, 인산, 황산, 푸마르산 및 그 조합. 적합한 염기의 예는 비제한적으로 하기로 이루어진 군에서 선택된 염기를 포함한다: 소듐 히드록시드, 소듐 아세테이트, 암모늄 히드록시드, 포타슘 히드록시드, 암모늄 아세테이트, 포타슘 아세테이트, 소듐 포스페이트, 포타슘 포스페이트, 소듐 시트레이트, 소듐 포르메이트, 소듐 셀레이트, 포타슘 셀레이트, 포타슘 푸마레이트 및 그 조합.
- [0165] 약학적 제제는 모든 유형의 제형을 포함하고, 구체적으로 주사에 적합한 것, 예를 들어, 현탁액 및 용액뿐 아니라 재구성될 수 있는 분말을 포함한다. 조성물 중의 공액체(즉, 본 원에서 설명한 중합체 및 활성제 사이에 형성된 공액체)의 양은 몇 가지 인자에 의존하는데, 조성물이 단위 투약 용기에 저장될 때 최적 치료적 유효 투여량이다(예, 약병). 부가적으로, 약학적 제제는 주사기에 보관 될 수 있다. 치료적 유효 투여량은 실험적으로 결정될 수 있으며, 이는 어느 양이 임상적으로 요망되는 중점 (endpoint)를 생성하는지 결정하기 위해 증가량의 공액체를 반복 투여하여 측정한다.
- [0166] 조성물 중의 임의의 개별 부형제의 양은 부형제의 활성 및 조성물의 특정 요건에 따라 달라질 것이다. 통상적으로, 임의의 개별 부형제의 최적량은 정형적 실험을 통해 결정되는데, 즉 다양한 양 (저량 내지 고량)의 부형제를 함유하는 조성물을 제조하고, 안정성 및 다른 요소를 시험하고, 이후 심각한 부작용이 없이, 최적 성과가 이루어지는 범위를 측정한다. 그러나, 일반적으로, 부형제는 조성물에 약 1 중량% 내지 약 99 중량%, 바람직하게 약 5 중량% ~ 98 중량%, 더 바람직하게 약 15 ~ 95 중량%의 양으로 존재하고, 농도는 30 중량% 미만인 것이 가장 바람직하다.
- [0167] 상기한 약학적 부형제 및 기타는 Remington: The Science & Practice of Pharmacy, 19<sup>th</sup> ed., Williams & Williams, (1995), the Physician's Desk Reference, 52<sup>nd</sup> ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998), 및 Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Exipients, 3<sup>rd</sup> Edition, American Pharmaceutical Association, Washington, D. C. , 2000에 기재되어 있다.
- [0168] 본 발명의 약학적 제제는, 필수는 아니지만 통상적으로, 주사를 통해 투여되고, 따라서 일반적으로 투여 직전 액체 용액 또는 현탁액이다. 약학적 제제는 또한 시럽, 크림, 연고, 정제, 분말등의 다른 형태를 취할 수 있다. 다른 투여 방식은 또한, 폐, 직장, 피부투과, 점막투과, 경구, 경막, 피하, 동맥내부 등을 포함한다. 비경구 투여의 적합한 제형 유형은 주사 준비 용액 (ready-for injection solution), 사용 전 용매와의 조합을 위한 건조 분말, 주사를 위해 준비된 현탁액, 사용전 비히클과의 조합을 위한 건조 불용성 조성물 및 투여 전 희석을 위한 액체 농축액 및 에멀전 등을 포함한다.
- [0169] 또한 본 발명은 본 원에서 제공한 공액체를, 당업자에 의해 결정된, 공액체 치료에 반응을 하는 질병을 앓는 환자에게 투여하는 방법을 제공한다. 이 방법은 공액체의 치료적 유효량, 바람직하게 약학적 제제의 일부로 제공된 것을 일반적으로 주사를 통하는 투여를 포함한다.
- [0170] 투여되는 실제 투여량은 연령, 체중 및 대상의 일반적 상태뿐 아니라, 치료되는 상태의 심각도, 건강 전문가의 판단 및 투여되는 공액체에 따라 다양할 수 있다.
- [0171] 특정 약물의 치료적 유효량은 당업자에 공지 및/또는 관련 참조문 및 문헌에 기재되어 있다. 일반적으로 공액체의 치료적 유효량은 약 0.001 mg 내지 100 mg, 바람직하게 0.01 mg/일 내지 75 mg/일의 용량, 및 더 바람직하게 0.10 mg/일 내지 50 mg/일의 용량의 범위이다. 임의의 주어진 공액체의 단위 투여량은(다시, 바

람직하게 약학적 제제의 일부로 제공된 것) 임상의, 환자의 요구 등에 따른 다양한 투약 스케줄로 투여될 수 있다.

**실시예**

- [0172] 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위해 제공되었으나, 본 발명의 제한으로 고려되어서는 안된다. 예를 들어, 실시예에서 PEG 가 사용되지만, 상기 논의 처럼 기타 수용성, 비-펩티드성 중합체의 사용이 본 발명에 포함된다.
- [0173] 본 실시예에서 언급되는 모든 PEG 시약은 Nektar AL, Huntsville, AL에서 시판된다. 모든 NMR 데이터는 Bruker사에서 생산한 300 또는 400 MHz NMR 분광계로 생성되었다.
- [0174] 실시예 1은 tert-부틸 에스테르 종결된 중합체의 형성을 위한 염기의 존재하에서 mPEG-OH와 tert-부틸 브로모아세테이트의 반응을 예시한다. 이후, 중합체를 NaOH를 염기로 사용하여 염기-촉진 가수분해 처리하고, 인산을 이용하여 산성화 시켜 최종 카르복시산 종결된 중합체를 형성한다.
- [0175] 실시예 2 및 3 은 2작용성 PEG 출발 물질의 유사 반응을 예시한다(PEG 디올; HO-PEG-OH). 실시예 4는 다 작용성, 4-팔 PEG 출발 물질의 반응을 예시하는데, 이는 펜타에리트리톨 핵심 기재이고, 각 PEG "팔"의 말단에 하나씩 4개의 반응성 히드록실을 가진다.
- [0176] 실시예 1 :mPEG (30, 000)-카르복실산
- [0177] 톨루엔 (600 ml)중의 mPEG-30,000 (50 g, 0.00167 몰) (NOF 사) 용액을, 300 ml 톨루엔을 증류 제거시킴으로써 공비 건조시켰다. t-부탄올 (70 ml), 포타슘 tert-부톡시드 (95%, 1.75 g, 0.0148 몰, 8.9 배 초과) 및 tert-부틸 브로모아세테이트 (3.3 g, 0.0169 몰, 10.1 배 초과)를 첨가하고, 혼합물을 아르곤 대기하 45°C 에서 밤새 교반하였다. 용매를 감압하에서 증류 제거하고, 잔여물을 증류수에 용해시켰다 (1000ml).
- [0178] 수용액의 pH를 1M 소듐 히드록시드를 사용하여 12로 조정하고, 1M 소듐 히드록시드를 정기적으로 첨가하여 pH를 12로 유지시키면서 용액을 18 시간 동안 교반하였다.
- [0179] pH를 5% 인산을 사용하여 3으로 조정하고, 생성물을 디클로로메탄으로 추출하였다. 추출물을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 에틸 에테르에 첨가하였다. 침전 생성물을 여과 제거하고, 감압하에서 건조시켜, 수율 46.6 g로 수득하였다.
- [0180] NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): 3.24 ppm (s, -OCH<sub>3</sub>), 3.51 ppm (s, PEG 골격), 4.01 ppm (s, -CH<sub>2</sub>-COO-).
- [0181] 음이온 교환 크로마토그래피 분석: mPEG (30,000)-카르복시산 100%. 이분석은 실질적으로 출발 물질 또는 다른 중합체성 불순물이 에테르-침전 생성물 중에 존재하지 않는다는 것을 보여주었다.
- [0182] 실시예 2 :PEG (10,000)-디카르복시산
- [0183] PEG-10,000 (35.25 g, 0.00705 당량) (NOF 사) (히드록실로 양쪽 말단이 종결됨)를 톨루엔 (600 ml) 중에 용해시키고, 톨루엔 증류 제거를 통해 공비 건조시켰다. 잔여물을 무수 톨루엔 (500ml)중에 재용해시켰다. tert-부탄올 (40 ml), 포타슘 tert-부톡시드 (4 g, 0.0356 몰, 5.1 배 초과) 및 무수 톨루엔 (40ml)을 조합하고, 상기 반응 혼합물에 첨가한 후, 약 3.5 시간 동안 교반하였다. t-부틸 브로모아세테이트 (7 ml, 0.0474 몰, 6.7 배 초과)를 첨가하고, 혼합물을 아르곤 대기하 40 °C에서 밤새 교반하였다. 용매를 감압하에서 증류 제거하고, 잔여물을 증류수 (1000 ml)에 용해시켰다.
- [0184] 수용액의 pH를 1M 소듐 히드록시드를 사용하여 12.1로 조정하고, 정기적으로 1M 소듐 히드록시드를 첨가하여 pH를 12.1로 유지하면서 용액을 밤새 교반하였다.
- [0185] pH를 1M 염산을 사용하여 1.0 으로 조정하고, 생성물을 디클로로메탄으로 추출하였다. 추출물을 무수 소듐 설페이트로 건조, 농축시키고 에틸 에테르에 첨가하였다. 침전 생성물을 여과 제거하고 감압하에서 건조시켜, 33 g을 수득하였다.
- [0186] NMR(d<sub>6</sub>-DMSO): 3.51 ppm (s, PEG 골격), 4.01 ppm (s, -CH<sub>2</sub>-COO-).
- [0187] 음이온 교환 크로마토그래피 분석: PEG (10,000)-디카르복시산 100%.
- [0188] 실시예 3: PEG (5,000)-디카르복시산

- [0189] 아세토니트릴(800ml) 중의 PEG-5,000 (35 g, 0.01400 당량) (NOF 사) 용액을, 아세토니트릴을 증류 제거함으로써 공비 건조시키고, 잔여물을 무수 톨루엔 (300 ml)중에 재용해시켰다. t-부탄올 (50 ml), 포타슘 tert-부톡시드 (4.7 g, 0.0419 몰, 2.99 배 초과), 및 무수 톨루엔 (50 ml) 을 조합하고, 상기 반응 혼합물에 첨가한 후, 약 3.5 시간 동안 교반하였다. t-부틸 브로모아세테이트 (7.2 ml, 0.0488 몰, 3.48 배 초과) 를 첨가하고, 혼합물을 20 시간 동안 아르곤 대기하 실온에서 교반하였다. 용매를 감압하에서 증류 제거하고, 잔여물을 증류수 (1000 ml)에 용해시켰다.
- [0190] 수용액의 pH를 1M 소듐 히드록시드를 사용하여 12.0으로 조정하고, 1M 소듐 히드록시드를 정기적으로 첨가하여 pH를 12.0 으로 유지하면서 용액을 밤새 교반하였다.
- [0191] 1M 염산을 사용하여 pH를 2.0으로 조정하고 생성물을 디클로로메탄으로 추출하였다. 추출물을 무수 소듐 설페이트로 건조, 농축시키고, 에틸 에테르에 첨가하였다. 침전 생성물을 여과 제거하고 감압하에서 건조시켜, 32 g을 수득하였다.
- [0192] NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): 3.51 ppm (s, PEG 골격), 4.01 ppm(s, -CH<sub>2</sub>-COO-).
- [0193] 음이온 교환 크로마토그래피 분석: PEG (5,000)-디카르복시산 100%.
- [0194] 실시예 4: 4-팔-PEG (10,000)-테트라카르복시산
- [0195] 톨루엔 (2,300ml) 중의 다중-팔 PEG (4-팔), MW 10 kDa (Nektar, Huntsville AL) (160 g, 0.064 당량) 용액을, 감압하 80 °C에서 1,000 ml의 톨루엔을 증류 제거함으로써 공비 건조시켰다. 다른 용기에서, tert-부탄올 (17.3ml) 및 포타슘 tert-부톡시드 (7.18 g, 0.128 몰, 2.00 배 초과) 을 혼합한 후, 상기 건조시킨 톨루엔 용액에 첨가하였다. 생성된 용액을 약 3.5 시간 동안 45 °C에서 교반하였다. t-부틸 브로모아세테이트 (20.8 ml, 0.141 몰, 2.20 배 초과) 를 첨가하고 혼합물을 아르곤 대기하 45 °C에서 12 시간 동안 교반하였다. 용매를 감압하에서 증류 제거하고, 잔여물을 증류수 (1,600 ml)에 용해시켰다 .
- [0196] 수용액의 pH를 1M 소듐 히드록시드를 사용하여 12.0으로 조정하고, 1M 소듐 히드록시드를 정기적으로 첨가하여 pH를 12.0 으로 유지하면서 용액을 17 시간 동안 교반하였다.
- [0197] 1M 인산을 사용하여 pH를 1.5로 조정하고 생성물을 디클로로메탄으로 추출하였다. 추출물을 무수 소듐 설페이트로 건조, 농축시키고, 에틸 에테르에 첨가하였다. 침전 생성물을 여과 제거하고 감압하에서 건조시켜, 15.5 g을 수득하였다.
- [0198] NMR(d<sub>6</sub>-DMSO): 3.51 ppm (s, PEG 골격), 4.01 ppm (s, -CH<sub>2</sub>-COO-), 치환 100%.
- [0199] -20 °C 에서 8 개월 동안 보관한 후, GPC 분석은 원 생성물과 동일하였다. 따라서 보관 기간 동안 검출될 만한 분해가 발생하지 않았다.
- [0200] 본 발명의 상기 유리한 내용에 속하는 본 발명의 많은 변형 및 다른 구현에는 당업자가 생각할 수 있을 것이다. 따라서 본 발명은 개시된 특정 구현예에 제한되지 않으며, 청구항의 범위 내에서 변형 및 다른 구현예를 포함하는 것이 의도된다.