



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년10월26일  
(11) 등록번호 10-1790804  
(24) 등록일자 2017년10월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 47/48 (2006.01) A61K 31/4745 (2006.01)  
C08G 65/329 (2006.01) C08G 65/333 (2006.01)  
C08G 65/48 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2012-7015272  
(22) 출원일자(국제) 2010년11월18일  
심사청구일자 2015년11월16일  
(85) 번역문제출일자 2012년06월13일  
(65) 공개번호 10-2012-0101070  
(43) 공개일자 2012년09월12일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/057289  
(87) 국제공개번호 WO 2011/063156  
국제공개일자 2011년05월26일
- (30) 우선권주장  
61/262,463 2009년11월18일 미국(US)  
61/290,072 2009년12월24일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
KR1020060090705 A\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자  
넥타르 테라퓨틱스  
미국 94158 캘리포니아주 샌프란시스코 사우스 미  
션 베이 불러바드 455 스위트 100
- (72) 발명자  
충 앤서니 오  
미국 35824 앨라배마주 사우스웨스트 헌즈빌 윈드  
릿지 웨이 117  
이 서주  
미국 35756 앨라배마주 매디슨 알리샤 서클 108  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 중합체-약물 콘쥬게이트의 산성 염 형태 및 알콕실화 방법

(57) 요약

양태 중에서 특히, 본원은 수용성 중합체-약물 콘쥬게이트의 혼합 산성 염을, 관련된 이의 제조 및 사용 방법과 함께 제공한다. 혼합 산성 염은 안정적으로 형성되고, 중합체-약물 콘쥬게이트의 상응하는 대부분 순수한 산성 염 또는 유리 염기 형태보다 가수분해에 더 저항성인 것으로 보인다. 상기 혼합 산성 염은 재생가능하게 제조되고 회수되며, 수용성 중합체 약물 콘쥬게이트의 비혼합 산성 염 형태에 비하여 놀라운 정도의 이점을 제공한다.

(72) 발명자

**조쉬 발찬드라 브이**

미국 35802 앨라배마주 헌츠빌 윌로우브룩 드라이브 1211 넘버2

**브레이 브라이언**

미국 35802 앨라배마주 헌츠빌 파밍데일 로드 512

**니에 샤오용**

미국 35802 앨라배마주 헌츠빌 윌로우브룩 드라이브 922 넘버6

**스펜스 패트릭**

미국 35756 앨라배마주 매디슨 포치 라이트 플레이스 110

**코즐로우스키 앤토니**

미국 35811 앨라배마주 헌츠빌 그린슬로프 트레일 2103

**맥매너스 사무엘**

미국 35802 앨라배마주 헌츠빌 타코마 트레일 8867

**딤니스 사친**

미국 77077 텍사스주 휴스턴 위팅턴 드라이브 12850 넘버1506

**레바티 그렉**

미국 77478 텍사스주 슈가 랜드 벨 마 스트리트 826

**스왈로우 데이비드**

미국 77379 텍사스주 스프링 펀처치 드라이브 9407

**셰퍼 앤서니**

미국 35801 앨라배마주 헌츠빌 셰이즈 크레스트 로드 2208

**헨들리 존**

미국 55804 미네소타주 덜루스 레스터 리버 로드 4912

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

수용성 중합체-활성제 콘쥬게이트의 혼합 염을 포함하며, 상기 콘쥬게이트 내 활성제는 적어도 하나의 염기성 아민기를 가지고, 또한 활성제 내 각각의 아민기에 대하여 아민기는 프로톤화 또는 비프로톤화되며, 임의의 주어진 프로톤화 아민기는 무기산 또는 트리플루오로아세트산(TFA)의 산성 염 형태인 조성물로서,

상기 수용성 중합체는 다중 팔 폴리(에틸렌 글리콜)이고, 활성제는 이리노테칸이고, 무기산은 염산이고, 활성제 내 아민기의 적어도 25mol% 는 트리플루오로아세트산(TFA)의 염으로서 프로톤화되고, 활성제 내 아민기의 25mol% 내지 40mol% 는 HCl 염으로서 프로톤화되고, 활성제 내 아민기의 5mol% 내지 35mol% 는 비프로톤화되는, 조성물.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

삭제

#### 청구항 7

삭제

#### 청구항 8

삭제

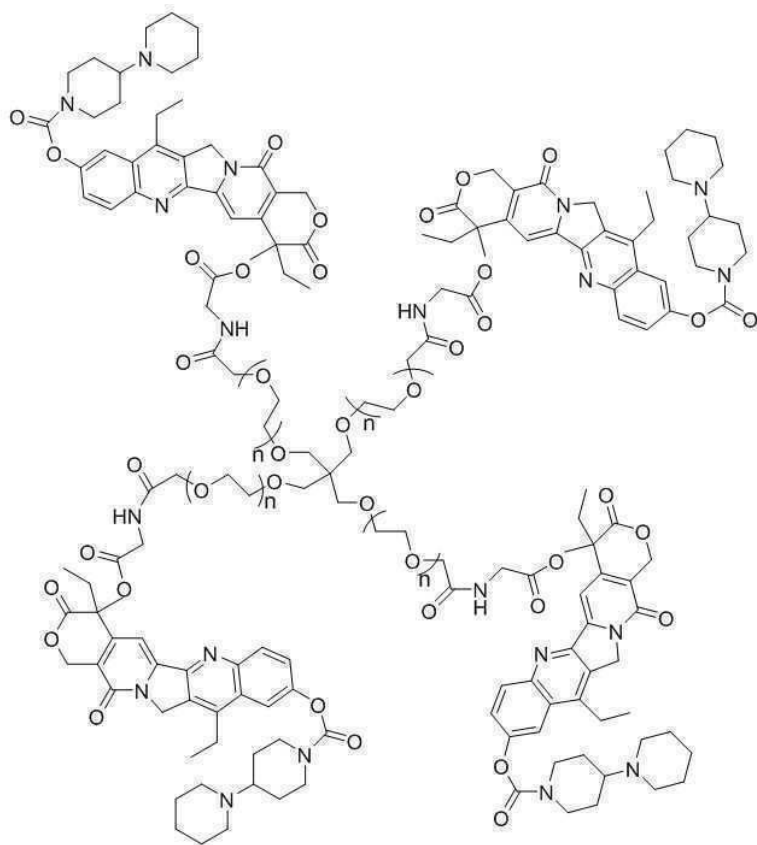
#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

제1항에 있어서, 수용성 중합체-활성제 콘쥬게이트는 하기 구조식 I에 해당하는 조성물:

[구조식 I]



여기에서, n은 20 내지 500 범위의 정수이고, 활성제 내 아민기의 적어도 25mol% 는 트리플루오로아세트산(TFA) 염으로서 프로톤화되고, 활성제 내 아민기의 25mol% 내지 40mol% 는 HCl 염으로서 프로톤화되고, 활성제 내 아민기의 5mol% 내지 35mol% 는 비프로톤화된다.

#### 청구항 11

삭제

#### 청구항 12

삭제

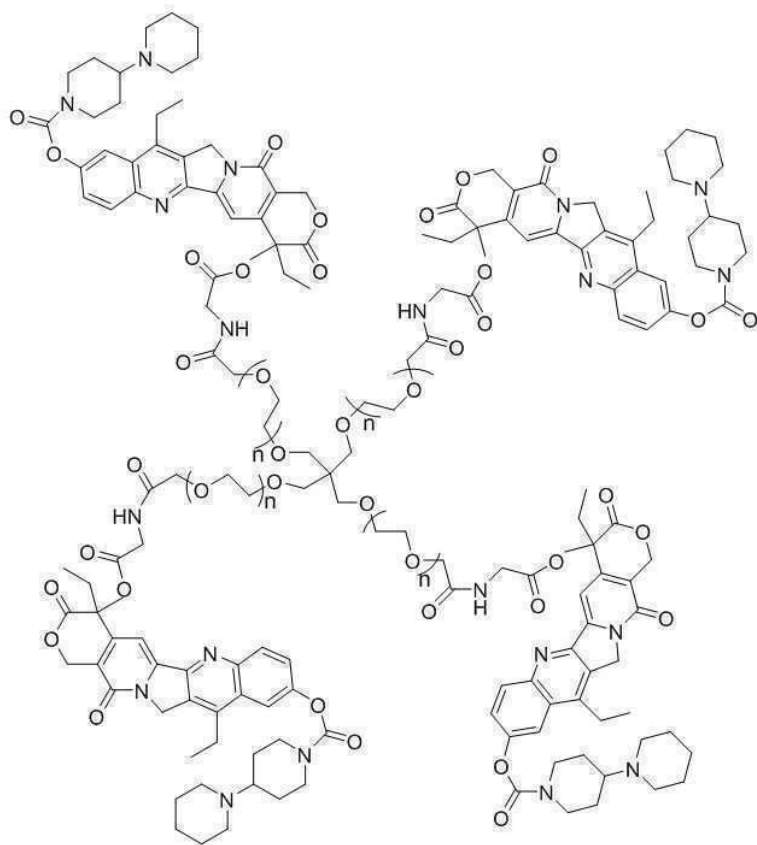
#### 청구항 13

삭제

#### 청구항 14

하기 구조식 I 의 트리플루오로아세트산/염산 혼합 염:

[구조식 I]



여기에서, n 은 40 내지 500 범위의 정수이고, 활성제 내 아민기의 25mol% 내지 40mol%는 HCl 염으로서 프로톤화되고, 활성제 내 아민기의 5mol% 내지 35mol%는 비프로톤화된다.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

(i) 트리플루오로아세트산(TFA)으로 처리함으로써 보호된 형태인 아민 함유 활성제의 무기산 염을 탈보호하여 탈보호된 무기산/TFA 혼합 염을 형성하는 단계,

(ii) 단계 (i)에서 형성된 탈보호된 산성 염에서 무기산 및 TFA의 상대적인 몰 양을 측정하는 단계,

(iii) 단계 (i)의 탈보호된 무기산/TFA 혼합 염을 염기의 존재하에 수용성 중합체 시약과 커플링시켜 중합체-활성제 콘쥬게이트를 형성하는 단계, 및

(iv) 상기 중합체 활성제 콘쥬게이트를 회수하는 단계로서, 여기에서 상기 중합체 활성제 콘쥬게이트는 유리 염기, 무기산 염 및 TFA 염 형태의 조합으로 존재하는 상기한 하나 이상의 아미노기를 가짐을 특징으로 하는 단계를 포함하는, 수용성 중합체-활성제 콘쥬게이트의 혼합 염을 제조하는 방법으로서,

상기 수용성 중합체는 다중 팔 폴리(에틸렌 글리콜)이고, 활성제는 이리노테칸이고, 무기산은 염산이고, 수용성 중합체 시약은 활성화된 폴리(에틸렌 글리콜) 에스테르이고, 활성제 내 아민기의 적어도 25mol% 는 트리플루오로아세트산(TFA)의 염으로서 프로톤화되고, 활성제 내 아민기의 25mol% 내지 40mol% 는 HCl 염으로서 프로톤화되고, 활성제 내 아민기의 5mol% 내지 35mol% 는 비프로톤화되는, 방법.

**청구항 18**

삭제

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

삭제

**청구항 21**

삭제

**청구항 22**

제17항에 있어서, 폴리에틸렌 글리콜 시약은 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 중합체 팔을 가지는 분지형 시약인 방법.

**청구항 23**

삭제

**청구항 24**

삭제

**청구항 25**

제17항에 있어서, 단계 (iii)의 염기는 아민인 방법.

**청구항 26**

삭제

**청구항 27**

삭제

**청구항 28**

삭제

**청구항 29**

삭제

**청구항 30**

삭제

**청구항 31**

삭제

**청구항 32**

삭제

**청구항 33**

제17항에 있어서, 보호된 형태의 아민 함유 활성제는 t-boc-글리신 이리노테칸인 방법.

**청구항 34**

삭제

**청구항 35**

삭제

**청구항 36**

삭제

**청구항 37**

삭제

**청구항 38**

삭제

**청구항 39**

배치마다 일정하게 최대 15% 다른 상대적인 물 양의 무기산 부가 염, 트리플루오로아세트산 염 및 유리 염기를 가지는 제17항에 의한 방법에 의하여 재생가능하게 제조된 혼합 염.

**청구항 40**

삭제

**청구항 41**

삭제

**청구항 42**

삭제

**청구항 43**

삭제

**청구항 44**

삭제

**청구항 45**

삭제

**청구항 46**

제39항의 혼합 염 또는 제17항의 방법에 의해 제조된 혼합 염을 포함하는, 암의 치료에 사용하기 위한 약학적으로 허용되는 조성물로서,

상기 혼합 염을 포함하는 수용액에 락트산을 첨가하고, 용액의 pH는 3.5로 조절되고, 생성된 용액을 동결건조하여 동결건조된 형태로 얻어지는, 조성물.

**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

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제



청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

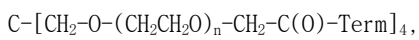
청구항 99

삭제

청구항 100

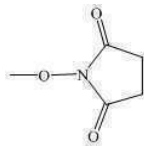
4개 팔 중합체 콘쥬게이트의 혼합 염을 포함하는 조성물로서, 상기 조성물 내 4개 팔 콘쥬게이트의 적어도 90%는,

(i) 하기 화학식에 의해 포함되는 구조를 가지고

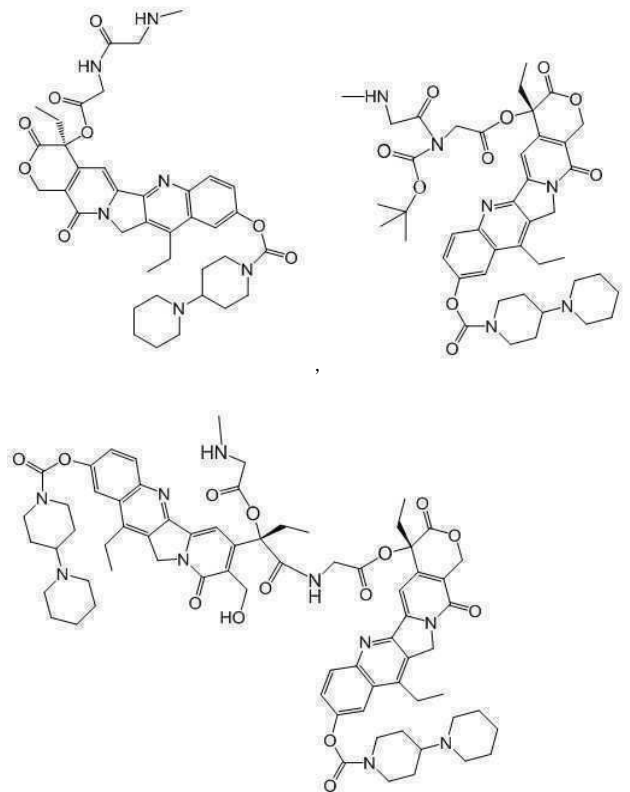


여기에서

각각의 경우에 n은 5 내지 150(예컨대, 113)의 값을 가지는 정수이며,



각각의 경우에 Term은 -OH, -OCH<sub>3</sub>, , -NH-CH<sub>2</sub>-C(O)-OH, -NH-CH<sub>2</sub>-C(O)-OCH<sub>3</sub>,



및 -NH-CH<sub>2</sub>-C(O)-O-이리노(“GLY-이리노”)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기에서 이리노는 이리노테칸의 잔기이며;

(ii) 조성물 내 4개 팔 콘쥬게이트의 적어도 90%에서 각각의 Term에 대하여 이의 적어도 90%는 -NH-CH<sub>2</sub>-C(O)-O-

이리노이고,

여기에서 조성물 내 4개 팔 콘주게이트의 적어도 90%에서 각각의 이리노 내 각각의 아미노기에 대하여, 각각의 아미노기는 프로톤화되거나 또는 비프로톤화되며, 임의의 주어진 프로톤화 아미노기는 무기산 또는 트리플루오로아세트산의 산성 염 형태이고, 상기 무기산은 염산이고, 활성제 내 아미노기의 적어도 25mol% 는 트리플루오로아세트산(TFA)의 염으로서 프로톤화되고, 활성제 내 아미노기의 25mol% 내지 40mol% 는 HCl 염으로서 프로톤화되고, 활성제 내 아미노기의 5mol% 내지 35mol% 는 비프로톤화되는, 조성물.

#### 청구항 101

(i) 트리플루오로아세트산(TFA)를 이용한 처리에 의하여 t-Boc 글리신-이리노테칸.HCl을 탈보호하여 탈보호된 글리신-이리노테칸 HCl 을 형성하는 단계,

(ii) 콘주게이트인 4개 팔-펜타에리트리톨릴-폴리에틸렌 글리콜-카복시메틸글리신-이리노테칸을 형성하기에 효과적인 조건 하에서 탈보호된 글리신-이리노테칸 HCl을 염기의 존재하에 4개 팔-펜타에리트리톨릴-폴리에틸렌 글리콜-카복시메틸석신이미드와 커플링시키는 단계, 및

(iii) 단계 (ii)의 콘주게이트를 회수하는 단계로서, 여기에서 상기 콘주게이트는 유리 염기, HCl 및 TFA 염 형태와 조합하여 아미노기를 포함하는 혼합 염인 단계

를 포함하는, 수용성 중합체-활성제 콘주게이트의 혼합 염을 제조하는 방법으로서,

상기 수용성 중합체는 다중 팔 폴리(에틸렌 글리콜)이고, 활성제는 이리노테칸이고, 활성제 내 아민기의 적어도 25mol% 는 트리플루오로아세트산(TFA)의 염으로서 프로톤화되고, 활성제 내 아민기의 25mol% 내지 40mol% 는 HCl 염으로서 프로톤화되고, 활성제 내 아민기의 5mol% 내지 35mol% 는 비프로톤화되는, 방법.

#### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 관련출원에 대한 상호참조

[0002] 본 출원은 2009년 11월 18일에 출원된 미국 가출원 일련번호 제61/262,463호, 및 2009년 12월 24일에 출원된 미국 가출원 일련번호 제61/290,072호 각각에 대하여 35 U.S.C. § 119(e)에 의하여 우선권의 이익을 주장하며, 이들 모두 전체적으로 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 개시내용은 일반적으로 수용성 중합체-약물 콘주게이트의 혼합 산성 염 조성물, 이의 약학 조성물, 및 이러한 혼합 산성 염 조성물을 제조, 제형화, 투여 및 사용하는 방법에 관한 것이다. 본 개시내용은 또한 일반적으로 이전에 분리된 알콕실화 올리고머로부터 알콕실화 중합체 물질을 제조하는 알콕실화 방법 및 알콕실화 중합체 물질을 포함하는 조성물, 알콕실화 중합체 물질을 사용하는 방법 등에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0005] 수년 동안, 생물학적 활성제의 안정성 및 운반성을 개선시키기 위하여 다수의 방법이 제안되어 왔다. 약학 제제의 제형 및 전달과 연관된 난제는 단지 몇 가지만 열거하자면 약학 제제의 나쁜 수용성, 독성, 낮은 생물학적 이용가능성, 불안정성 및 빠른 생체내 분해를 포함할 수 있다. 많은 접근법이 약학 제제의 전달을 개선시키기 위하여 고안되었지만, 어떤 단일 접근법도 잠재적인 결점이 없는 것이 없다. 예를 들어, 하나 이상의 이러한 문제점을 해결하거나 또는 적어도 개선시키는 것을 겨냥한 통상적으로 이용되는 약물 전달 접근법은, 예를 들어 리포솜, 중합체 매트릭스, 또는 단분자 미셀에의 약물 캡슐화, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 수용성 중합체에의 공유 부착, 유전자 표적화제의 사용, 염의 형성 등을 포함한다.

[0006] 수용성 중합체의 공유 부착은 활성제의 수용성을 개선시킬 뿐만 아니라 활성제의 약리학적 특성을 변경시킬 수 있다. 특정 예시적인 중합체 콘주게이트는 특히 미국 특허 제7,744,861호에 기술되어 있다. 다른 접근법에서, 산성 또는 염기성 관능기를 가진 활성제는 적합한 염기 또는 산 과 반응하여 염 형태로 시판될 수 있다. 모든

활성 분자의 반 이상이 염으로서 시판된다(Polymorphism in the Pharmaceutical Industry, Hilfiger, R., ed., Wiley-VCH, 2006). 염 형태에 관한 난제는 적합한 염을 찾는 것뿐만 아니라 가공 동안 고체 상태 거동을 제어하는 것을 포함한다. 생물 약제학적 염은 비결정질, 결정질일 수 있고, 수화물, 용매, 다양한 다형체 등으로 존재할 수 있다. 흥미롭게도, 드물지만 염 형태가 있더라도, 약물 제형에서 사용되는 중합체 콘주게이트의 단독의 혼합 산성 염 형태로 되게 한다.

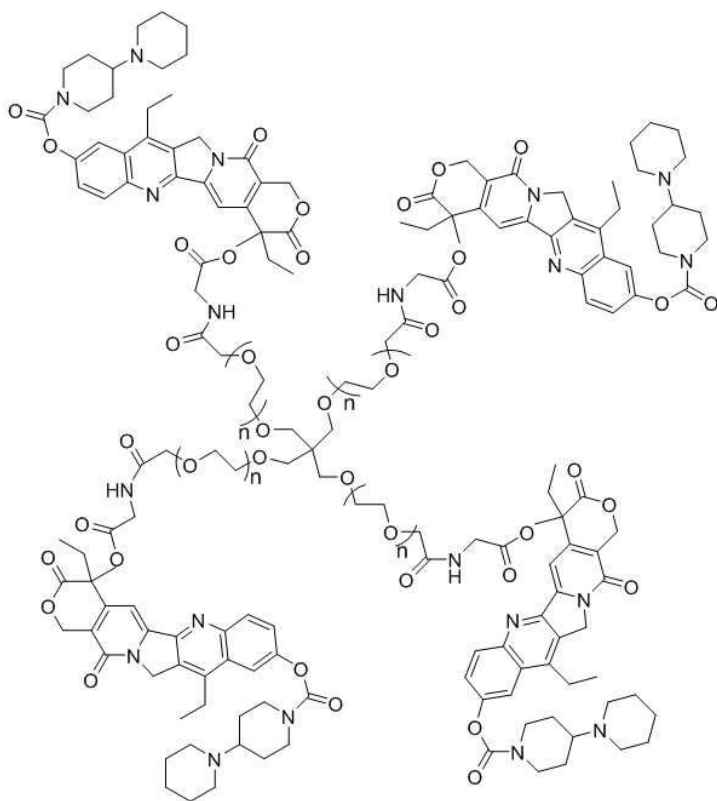
- [0007] 수용성 중합체 물의 활성제 콘주게이트의 제조와 연관된 다른 난제는 일관되고 재생가능한 방법으로 비교적 순수한 수용성 중합체를 제조하는 능력이다. 예를 들어, 반응성 작용기로 활성화된 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG) 유도체는 활성제(예를 들어 소분자 및 단백질)와 커플링하여 PEG와 활성제 사이에서 콘주게이트를 형성하는데 유용하다. 활성제가 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 “PEG”의 중합체와 콘주게이트될 때, 콘주게이션된 활성제는 통상적으로 “페길화(PEGylated)”된 것으로 지칭된다.
- [0008] 비콘주게이션된 상태에서 활성제의 안전성 및 효능과 비교할 때, 콘주게이션된 형태는 상이하고, 종종 임상적으로 유의한 특성을 나타낸다. 페길화된 활성제, 예를 들어 PEGASYS<sup>®</sup> 페길화 인터페론 알파-2a(Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ), PEG-INTRON<sup>®</sup> 페길화 인테페론 알파-2b(Schering Corp., Kenilworth, NJ) 및 NEULASTA<sup>®</sup> PEG-필그라스티미(Amgen Inc., Thousand Oaks, CA)의 상업적 성공은 페길화가 활성제의 하나 이상의 특성을 개선시키는 잠재력을 가지는 정도를 입증한다.
- [0009] 콘주게이트를 제조함에 있어서, 중합체 시약은 통상적으로 콘주게이트 합성에 대한 비교적 직접적인 합성 접근법을 허용하는데 이용된다. 중합체 시약을 포함하는 조성물을 활성제를 포함하는 조성물과 결합함으로써, 적절한 반응 조건 하에서 비교적 편리한 콘주게이트 합성을 수행하는 것이 가능하다.
- [0010] 그러나, 약물 제품에 대한 규제 요구조건에 적합한 중합체 시약의 제조는 종종 간단하지 않다. 통상적인 중합화 접근법은 비교적 불순한 조성물 및/또는 낮은 수득률을 가져온다. 이러한 불순물 및 수득률은 약학 분야 외에서는 문제가 아닐 수 있지만, 안전성 및 비용은 인간 사용을 위한 약제의 맥락에서는 중요한 것을 나타낸다. 따라서, 통상적인 중합화 접근법은 약학 콘주게이트의 제조를 위한 것으로 의도된 중합체 시약의 합성에 대하여 적합하지 않다.
- [0011] 다중 팔 중합체의 경우에, 상당량의 바람직하지 않은 불순물이 없으면서 잘 제어되고 잘 정의된 특성을 가지는 이용가능하고, 바람직한 수용성 중합체가 부족하다. 따라서 예를 들어 고분자량의 다중 팔 폴리(에틸렌 글리콜)를 용이하게 획득할 수 있지만, 시판되는 중합체로부터 제조된 약물 콘주게이트는 매우 낮거나 또는 매우 높은 분자량의 생물학적 활성 불순물을 가지는 중합체-약물 콘주게이트가 상당량(즉, 8% 초과) 있을 수 있다. 약물 조성물에서 활성 불순물의 이러한 정도는 상기 조성물을 용인될 수 없게 하며, 따라서 이러한 약물의 승인을 (불가능하지 않다면) 어렵게 할 수 있다.

## 발명의 내용

### 과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 수용성 중합체-활성제 콘주게이트의 혼합 염을 포함하는 조성물이 제공되며, 상기 콘주게이트 내 활성제는 적어도 하나의 아민 또는 다른 염기성 질소 함유 기를 가지고, 또한 상기 아민 또는 다른 염기성 질소 함유 기는 프로톤화 또는 비프로톤화(즉, 유리 염기임)되며, 임의의 주어진 프로톤화 아민 또는 다른 염기성 질소 함유 기는 강 무기산 또는 강 유기산, 예를 들어 트리플루오로아세트산(TFA)의 산 부가 염이다.
- [0013] 강 무기산의 예는 하이드로할릭산(예컨대, 염산, 불화수소산, 요오드화수소산 및 브롬화수소산), 황산, 질산, 인산 및 아질산을 포함한다.
- [0014] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 프로톤화 형태는 하이드로할릭산의 부가 염을 포함한다.
- [0015] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 프로톤화 형태는 염산의 부가 염을 포함한다.
- [0016] 강 유기산의 예는 pKa가 약 2.00 미만인 유기산을 포함한다. 예는 트리클로로아세트산, 디클로로아세트산, 및 혼합 할로아세트산, 예를 들어 플루오로디클로로아세트산, 플루오로클로로아세트산, 클로로디플루오로아세트산 등을 포함한다.

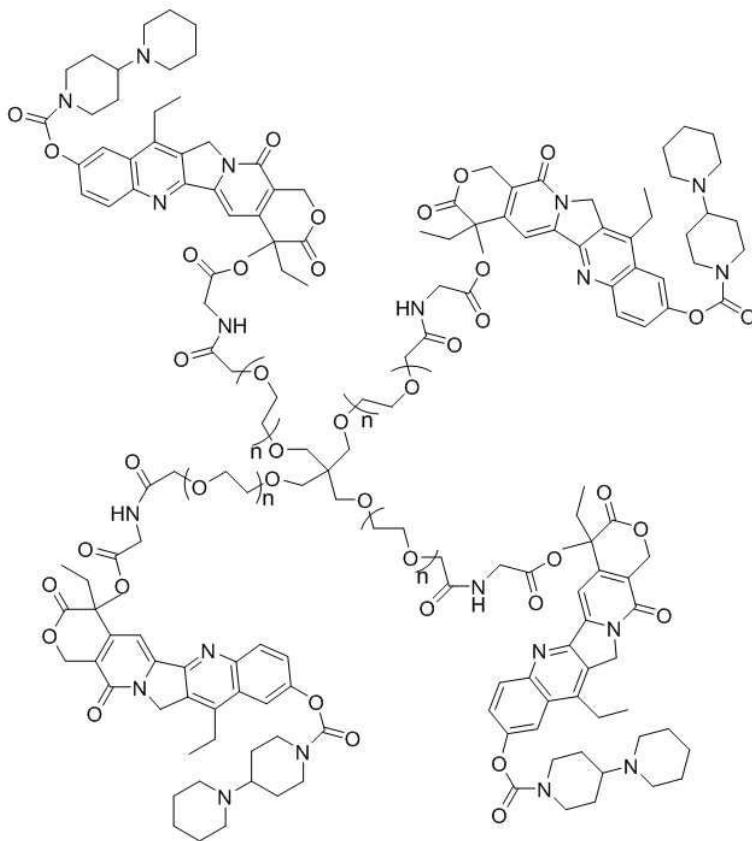
- [0017] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 수용성 중합체는 선형 또는 다중 팔형이다.
- [0018] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 수용성 중합체는 폴리(알킬렌 글리콜), 예를 들어 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 이의 공중합체 또는 삼량체이다.
- [0019] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 활성제는 소분자 약물, 펩티드 및 단백질로부터 선택된다.
- [0020] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 활성제는 캄토테신이다.
- [0021] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 조성물은 하기 구조식 I에 해당하는 수용성 중합체-활성제 콘주게이트의 혼합 염을 포함하며,



- [0022]
- [0023] 여기에서,  $n$ 은 20 내지 약 600 범위의 정수이고(특정 프로톤화 아미노 질소 원자 및 반대이온은 나타내지 않음), 각각의 이리노테칸 내 각각의 아민기에 대하여, 각각의 아미노기는 프로톤화 또는 비프로톤화되며, 임의의 주어진 프로톤화 아민기는 무기산 또는 트리플루오로아세트산과 같은 유기산의 산성 염 형태이다.
- [0024] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 콘주게이트의 조성물(예컨대, 4개 팔 콘주게이트의 조성물)에 대하여, 조성물 내 TFA 염으로서 프로톤화된 활성제 아미노기(또는 다른 염기성 질소 원자)의 mol%는 조성물 내 무기산 염으로서 프로톤화된 활성제 아미노기의 mol% 및 조성물 내 유리 염기 형태로 활성제 아미노기의 mol%의 각각의 것보다 크다.
- [0025] 또한 대안적인 실시형태에서, 콘주게이트의 조성물(예컨대, 4개 팔 콘주게이트의 조성물)에 대하여, 조성물 내 TFA 염으로서 프로톤화된 활성제 아민기(또는 다른 염기성 질소 원자)의 mol%는 조성물 내 유리 염기(즉, 비프로톤화) 형태인 활성제 아민기의 mol% 보다 크다.
- [0026] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 콘주게이트의 조성물(예컨대, 4개 팔 콘주게이트의 조성물)에 대하여, 조성물 내 활성제 아민기의 적어도 20mol%는 TFA 염으로서 프로톤화된다.
- [0027] 하나 이상의 실시형태에서, 콘주게이트의 조성물(예컨대, 4개 팔 콘주게이트의 조성물)에 대하여, 조성물 내 활성제 아민기의 적어도 25mol%는 TFA염으로서 프로톤화된다.
- [0028] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 콘주게이트의 조성물(예컨대, 4개 팔 콘주게이트의 조성물)에 대하여, 조성물 내 활성제 아미노기의 약 20mol% 내지 45mol%는 TFA염으로서 프로톤화된다.
- [0029] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 콘주게이트의 조성물(예컨대, 4개 팔 콘주게이트의 조성물)에 대하여, 조

성물 내 활성제 아미노기의 약 24mol% 내지 38mol%는 TFA염으로서 프로톤화된다.

- [0030] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 콘쥬게이트의 조성물(예컨대, 4개 팔 콘쥬게이트의 조성물)에 대하여, 조성물 내 활성제 아미노기의 약 35mol% 내지 65mol%는 TFA염으로서 프로톤화된다.
- [0031] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 콘쥬게이트의 조성물(예컨대, 4개 팔 콘쥬게이트의 조성물)에 대하여, 조성물 내 활성제 아미노기의 약 30mol% 내지 65mol%는 무기산 염(예를 들어 HCl 염)으로서 프로톤화된다.
- [0032] 또한 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 콘쥬게이트의 조성물(예컨대, 4개 팔 콘쥬게이트의 조성물)에 대하여, 조성물 내 활성제 아미노기의 약 32mol% 내지 60mol%는 무기산 염(예를 들어 HCl 염)으로서 프로톤화된다.
- [0033] 또한 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 콘쥬게이트의 조성물(예컨대, 4개 팔 콘쥬게이트의 조성물)에 대하여, 조성물 내 활성제 아미노기의 약 35mol% 내지 57mol%는 무기산 염(예를 들어 HCl 염)으로서 프로톤화된다.
- [0034] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 콘쥬게이트의 조성물(예컨대, 4개 팔 콘쥬게이트의 조성물)에 대하여, 조성물 내 활성제 아미노기의 약 25mol% 내지 40mol%는 무기산 염(예를 들어 HCl 염)으로서 프로톤화되고, 조성물 내 활성제 아미노기의 약 5mol% 내지 35mol%는 비프로톤화(즉, 유리 염기임)된다.
- [0035] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 콘쥬게이트의 조성물(예컨대, 4개 팔 콘쥬게이트의 조성물)에 대하여, 조성물 내 활성제 아미노기의 약 32mol% 내지 60mol%는 무기산 염(예를 들어 HCl 염)으로서 프로톤화되고, 조성물 내 활성제 아미노기의 약 5mol% 내지 35mol%는 비프로톤화(즉, 유리 염기임)된다.
- [0036] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 콘쥬게이트의 트리플루오로아세트산/염산 혼합 염이 제공되고, 상기 콘쥬게이트는 하기의 구조를 가지며,



- [0037]
- [0038] 여기서, n은 약 20 내지 약 500(약 40 내지 약 500을 포함함) 범위의 정수이다(상기 구조에서, 프로톤화 형태의 특정 염기성 질소 원자 및 해당하는 음이온은 나타나지 않았음에 주목한다). 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 직전에 상기한 구조에 포함된 콘쥬게이트 내 아미노기의 일부분은 프로톤화되지 않는다. 상기 및 본원에서 추가적으로 제공된 바와 같이 프로톤화 형태 및 비프로톤화 형태의 예시적인 몰 비율은 상기 콘쥬게이트에 적용된다.
- [0039] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 수용성 중합체-활성제 콘쥬게이트의 혼합 염을 제공하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 (i) 트리플루오로아세트산(TFA) 또는 다른 유기산 탈보호화 시약으로 처리함으로써 보호



된 형태인 아민 함유 활성제의 무기산 염을 탈보호하여 탈보호된 활성제 산성 염을 형성하는 단계, (ii) 단계 (i)의 탈보호된 활성제 산성 염을 염기(예컨대, 트리메틸 아민, 트리에틸 아민 및 디메틸아미노-피리딘)의 존재 하에 수용성 중합체 시약과 커플링시켜 중합체-활성제 콘쥬게이트를 형성하는 단계, 및 (iii) 중합체-활성제 콘쥬게이트를 회수하는 단계를 포함하고, 여기에서 상기 회수된 중합체-활성제 콘쥬게이트는 상기 콘쥬게이트 내에 개별적으로 유리 염기 형태(비프로톤화), 무기산 염 형태, 및 TFA 또는 다른 유기산 염 형태로 이루어진 군 으로부터 선택된 형태로 존재하는 활성제 아미노기를 가짐을 특징으로 한다. 본 발명의 하나 이상의 실시형태에 서, 상기 방법은 단계 (i)에서 형성된 탈보호된 산성 염에서 무기산 및 TFA의 상대적인 몰 양을 측정하는 단계 를 추가로 포함한다. 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 단계 (i)에서 무기산염은 하이드로할릭산 염, 예를 들어 염산 염이다. 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 단계 (ii)에서 염기의 양은 1.00 ~ 2.00(TFA의 몰수 + 산의 몰수)의 범위이다. 하나 이상의 관련 실시형태에서, 단계 (ii)에서 염기의 양은 1.00 ~ 1.50(TFA의 몰수 + 무기산의 몰수)의 범위이며, 여기에서 괄호는 곱셈을 나타낸다. 하나 이상의 관련 실시형태에서, 단계 (ii)에서 염기의 양은 1.00 ~ 1.20(TFA의 몰수 + 무기산의 몰수)의 범위이다. 하나의 특정 실시형태에서, 염기의 당량 수 는 1.05(TFA의 몰수 + 무기산의 몰수)이다.

[0040] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 수용성 중합체 시약은 활성화된 폴리에틸렌 글리콜 에스테르(즉, 적어도 하나의 활성화된 에스테르기를 가지는 폴리에틸렌 글리콜 시약)이다. 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 수 용성 중합체 시약은 3개 이상의 중합체 팔을 가지는 폴리에틸렌 글리콜 시약이다.

[0041] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 중합체-활성제 콘쥬게이트에서 활성제 아민기는 2차 아민기 및 3차 아민 기로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 활성제 아민기는 3차 아미노기이다. 또 다른 실시형태에서, 중합체-활성제 콘쥬게이트는 상응하는 콘쥬게이트 산으로서,  $pK_a$ 가 약 10 내지 11.5의 범위인 염기성 질소 원자를 포함한다.

[0042] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 활성제는 소분자, 펩티드 및 단백질로부터 선택된다. 본 발명의 하나 이 상의 실시형태에서, 활성제는 캄토테신이다. 예시적인 캄토테신 분자는 캄토테신, 이리노테칸 및 7-에틸-10-하 이드록시-캄토테신(SN-38)으로부터 선택된다. 수용성 중합체와의 공유 부착을 위한 예시적인 위치는 특히 캄토 테신 골격의 7-고리 위치, 10-고리 위치 및 20-고리 위치를 포함한다.

[0043] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 약학적으로 허용가능한 조성물이 제공되며, 상기 약학적으로 허용가능한 조성물은 (i) 본원에 기술된 임의의 하나 이상의 실시형태에 따른 혼합 염, 및 선택적으로 동결건조된 형태인 락테이트 완충제를 포함한다. 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 약학적으로 허용가능한 조성물은 멸균 조성 물이다. 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 약학적으로 허용가능한 조성물은 선택적으로 비콘쥬게이트 형태 로 이리노테칸 100mg 용량의 등가물을 함유하는, 선택적으로 용기(예컨대, 바이알) 내로 제공된다.

[0044] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 본원에 기술된 (활성제가 항암제인) 콘쥬게이트 함유 조성물을 하나 이상 유형의 암성 고형 종양으로 고통받는 개체에 투여하는 것을 포함하는 방법이 제공되며, 여기에서 콘쥬게이트 함 유 조성물은 선택적으로 5% w/w 텍스트로스의 용액에 용해된다. 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 투여는 정맥내 주입을 통하여 이루어진다.

[0045] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 수용성 중합체-활성제 콘쥬게이트의 혼합 염을 제조하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 (i) 트리플루오로아세트산(TFA)를 이용한 처리에 의하여 t-Boc 글리신-이리노테칸.HCl을 탈보호하여 탈보호된 글리신-이리노테칸 HCl/TFA 혼합 염을 형성하는 단계, (ii) 콘쥬게이트인 4개 팔-펜타에리 트리톨릴-폴리에틸렌 글리콜-카복시메틸 글리신-이리노테칸(또한 펜타에리트리톨릴-4개 팔-(PEG-1-메틸렌-2-옥 소-비닐아미노 아세테이트 연결-이리노테칸으로도 지칭됨)을 형성하기에 효과적인 조건 하에서 탈보호된 글리신 -이리노테칸 HCl/TFA 혼합 염을 염기의 존재시 4개 팔-펜타에리트리톨릴-폴리에틸렌 글리콜-카복시메틸 석신이 미드와 커플링시키는 단계, 및 (iii) 단계 (ii)의 콘쥬게이트를 회수하는 단계를 포함하고, 여기에서 상기 콘쥬 게이트는 유리 염기, HCl 및 TFA 염 형태와 조합하여 아민기를 포함하는 혼합 염이다. 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 상기 방법은 콘쥬게이트를 정제하는 단계(예컨대, 콘쥬게이트를 재결정화하여 재결정화된 콘쥬게 이트를 형성하는 단계를 포함함)를 추가로 포함한다. 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 재결정화 생성물이 제공되며, 재결정화 생성물은 유리 염기, HCl 및 TFA 염 형태의 조합으로서 존재하는 활성제 아미노기를 포함하 는 혼합 산성 염이다.

[0046] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 암으로 고통받는 포유동물을 치료하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 유 기 염기 및 프로톤화 형태로 아민 또는 다른 질소 함유 기를 가지는 캄토테신을 포함하는 수용성 중합체-캄토테 신 콘쥬게이트의 혼합 염의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하고, 각각의 프로톤화 형태는 강 무기산 및 트



리플루오로아세트산 중 하나의 산 부가 염으로서 존재한다. 혼합 산 염은 개체에서 고형 종양 성장을 둔화시키거나 억제시키는데 효과적일도록 포유동물에 투여된다. 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 암성 고형 종양은 대장암(colorectal cancer), 난소암, 자궁암, 유방암 및 비소세포폐암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

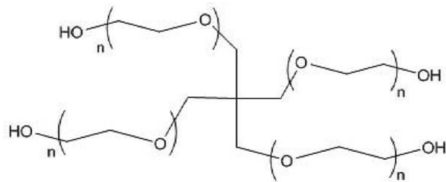
[0047] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 본원에 기술된 바와 같이 활성제 콘쥬게이트의 혼합 산성 염이 제공되며, 여기에서 활성제는 암 치료용 약제의 제조를 위한 항암제이다.

[0048] 다른 양태에서, 적합한 용매에서 이전에 분리된 알콕실화가능 올리고머를 알콕실화하여 알콕실화 중합체 생성물을 형성하는 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 상기 이전에 분리된 알콕실화가능 올리고머는 300달톤 초과(예컨대, 500달톤 초과)의 공지되고 한정된 중량 평균 분자량을 가진다.

[0049] 본 발명의 상기한 양태의 하나 이상의 실시형태에서, 상기 조성물은 적합한 용매에서 이전에 분리된 알콕실화가능 올리고머를 알콕실화하여 알콕실화 중합체 생성물을 형성하는 단계를 포함하는 방법으로 제조된 알콕실화 중합체 생성물을 포함하는 조성물이 제공되며, 이전에 분리된 알콕실화가능 올리고머는 300달톤 초과(예컨대, 500달톤 초과)의 공지되고 한정된 중량 평균 분자량을 가진다.

[0050] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 순도가 92중량% 초과인 알콕실화 중합체 생성물을 포함하는 조성물이 제공되며, 예를 들어 겔여과 크로마토그래피(GFC) 분석으로 결정된 바와 같이 고분자량 생성물 및 디올의 전체 합한 함량은 8중량% 미만(예컨대, 2중량% 미만)이다.

[0051] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 알콕실화 중합체 생성물은 하기 구조를 가지며,



[0052]

[0053] 여기에서, 각각의 n은 20 내지 1000(예컨대, 50 내지 1000)의 정수이다.

[0054] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, (i) 적합한 용매에서 이전에 분리된 알콕실화가능 올리고머를 알콕실화하여 알콕실화 중합체 물질을 형성하는 단계(여기에서, 이전에 분리된 알콕실화가능 올리고머는 300달톤 초과(예컨대, 500달톤 초과)의 공지되고 한정된 중량 평균 분자량을 가짐), 및 (ii) 선택적으로 알콕실화 중합체 생성물을 추가로 활성화시켜 중합체-약물 콘쥬게이트를 제조하는데 (특히) 중합체 시약으로서 유용한 활성화된 알콕실화 중합체 생성물을 제공하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0055] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 순도가 90% 초과인 알콕실화 중합체 생성물을 포함하는 조성물로부터 수득하고/수득하거나, 순도가 90% 초과인 알콕실화 중합체 생성물을 포함하는 조성물에 함유된 알콕실화 중합체 생성물을 활성화하여 중합체-약물 콘쥬게이트를 제조하는데 (특히) 중합체 시약으로서 유용한 활성화된 알콕실화 중합체 생성물을 제공하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0056] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 활성화된 알콕실화 중합체 생성물을 활성제와 콘쥬게이션하는 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 상기 활성화된 알콕실화 중합체 생성물은 순도가 90% 초과인 알콕실화 중합체 생성물을 포함하는 조성물로부터 수득하고/수득하거나, 순도가 90% 초과인 알콕실화 중합체 생성물을 포함하는 조성물에 함유된 알콕실화 중합체 생성물을 활성화함으로써 활성화된 알콕실화 중합체 생성물을 형성하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된다.

[0057] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 염기의 존재하에 아민 보유 활성제(예컨대, 탈보호된 글리신-이리노테칸)를 중합체 제제(예컨대, 4개 팔-펜타에리트리톨릴-폴리(에틸렌 글리콜)-카복실메틸 석신이미드)에 (콘쥬게이션 조건 하에서) 커플링시켜 콘쥬게이트를 형성하는 것에 의해 제조된, 수용성 중합체-활성제 콘쥬게이트의 혼합 염이 제공되며, 상기 콘쥬게이트는 혼합 염 콘쥬게이트(예컨대, 상기 콘쥬게이트는 질소 원자를 가지며, 질소 원자의 각각의 하나는 프로톤화되거나 프로톤화되지 않을 것이며, 임의의 주어진 프로톤화 아미노기는 2개의 상이한 음이온 중 하나를 가지는 산성 염)의 형태이고, 또한 선택적으로 중합체 시약은 본원에 기술된 바와 같이 제조된 알콕실화 생성물로부터 제조된다.

[0058] 본 방법, 조성물 등의 추가적인 실시형태는 하기 설명, 도면, 실시예 및 청구범위로부터 명백해질 것이다. 상기 및 하기 설명으로부터 이해될 수 있는 바와 같이, 본원에 기술된 각각 및 모든 특징, 이러한 특징의 2가지 이상

의 각각 및 모든 조합은, 이러한 조합에 포함된 특징이 상호 불일치하지 않는다면, 본 개시내용의 범주 내에 포함된다. 추가로, 임의의 특징 또는 특징의 조합은 본 발명의 임의의 실시형태로부터 특별히 배제될 수 있다. 본 발명의 추가적인 양태 및 이점은, 특히 수반된 실시예 및 도면과 함께 고려될 때, 하기 설명 및 청구범위에서 제시된다.

### 도면의 간단한 설명

[0059]

도 1은 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K의 3가지 상이한 샘플에 대한 스트레스 안정성 연구의 결과를 나타낸 그래프이며, 각각은 트리플루오로아세트산, 염산 염 및 유리 염기의 상대적인 양에 대하여 상이한 조성을 가진다. 시험한 샘플은 99% 초과 HCl 염(1% 미만의 유리 염기, 삼각형), 94% 전체 염(6% 유리 염기, 정사각형), 및 52% 전체 염(48% 유리 염기, 원)을 포함하였다. 샘플은 25℃ 및 60%의 상대 습도에서 저장되었고, 그래프는 실시예 3에 상세히 기술된 바와 같이 시간의 경과에 따른 화합물의 분해를 도시한다.

도 2는 40℃ 및 75%의 상대 습도에서 저장된 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K의 샘플에서 시간의 경과에 따른 유리 이리노데칸의 증가를 나타낸 그래프이며, 각각은 트리플루오로아세트산 및 염산염 및 유리 염기의 상대적인 양에 대하여 상이한 조성을 가진다. 시험한 샘플은 실시예 3에 기술된 바와 같이 99% 초과 HCl 염(1% 미만의 유리 염기, 정사각형)을 함유한 생성물 및 86% 전체 염(14% 유리 염기, 다이아몬드)을 함유한 생성물에 해당한다.

도 3은 실시예 3에 기술된 바와 같이 40℃ 및 75%의 상대 습도에서 저장된 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K의 샘플에서 작은 PEG 중(PEG 분해 생성물)의 시간의 경과에 따른 증가를 도시한다. 시험한 샘플은 99% 초과 HCl 염(1% 미만의 유리 염기, 정사각형)을 함유한 생성물 및 86% 전체 염(14% 유리 염기, 다이아몬드)을 함유한 생성물에 해당한다.

도 4는 실시예 5에 상세히 기술된 바와 같이 모노-이리노데칸으로 치환된 (DS-1), 디-이리노데칸으로 치환된 (DS-2), 트리-이리노데칸으로 치환된 (DS-3) 및 테트라-이리노데칸으로 치환된 (DS-4) 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K로부터 가수분해를 통한 이리노데칸의 방출을 보이는 크로마토그램의 오버레이의 모습이다.

도 5는 돼지 카복시펩티다아제 B의 존재하에 pH 8.4의 수성 완충액에서 상기 기술된 바와 같은 다양한 종의 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K의 가수분해 결과를 실시예 5에 기술된 바와 같이 가수분해 반응속도론 모델링 데이터와 비교하여 나타내는 그래프이다. 상기 반응속도론 모델에서, 모든 종의 가수분해는 1차 반응속도인 것으로 가정하였다. DS4( $0.36\text{hr}^{-1}$ )의 소멸에 대하여 일정한 1차 반응 속도를 사용하여 모든 곡선을 생성하였다.

도 6은 인간 혈장에서 상기 기술된 바와 같은 다양한 종의 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K의 가수분해를 가수분해 반응속도론 모델링 데이터와 비교하여 나타내는 그래프이다. 상세 내용은 실시예 5에 제공되어 있다. 운동속도론 모델에 대하여, 모든 종의 가수분해는 1차 반응속도인 것으로 가정하였다. DS 4( $0.26\text{hr}^{-1}$ )의 소멸에 대하여 일정한 1차 반응 속도를 사용하여 모든 곡선을 생성하였다.

도 7은 실시예 8에 기술된 바와 같이 제조된 물질의 겔 여과 크로마토그래피 후의 크로마토그램이다.

도 8은 실시예 9에 기술된 바와 같이 제조된 물질의 겔 여과 크로마토그래피 후의 크로마토그램이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0060]

이제 본 발명의 다양한 양태를 이하에서 보다 완전하게 기술할 것이다. 그러나, 이러한 양태는 다수의 다양한 형태로 구체화될 수 있고, 본원에서 설명된 실시형태로 한정하는 것으로 해석되어서는 안되며, 오히려 이들 실시형태는 본 개시내용을 철저하고 완전하게 하며, 당업자에게 본 발명의 범주를 완전히 전달하기 위하여 제공된다.

[0061]

“상기” 또는 “하기”에서 본원에 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 전체적으로 참조로 본원에 포함된다. 본 명세서의 교시 내용과 참고문헌에 포함된 기술간에 불일치가 있는 경우, 본 명세서 내 교시 내용의 의미가 우선할 것이다.

[0062]

본 명세서에서 사용된 단수 형태(“a”, “an” 및 “the”)는 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는다면 복수의 지시물을 포함한다. 따라서 예를 들어 “중합체”에 대한 언급은 단일 중합체뿐만 아니라 2개 이상의 동일 또는 상이한 중합체를 포함하고, “콘주게이트”에 대한 언급은 단일 콘주게이트뿐만 아니라 2개 이상의 동일 또는

상이한 콘주게이트를 지칭하며, “부형제”에 대한 언급은 단일 부형제뿐만 아니라 2개 이상의 동일 또는 상이한 부형제 등을 포함한다.

[0063] 본 발명을 설명하고 요구하는데 있어서, 다음 용어가 하기 기술된 정의에 따라서 사용될 것이다.

[0064] “작용기”는 유기 합성의 정상적인 조건 하에서 사용되어, 부착된 실체와 다른 실체(통상적으로 추가 작용기를 가짐) 사이에 공유 결합을 형성할 수 있는 기이다. 작용기는 일반적으로 다중 결합(들) 및/또는 헤테로원자(들)를 포함한다. 바람직한 작용기는 본원에 기술되어 있다.

[0065] 용어 “반응성”은 유기 합성의 통상적인 조건 하에서 용이하게 또는 실제의 속도로 반응하는 작용기를 지칭한다. 이는 반응하지 않거나 반응하기 위하여 강한 촉매 또는 비현실적인 반응 조건을 필요로 하는 기(즉, “비반응성” 기 또는 “불활성” 기)와 대조적이다.

[0066] “보호기”는 임의의 반응 조건 하에서 분자 내 특정한 화학적 반응성 작용기의 반응을 방지하거나 차단하는 부분이다. 보호기는 보호될 화학적 반응성기의 유형뿐만 아니라 이용될 반응 조건 및 분자 내 추가적인 반응성기 또는 보호기의 존재에 따라 다를 것이다. 보호될 수 있는 작용기는 예로서 카복실산기, 아미노기, 하이드록실기, 티올기, 카보닐기 등을 포함한다. 카복실산에 대한 대표적인 보호기는 에스테르(예를 들어 *p*-메톡시벤질 에스테르), 아미드 및 하이드라지드를 포함하고; 아미노기에 대한 대표적인 보호기는 카바메이트(예를 들어 *tert*-부톡시카보닐) 및 아미드를 포함하며; 하이드록실기에 대한 대표적인 보호기는 에테르 및 에스테르를 포함하고; 티올기에 대한 대표적인 보호기는 티오에테르 및 티오에스테르를 포함하며; 카보닐기에 대한 대표적인 보호기는 아세탈 및 케탈; 등을 포함한다. 이러한 보호기는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 예를 들어 문헌 [T.W. Greene 및 G.M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Third Edition, Wiley, New York, 1999], [P.J. Kocienski, *Protecting Groups*, Third Ed., Thieme Chemistry, 2003] 및 본원에 인용된 참고문헌에 기술되어 있다.

[0067] “보호된 형태”의 작용기는 보호기를 가지는 작용기를 지칭한다. 본원에서 사용된 용어 “작용기” 또는 임의의 동의어는 작용기의 보호된 형태를 포함하는 것으로 의미된다.

[0068] 본원에 사용된 “PEG” 또는 “폴리(에틸렌 글리콜)”은 임의의 수용성 폴리(에틸렌 옥사이드)를 포함하는 것으로 의미된다. 통상적으로, 본 발명에서의 사용을 위한 PEG는, 예컨대 합성 변형 동안 말단 산소(들)가 대체되었는지 여부에 따라서 “-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-” 또는 “-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n-1</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-”의 2개 구조 중 하나를 포함할 것이다. 변수(n)는 3 내지 약 3000의 범위이고, 전체 PEG의 말단기 및 구조는 다양할 수 있다.

[0069] 수용성 중합체는 하나 이상의 “말단 캡핑기”를 가질 수 있으며, 이 경우에 수용성 중합체가 “말단 캡핑”된 것으로 말할 수 있다. 말단 캡핑기에 관하여, 예시적인 말단 캡핑기는 일반적으로 탄소 함유기 및 수소 함유기이며, 통상적으로 1개 내지 20개의 탄소 원자 및 상기 기에 공유 결합된 산소 원자로 이루어진다. 이에 관하여, 상기 기는 통상적으로 알콕시(예컨대, 메톡시, 에톡시 및 벤질옥시)이고, 탄소 함유기에 대하여 선택적으로 포화 또는 불포화 형태뿐만 아니라 아릴, 헤테로아릴, 사이클로, 헤테로사이클로, 및 상기한 임의의 것의 치환된 형태일 수 있다.

[0070] 말단 캡핑기는 또한 검출가능한 표지를 포함할 수 있다. 중합체가 검출가능한 표지를 포함하는 말단 캡핑기를 가질 때, 중합체 및/또는 중합체가 부착되는 부분(예컨대, 활성제)의 양 또는 위치는 적합한 검출기를 사용함으로써 측정될 수 있다. 이러한 표지는 이에 제한되지 않지만, 형광 물질, 화학 발광 물질, 효소 표지화에 사용된 부분, 비색물질(예컨대, 염료), 금속 이온, 방사성 부분 등을 포함한다.

[0071] 본 발명의 중합체의 내용에서 “수용성” 또는 “수용성 중합체 부분”은 실온에서 적어도 35중량%, 바람직하게는 70중량% 초과, 보다 바람직하게는 95중량% 초과가 물에 용해하는 임의의 부분 또는 중합체이다. 통상적으로, 수용성 중합체 또는 부분은 여과 후 동일 용액을 통과하는 빛의 적어도 약 75%, 보다 바람직하게는 적어도 약 95%를 통과시킬 것이다.

[0072] 특정 작용기와 결합되어 사용될 때 용어 “활성화된”은 다른 분자 상의 친전자체 또는 친핵체와 용이하게 반응하는 반응성 작용기를 지칭한다. 이는 반응하기 위하여 강염기 또는 매우 비현실적인 반응 조건을 필요로 하는 기(즉, “비반응성” 기 또는 “불활성” 기)와 대조적이다.

[0073] “친전자체”는 친전자성 중심을 가지는, 즉 전자를 추적하거나 또는 친핵체와 반응할 수 있는 중심을 가진 이온 또는 원자, 또는 중성 또는 이온성 원자 집합을 지칭한다.

- [0074] “친핵체”는 친핵성 중심을 가지는, 즉 친전자성 중심을 추적하거나 또는 친전자체와 반응할 수 있는 중심을 가진 이온 또는 원자, 또는 중성 또는 이온성 원자 집합을 지칭한다.
- [0075] 용어 “보호된” 또는 “보호기” 또는 “보호성 기”는 임의의 반응 조건 하에서 분자 내 특정한 화학적 반응성 작용기의 반응을 방지하거나 차단하는 부분(즉, 보호기)의 존재를 지칭한다. 보호기는 보호될 화학적 반응성기의 유형뿐만 아니라 이용될 반응 조건 및 분자 내 추가적인 반응성기 또는 보호기의 존재에 따라 다를 것이다. 당업계에 알려져 있는 보호기는 문헌[Greene, T.W., *et al.*, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York, NY (1999)]에서 찾아볼 수 있다.
- [0076] 수용성 중합체, 예를 들어 PEG의 내용에서 “분자량”은 통상적으로 크기 배제 크로마토그래피, 광산란 기법, 또는 1,2,4-트리클로로벤젠과 같은 유기 용매 중의 고유점도 측정에 의해 측정된 중합체의 중량 평균 분자량을 지칭한다.
- [0077] 용어 “스페이서” 또는 “스페이서 부분”은 본원에서 선택적으로 일련의 단량체 및 친전자체의 말단과 같은 상호연결 부분을 연결하는데 사용되는 원자 또는 원자의 집합을 지칭하는데 사용된다. 본 발명의 스페이서 부분은 가수분해에 안정적일 수 있거나 또는 생리학적으로 가수분해될 수 있거나 효소로 분해가능한 연결을 포함할 수 있다.
- [0078] “가수분해가능한” 연결은 생리적 조건 하에서 물과 반응하는(즉, 가수분해되는) 비교적 불안정한 결합이다. 물에서 가수분해하는 결합의 경향은 2개 중심 원자를 연결하는 연결의 일반적 유형뿐만 아니라 이들 중심 원자에 부착된 치환기에 좌우될 것이다. 예시적인 가수분해 불안정 연결은 카복실레이트 에스테르, 포스페이트 에스테르, 무수물, 아세탈, 케탈, 아실옥시알킬 에테르, 이민, 오르토에스테르, 펩티드 및 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0079] “효소로 분해가능한 연결”은 하나 이상의 효소에 의해 분해되는 연결을 의미한다.
- [0080] “가수분해에 안정적”인 연결 또는 결합은 실질적으로 물에서 안정적인, 다시 말해서 오랜 기간 동안 임의의 감지가능한 정도로 생리적 조건 하에서 가수분해를 겪지 않는 화학적 결합을 지칭한다. 가수분해에 안정적인 연결의 예는 이에 제한되지 않지만, 탄소-탄소 결합(예컨대, 지방족 사슬에서), 에테르, 아마이드, 우레탄 등을 포함한다. 일반적으로, 가수분해에 안정적인 연결은 생리적 조건 하에서 1일당 약 1% 내지 2% 미만의 가수분해율을 보이는 것이다. 대표적인 화학 결합의 가수분해율은 대부분의 표준 화학 교과서에서 찾아볼 수 있다.
- [0081] 중합체의 기하학적 구조 또는 전체적인 구조와 관련하여 “다중 팔”은 “코어” 분자 또는 구조에 연결된 3개 이상의 중합체 함유 “팔”을 가지는 중합체를 지칭한다. 따라서, 다중 팔 중합체는 3개 중합체 팔, 4개 중합체 팔, 5개 중합체 팔, 6개 중합체 팔, 7개 중합체 팔, 8개 이상의 중합체 팔을 가질 수 있으며, 이는 다중 팔 중합체의 배열 및 코어 구조에 따라 좌우될 수 있다. 다중 팔 중합체의 하나의 특정 유형은 단일 덴드리머 분자 내에 적어도 3개 분지의 개시 코어, 2 이상의 내부 분지 다중성, 2 이상의 세대, 및 적어도 25개의 표면 기를 가지는 수지상 중합체 또는 고분지(hyperbranched) 중합체로서 지칭되는 고도로 분지된 중합체이다. 본원에서의 목적을 위하여, 덴드리머는 다중 팔 중합체의 구조와는 별개의 구조를 가지는 것으로 간주된다. 다시 말하면, 본원에서 지칭되는 다중 팔 중합체는 명시적으로 덴드리머를 배제한다. 추가적으로 본원에서 제공되는 다중 팔 중합체는 비가교결합 코어를 가진다.
- [0082] “덴드리머” 또는 “고분지 중합체”는, 모든 결합이 규칙적인 분지 패턴 및 각각 분지점을 제공하는 반복 단위를 가지는 중심 결절점(focal point) 또는 코어로부터 방사상으로 나오는 구형인, 크기 단분산 중합체이다. 덴드리머는 반드시 아니지만 통상적으로 나노규모의 다단계 제작 공정을 사용하여 형성된다. 각각의 단계는 이전 세대의 2배 이상의 복잡성을 가지는 새로운 “세대”를 형성한다. 덴드리머는 특정한 수지상 상태 특성, 예를 들어 코어 캡슐화, 덴드리머를 다른 유형의 중합체와는 구별되게 만드는 것을 나타낸다.
- [0083] “분지점”은, 중합체가 하나 이상의 추가적인 중합체 팔로 선형 구조로부터 분리하거나 분지하는 하나 이상의 원자를 포함하는 분기점을 지칭한다. 다중 팔 중합체는, 분지가 덴드리머를 형성하는 규칙적인 반복이 아닌 한, 하나의 분지점 또는 다중 분지점을 가질 수 있다.
- [0084] “실질적으로” 또는 “필수적으로”는 거의 전부 또는 완전히, 예를 들어 어떤 주어진 양의 95% 이상을 의미한다.
- [0085] “알킬”은 길이가 약 1개 내지 20개 원자의 범위인 탄화수소 사슬을 지칭한다. 이러한 탄화수소 사슬은 반드시 아니지만 바람직하게 포화형이고, 분지형 또는 직쇄일 수 있다. 예시적인 알킬 기는 메틸, 에틸,



이소프로필, n-부틸, n-펜틸, 2-메틸-1-부틸, 3-펜틸, 3-메틸-3-펜틸 등을 포함한다.

- [0086] “저급 알킬”은 메틸, 에틸, n-부틸, i-부틸 및 t-부틸로 예시되는 바와 같이, 1개 내지 6개 탄소 원자를 포함하는 알킬기를 지칭하며, 직쇄 또는 분지형일 수 있다.
- [0087] “사이클로알킬”은 가교, 융합 또는 스피로 사이클릭 화합물을 포함하며, 바람직하게는 3개 내지 약 12개 탄소 원자, 보다 바람직하게는 3개 내지 약 8개 탄소 원자로 구성된 포화된 사이클릭 탄화수소 사슬을 지칭한다.
- [0088] “비간섭 치환기”는 분자에 존재할 때, 통상적으로 분자 내에 포함된 다른 작용기와 비반응성인 기이다.
- [0089] 예를 들어 “치환된 알킬”에서와 같이 용어 “치환된”은 하나 이상의 비간섭 치환기, 이에 제한되지 않지만 예를 들어 C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 사이클로알킬, 예컨대 사이클로프로필, 사이클로부틸 등; 할로, 예컨대 플루오로, 클로로, 브로모 및 요오도; 시아노; 알콕시, 저급 페닐; 치환된 페닐 등으로 치환된 부분(예컨대, 알킬기)을 지칭한다. 페닐 고리 상의 치환기에 대하여, 치환기는 임의의 배향(orientation)(즉, 오르토, 메타 또는 파라)일 수 있다.
- [0090] “알콕시”는 -O-R 기를 지칭하며, 여기에서 R은 알킬 또는 치환된 알킬, 바람직하게는 C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 알킬(예컨대, 메톡시, 에톡시, 프로필옥시 등), 바람직하게는 C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 알킬이다.
- [0091] 본원에서 사용된 “알케닐”은 예를 들어 에틸닐(비닐), 2-프로펜-1-일(알릴), 이소프로페닐, 3-부텐-1-일 등과 같이 적어도 하나의 이중 결합을 포함하는 길이가 1개 내지 15개 원자인 분지 및 비분지 탄화수소기를 지칭한다.
- [0092] 본원에서 사용된 용어 “알키닐”은 예를 들어 에틸닐, 1-프로피닐, 3-부틴-1-일, 1-옥틴-1-일 등과 같이 적어도 하나의 삼중 결합을 포함하는 길이가 2개 내지 15개 원자인 분지 및 비분지 탄화수소기를 지칭한다.
- [0093] 용어 “아릴”은 최대 14개까지의 탄소 원자를 가지는 방향족기를 의미한다. 아릴 기는 페닐, 나프틸, 비페닐, 페난트레세닐, 나프타세닐 등을 포함한다.
- [0094] “치환된 페닐” 및 “치환된 아릴”은 각각 할로(F, Cl, Br, I), 하이드록실, 시아노, 니트로, 알킬(예컨대, C<sub>1-6</sub> 알킬), 알콕시(예컨대, C<sub>1-6</sub> 알콕시), 벤질옥시, 카복시, 아릴 등으로부터 선택된 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개(예컨대, 1개 내지 2개, 1개 내지 3개, 1개 내지 4개 또는 1개 내지 5개 치환기)로 치환된 페닐기 및 아릴기를 나타낸다.
- [0095] 무기산은 탄소 원자가 없는 산이다. 예로는 하이드로할릭산, 질산, 황산, 인산 등을 포함한다.
- [0096] “하이드로할릭산”은 할로젠화 수소, 예를 들어 불화수소산(HF), 염산(HCl), 브롬화수소산(HBr) 및 요오드화수소산(HI)을 의미한다.
- [0097] “유기산”은 하나 이상의 카복시기(-COOH)를 가지는 임의의 유기 화합물(즉, 적어도 하나의 탄소 원자를 가지는 화합물)을 의미한다. 일부 구체적인 예는 포름산, 락트산, 벤조산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 디클로로아세트산, 트리클로로아세트산, 혼합된 클로로플루오로아세트산, 시트르산, 옥살산 등을 포함한다.
- [0098] 본원에서 사용된 “활성제”는 생체내 또는 시험관내에서 입증될 수 있는 일부 약리학적 효과, 종종 유익한 효과를 제공하는 임의의 제제, 약물, 화합물 등을 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 이들 용어는 환자 내에서 국부적 또는 전신적 효과를 생성하는 임의의 생리학적 또는 약리학적 활성 물질을 추가로 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이 특히 본원에 기술된 합성 접근법과 관련하여, “활성제”는, 생체내 투여 시 모(parent) “생물활성” 분자가 방출되도록 하는, 활성제의 유도체화된 형태 또는 링커 변형된 형태를 포함하는 것으로 의도된다.
- [0099] “약학적으로 허용되는 부형제” 및 “약학적으로 허용되는 담체”는 활성제를 포함하는 조성물 내에 포함될 수 있고 환자에게 어떤 유의한 불리한 독성 효과도 야기하지 않는 부형제를 지칭한다.
- [0100] “약리학적 유효량”, “생리학적 유효량” 및 “치료적 유효량”은 혈류 또는 표적 조직 또는 체내 부위에서 활성제 및/또는 콘주게이트의 원하는 수준을 제공하는데 필요한 약학 제제물 내에 존재하는 활성제의 양을 의미하는 것으로 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 정확한 양은 다수의 인자, 예컨대 특정 활성제, 약학 제제물의 성분 및 물리적 특성, 의도된 환자 집단, 및 환자의 고려 사항에 좌우될 것이며, 이는 본원에 제공되고 관련 문헌에서 이용가능한 정보에 기초하여 당업자가 용이하게 결정할 수 있다.
- [0101] 중합체 내용에서 “다작용성”은 3가지 이상의 작용기를 가지는 중합체를 의미하며, 상기 작용기는 동일 또는

상이할 수 있고, 통상적으로 중합체 말단에 존재한다. 다작용성 중합체는 통상적으로 약 3개 내지 100개의 작용기, 또는 3개 내지 50개의 작용기, 또는 3개 내지 25개의 작용기, 또는 3개 내지 15개의 작용기, 또는 3개 내지 10개의 작용기를 포함할 것이며, 즉 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 작용기를 포함한다.

[0102] “2관능성” 및 “2작용성”은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 통상적으로 중합체 말단에서 중합체 내에 포함된 2개의 작용기를 가지는 중합체와 같은 실체를 의미한다. 작용기가 동일할 경우, 상기 실체는 호모2관능성 또는 호모2작용성으로 말한다. 작용기가 상이할 경우, 상기 실체는 헤테로2관능성 또는 헤테로2작용성으로 말한다.

[0103] 본원에 기술된 염기성 또는 산성 반응물은 이의 중성, 하전 및 임의의 해당하는 염 형태를 포함한다.

[0104] 용어 “개체”, “개인” 및 “환자”는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 척추동물, 바람직하게는 포유동물을 지칭한다. 포유동물은 이에 제한되지 않지만, 쥐과 동물, 설치류, 원숭이, 사람, 가축, 스포츠용 동물 및 애완동물을 포함한다. 이러한 개체는 통상적으로 본원에 기술된 바와 같은 수용성 중합체-활성제 콘주게이트의 투여에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 이상을 겪고 있거나 이상이 생기기 쉽다.

[0105] 특히 주어진 양과 관련하여, 용어 “약”은 +5% 또는 -5%의 편차를 포함하는 것으로 의미된다.

[0106] 특정 이상의 “치료” 및 “치료하는”은 (1) 상기 이상을 예방하는 것, 즉 이상에 노출될 수 있거나 이상에 쉽게 걸릴 수 있지만 아직 이상을 경험하지 않거나 이상을 나타내지 않은 개체에서 이상이 나타나지 않도록 하거나, 또는 더 작은 강도 또는 더 낮은 정도로 일어나도록 하는 것, 및 (2) 이상을 억제하는 것, 즉 이상의 진행을 막는 것 또는 이상을 반전시키는 것을 포함한다.

[0107] “선택적인” 또는 “선택적으로”는 이후에 기술되는 상황이 필요할 수 있지만 반드시 필요한 것은 아니어서, 기술은 상황이 일어나는 경우 및 상황이 일어나지 않는 경우를 포함하는 것을 의미한다.

[0108] “소분자”는, 통상적으로 분자량이 약 1000달톤 미만, 바람직하게는 약 800달톤 미만인 유기, 무기 또는 유기 금속 화합물이다. 본원에서 지칭되는 바와 같이 소분자는 분자량이 약 1000 미만인 올리고펩티드 및 다른 생체 분자를 포함한다.

[0109] “펩티드”는 약 13개 내지 50개 정도의 아미노산으로 구성된 분자이다. 올리고펩티드는 통상적으로 약 2개 내지 12개의 아미노산을 포함한다.

[0110] 분명하게 반대로 명시되어 있지 않다면, 본원에서 사용된 용어 “부분적 혼합 염” 및 “혼합 염”은 상호교환적으로 사용되고, 중합체 콘주게이트(및 다수의 이러한 중합체 콘주게이트를 포함하는 해당하는 조성물)의 경우에 콘주게이트 및 하나 이상의 염기성 아미노(또는 다른 염기성 질소 함유)기를 포함하는 조성물을 지칭하며, 여기에서 (i) 콘주게이트 또는 콘주게이트 조성물 내 염기성 아미노기 중 임의의 주어진 하나는 비프로톤화되거나 또는 프로톤화되고 (ii) 임의의 주어진 프로톤화 염기성 아미노기에 대하여, 프로톤화 염기성 아미노기는 2개의 상이한 반대이온 중 하나를 가질 것이다. (용어 “부분적 혼합 염”은 화합물 또는 조성물 내 모든 아미노기가 프로톤화되지 않아서, 조성물이 “부분적인” 염인 특징을 지칭하는 한편, “혼합”은 다양한 반대이온의 특징을 지칭한다) 본원에 제공된 혼합 염은 수화물, 용매화합물, 비결정질 형태, 결정질 형태, 다형체, 이성질체 등을 포함한다.

[0111] “유리 염기” 형태인 아민(또는 다른 염기성 질소)기는 아민기, 즉 1차, 2차, 3차 아민이 유리 전자쌍을 가지는 것이다. 상기 아민은 중성이며, 즉 비하전된 것이다.

[0112] “프로톤화 형태”인 아민기는, 아민기가 양으로 하전되도록 프로톤화 아민으로서 존재한다. 본원에 사용된 바와 같이, 프로톤화된 아민기는 또한 무기산 또는 유기산과 같은 산과 아민의 반응으로 생성된 산 부가 염의 형태일 수 있다.

[0113] 활성제의 아미노기의 “mol%”는 하나의 특정 형태 또는 다른 형태로 중합체 콘주게이트에 포함된 활성제 분자 내 아미노기의 분획 또는 백분율을 지칭하며, 콘주게이트 내 아미노기의 전체 mol%는 100%이다.

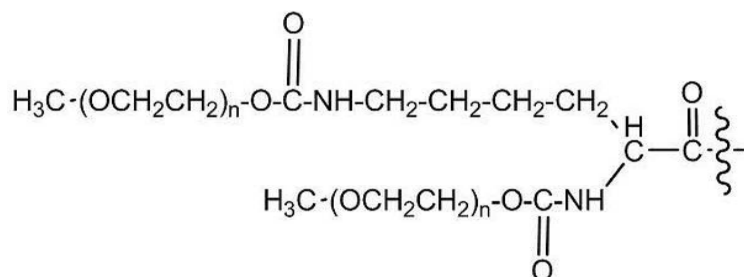
[0114] 본원에서 사용된 “psi”는 제곱인치 당 파운드를 의미한다.

[0115] 개관: 혼합 염 콘주게이트, 알콕실화 방법, 및 알콕실화 방법을 사용하여 중합체 생성물로부터 제조된 중합체 시약으로부터 제조된 콘주게이트(및 이의 혼합 염 형태)의 조성물

- [0116] 혼합 염: 앞서 나타낸 바와 같이, 본 발명의 하나 이상의 양태에서, 수용성 중합체 및 활성제 콘주게이트가 제공되며, 여기에서 상기 콘주게이트는 혼합 염의 형태이다. 이러한 콘주게이트는 신규 고체 상태의 형태를 나타내고, 콘주게이트의 형성에서 염기를 이용한 처리에도 불구하고, 콘주게이트는 혼합 염으로서 침전된다는 발견에 적어도 부분적으로 기초한다. 게다가, 콘주게이트는 혼합 염으로서 확실하고 재생가능하게 생성될 수 있으며, 이 때 콘주게이트 내(및 콘주게이트의 활성제 성분 내) 임의의 주어진 염기성 질소 원자는 다양한 형태 중 하나에 존재한다는 것이 발견되었다. 구체적으로, 본원에 제공된 콘주게이트는 활성제 염기성 질소 원자, 예컨대 아미노기를 가지며, 상기 질소 원자 각각은 프로톤화 또는 비프로톤화될 것이고, 이때 임의의 주어진 프로톤화 아미노기는 하나 이상의 상이한 음이온을 가지는 산성 염이다. 게다가, 콘주게이트의 혼합 염 형태는, 콘주게이트의 유리 염 또는 단일 산성 염 형태에 상응하는 것과 비교할 때 여러 가지 예측하지 못한 유리한 특성(즉, 중합체 백본의 분해에 대하여 보다 큰 안정성, 보다 큰 가수분해 안정성 등)을 가진다는 것이 발견되었다.
- [0117] 알콕실화 방법: 또한 앞서 나타낸 바와 같이, 본 발명의 하나 이상의 양태에서, 적합한 용매에서 이전에 분리된 알콕실화가능 올리고머를 알콕실화하여 알콕실화 중합체 생성물을 형성하는 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 여기에서 상기 이전에 분리된 알콕실화가능 올리고머는 300달톤 초과(예컨대, 500달톤 초과)의 공지되고 한정된 중량 평균 분자량을 가진다. 다른 이점 중에서, 본원에서 제공된 알콕실화 방법은 이미 공지된 방법에 의해 제조된 중합체 생성물 보다 우수한(예컨대, 굳기 및 순도에 관해서) 중합체 생성물을 생성한다. 하나 이상의 실시 형태에서, 본 알콕실화 방법에 의해 형성된 중합체는 본원에 기술된 바와 같이 혼합 산성 염을 제조하는데 유리하게 사용될 수 있다.
- [0118] 알콕실화 방법을 사용하여 중합체 생성물로부터 제조된 중합체 시약으로부터 제조된 콘주게이트(및 이의 혼합 염 형태)의 조성물: 또한 앞서 나타낸 바와 같이, 본 발명의 하나 이상의 양태에서, 수용성 중합체 활성제 콘주게이트의 혼합 염이 제공되며, 여기에서 상기 콘주게이트는 염기의 존재하에 (콘주게이션 조건 하에서) 아민 보유 활성제(예컨대, 탈보호된 글리신-이리노테칸)를 중합체 시약(예컨대, 4개 팔 펜타에리트리톨릴-폴리(에틸렌 글리콜)-카복시메틸 석신이미드)과 커플링시켜 콘주게이트를 형성함으로써 제조되며, 상기 콘주게이트는 혼합 염 콘주게이트(예컨대, 상기 콘주게이트는 질소 원자를 가지며, 질소 원자 각각은 프로톤화되거나 비프로톤화될 것이고, 임의의 주어진 프로톤화 아미노기는 2개의 상이한 음이온 중 하나를 가지는 산성 염임)이고, 또한 선택적으로 중합체 시약은 본원에 기술된 바와 같이 제조된 알콕실화 생성물로부터 제조된다.
- [0119] **콘주게이트 - 중합체 개괄**
- [0120] (취한 구체적인 형태(예컨대, 염기 형태, 염 형태, 혼합 염 등)에 관계없이) 수용성 중합체-활성제 콘주게이트는 수용성 중합체를 포함한다. 통상적으로, 콘주게이트를 형성하기 위하여, 중합체 시약의 형태인 수용성 중합체는 활성제 내에 포함된 친전자체 또는 친핵체에서 (콘주게이션 조건 하에서) 활성제와 커플링된다. 예를 들어, (다시 예컨대 활성화 에스테르를 가지는 중합체 시약의 형태로) 수용성 중합체는 하나 이상의 염기성 아민기(또는 다른 염기성 질소 원자), 즉 pK가 약 7.5 내지 약 11.5(콘주게이션 후에 측정됨)인 아민을 가지는 활성제와 커플링될 수 있다.
- [0121] 콘주게이트의 수용성 중합체 성분은 통상적으로 수용성인 비펩티드 중합체이다. 대표적인 중합체는 폴리(알킬렌 글리콜), 폴리(올레핀 알코올), 폴리(비닐피롤리딘), 폴리(하이드록시알킬메타크릴아미드), 폴리(하이드록시알킬메타크릴레이트), 폴리(사카라이드), 폴리( $\alpha$ -하이드록시산), 폴리(아크릴산), 폴리(비닐 알코올), 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리(N-아크릴로일모르폴린), 또는 이의 공중합체 또는 삼량체를 포함한다. 하나의 특정 수용성 중합체는 반복 단위  $(CH_2CH_2O)_n$ -를 포함하는 폴리에틸렌 글리콜 또는 PEG이며, n은 3 내지 약 2700 또는 이를 상회하거나, 바람직하게는 약 25 내지 약 1300의 범위이다. 통상적으로 부분적 혼합 산성 염에서 수용성 중합체의 중량 평균 분자량은 약 100달톤 내지 약 150,000달톤의 범위이다. 콘주게이트에 대한 예시적인 전체 분자량은 약 800달톤 내지 약 80,000달톤, 또는 약 900달톤 내지 약 70,000달톤의 범위일 수 있다. 추가적인 대표적 분자량 범위는 순간 부분적 혼합 염의 더 높은 분자량 실시형태에 대하여 약 1,000달톤 내지 약 40,000달톤, 또는 약 5,000달톤 내지 약 30,000달톤, 또는 약 7500달톤 내지 약 25,000달톤, 또는 심지어 약 20,000달톤 내지 약 80,000달톤이다.
- [0122] 수용성 중합체는 선형, 분지형, 분기형을 포함하여 다수의 기하학적 구조 또는 형태 중 임의의 것일 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 중합체는 종종 선형 또는 다중 팔형이다. 수용성 중합체는 단순히 수용성 중합체로서 상업적으로 얻을 수 있다. 추가적으로, 수용성 중합체는 (선택적으로 추가 변형 또는 활성화 없이 활성제와 커플링될 수 있다).

플링될 수 있는) 중합체 시약으로서 활성화된 형태로 편리하게 얻을 수 있다. 수용성 중합체 및 중합체 시약의 설명은 문헌[Nektar Advanced PEGylation Catalog, 2005-2006, "Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation"]에서 찾아볼 수 있으며, 특히 NOF 사 및 JenKem Technology USA로부터 구입할 수 있다.

[0123] 분지형 패턴으로 2개의 중합체 팔을 가지는 예시적인 분지형 중합체는 하기의 것이며, 이는 종종 PEG-2 또는 mPEG-2로 지칭되며,

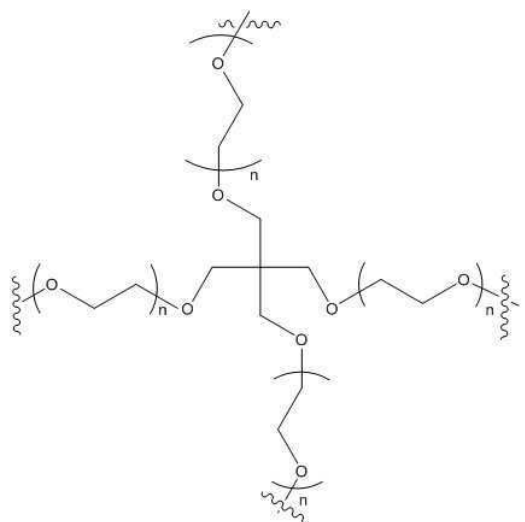


[0124]

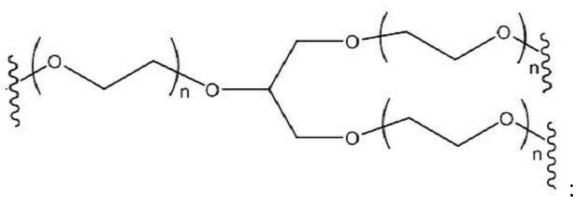
[0125] 여기에서 "3" 는 활성제 내에 포함된 친전자체 또는 친핵체와의 반응에 적합한 임의의 작용기를 형성하는 추가적인 원자에 대한 위치를 나타낸다. 예시적인 작용기는 NHS 에스테르, 알데히드 등을 포함한다.

[0126] 변수 “n”을 포함하는 본원에 기술된 중합체 구조에 대하여, 이러한 변수는 정수에 해당하며 중합체의 반복 단량체 구조 내 단량체 서브유닛의 수를 나타낸다.

[0127] 콘주게이트를 제조하는데 있어서 사용에 대하여 예시적인 구조는 예를 들어 3개, 4개, 5개, 6개 또는 8개 중합체 팔을 가지는 다중 팔 수용성 중합체 시약이며, 각각의 중합체 팔은 최적으로 작용기를 가진다. 다중 팔 중합체 시약은 중합체 팔이 나오는 다수의 코어(예컨대, 폴리올 코어) 중 임의의 것을 가질 수 있다. 예시적인 폴리올 코어는 글리세롤, 글리세롤 이량체(3,3'-옥시디프로판-1,2-디올) 트리메틸올프로판, 당(예를 들어 소르비톨 또는 펜타에리트리톨, 펜타에리트리톨 이량체), 및 글리세롤 올리고머, 예컨대 핵사글리세롤 또는 3-(2-하이드록시-3-(2-하이드록시에톡시)프로폭시)프로판-1,2-디올, 및 다른 글리세롤 축합 생성물을 포함한다. 예시적인 코어 및 이로부터 나오는 중합체 팔은 하기 화학식의 것일 수 있다:

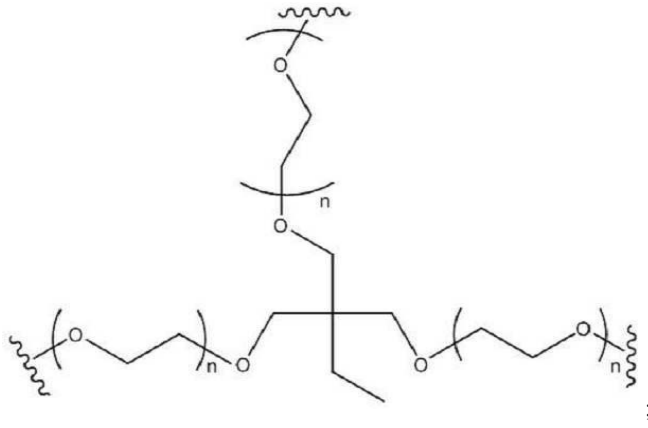


[0128]

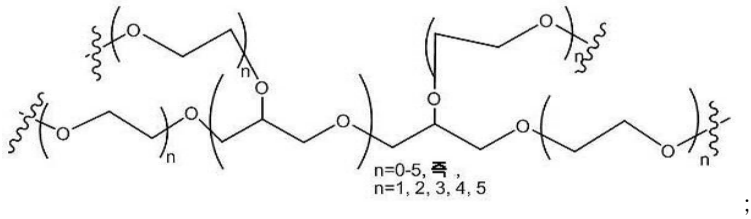


[0129]

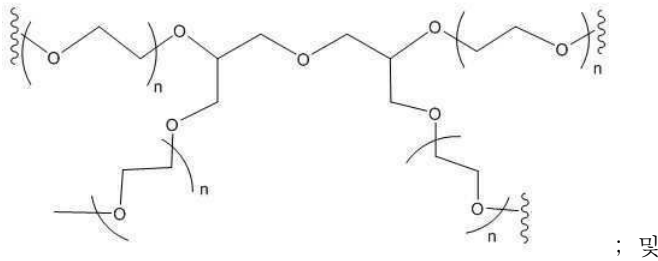




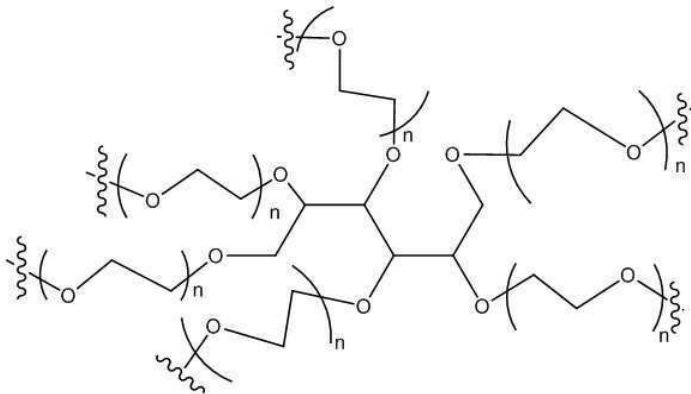
[0130]



[0131]



[0132]



[0133]

[0134] 예시적인 실시형태에서, 수용성 중합체는 상기 나타난 바와 같이 4개 팔 중합체이며, n은 약 20 내지 약 500, 또는 약 40 내지 약 500의 범위일 수 있다.

[0135] 본원에 기술된 다중 팔 실시형태에서, 각각의 중합체 팔은 통상적으로 200달톤, 250달톤, 300달톤, 400달톤, 500달톤, 600달톤, 700달톤, 800달톤, 900달톤, 1000달톤, 1500달톤, 2000달톤, 3000달톤, 4000달톤, 5000달톤, 6000달톤, 7000달톤, 7500달톤, 8000달톤, 9000달톤, 10000달톤, 12,000달톤, 15000달톤, 17,500달톤, 18,000달톤, 19,000달톤, 20,000달톤 이상 중 하나 이상에 해당하는 분자량을 가진다. 본원에 기술된 다중 팔 중합체 배열에 대한 전체적인 분자량(다시 말하면, 전체로서 다중 팔 중합체의 분자량)은 일반적으로 800, 1000, 1200, 1600, 2000, 2400, 2800, 3200, 3600, 4000, 5000, 6000, 8000, 10,000, 12,000, 15,000, 16,000, 20,000, 24,000, 25,000, 28,000, 30,000, 32,000, 36,000, 40,000, 45,000, 48,000, 50,000, 60,000, 80,000 또는 100,000 이상 중 하나에 해당한다.

[0136] 수용성 중합체, 예컨대 PEG는 개재 링커(intervening linker)를 통하여 활성제에 공유적으로 연결될 수 있다. 링커는 임의의 수의 원자를 포함할 수 있다. 일반적으로 말해서, 링커는 약 1개 원자 내지 약 50개 원자; 약 1

개 원자 내지 약 25개 원자; 약 3개 원자 내지 약 12개 원자; 약 6개 원자 내지 약 12개 원자; 및 약 8개 원자 내지 약 12개 원자의 범위 중 하나 이상을 만족하는 원자 길이를 가진다. 원자 사슬 길이를 고려할 때에는, 전체적인 거리에 기여하는 원자만 고려한다. 예를 들어, 구조  $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$ 를 가지는 링커는, 치환기가 링커의 길이에 상당히 기여하지 않은 것으로 간주되므로 11개 원자의 사슬 길이를 가지는 것으로 간주된다. 예시적인 링커는 2작용성 화합물, 예를 들어 아미노산(예컨대, 알라닌, 글리신, 이소류신, 류신, 페닐알라닌, 메티오닌, 세린, 시스테인, 사르코신, 발린, 리신 등)을 포함한다. 아미노산은 자연적으로 생성되는 아미노산 또는 비자연적으로 생성되는 아미노산일 수 있다. 적합한 링커는 또한 올리고펩티드를 포함한다.

[0137] 부착된 PEG 사슬이 있는 중합체 코어를 예시하기 위하여 상기에 다중 팔 구조를 우선 나타내었으며, 명백히 나타내지 않았지만 활성제의 성질 및 이용된 부착물의 화학 성질에 따라서, 최종 구조는 선택적으로 각각의 중합체 팔의 말단에서 산소 원자에 부착되는 추가적인 에틸렌기  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 를 포함할 수 있고/있거나 선택적으로 다수의 개재 링커 원자 중 임의의 것을 포함하여 활성제에의 공유 부착을 용이하게 할 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 예시된 PEG 팔 각각은 말단 산소 원자에 공유부착되는 카복시 메틸기  $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$ 를 추가로 포함한다.

### [0138] 개선된 중합체 조성물을 위한 신규 알콕실화 방법

[0139] 또한 상기에서 나타난 바와 같이, (예를 들어) 활성제(및 이의 염 및 혼합 염 형태)와의 콘쥬게이트를 제조하는데 유용성이 있는 수용성 중합체는 상업적으로 얻을 수 있다. 그러나 본원에 추가로 기술된 바와 같이, 활성제(및 이의 염 및 혼합 염 형태)와의 콘쥬게이트를 제조하는데 특히 적합한 수용성 중합체를 제조하는 방법(상기 방법은 상기 기술된 수용성 중합체를 제조하는 방법과 구별됨)이 제공된다.

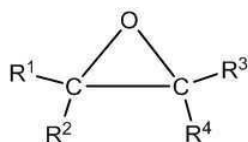
[0140] 이와 관련하여, 적합한 용매에서 이전에 분리된 알콕실화가능 올리고머를 알콕실화하여 알콕실화 중합체 생성물을 형성하는 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 이전에 분리된 알콕실화가능 올리고머는 300달톤 초과(예컨대, 500달톤 초과)의 공지되고 한정된 중량 평균 분자량을 가진다.

### [0141] 신규 알콕실화 방법에서 알콕실화 단계

[0142] 단량체의 순차적인 첨가가 옥시란 화합물의 반복 반응을 통해 이루어지도록, 알콕실화 단계는 알콕실화 조건을 사용하여 수행된다. 알콕실화가능 올리고머는 초기에 하나 이상의 하이드록실 작용기를 가질 때, 알콕실화가능 올리고머에서 하나 이상의 이들 하이드록실기는 강염기와의 반응에 의해 반응성 알콕시드로 전환될 것이다. 이때, 옥시란 화합물은 알콕실화가능 작용기(예컨대, 반응성 알콕시드)와 반응함으로써, 반응성 알콕시드에 첨가할 뿐만 아니라 또한 다른 반응성 알콕시드에서 종결하는 방식으로 첨가한다. 그 후, 이전에 첨가되고 반응된 옥시란 화합물의 반응성 알콕시드 말단에서 옥시란 화합물의 반복된 반응은 중합체 사슬을 효과적으로 생성한다.

[0143] 하나 이상의 알콕실화가능 작용기 각각은 바람직하게 하이드록실이지만, 아민, 티올 및 카복실산의 하이드록실기와 같은 다른 기는 허용되는 알콕실화가능 작용기의 역할을 할 수 있다. 또한, 알데히드, 케톤, 니트릴 및 아미드에서 알파 탄소 원자의 수소의 산도 때문에, 이들 기의 알파 탄소 원자에서의 첨가는 허용되는 알콕실화가능 작용기의 역할을 할 수 있다.

[0144] 옥시란 화합물은 옥시란기를 포함하고 다음 화학식의 것을 가지며,



[0145] 여기서(이 구조에 대하여)

[0146]

[0147]  $\text{R}^1$ 은 H 및 알킬(바람직하게는 알킬일 경우 저급 알킬)로 이루어지는 군으로부터 선택되고;

[0148]  $\text{R}^2$ 은 H 및 알킬(바람직하게는 알킬일 경우 저급 알킬)로 이루어지는 군으로부터 선택되며;

[0149]  $\text{R}^3$ 은 H 및 알킬(바람직하게는 알킬일 경우 저급 알킬)로 이루어지는 군으로부터 선택되고;

[0150]  $\text{R}^4$ 은 H 및 알킬(바람직하게는 알킬일 경우 저급 알킬)로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

- [0151] 상기 옥시란 화합물 화학식에 대하여,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  및  $R^4$ 의 각각은 H인 것이 특히 바람직하고,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  및  $R^4$  중 하나만 알킬(예컨대, 메틸 및 에틸)이고 나머지 치환기는 H인 것이 바람직하다. 예시적인 옥시란 화합물은 에틸렌 옥사이드, 프로필렌 옥사이드 및 1,2-부틸렌 옥사이드이다. 최적의 알콕실화 조건을 만드는 첨가되는 옥시란 화합물의 양은 다수의 요인, 예를 들어 출발 알콕실화가능 올리고머의 양, 생성되는 알콕실화 중합체 물질의 원하는 크기 및 알콕실화가능 올리고머 상의 알콕실화가능 작용기의 수에 좌우된다. 따라서, 더 큰 알콕실화 중합체를 원하는 경우, 상대적으로 더 많은 옥시란 화합물이 알콕실화 조건에 존재한다. 유사하게, (0a)가 단일 알콕실화가능 작용기 상에서 중합체 주어진 크기의 “성장”을 달성하기 위해 필요한 옥시란 화합물의 양을 나타낸다면, 2개의 알콕실화가능 작용기를 가지는 알콕실화가능 올리고머는 2배의 (0a)를 필요로 하고, 3개의 알콕실화가능 작용기를 가지는 알콕실화가능 올리고머는 3배의 (0a)를 필요로 하며, 4개의 알콕실화가능 작용기를 가지는 알콕실화가능 올리고머는 4배의 (0a) 등을 필요로 한다. 모든 경우에서, 당업자는 알콕실화 중합체 물질의 원하는 분자량을 고려하고 통상적인 실험에 따라서 알콕실화 조건에 필요한 옥시란 화합물의 적절한 양을 결정할 수 있다.
- [0152] 알콕실화 조건은 강염기의 존재를 포함한다. 강염기의 목적은 알콕실화가능 올리고머 내에 존재하는 각각의 산의 수소(예컨대, 하이드록실기의 수소)를 탈프로톤화하고 알콕시드 이온 종(또는 비하이드록실 알콕실화가능 작용기를 위한 이온 종)을 형성하는 것이다. 알콕실화 조건의 일부로서 사용을 위한 바람직한 강염기는 알칼리 금속, 예를 들어 금속 칼륨, 금속 나트륨, 및 알칼리 금속 혼합물, 예를 들어 나트륨-칼륨 합금; 하이드록시드, 예를 들어 NaOH 및 KOH; 및 알콕시드(예컨대, 옥시란 화합물의 첨가 후에 존재함)이다. 다른 강염기는 당업자에 의해 사용될 수 있고 확인될 수 있다. 예를 들어 주어진 염기는, 강염기가 알콕시드 이온 종(또는 비하이드록실 알콕실화가능 작용기를 위한 이온 종)을 형성할 수 있고, 또한 옥시란 분자와 알콕시드 이온 종의 반응을 방해하도록(또는 비현실적으로 느린 반응을 통해 효과적으로 방해하도록) 알콕시드 이온 종을 방해하지 않는 양이온을 제공할 수 있다면, 본원에서 강염기로서 사용될 수 있다. 강염기는 일반적으로 소량 및 계산된 양으로 존재하며, 이 양은 전체 반응 혼합물의 중량에 기초하여 0.001중량% 내지 10.0중량%; 및 전체 반응 혼합물의 중량에 기초하여 0.01중량% 내지 약 6.0중량%의 범위 중 하나 이상에 속할 수 있다.
- [0153] 알콕실화 조건은 알콕실화가 일어나는데 적합한 온도를 포함한다. 알콕실화가 일어나는데 적합할 수 있는 예시적인 온도는 10℃ 내지 260℃; 20℃ 내지 240℃; 30℃ 내지 220℃; 40℃ 내지 200℃; 50℃ 내지 200℃; 80℃ 내지 140℃; 및 100℃ 내지 120℃의 범위 중 하나 이상에 속하는 것을 포함한다.
- [0154] 알콕실화 조건은 알콕실화가 일어나는데 적합한 압력을 포함한다. 알콕실화가 일어나는데 적합할 수 있는 예시적인 압력은 10psi 내지 1000psi; 15psi 내지 500psi; 20psi 내지 250psi; 25psi 내지 100psi의 범위 중 하나 이상에 속하는 것을 포함한다. 추가적으로, 알콕실화 압력은 거의 해수면에서의 대기압(예컨대, 제곱 인치당 14.696파운드 +/- 10%)일 수 있다.
- [0155] 일부 경우에서, 알콕실화 조건은 액체 형태로 옥시란 화합물의 첨가를 포함한다. 일부 경우에서, 알콕실화 조건은 증기 형태로 옥시란 화합물의 첨가를 포함한다.
- [0156] 알콕실화 조건은 적합한 용매의 사용을 포함한다. 최적으로, 알콕실화 조건이 일어나는 시스템은 탈프로톤화될 수 있는 (또는 알콕실화 조건이 일어날 pH, 온도 등의 조건 하에서 실질적으로 프로톤화된 상태로 남아 있는) (임의의 용매를 포함하여) 임의의 성분을 포함하지 않을 것이다. 알콕실화에 적합한 용매는 테트라하이드로푸란 (THF), 디메틸포름아미드(DMF), 톨루엔, 벤젠, 크실렌, 메시틸렌, 테트라클로로에틸렌, 아니솔, 디메틸아세트아미드, 및 상기한 것들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 유기 용매를 포함한다. 알콕실화 조건의 일부로서 사용에 덜 이상적인 (그러나 그럼에도 불구하고 여전히 고려되는) 용매는 아세토니트릴, 페닐아세토니트릴 및 에틸 아세테이트이고, 일부 경우에서 알콕실화 조건은 용매로서 아세토니트릴, 페닐아세토니트릴 및 에틸 아세테이트 중 임의의 것을 포함하지 않을 것이다.
- [0157] 본 발명이 하나 이상의 실시형태에서, 알콕실화 조건이 액체 상(liquid phase)에서 수행될 때, 알콕실화 조건은, 알코올실화가능 올리고머 및 알콕실화가능 올리고머를 알콕실화로부터 형성된 원하는 알콕실화 중합체들 다 사용된 적합한 용매에서 유사한 가용성(그리고, 바람직하게는 실질적으로 동일한 가용성)를 가질 뿐만 아니라, 적합한 용매에서 실질적으로 가용성이도록 수행된다. 예를 들어, 하나 이상의 실시형태에서, 알콕실화가능 올리고머는 알콕실화 조건에 사용된 용매에서 실질적으로 가용성일 수 있고, 생성된 알콕실화 중합체 물질은 또한 알콕실화 조건에서 실질적으로 가용성일 것이다.
- [0158] 하나 이상의 실시형태에서, 적합한 용매에서 알콕실화올리고머 및 알콕실화 중합체 물질의 실질적으로 동일한

가용성은 적합한 용매에서 (예를 들어 이전에 분리된 알콕실화 올리고머의 제조에서 사용된) 전구체 분자의 가용성과 반대로 유지되며, 상기 전구체 분자는 알콕실화 올리고머 및/또는 알콕실화 중합체 물질보다 적합한 용매에서 더 낮은 (그리고 실질적으로 훨씬 더 낮은) 가용성을 가질 수 있다. 단지 예로서, 알콕실화 올리고머 및 알콕실화 중합체 물질은 둘 다 펜타에리트리톨 코어를 가질 것이고, 둘 다 톨루엔에서 실질적으로 가용성일 것이지만 펜타에리트리톨 자체는 톨루엔에서 제한된 가용성을 가진다.

[0159] 알콕실화 조건에 이용되는 용매는 톨루엔이 특히 바람직하다. 반응에 사용된 톨루엔의 양은 옥시란 화합물의 완전한 첨가 후 반응 혼합물의 중량을 기초로 하여, 반응 혼합물의 25중량% 초과, 75중량% 미만이다. 당업자는 중합체의 원하는 분자량, 알콕실화가 일어날 부위의 수, 사용된 알콕실화 올리고머의 중량 등을 고려하여 용매의 출발 양을 계산할 수 있다.

[0160] 톨루엔의 양은 상기 양이 알콕실화 조건이 원하는 알콕실화 중합체 물질을 제공하는데 충분하도록 측정되는 것이 바람직하다.

[0161] 추가적으로, 알콕실화 조건은 실질적으로 물이 존재하지 않는 것이 특히 바람직하다. 따라서, 알콕실화 조건은 물 함량이 100ppm 미만, 보다 바람직하게는 50ppm, 훨씬 더 바람직하게는 20ppm, 훨씬 더 바람직하게는 14ppm 미만, 훨씬 보다 더 바람직하게는 8ppm 미만인 것이 바람직하다.

[0162] 알콕실화 조건은 적합한 반응 용기, 통상적으로 스테인리스 스틸 반응 용기에서 일어난다.

[0163] 하나 이상의 실시형태에서, 알콕실화가능 올리고머 및/또는 전구체 분자는 허용되는 알과 수소를 가지는 탄소에 부착된 이소시아네이트기가 없다. 하나 이상의 실시형태에서, 이전에 제조된 알콕실화가능 올리고머 및/또는 전구체 분자는 이소시아네이트기가 없다.

#### [0164] 신규 알콕실화 방법에서 알콕실화가능한 올리고머

[0165] 신규 알콕실화 방법에서 사용된 알콕실화가능 올리고머는 적어도 하나의 알콕실화가능 작용기를 가져야 한다. 그러나, 알콕실화가능 올리고머는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개 이상의 알콕실화가능 작용기를 가질 수 있으며, 바람직하게 알콕실화가능 올리고머는 1개 내지 6개의 알콕실화가능 작용기를 가질 수 있다.

[0166] 이전에 진술한 바와 같이, 알콕실화가능 올리고머 내 각각의 알콕실화가능 작용기는 하이드록실, 카복실산, 아민, 티올, 알데히드, 케톤 및 니트릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택될 수 있다. 알콕실화가능 올리고머 내 2개 이상의 알콕실화 작용기의 경우에서, 동일한 알콕실화가능 올리고머 내 상이한 알콕실화가능 작용기가 또한 고려되지만, 각각의 알콕실화 작용기는 동일한 것(예컨대, 알콕실화가능 올리고머 내 각각의 알콕실화가능 작용기는 하이드록실임)이 통상적이다. 알콕실화 작용기가 하이드록실일 경우, 하이드록실은 1차 하이드록실임이 바람직하다.

[0167] 알콕실화가능 올리고머는 다수의 가능한 기하학적 구조 중 임의의 것을 취할 수 있다. 예를 들어, 알콕실화가능 올리고머는 선형일 수 있다. 선형 알콕실화가능 올리고머의 하나의 예에서, 선형 알콕실화가능 올리고머의 하나의 말단은 상대적으로 불활성 작용기(예컨대, 말단 캡핑기)이고, 다른 말단은 알콕실화가능 작용기(예컨대, 하이드록실)이다. 이러한 구조의 예시적인 알콕실화 올리고머는 메톡시-PEG-OH, 또는 간단히 mPEG이며, 여기에서 하나의 말단은 상대적으로 불활성 메톡시기인 반면, 다른 말단은 하이드록실기이다. mPEG의 구조는 하기와 같이 주어진다:



[0169] (여기에서, 바로 앞의 구조에 대해서 n은 13 내지 100의 정수이다).

[0170] 알콕실화가능 올리고머가 취할 수 있는 선형 기하학적 구조의 다른 예는 각각의 말단에서 (동일 또는 상이한) 알콕실화가능 작용기를 가지는 선형 유기 중합체이다. 이 구조의 예시적인 알콕실화가능 올리고머는 알파-디하이드록실폴리, 오메가-디하이드록실폴리(에틸렌 글리콜), 또는 하기 화학식의 것이며,



[0172] (여기에서, 바로 앞의 구조에 대해서 n은 13 내지 100의 정수이다)

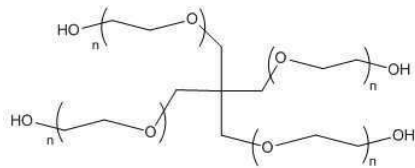
[0173] 이는 간단한 형태로 HO-PEG-OH로서 나타내어질 수 있고, 여기에서 -PEG- 기호는 다음 구조 단위를 나타내는 것으로 이해된다:

[0174]  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$

[0175] (여기에서, 바로 앞의 구조에 대해서  $n$ 은 13 내지 100의 정수이다).

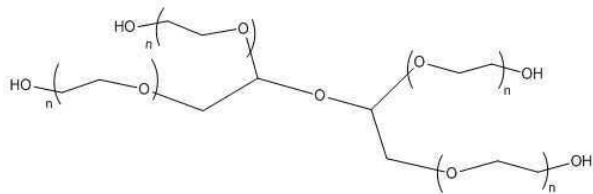
[0176] 알콕실화가능한 올리고머가 가질 수 있는 다른 기하학적 구조는 “다중 팔” 또는 분지형 구조이다. 이러한 분지형 구조에 대하여, 알콕실화가능한 올리고머 중 하나 이상의 원자가 “분지점 원자”로서의 역할을 하며, 분지점 원자를 통하여 반복되는 단량체 또는 “팔”의 2개, 3개, 4개 이상(그러나 통상적으로는 2개, 3개 또는 4개)의 별개의 세트가 (직접적으로 또는 하나 이상의 원자를 통하여) 연결된다. 최소한, 본원에 사용된 바와 같은 “다중 팔” 구조는 3개 이상의 별개의 팔을 가지지만, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 이상만큼 많은 팔을 가질 수 있으며, 4개 내지 8개 다중 팔 구조(예를 들어 4개 팔 구조, 5개 팔 구조, 6개 팔 구조 및 8개 팔 구조)가 바람직하다.

[0177] 알콕실화가능 올리고머에 대한 예시적인 다중 팔 구조는 하기와 같이 제공되며,



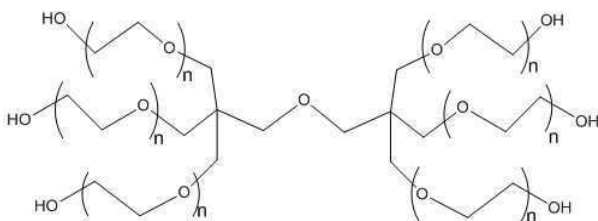
[0178]

[0179] 여기에서, (오직 바로 앞의 구조에 대해서)  $n$ 의 평균값은 1 내지 50, 예컨대 10 내지 50이고(또는 다르게는 상기 구조의 분자량이 300달톤 내지 9,000달톤(예컨대 약 500달톤 내지 5,000달톤)이 되도록 한정됨);



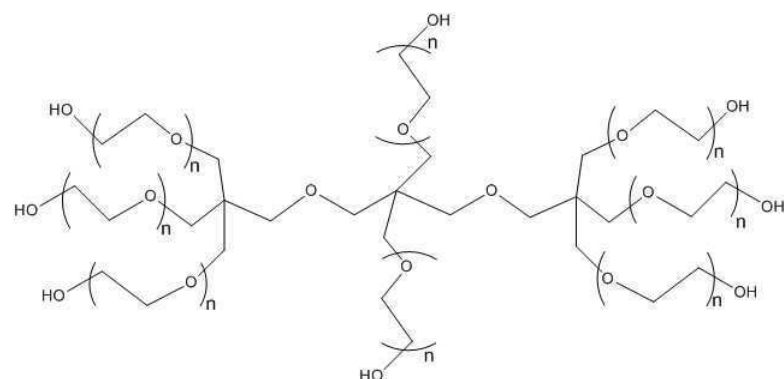
[0180]

[0181] 여기에서, (오직바로 앞의 구조에 대해서)  $n$ 의 평균값은 2 내지 50, 예컨대 10 내지 50이며(또는 다르게는 상기 구조의 분자량이 300달톤 내지 9,000달톤(예컨대 약 500달톤 내지 5,000달톤)이 되도록 한정됨);



[0182]

[0183] 여기에서, (오직 바로 앞의 구조에 대해서)  $n$ 의 평균값은 2 내지 35, 예컨대 8 내지 40이고(또는 다르게는 상기 구조의 분자량이 750달톤 내지 9,500달톤(예컨대 약 500달톤 내지 5,000달톤)이 되도록 한정됨);



[0184]

[0185] 여기에서, (오직 바로 앞의 구조에 대해서)  $n$ 의 평균값은 2 내지 35, 예컨대 5 내지 35이다(또는 다르게는 상기



구조의 분자량이 1,000달톤 내지 13,000달톤(예컨대 약 500달톤 내지 5,000달톤)이 되도록 한정됨).

[0186] 4가지 바로 앞의 구조 각각에 대하여, 각각의 경우에 n의 값은 실질적으로 동일한 것이 바람직하다. 따라서, n의 모든 값이 주어진 알콕실화가능 올리고머에 대하여 고려될 때, 알콕실화가능 올리고머에 대한 n의 모든 값은 3표준 편차 이내, 보다 바람직하게는 2표준 편차 이내, 훨씬 더 바람직하게는 1표준 편차 이내임이 바람직하다.

[0187] 알콕실화가능 올리고머의 분자량에 관해서, 알콕실화가능 올리고머는 공지되고 한정된 중량 평균 분자량을 가질 것이다. 본원에서의 사용을 위하여, 중량 평균 분자량은, 알콕실화 올리고머가 자신이 생성된 합성 환경에서 분리될 때 단지 알콕실화가능 올리고머에 대하여 공지 및 한정될 수 있다. 예시적인 알콕실화가능 올리고머에 대한 중량 평균 분자량은 300달톤 초과; 500달톤 초과; 300달톤 내지 15,000달톤; 500달톤 내지 5,000달톤; 300달톤 내지 10,000달톤; 500달톤 내지 4,000달톤; 300달톤 내지 5,000달톤; 500달톤 내지 3,000달톤; 300달톤 내지 2,000달톤; 500달톤 내지 2,000달톤; 300달톤 내지 1,000달톤; 500달톤 내지 1,000달톤; 1,000달톤 내지 10,000달톤; 1,000달톤 내지 5,000달톤; 1,000달톤 내지 4,000달톤; 1,000달톤 내지 3,000달톤; 1,000달톤 내지 2,000달톤; 1,500달톤 내지 15,000달톤; 1,500달톤 내지 5,000달톤; 1,500달톤 내지 10,000달톤; 1,500달톤 내지 4,000달톤; 1,500달톤 내지 3,000달톤; 1,500달톤 내지 2,000달톤; 2,000달톤 내지 5,000달톤; 2,000달톤 내지 4,000달톤; 및 2,000달톤 내지 3,000달톤의 범위 중 하나 이상에 속할 것이다.

[0188] 본 발명의 목적을 위하여, 알콕실화가능 올리고머는 바람직하게 이전에 분리된다. 이전에 분리됨은 알콕실화가능 올리고머가 자신이 생성된 합성 환경으로부터의 밖에 분리되어(가장 통상적으로는 알콕실화가능 올리고머를 제조하는데 사용된 알콕실화 조건의 밖에) 존재하며, 선택적으로 비교적 긴 기간 동안 저장될 수 있거나 또는 선택적으로 이후의 사용을 위하여 실질적인 변화없이 보다 짧은 시간 동안 저장될 수 있음을 의미한다. 따라서, 예를 들어 불활성 환경에서 저장된다면, 알콕실화가능 올리고머는 이전에 분리된다. 이와 관련하여 이전에 분리된 알콕실화가능 올리고머는 실질적으로 옥시란 화합물이 없는(예컨대, 0.1중량% 미만) 용기내에 저장될 수 있다. 또한, 이전에 분리된 알콕실화가능 올리고머는 15일 동안 10% 초과로 분자량이 변하지 않는다. 따라서, 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, “이전에 분리된”의 개념은 (예를 들어) 계속 진행 중이고 연속적인 알콕실화 반응이 전구체 분자로부터 알콕실화가능 올리고머에 해당하는 구조로, 알콕실화 중합체 물질에 해당하는 구조로 진행되는 것이 허용되는 상황과 대조되며, “이전에 분리된”의 개념은 알콕실화가능 올리고머가 알콕실화 올리고머가 형성된 조건으로부터 떨어져서 존재하는 것을 필요로 한다. 그러나 본 발명에 의하여, 이전에 분리된 알콕실화가능 올리고머는 일단 별개의 단계로서 알콕실화 조건에 첨가되면 알콕실화 단계를 거칠 것이다.

#### [0189] 신규 알콕실화 방법에서 알콕실화가능 올리고머의 공급

[0190] 알콕실화가능 올리고머는 합성 방법을 통해 획득될 수 있다. 이와 관련하여, 알콕실화가능 올리고머는 (a) 분자량이 300달톤 미만(예컨대, 500달톤 미만)인 전구체 분자를 알콕실화하여 알콕실화가능 올리고머 또는 프리폴리머를 포함하는 반응 혼합물을 형성하는 단계, 및 (b) 반응 혼합물로부터 알콕실화가능 올리고머를 분리하는 단계에 의해 제조된다. 전구체 분자를 알콕실화하는 단계는 주로 이전에 논의된 알콕실화 단계의 조건 및 필요 사항을 따른다. 알콕실화가능 올리고머를 분리하는 단계는 임의의 당업계에 알려진 단계를 사용하여 수행될 수 있지만, 모든 옥시란 화합물이 반응에서 소비될 수 있게 하는 단계, 키팅 단계를 활발하게 실행하는 단계, 당업계에 알려진 접근법을 통하여 최종 반응 혼합물을 분리하는 단계(예를 들어, 모든 휘발성 물질을 증류하여 없애는 단계, 여과 또는 세척에 의하여 고체 반응 부산물을 제거하는 단계, 및 크로마토그래피 수단을 적용하는 단계를 포함함)를 포함할 수 있다.

[0191] 추가적으로, 알콕실화가능 올리고머는 상업적 공급원으로부터 획득할 수 있다. 예시적인 상업적 공급원은 NOF 사(社)(NOF Corporation, 일본 도쿄)를 포함하며, 이는 상표명 SUNBRIGHT DKH<sup>®</sup> 폴리(에틸렌 글리콜), SUNBRIGHT<sup>®</sup> GL 글리세린, 트리-폴리(에틸렌 글리콜) 에테르, SUNBRIGHT PTE<sup>®</sup> 펜타에리트리톨, 테트라-폴리(에틸렌 글리콜) 에테르, SUNBRIGHT<sup>®</sup> DG 디-글리세린, 테트라-폴리(에틸렌 글리콜) 에테르, 및 SUNBRIGHT HGEO<sup>®</sup> 헥사-글리세린, 옥타-폴리(에틸렌 글리콜) 에테르 하에서 알콕실화가능 올리고머를 제공한다. 바람직한 알콕실화가능 올리고머는 구조가 SUNBRIGHT PTE<sup>®</sup>-2000 펜타에리트리톨, 테트라-폴리(에틸렌 글리콜) 에테르(중량 평균 분자량이 약 2,000달톤임) 및 SUNBRIGHT<sup>®</sup> DG-2000 디-글리세린, 테트라-폴리(에틸렌 글리콜) 에테르(중량 평균 분자량이 약 2,000달톤임)인 것들을 포함한다.

[0192] 전구체 분자는 하나 이상의 알콕실화가능 작용기를 가지는 임의의 소분자(예컨대, 분자량이 알콕실화가능 올리고머의 중량 평균 분자량 미만임)일 수 있다.

[0193] 예시적인 전구체 분자는 폴리올을 포함하며, 폴리올은 다수의 이용가능한 하이드록실기를 가지는 (통상적으로 분자량이 300달톤 미만, 예컨대 500달톤 미만인) 소분자이다. 알콕실화가능 올리고머 또는 프리폴리머에서 중합체 팔의 원하는 수에 따라서, 전구체 분자의 역할을 하는 폴리올은 통상적으로 3개 내지 약 25개의 하이드록실기, 바람직하게는 약 3개 내지 약 22개의 하이드록실기, 가장 바람직하게는 약 4개 내지 약 12개의 하이드록실기를 포함할 것이다. 바람직한 폴리올은 글리세롤 올리고머 또는 중합체, 예를 들어 헥사글리세롤, 펜타에리트리톨 및 이의 올리고머 또는 중합체(예컨대, 디펜타에리트리톨, 트리펜타에리트리톨, 테트라펜타에리트리톨, 및 펜타에리트리톨의 에톡실화 형태), 및 당 유래 알코올, 예컨대 소르비톨, 아라비니톨(arabinitol), 및 만니톨을 포함한다. 또한, 많은 상업적으로 이용가능한 폴리올, 예를 들어 이노시톨의 다양한 이성질체(즉, 1,2,3,4,5,6-헥사하이드록시사이클로헥산), 2,2-비스(하이드록시메틸)-1-부탄올, 2-아미노-2-(하이드록시메틸)-1,3-프로판디올(트리스(TRIS)), 2-[비스(2-하이드록시에틸)아미노]-2-(하이드록시메틸)-1,3-프로판디올, {[2-하이드록시-1,1-비스(하이드록시메틸)에틸]아미노}아세트산(트리신), 2-[(3-[[2-하이드록시-1,1-비스(하이드록시메틸)에틸]아미노]프로필)아미노]-2-(하이드록시메틸)-1,3-프로판디올, 2-[[2-하이드록시-1,1-비스(하이드록시메틸)에틸]아미노]에탄설포산(TES), 4-[[2-하이드록시-1,1-비스(하이드록시메틸)에틸]아미노]-1-부탄설포산, 및 2-[비스(2-하이드록시에틸)아미노]-2-(하이드록시메틸)-1,3-프로판디올 염산염이 허용되는 전구체 분자의 역할을 할 수 있다. 전구체 분자가 알콕실화가능 단계를 방해할 이온화기 또는 기들을 가지는 경우에, 이온화기는 알콕실화 단계를 수행하기 전에 보호되거나 또는 변형되어야 한다.

[0194] 예시적인 바람직한 전구체 분자는 글리세롤, 디글리세롤, 트리글리세롤, 헥사글리세롤, 만니톨, 소르비톨, 펜타에리트리톨, 디펜타에리트리톨, 및 트리펜타에리트리톨로 이루어진 군으로부터 선택된 전구체 분자를 포함한다.

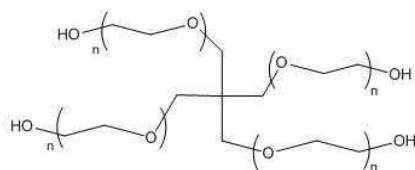
[0195] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서, 이전에 분리된 알콕실화가능 올리고머도 알콕실화 중합체 생성물도 모두 전구체 분자의 알콕실화 작용기(예컨대, 하이드록실기)를 가지는 것이 바람직하다.

#### [0196] 신규 알콕실화 방법에 의해 생성된 알콕실화 중합체 물질

[0197] 본원에 기술된 방법 하에서 제조된 알콕실화 중합체 물질은 알콕실화가능 올리고머의 구조에 상응하는 기본 구조를 가질 것이다(즉, 선형의 알콕실화가능 올리고머는 선형의 알콕실화 중합체 물질을 생성하며, 4개 팔 알콕실화가능 올리고머는 4개 팔 알콕실화 중합체 물질을 생성한다). 결과로서, 알콕실화 중합체 물질은 선형, 분지형 및 다중 팔형을 포함하여 다수의 가능한 기하학적 구조 중 임의의 것을 취할 것이다.

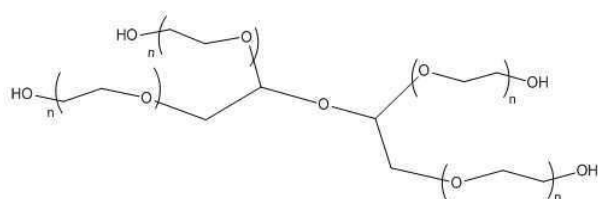
[0198] 분지형 구조에 대하여, 분지형의 알콕실화 중합체 물질은 3개 이상의 별개의 팔을 가질 것이지만, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 이상만큼 많은 팔을 가질 수 있으며, 4개 내지 8개 팔의 분지형 구조(예를 들어 4개 팔 분지형 구조, 5개 팔 분지형 구조, 6개 팔 분지형 구조 및 8개 팔 분지형 구조)가 바람직하다.

[0199] 알콕실화 중합체 물질에 대한 예시적인 분지형 구조가 하기와 같이 제공되며,



[0200]

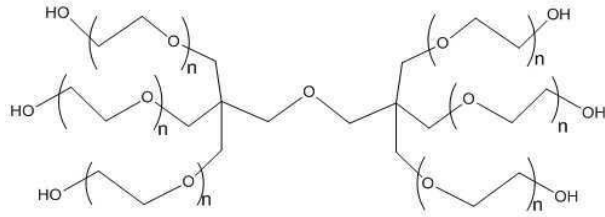
[0201] 여기에서, (오직 바로 앞의 구조에 대해서) n의 평균값은 10 내지 1,000; 10 내지 500; 10 내지 250; 50 내지 1000; 50 내지 250; 및 50 내지 120(또는 다르게는 상기 구조의 분자량이 2,000달톤 내지 180,000달톤, 예컨대 2,000달톤 내지 120,000달톤이 되도록 한정됨)의 범위 중 하나 이상을 만족하고;



[0202]

[0203] 여기에서, (오직 바로 앞의 구조에 대해서) n의 평균값은 10 내지 1,000; 10 내지 500; 10 내지 250; 50 내지 1000; 50 내지 250; 및 50 내지 120(또는 다르게는 상기 구조의 분자량이 2,000달톤 내지 180,000달톤, 예컨대

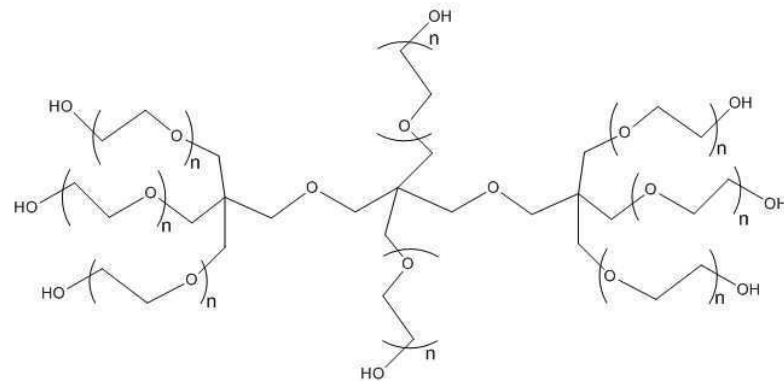
2,000달톤 내지 120,000달톤이 되도록 한정됨)의 범위 중 하나 이상을 만족하고;



[0204]

[0205]

여기에서, (오직 바로 앞의 구조에 대해서)  $n$ 의 평균값은 10 내지 750; 40 내지 750; 50 내지 250; 및 50 내지 120(또는 다르게는 상기 구조의 분자량이 3,000달톤 내지 200,000달톤, 예컨대 12,000달톤 내지 200,000달톤이 되도록 한정됨)의 범위 중 하나 이상을 만족하며;



[0206]

[0207]

여기에서, (오직 바로 앞의 구조에 대해서)  $n$ 의 평균값은 10 내지 600 및 35 내지 600(또는 다르게는 상기 구조의 분자량이 4,000달톤 내지 215,000달톤, 예컨대 12,000달톤 내지 215,000달톤이 되도록 한정됨)의 범위 중 하나 이상을 만족한다.

[0208]

4가지 바로 앞의 구조 각각에 대하여, 각각의 경우에  $n$ 의 값은 실질적으로 동일한 것이 바람직하다. 따라서,  $n$ 의 모든 값이 주어진 알콕실화 중합체 물질에 대하여 고려될 때, 알콕실화 중합체 물질, 알콕실화가능 올리고머 또는 프리폴리머에 대한  $n$ 의 모든 값은 3표준 편차 이내, 보다 바람직하게는 2표준 편차 이내, 훨씬 더 바람직하게는 1표준 편차 이내임이 바람직하다.

[0209]

알콕실화 중합체 물질의 분자량에 관해서, 알콕실화 중합체 물질은 공지되고 한정된 중량 평균 분자량을 가질 것이다. 본원에서의 사용을 위하여, 중량 평균 분자량은, 중합체가 그것이 생성된 합성 환경에서 분리될 때 단지 중합체에 대하여 공지 및 한정될 수 있다.

[0210]

알콕실화 중합체 생성물의 전체 분자량은 의도된 목적에 적합한 분자량일 수 있다. 임의의 주어진 목적에 대하여 허용되는 분자량은 통상적인 실험에 의한 시행착오를 통하여 결정될 수 있다. 알콕실화 중합체 생성물에 대한 예시적인 분자량은 2,000달톤 내지 215,000달톤; 5,000달톤 내지 215,000달톤; 5,000달톤 내지 150,000달톤; 5,000달톤 내지 100,000달톤; 5,000달톤 내지 80,000달톤; 6,000달톤 내지 80,000달톤; 7,500달톤 내지 80,000달톤; 9,000달톤 내지 80,000달톤; 10,000달톤 내지 80,000달톤; 12,000달톤 내지 80,000달톤; 15,000달톤 내지 80,000달톤; 20,000달톤 내지 80,000달톤; 25,000달톤 내지 80,000달톤; 30,000달톤 내지 80,000달톤; 40,000달톤 내지 80,000달톤; 6,000달톤 내지 60,000달톤; 7,500달톤 내지 60,000달톤; 9,000달톤 내지 60,000달톤; 10,000달톤 내지 60,000달톤; 12,000달톤 내지 60,000달톤; 15,000달톤 내지 60,000달톤; 20,000달톤 내지 60,000달톤; 25,000달톤 내지 60,000달톤; 30,000달톤 내지 60,000; 6,000달톤 내지 40,000달톤; 9,000달톤 내지 40,000달톤; 10,000달톤 내지 40,000달톤; 15,000달톤 내지 40,000달톤; 19,000달톤 내지 40,000달톤; 15,000달톤 내지 25,000달톤; 및 18,000달톤 내지 22,000달톤의 범위 중 하나 이상에 속하는 중량 평균 분자량을 가질 것이다.

[0211]

임의의 주어진 알콕실화 중합체 물질에 대하여, 특이적인 반응성기를 보유하여 중합체 시약을 형성하도록 알콕실화 중합체 물질을 추가로 변형시키기 위한 선택적인 단계가 수행될 수 있다. 따라서, 당업계에 잘 알려진 기술을 사용하여, 알콕실화 중합체 물질은 기능화되어 반응성기(예컨대, 카보실산, 활성 에스테르, 아민, 티올,



말레이미드, 알데히드, 케톤 등)를 포함할 수 있다.

[0212] 특이적인 반응성 기를 보유하도록 알콕실화 중합체 생성물을 추가로 변형시키기 위한 선택적인 단계를 수행함에 있어서, 이러한 선택적인 단계는 적합한 용매 중에서 수행된다. 당업자는 어떤 구체적인 용매가 임의의 주어진 반응 단계에 대하여 적절할 것인지를 결정할 수 있다. 그러나 종종 용매는 바람직하게 비극성 용매 또는 극성 용매이다. 비극성 용매의 비제한적인 예는 벤젠, 크실렌 및 톨루엔을 포함한다. 예시적인 극성 용매는 이에 제한되지 않지만, 디옥산, 테트라하이드로푸란(THF), *t*-부틸 알코올, DMSO(디메틸 설펍사이드), HMPA(헥사메틸포스포라미드), DMF(디메틸포름아미드), DMA(디메틸아세트아미드) 및 NMP(*N*-메틸피롤리돈)을 포함한다.

[0213] **알콕실화 중합체 재료의 추가 조성물**

[0214] 본원에 제공된 본 발명의 다른 양태는 알콕실화 중합체 물질을 포함하는 조성물이며, 상기 조성물은 알콕실화 중합체 물질을 포함하는 임의의 조성물뿐만 아니라, 알콕실화 중합체 물질이 예를 들어 중합체 시약 및 이러한 시약과 활성제의 커플링으로 형성된 콘주게이트의 조성물로 추가로 변형된 조성물을 포함한다. 특히, 본원에 기술된 방법의 이점은 고순도의 알콕실화 중합체 물질 함유 조성물을 획득하는 능력이다. 조성물은 하기의 점을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다: 실질적으로 낮은 함량의 고분자량 불순물(예컨대, 분자량이 원하는 알콕실화 중합체 물질의 분자량보다 더 큰 중합체 함유 중) 및 낮은 함량의 저분자량 디올 불순물(즉, HO-PEG-OH)을 가지는 것을 특징으로 할 수 있으며, 2가지 중 1가지 불순물 종류(및 바람직하게는 2가지 불순물 종류 모두)는 총량이 8중량% 미만, 보다 바람직하게는 2중량% 미만이다. 추가적으로 또는 대안적으로, 상기 조성물은 또한 알콕실화 중합체 물질(뿐만 아니라 알콕실화 중합체 물질로 형성된 중합체 시약을 포함하는 조성물, 및 상기 중합체 시약과 활성제의 콘주게이팅으로 형성된 콘주게이트의 조성물)의 순도가 92중량% 초과, 93중량% 초과, 94중량% 초과, 95중량% 초과, 바람직하게는 96중량% 초과, 보다 바람직하게는 97중량% 초과인 것을 특징으로 할 수 있다. 겔 투과 크로마토그래피(GPC) 및 겔 여과 크로마토그래피(GFC)를 사용하여 알콕실화 중합체 물질을 특성화할 수 있다. 이러한 크로마토그래피 방법은 분자량에 따라서 조성물의 성분에 대한 조성물의 분리를 가능하게 한다. 실시예 8 및 실시예 9에 기술된 생성물의 예시적인 GFC 추적은 도 7 및 도 8에 제공되어 있다.

[0215] **알콕실화 중합체 물질 및 이로 형성된 조성물의 예시적인 용도**

[0216] 본원에 제공된 알콕실화 중합체 물질 및 특정 반응성 기를 가지도록 추가로 변형된 이들의 알콕실화 중합체 생성물(이후, “중합체 시약”이라 지칭함)은 콘주게이션, 예를 들어 활성제에 유용하다. 본원에 기술된 중합체 시약과의 반응에 적합한 생물학적 활성제의 바람직한 기는 친전자성기 및 친핵성기이다. 예시적인 기는 1차 아민, 카복실산, 알코올, 티올, 하이드라진 및 하이드라지드를 포함한다. 본원에 기술된 중합체 시약과의 반응에 적합한 이러한 기들은 당업자에게 공지되어 있다. 따라서, 본 발명은 콘주게이션 조건 하에서 활성제를 본원에 기술된 중합체 시약과 접촉시키는 단계를 포함하는 콘주게이트를 제조하는 방법을 제공한다.

[0217] 적합한 콘주게이션 조건은 중합체 시약과 활성제 사이의 콘주게이션을 달성하기에 충분한 시간, 온도, pH, 시약 농도, 시약 작용기(들), 활성제에 이용가능한 작용기, 용매 등이다. 당업계에 공지된 바와 같이, 구체적인 조건은 특히 활성제, 원하는 콘주게이션의 유형, 반응 혼합물 내 다른 물질의 존재 등에 좌우된다. 임의의 특정 경우에서 콘주게이션을 달성하기에 충분한 조건은 본원의 개시 내용을 이해하고, 관련 문헌을 참고로 하고/하거나 통상적인 실험을 통하여 당업자가 결정할 수 있다.

[0218] 예를 들어, 중합체 시약은 *N*-하이드록시석신이미드 활성 에스테르(예컨대, 석신이미딜 석시네이트, 석신이미딜 프로피오네이트 및 석신이미딜 부타노에이트)를 포함하며, 활성제는 아민기를 포함하고, 콘주게이션은 실온에서 약 7.5 내지 약 9.5의 pH에서 이루어질 수 있다. 추가적으로, 중합체 시약은 비닐설폰 반응성기 또는 말레이미드기를 포함하고 약리학적 활성제가 설피드릴기를 포함할 때, 콘주게이션은 실온에서 약 7 내지 약 8.5의 pH에서 이루어질 수 있다. 게다가, 중합체 시약과 연관된 반응성 기는 알데히드 또는 케톤이고 약리학적 활성제는 1차 아민을 포함하며, 콘주게이션은 환원적 아민화에 의해 이루어질 수 있고, 여기에서 약리학적 활성제의 1차 아민은 중합체의 알데히드 또는 케톤과 반응한다. 약 6 내지 약 9.5의 pH에서 일어나서, 초기에 환원적 아민화는 콘주게이트를 생성하며, 여기에서 약리학적 활성제 및 중합체는 이민 결합을 통하여 연결된다. NaCNBH<sub>3</sub>과 같은 적합한 환원제로 이민 결합 함유 콘주게이트의 추가 처리는 이민을 2차 아민으로 환원시킨다. 이들 반응 및 다른 콘주게이션 반응에 관한 추가적인 정보에 대해서는, 문헌[Hermanson "Bioconjugate Techniques," Academic Press, 1996]을 참조한다.

[0219] 예시적인 콘주게이션 조건은 약 4 내지 약 10의 pH, 예를 들어 약 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 또는 10.0의 pH에서 콘주게이션 반응을 수행하는 것을 포함한다. 반응은 약 5분 내지 약 72

시간, 바람직하게는 약 30분 내지 약 48시간, 보다 바람직하게는 약 4시간 내지 약 24시간 진행될 수 있다. 콘주게이션이 일어날 수 있는 온도는 반드시 아니지만 통상적으로 약 0℃ 내지 약 40℃의 범위이고, 종종 실온 이하에서 일어난다. 콘주게이션 반응은 종종 인산 완충 용액, 아세트산 나트륨, 또는 유사한 시스템을 사용하여 수행된다.

[0220] 시약 농도에 대하여, 과량의 중합체 시약이 통상적으로 활성제와 결합된다. 그러나 일부 경우에서, 활성제의 반응성에 대하여 중합체 시약 상 반응기의 화학량론적 양을 가지는 것이 바람직하다. 따라서 예를 들어, 4개의 반응성 기를 가지는 중합체 시약 1mol은 활성제 4mol과 결합된다. 활성제에 대한 중합체 시약 반응성 기의 예시적인 비율(중합체 시약의 반응성 기:활성제)은 약 1:1, 1:0.1, 1:0.5, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:8 또는 1:10의 몰 비율을 포함한다. 실질적으로 더 이상 콘주게이션이 일어나지 않을 때까지 콘주게이션 반응이 진행될 수 있으며, 이는 일반적으로 시간의 경과에 따른 반응의 진행을 모니터링함으로써 측정될 수 있다.

[0221] 반응의 진행은 다양한 시점에서 반응 혼합물로부터 분취액을 취하고 크로마토그래피 방법, SDS-PAGE 또는 MALDI-TOF 질량 분석법, NMR, IR, 또는 임의의 다른 적합한 분석 방법에 의해 반응 혼합물을 분석함으로써 모니터링할 수 있다. 일단 형성된 콘주게이트의 양 또는 남아 있는 비콘주게이션된 중합체 시약의 양에 대하여 안정기에 도달하면, 반응은 완료된 것으로 가정한다. 통상적으로, 콘주게이션 반응은 대략 몇 분 내지 몇 시간(예컨대, 5분 내지 24시간 이상) 걸린다. 생성된 생성물 혼합물은 반드시 정제되지는 않지만, 과량의 활성제, 강염기, 촉합제 및 반응 부산물 및 용매를 분리하는 것이 바람직하다. 그 다음에 생성되는 콘주게이트는 크로마토그래피 방법, 분광학적 방법, MALDI, 모세관 전기이동 및/또는 겔 전기영동과 같은 분석 방법을 사용하여 추가로 특성화될 수 있다. 중합체-활성제 콘주게이트는 정제되어 상이한 콘주게이트 종을 획득/분리할 수 있다.

[0222] 활성제에 대하여, 알콕실화 중합체 물질 및 알콕실화 중합체 물질로 제조된 중합체 시약은 적합한 콘주게이션 조건 하에서 결합되어 콘주게이트를 생성할 수 있다. 이와 관련하여, 예시적인 활성제는 소분자 약물, 올리고펩티드, 펩티드, 및 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 활성제일 수 있다. 본원에서의 사용을 위한 활성제는 이에 제한되지 않지만, 아드리아마이신,  $\gamma$ -아미노부티르산(GABA), 아미오다론, 아미트립틸린, 아지트로마이신, 벤즈페타민, 브로모페니라민, 카비녹사민, 칼시토닌 클로람부실, 클로로프로카인, 클로로퀸, 클로르페니라민, 클로르프로마진, 신나리진, 클라리트로마이신, 클로미펜, 사이클로벤자프린, 사이클로펜톨레이트, 사이클로포스파미드, 다카바진, 다우노마이신, 데메클로사이클린, 디부카인, 디사이클로민, 디에틸프로프리온, 딜타아젬, 디멘히드리네이트, 디펜히드라민, 디소피라미드, 독세핀, 독시사이클린, 독실아민, 디프리담, EDTA, 에리트로마이신, 플루라제팜, 젠티아나 바이올렛, 하이드록시클로로퀸, 이미프라민, 인슐린, 이리노테칸, 레보메타딜, 리도카인, 록사린, 메클로레타민, 멜파란, 메타돈, 메토티메페라진, 메토티렉세이트, 메토크로프라미드, 미노사이클린, 나프티핀, 니카르디핀, 니자티딘, 올페나드린, 옥시부틴, 옥시테트라사이클린, 페녹시벤자민, 펜톨라민, 프로카인아미드, 프로카인, 프로마진, 프로메타진, 프로파라카인, 프로폭시카인, 프로폭시펜, 라니티딘, 타목시펜, 테르비나핀, 테트라카인, 테트라사이클린, 트라나돌, 트리플루프로마진, 트리메프라진, 트리메틸벤즈아미드, 트리미프라민, 트리펠레나민, 트롤레안도마이신, 티라민, 우라실 머스타드, 베라파밀 및 바소프레신을 포함할 수 있다.

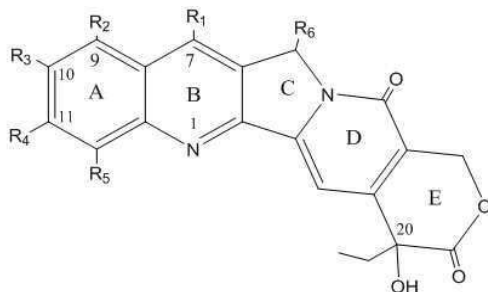
[0223] 추가적인 예시적 활성제는 아크라비스틴, 아목사핀, 아스테미졸, 아트로핀, 아지트로마이신, 벤자프릴, 벤즈트로핀, 베페리덴, 부프라카인, 부프레노르핀, 부스피론, 부토르파놀, 카페인, 캄토테신 및 캄토테신 집단에 속하는 분자, 세프리악손, 클로르프로마진, 시프로플록사신, 클라다라빈, 클레마스틴, 클린다마이신, 클로파자민, 클로자핀, 코카인, 코데인, 사이프로헵타딘, 데시프라민, 디하이드로에르고타민, 디페니돌, 디페녹시레이트, 디피리다몰, 도세탁셀, 독사프람, 에르고타민, 팜시클로버, 펜타닐, 플라복세이트, 플루다라빈, 플루페나진, 플루바스틴, 간시클로버, 그라니스테론, 구아네티딘, 할로페리돌, 호마트로핀, 하이드로코돈, 하이드로모르폰, 하이드록시진, 히오시아민, 이미프라민, 이트라코나졸, 케테로락, 케토코나졸, 레보카르부스틴, 레보르폰, 린코마이신, 로메플록사신, 로페라미드, 로자탄, 록사핀, 마진돌, 메클리진, 메페리딘, 메피바카인, 메소리다진, 메트딜라진, 메테나민, 메티마졸, 메토티메페라진, 메티세르지드, 메트로니다졸, 미녹시딜, 미토마이신 c, 몰린돈, 모르핀, 나파조돈, 날부핀, 날리덱산, 날메펜, 날록손, 날트렉손, 나파졸린, 네도크로밀, 니코틴, 노르플록사신, 오폴록사신, 온단스테론, 옥시코돈, 옥시모르폰, 파클리탁셀, 펜타조신, 펜톡시필린, 페르페나진, 피소스티그민, 필로카르핀, 피모지드, 프라복신, 프라조신, 프로클로르페라진, 프로마진, 프로메타진, 퀴니딘, 퀴닌, 라우일피아 알칼로이드, 리보플라빈, 리파부틴, 리스페리돈, 로쿠로니움, 스코팔라민, 수펜타닐, 타크린, 테라조신, 테르코나졸, 테르페나딘, 티오리다진, 티오티센, 티클로피딘, 티몰롤, 톨라자미드, 톨메틴, 트라조돈, 트리에틸페라진, 트리플루오프로마진, 트리헥실페니딜, 트리메프라진, 트리미프라민, 투보쿠라린, 베쿠로니움, 비다라빈, 빈블라스틴, 빈크리스틴 및 비노렐빈으로 이루어진 군으로부터 선택된 것들을 포함한다.

[0224]

또한 추가적인 예시적 활성제는 아세타졸아미드, 아크라비스틴, 아사이클로비르, 아데노신 인산, 알로푸리날, 알프라졸람, 아목사핀, 암리논, 아프라클로니딘, 아자타딘, 아스트레오남, 비사코딜, 블레오마이신, 브로모페니라민, 부스피론, 부토코나졸, 캄토테신 및 캄토테신 집단에 속하는 분자, 카르비녹사민, 세파만돌, 세파졸, 세픽심, 세프메타졸, 세포니시드, 세포페라존, 세포탁심, 세포테탄, 세프포독심, 세프리아손, 세파필린, 클로로퀸, 클로르페니라민, 시메티딘, 클라다라빈, 클로트리마졸, 클록사실린, 디다노신, 디피리다몰, 독사조신, 독실아민, 에코나졸, 에녹사신, 에스타졸람, 에티오나미드, 팜시클로버, 파모티딘, 플루코나졸, 플루다라빈, 폴산, 간시클로버, 하이드록시클로로퀸, 요오드퀴놀, 이소니아지드, 이트라코나졸, 케토코나졸, 라모트리진, 란소프라졸, 로르세타딘, 로자탄, 메벤다졸, 메르캅토프린, 메토크세이트, 메트로니다졸, 미코나졸, 미다졸람, 미녹시딜, 나파조돈, 날리딕스산, 니아신, 니코틴, 니자티딘, 오메페라졸, 옥사프로진, 옥시코나졸, 파파베린, 펜토스타틴, 페나조피리딘, 필로카르핀, 피록시캄, 프라조신, 프리마퀸, 피라진아미드, 피리메타민, 피록시딘, 퀴니딘, 퀴닌, 리바베린, 리팜핀, 설파다이아진, 설파메티졸, 설파메톡사졸, 설파살라진, 설파속사졸, 테라조신, 티아벤다졸, 티아민, 티오구아닌, 티몰롤, 트라조돈, 트리암테렌, 트리아졸람, 트리메타디온, 트리메토프림, 트리메트렉세이트, 트리켈렌아민, 트로피카미드 및 비다라빈으로 이루어진 군으로부터 선택된 것들을 포함한다.

[0225]

또한 추가적인 예시적 활성제는 캄토테신 집단에 속하는 분자를 포함한다. 예를 들어, 활성제는 하기의 일반 구조를 가질 수 있으며,

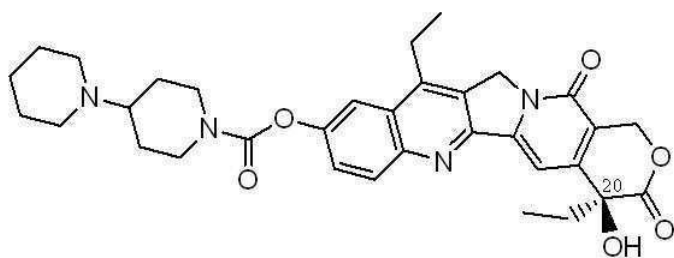


[0226]

[0227]

여기에서  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  및  $R_5$ 는 각각 독립적으로 수소; 할로; 아실; 알킬(예컨대, C1-C6 알킬); 치환된 알킬; 알콕시(예컨대, C1-C6 알콕시); 치환된 알콕시; 알케닐; 알키닐; 사이클로알킬; 하이드록실; 시아노; 니트로; 아지도; 아미도; 하이드라진; 아미노; 치환된 아미노(예컨대, 모노알킬아미노 및 디알킬아미노); 하이드록시카보닐; 알콕시카보닐; 알킬카보닐옥시; 알킬카보닐아미노; 카바모일옥시; 아릴설포닐옥시; 알킬설포닐옥시;  $-C(R_7)=N-(O)_i-R_8$ (여기에서  $R_7$ 은 H, 알킬, 알케닐, 사이클로알킬 또는 아릴이고,  $i$ 는 0 또는 1이며,  $R_8$ 은 H, 알킬, 알케닐, 사이클로알킬 또는 헤테로사이클임); 및  $R_9C(O)O-$ (여기에서  $R_9$ 는 할로젠, 아미노, 치환된 아미노, 헤테로사이클, 치환된 헤테로사이클 또는  $R_{10}-O-(CH_2)_m-$ (여기에서  $m$ 은 1 내지 10의 정수이고,  $R_{10}$ 은 알킬, 페닐, 치환된 페닐, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 헤테로사이클 또는 치환된 헤테로사이클로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 또는  $R_3$ 과 함께  $R_2$ , 또는  $R_4$ 와 함께  $R_3$ 은 치환된 또는 비치환된 메틸렌디옥시, 에틸렌디옥시 또는 에틸렌옥시를 형성하고;  $R_6$ 은 H 또는  $OR'$ (여기에서,  $R'$ 은 알킬, 알케닐, 사이클로알킬, 할로알킬 또는 하이드록시알킬임)이다. 나타내지는 않았지만, 바로 앞의 구조에서 20-위치 이외의 위치(예컨대, 10-위치 또는 11-위치 등)에 해당하는 하이드록실기를 가지는 유사체는 가능한 활성제에 포함된다.

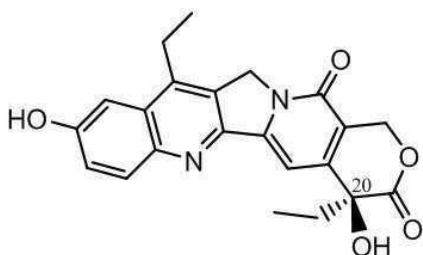
[0228] 예시적인 활성제는 이리노테칸이다.



### 이리노테칸

[0229]

[0230] 다른 예시적인 활성제는 7-에틸-10-하이드록시-캄토테신(SN-38)이며, 이의 구조는 하기에 나타내어져 있다.

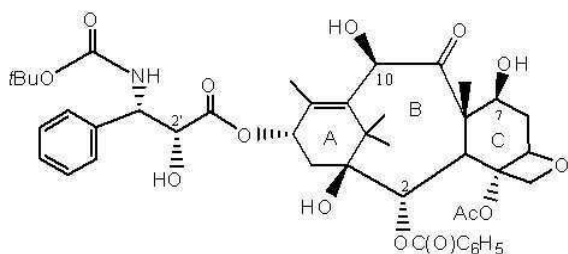


[0231]

### 7-에틸-10-하이드록시-캄토테신

[0232]

활성제의 또 다른 예시적인 부류는 탁산 집단에 속하는 분자를 포함한다. 이러한 부류의 분자 유래의 예시적인 활성제는 도세탁셀이며, 여기에서 2' 하이드록실기에서 하이드록시의 H는 하기와 같은 바람직한 다중 팔 중합체 콘쥬게이트를 형성하는데 관련된다.



[0233]

[0234]

본원에 기술된 중합체 시약은 다수의 실체, 예를 들어 필름, 화학적 분리 및 정제 표면, 고체 지지체, 금속 표면 예를 들어 금, 티타늄, 탄탈륨, 니오븀, 알루미늄, 강철, 및 이들의 산화물, 규소 산화물, 거대분자(예컨대, 단백질, 폴리펩티드 등), 및 소분자에 공유적으로 또는 비공유부착될 수 있다. 추가적으로, 중합체 시약은 또한 생화학 센서, 생체전자 스위치 및 게이트에 사용될 수 있다. 중합체 시약은 또한 펩티드 합성, 중합체 코팅된 표면 및 중합체 그래프트의 제조에 대한 담체로서 이용되어, 친화력 분배를 위한 중합체-리간드 콘쥬게이트를 제조, 가교결합 또는 비가교결합 하이드로겔을 제조, 및 생물반응기를 위한 중합체-보조인자 부가체를 제조할 수 있다.

[0235]

선택적으로, 콘쥬게이트는 수의학 용도 및 인간의 의학적 용도를 위한 약학 조성물로서 제공될 수 있다. 이러한 약학 조성물은 콘쥬게이트를 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제, 및 선택적으로 임의의 다른 치료 성분과 결합함으로써 제조된다.

[0236]

예시적인 약학적으로 허용되는 부형제는 제한되지 않으며, 탄수화물, 무기 염, 향균제, 항산화제, 계면활성제, 완충제, 산, 염기, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0237]

탄수화물, 예를 들어 당, 유도체화 당 예를 들어 알디톨, 알도산, 에스테르화 당 및/또는 당 중합체는 부형제로서 존재할 수 있다. 구체적인 탄수화물 부형제는 예를 들어 단당류, 예를 들어 프룩토스, 말토스, 갈락토스, 글



루코스, D-만노스, 소르보스 등; 이당류, 예를 들어 락토스, 수크로스, 트레할로스, 셀로비오스 등; 다당류, 예를 들어 라피노스, 펠레치토스, 말토덱스트린, 텍스트란, 전분 등; 및 알디톨, 예를 들어 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 락티톨, 소르비톨(글루시톨), 피라노실 소르비톨, 미오이노시톨 등을 포함한다.

- [0238] 부형제는 또한 무기 염 또는 완충제, 예를 들어 시트르산, 염화나트륨, 염화칼륨, 황산나트륨, 질산칼륨, 제1인산나트륨, 제2인산나트륨 및 이의 조합을 포함할 수 있다.
- [0239] 조성물은 또한 세균 성장을 방지 또는 막기 위한 항균제를 포함할 수 있다. 본 발명의 하나 이상의 실시형태에 적합한 항균제의 비제한적인 예는 벤잘코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드, 벤질 알코올, 세틸피리디늄 클로라이드, 클로로부탄올, 페놀, 페닐에틸 알코올, 페닐머큐릭 니트레이트, 티메르솔 및 이의 조합을 포함한다.
- [0240] 또한 항산화제가 조성물에 존재할 수 있다. 항산화제는 산화를 방지하여 콘주게이트 또는 제조물의 다른 성분의 변패를 방지하는데 사용된다. 본 발명의 하나 이상의 실시형태에서의 사용에 적합한 항산화제는 예를 들어 아스코빌 팔미테이트, 부틸화 하이드록시아니솔, 부틸화 하이드록시톨루엔, 차아인산, 모노티오글리세롤, 프로필 갈레이트, 소듐 비셀파이트, 소듐 포름알데히드 설폭실레이트, 소듐 메타비셀파이트, 및 이의 조합을 포함한다.
- [0241] 계면활성제는 부형제로서 존재할 수 있다. 예시적인 계면활성제는 폴리스orb에이트 예를 들어 “Tween 20” 및 “Tween 80”, 및 플루로닉 예를 들어 F68 및 F88(이들 모두 BASF(미국 뉴저지주 마운트 올리브 소재)로부터 입수가능함); 소르비탄 에스테르; 지질, 예를 들어 인지질 예를 들어 레시틴 및 다른 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민(바람직하게는 리포솜 형태가 아님), 지방산 및 지방 에스테르; 스테로이드, 예를 들어 콜레스테롤; 및 킬레이트화제, 예를 들어 EDTA, 아연 및 다른 적합한 양이온을 포함한다.
- [0242] 산 또는 염기는 조성물 중에 부형제로서 존재할 수 있다. 사용될 수 있는 산의 비제한적인 예는 염산, 아세트산, 인산, 시트르산, 말산, 락티산, 포름산, 트리클로로아세트산, 질산, 과염소산, 황산, 푸마르산, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 산을 포함한다. 적합한 염기의 예는 제한없이 수산화나트륨, 아세트산나트륨, 수산화암모늄, 수산화칼륨, 아세트산암모늄, 아세트산칼륨, 인산나트륨, 인산칼륨, 시트르산나트륨, 포름산나트륨, 황산나트륨, 푸마르산칼륨, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 염기를 포함한다.
- [0243] 조성물 중 콘주게이트(즉, 활성제와 중합체 물질 사이에 형성된 콘주게이트)의 양은 다수의 작용자에 따라서 다를 것이지만, 최적으로는 조성물이 단위 용량 용기(예컨대, 바이알) 내에 저장될 때 치료적 유효량일 것이다. 추가적으로, 약학 제조물이 시린지 내에 저장될 수 있다. 치료적 유효 용량은, 어떠한 양이 임상적으로 원하는 중점을 만드는지 결정하기 위하여 콘주게이트의 양을 증가시키면서 반복 투여함으로써 실험적으로 결정할 수 있다.
- [0244] 조성물 중 임의의 개별적인 부형제의 양은 부형제의 활성 및 조성물의 특정 요구에 따라서 다를 것이다. 통상적으로, 임의의 개별적인 부형제의 최적 양은 통상적인 실험을 통하여, 즉 (저함량 내지 고함량의 범위로) 다양한 양의 부형제를 함유하는 조성물을 제조하고, 안정성 및 다른 파라미터를 시험한 다음, 유의한 부작용이 없이 최적의 성능을 달성하는 범위를 결정함으로써 결정된다.
- [0245] 그러나 일반적으로 부형제는 조성물 중에 약 1중량% 내지 약 99중량%, 바람직하게는 약 5중량% 내지 약 98중량%, 보다 바람직하게는 약 15중량% 내지 약 95중량% 부형제의 양으로, 가장 바람직하게는 30중량% 미만의 농도로 존재할 것이다.
- [0246] 다른 부형제와 함께 이들 상기한 약학 부형제는 문헌["Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19<sup>th</sup> ed., Williams & Williams, (1995)], ["Physician's Desk Reference", 52<sup>nd</sup> ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998)], 및 [Kibbe, A.H., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3<sup>rd</sup> Edition, American Pharmaceutical Association, Washington, D.C., 2000]에 기술되어 있다.
- [0247] 약학적으로 허용되는 조성물은 모든 유형의 제형, 특히 주사에 적합한 제형, 예컨대 액체뿐만 아니라 재구성될 수 있는 분말 또는 동결건조물(lyophilate)을 포함한다. 주사 전에 고체 조성물을 재구성하는데 적합한 희석제의 예는 주사용 정균수(bacteriostatic water), 수 중 텍스트로스 5%, 인산염 완충 식염수, 링거액, 식염수(saline), 멸균수, 탈이온수, 및 이의 조합을 포함한다. 액체 약학 조성물에 대하여, 용액 및 현탁액이 고려된다.
- [0248] 본 발명의 하나 이상의 실시형태의 조성물은 반드시 아니지만 통상적으로 주사를 통하여 투여되고, 따라서 일반적으로 투여 직전에 액체 용액 또는 현탁액이다. 약학 제조물은 또한 다른 형태, 예를 들어 시럽, 크림,

연고, 정제, 분말 등을 취할 수 있다. 또한 투여의 다른 방식은 예를 들어 폐, 직장, 경피, 경점막, 구강, 척추강내, 피하, 동맥 내 등이 포함된다.

[0249] 또한 본 발명은 본원에 제공된 바와 같은 콘쥬게이트를 콘쥬게이트를 이용한 치료에 반응하는 이상을 겪고 있는 환자에게 투여하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 일반적으로 주사를 통해 환자에게 (바람직하게는 약학 조성물의 부분으로서 제공되는) 콘쥬게이트의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 앞서 기술한 바와 같이, 콘쥬게이트는 정맥 주사에 의한 비경구적 주사로 투여될 수 있다. 비경구적 투여에 적합한 제형 유형은 특히 즉시 주사가 가능한(ready-for-injection) 용액, 사용 전에 용매와 조합되는 건조 분말, 즉시 주사가 가능한 현탁액, 사용 전에 비히클과의 조합되는 건조 불용성 조성물, 및 투여 전에 희석되는 에멀전 및 액체 농축물을 포함한다.

[0250] 투여 방법은 콘쥬게이트의 투여에 의해 치료되거나 예방될 수 있는 임의의 이상을 치료하는데 사용될 수 있다. 당업자는 특정 콘쥬게이트가 어떤 이상을 효과적으로 치료할 수 있는지 이해한다. 유리하게, 콘쥬게이트는 다른 활성제의 투여 전에, 투여와 동시에, 또는 투여 후에 환자에게 투여될 수 있다.

[0251] 투여될 실제 용량은 개체의 연령, 체중 및 일반적인 상태뿐만 아니라 치료될 이상의 심각성, 의료인의 판단, 및 투여될 콘쥬게이트에 따라서 다를 것이다. 치료적 유효량은 당업자에게 공지되어 있고/있거나 관련 참고 교과서 및 문헌에 기술되어 있다. 일반적으로, 치료적 유효량은 약 0.001mg 내지 100mg, 바람직하게는 0.01mg/일 내지 75mg/일, 보다 바람직하게는 0.10mg/일 내지 50mg/일의 범위일 것이다. 주어진 용량은 예를 들어 관련 증상이 완화되고/완화되거나 완전히 없어질 때까지 주기적으로 투여될 수 있다.

[0252] 임의의 주어진 콘쥬게이트(즉, 바람직하게는 약학 제조물의 일부로서 제공된 콘쥬게이트)의 단위 투여량은 임상의의 판단, 환자의 요구 등에 따라서 다양한 투여 스케줄로 투여될 수 있다. 구체적인 투여 스케줄은 당업자에게 공지될 것이거나 또는 통상적인 방법을 사용하여 실험적으로 결정될 수 있다. 예시적인 투여 스케줄은 1일에 1회, 1주일에 3회, 1주일에 2회, 1주일에 1회, 1개월에 2회, 1개월에 1회, 및 이의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일단 임상적 중점이 달성되면, 조성물의 투여는 중단된다.

[0253] 본원에 기술된 임의의 콘쥬게이트를 투여하는 하나의 이점은, 가수분해로 분해가능한 연결이 활성제 부분의 잔기와 수용성 중합체 사이에 포함될 때 개별적인 수용성 중합체 부분이 절단될 수 있다는 것이다. 이러한 결과는, 중합체의 크기 때문에 체내로부터의 클리어런스(clearance)가 잠재적으로 문제가 될 때 유리하다. 최적으로, 생리적으로 절단가능하고/절단가능하거나 효소로 분해가능한 연결, 예를 들어 아미드, 카보네이트 또는 에스테르 포함 연결의 사용을 통하여 각각의 수용성 중합체 부분의 절단이 용이하게 된다. 이러한 방법으로, (개별적인 수용성 중합체 부분의 절단을 통하여) 콘쥬게이트의 클리어런스는 원하는 클리어런스 특성을 제공할 중합체 분자 크기 및 작용기 유형을 선택함으로써 조정될 수 있다. 당업자는 중합체의 적절한 분자 크기뿐만 아니라 절단가능한 작용기를 결정할 수 있다. 예를 들어, 통상적인 실험을 사용하여 먼저 상이한 중합체 중량 및 절단가능한 작용기를 가지는 다양한 중합체 유도체를 제조한 다음, 환자에게 중합체 유도체를 투여하고 주기적인 혈액 및/또는 소변 샘플링에 의해 (예컨대, 주기적인 혈액 또는 소변 샘플링을 통하여) 클리어런스 프로필을 획득함으로써, 당업자는 적절한 분자 크기 및 절단가능한 작용기를 결정할 수 있다. 일단 일련의 클리어런스 프로필의 각각의 시험한 콘쥬게이트에 대하여 획득하면, 적합한 콘쥬게이트를 확인할 수 있다.

#### [0254] 혼합 염 - 활성제 “D” 에 관한 고려 사항

[0255] 앞서 나타낸 바와 같이, 수용성 중합체 콘쥬게이트 및 이러한 콘쥬게이트를 포함하는 조성물이 혼합 염으로서 제공될 수 있다. 혼합 염 콘쥬게이트 및 조성물 내용에서, 활성제는, 수용성 중합체에 콘쥬게이션될 때, 적어도 하나의 염기성 질소 원자, 예를 들어 아민기(예컨대, 수용성 중합체와 콘쥬게이션되지 않은 기를 포함하는 아민 또는 다른 염기성 질소)를 포함하는, 소분자 약물, 올리고펩티드, 펩티드, 또는 단백질이다. 혼합 염에서, 염기성 질소 원자는 각각 개별적으로 프로톤화되거나 또는 비프로톤화되고, 프로톤화 질소 원자는 2개의 상이한 음이온의 산성 염으로서 존재한다.

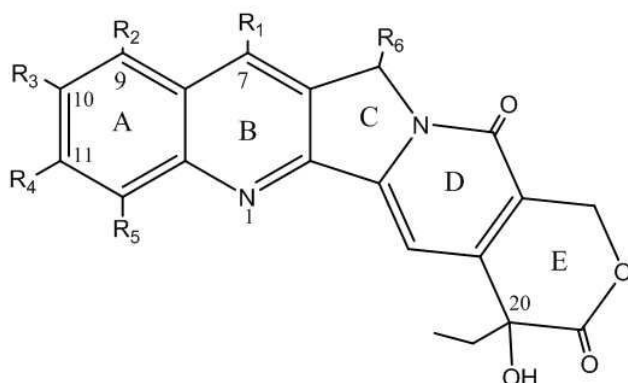
[0256] 본원에 기술된 바와 같이 혼합 산성 염을 제공하는데 적합한 적어도 하나의 아민기 또는 염기성 질소 원자를 포함하는 활성제는 이에 제한되지 않지만 아드리아마이신, γ-아미노부티르산(GABA), 아미오다론, 아미트립틸린, 아지트로마이신, 벤즈페타민, 브로모페니라민, 카비독사민, 칼시토닌 클로람부실, 클로로프로카인, 클로로퀸, 클로르페니라민, 클로르프로마진, 신나리진, 클라리트로마이신, 클로미펜, 사이클로벤자프린, 사이클로펜테이트, 사이클로포스파미드, 다카바진, 다우노마이신, 데메클로사이클린, 디부카인, 디사이클로민, 디에틸프로프린, 딜티아젠프, 디펜히드리네이트, 디펜히드라민, 디소피라미드, 독세핀, 독시사이클린, 독실아민, 디프리담,

EDTA, 에리트로마이신, 플루라제팜, 겐티아나 바이올렛, 하이드록시클로로퀸, 이미프라민, 인슐린, 이리노테칸, 레보메타딜, 리도카인, 록사린, 메클로레타민, 멜파란, 메타돈, 메토티메페라진, 메토티렉세이트, 메토클로프라미드, 미노사이클린, 나프티핀, 니카르디핀, 니자티딘, 올페나드린, 옥시부틴, 옥시테트라사이클린, 페녹시벤자민, 펜톨라민, 프로카인아미드, 프로카인, 프로마진, 프로메타진, 프로파라카인, 프로폭시카인, 프로폭시펜, 라니티딘, 타목시펜, 테르비나핀, 테트라카인, 테트라사이클린, 트라나돌, 트리플루프로마진, 트리메프라진, 트리메틸벤즈아미드, 트리미프라민, 트리켈레나민, 트롤레안도마이신, 티라민, 우라실 머스타드, 베라파밀 및 바소프레신을 포함한다.

[0257] 추가적인 활성제는 하나 이상의 질소 포함 헤테로사이클, 예를 들어 아크라비스틴, 아목사핀, 아스테미졸, 아르로핀, 아지트로마이신, 벤자프릴, 벤즈트로핀, 베페리덴, 부프라카인, 부프레노르핀, 부스피론, 부토르파놀, 카페인, 캄토테신 및 캄토테신 집단에 속하는 분자, 세프리악손, 클로르프로마진, 시프로록사신, 클라다라빈, 클레마스틴, 클린다마이신, 클로파자민, 클로자핀, 코카인, 코테인, 사이프로헵타딘, 데시프라민, 디하이드로에르고타민, 디페니돌, 디페녹시레이트, 디피리다몰, 독사프람, 에르고타민, 팜시클로버, 펜타닐, 플라복세이트, 플루다라빈, 플루페나진, 플루바스틴, 간시클로버, 그라니스테론, 구아네티딘, 할로페리돌, 호마트로핀, 하이드로코돈, 하이드로모르폰, 하이드록시진, 히오시아민, 이미프라민, 이트라코나졸, 케테로락, 케토코나졸, 레보카르부스틴, 레보르폰, 린코마이신, 로메플록사신, 로페라미드, 로자탄, 록사핀, 마진돌, 메클리진, 메페리딘, 메피바카인, 메소리다진, 메트딜라진, 메테나민, 메티마졸, 메토티리메페라진, 메티세르지드, 메트로니다졸, 미녹시딜, 미토마이신 c, 몰린돈, 모르핀, 나파조돈, 날부핀, 날리딕스산, 날메펜, 날록손, 날트렉손, 나파졸린, 네도크로밀, 니코틴, 노르플록사신, 오픈록사신, 온단스테론, 옥시코돈, 옥시모르폰, 펜타조신, 펜톡시필린, 페르페나진, 피소스티그민, 필로카르핀, 피모지드, 프라목신, 프라조신, 프로클로르페라진, 프로마진, 프로메타진, 퀴니딘, 퀴닌, 라우윌피아 알칼로이드, 리보플라빈, 리파부틴, 리스페리돈, 로쿠로니움, 스코팔라민, 수펜타닐, 타크린, 테라조신, 테르코나졸, 테르페나딘, 티오리다진, 티오티센, 티클로디핀, 티몰롤, 톨라자미드, 톨메틴, 트라조돈, 트리에틸페라진, 트리플루오프로마진, 트리헥실페니딜, 트리메프라진, 트리미프라민, 투보쿠라린, 베쿠로니움, 비다라빈, 빈블라스틴, 빈크리스틴 및 비노렐빈을 포함하는 것을 포함한다.

[0258] 추가적인 활성제는 방향족 고리 질소, 예를 들어 아세타졸아미드, 아크라비스틴, 아사이클로비르, 아테노신 인산, 알로푸리날, 알프라졸람, 아목사핀, 암리논, 아프라클로니딘, 아자타딘, 아즈트레오남, 비사코딜, 블레오마이신, 브로모페니라민, 부스피론, 부토코나졸, 캄토테신 및 캄토테신 집단에 속하는 분자, 카르비녹사민, 세파만돌, 세파졸, 세픽심, 세프메타졸, 세포니시드, 세포페라존, 세포탁심, 세포테탄, 세프포독심, 세프리악손, 세파필린, 클로로퀸, 클로르페니라민, 시메티딘, 클라다라빈, 클로트리마졸, 클록사실린, 디다노신, 디피리다몰, 독사조신, 독실아민, 에코나졸, 에녹사신, 에스타졸람, 에티오나미드, 팜시클로버, 파모티딘, 플루코나졸, 플루다라빈, 폴산, 간시클로버, 하이드록시클로로퀸, 요오드퀴놀, 이소니아지드, 이트라코나졸, 케토코나졸, 라모트리진, 란소프라졸, 로르세타딘, 로자탄, 메벤다졸, 메르캅토프린, 메토티렉세이트, 메트로니다졸, 미코나졸, 미다졸람, 미녹시딜, 나파조돈, 날리딕스산, 니아신, 니코틴, 니자티딘, 오메페라졸, 옥사프로진, 옥시코나졸, 파파베린, 펜토스타틴, 페나조피리딘, 필로카르핀, 피록시감, 프라조신, 프리마퀸, 피라진아미드, 피리메타민, 피록시딘, 퀴니딘, 퀴닌, 리바베린, 리팜핀, 설파다이아진, 설파메티졸, 설파메톡사졸, 설파살라진, 설파속사졸, 테라조신, 티아벤다졸, 티아민, 티오구아닌, 티몰롤, 트라조돈, 트리암테렌, 트리아졸람, 트리메타디온, 트리메토프림, 트리메트렉세이트, 트리켈렌아민, 트로피카미드 및 비다라빈을 포함하는 것을 포함한다.

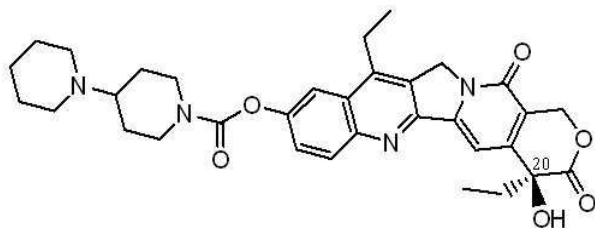
[0259] 바람직한 활성제는 캄토테신 집단의 분자에 속하는 것이다. 예를 들어, 활성제는 하기의 일반 구조를 가질 수 있으며,



[0261] 여기에서  $R_1$  내지  $R_5$ 는 각각 독립적으로 수소; 할로; 아실; 알킬(예컨대, C1-C6 알킬); 치환된 알킬; 알콕시(예컨대, C1-C6 알콕시); 치환된 알콕시; 알케닐; 알키닐; 사이클로알킬; 하이드록실; 시아노; 니트로; 아지도; 아미도; 하이드라진; 아미노; 치환된 아미노(예컨대, 모노알킬아미노 및 디알킬아미노); 하이드록시카보닐; 알콕시카보닐; 알킬카보닐옥시; 알킬카보닐아미노; 카바모일옥시; 아릴설폰일옥시; 알킬설폰일옥시;  $-C(R_7)=N-(O)_i-$  ( $R_7$ (여기에서  $R_7$ 은 H, 알킬, 알케닐, 사이클로알킬 또는 아릴이고,  $i$ 는 0 또는 1이며,  $R_8$ 은 H, 알킬, 알케닐, 사이클로알킬 또는 헤테로사이클임); 및  $R_9C(O)O-$ (여기에서  $R_9$ 는 할로젠, 아미노, 치환된 아미노, 헤테로사이클, 치환된 헤테로사이클 또는  $R_{10}-O-(CH_2)_m-$ (여기에서  $m$ 은 1 내지 10의 정수이고,  $R_{10}$ 은 알킬, 페닐, 치환된 페닐, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 헤테로사이클 또는 치환된 헤테로사이클로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 또는  $R_3$ 과 함께  $R_2$ , 또는  $R_4$ 와 함께  $R_3$ 은 치환된 또는 비치환된 메틸렌디옥시, 에틸렌디옥시 또는 에틸렌옥시를 형성하고;  $R_6$ 은 H 또는  $OR'$ (여기에서  $R'$ 은 알킬, 알케닐, 사이클로알킬, 할로알킬 또는 하이드록시알킬임)이다.

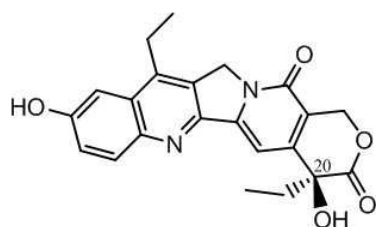
[0262] 상기 구조와 관련하여 나타내지는 않았지만, 20-위치 이외(예컨대, 10-위치 또는 11-위치 등)에서 하이드록실기를 가지는 유사체는 유사하게 바람직하다.

[0263] 하나의 특정 실시형태에서, 활성제는 이리노테칸(구조는 다음에 나타냄)이다.



[0264]

[0265] 또 다른 특정 구체예에서, 활성제는 이리노테칸의 대사물질인 활성제 7-에틸-10-하이드록시-캄토테신(SN-38)이며, 이의 구조는 하기에 나타내어져 있다.



[0266]

# [0267] **혼합 염 - 콘쥬게이트에 관한 고려 사항**

[0268] 수용성 중합체 및 활성제의 예시적인 혼합 염 콘쥬게이트는 상기 기술된 바와 같이 다수의 구조적 특징 중 임의의 것을 가질 수 있다. 즉, 콘쥬게이트는 통상적으로 선형 수용성 중합체의 각각의 말단에서, 선형 구조, 즉 선형 수용성 중합체에 공유부착된 1개 또는 2개 활성제 분자를 가지는 구조를 가질 수 있다. 대안적으로, 콘쥬게이트는 분기형, 분지형 또는 다중 팔 구조를 가질 수 있다.

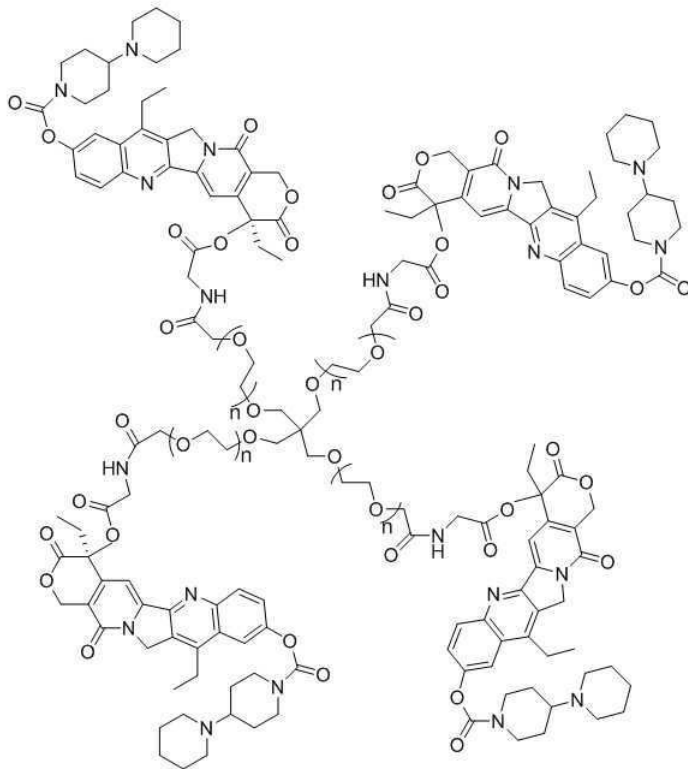
[0269] 하나의 예시적인 다중 팔 중합체 콘쥬게이트는 일반화된 구조  $R(-Q-POLY_1-X-D)_q$ 에 해당하며, 여기에서  $R$ 은 약 3개 내지 약 150개의 탄소 원자를 가지는 유기 라디칼이고,  $Q$ 는 (바람직하게 가수분해에 안정적인) 링커이며  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-NH-C(O)-$  및  $-C(O)-NH-$ 일 수 있고,  $POLY_1$ 은 수용성인 비펩티드 중합체이며,  $X$ 는 가수분해가능한 링커를 포함하는 스페이서이고,  $D$ 는 활성제 부분이며,  $q$ 는 3 내지 25(예컨대, 3 내지 10, 예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10 중 임의의 것)의 범위이다.

[0270] 다른 예시적인 다중 팔 중합체 콘쥬게이트는 일반화된 구조  $R(-Q-POLY_1-CH_2C(O)-NH-CH_2-C(O)-O-D)_q$ 에 해당하며, 여기에서  $R$ 은 3개 내지 150개의 탄소 원자를 가지는 유기 라디칼이고;  $Q$ 는 링커이며, 여기에서  $R$ 은  $Q$ 와 함께 취해져서  $R(-Q)_q$ 를 형성할 때 " $q$ " 하이드록실 또는 티올 프로톤의 제거 후 각각  $POLY_1$ 에 대한 부착점을 형성하는 폴리올 또는 폴리티올의 잔기이고;  $POLY_1$ 은 폴리(알킬렌 글리콜), 폴리(올레핀 알코올), 폴리(비닐피롤리돈),



폴리(하이드록실알킬-메타크릴아미드), 폴리(하이드록시알킬-메타크릴레이트), 폴리( $\alpha$ -하이드록시산), 폴리(아크릴산), 폴리(비닐 알코올), 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리(N-아크릴로일모르폴린), 및 이의 공중합체 또는 삼량체로 이루어진 군으로부터 선택된 수용성 중합체이며; D는 10-고리 위치, 11-고리 위치 또는 20-고리 위치에서 부착된 캄토테신이고; q는 3 내지 50(예컨대, 3 내지 10, 예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10 중 임의의 것)의 값을 가진다.

[0271] 하나의 예시적인 다중 팔 중합체 콘쥬게이트 구조는 하기 구조에 해당한다.



[0272]

[0273] 상기 구조는 본원에서 간단한 방식으로 “4개 팔-PEG-Gly-이리노” (4개 팔-펜타에리트리톨릴-PEG-카복실메틸글리신 이리노테칸)로 지칭되며, 보다 완전한 명칭은 “펜타에리트리톨릴-4개 팔-(PEG-1-메틸렌-2-옥소-비닐아미노아세테이트 연결-이리노테칸)”에 해당한다. 콘쥬게이트의 활성제의 부분에서 염기성 아미노 및/또는 질소기는 중성 형태로만 상기에 나타내어져 있고, 콘쥬게이트는 본원에 상세히 기술되어 있는 바와 같이 부분적 혼합 염의 특징을 가지는 것을 이해한다. 상기 구조에서 볼 수 있는 바와 같이, 카복실메틸 변형된 4개 팔-펜타에리트리톨릴 PEG 시약은 중합체 부분 및 활성제, 즉 이리노테칸 사이에서 개재하는 글리신 링커를 가진다.

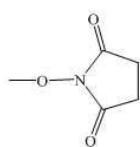
[0274] 특정 경우에서, 불완전한 전환, 즉 100% 미만의 수득물, 및 특히 다중 팔 폴리에틸렌 글리콜계 물질의 화학 합성 동안 통상적으로 부닥치게 되는 다른 불가피한 복잡화로 인하여, “4개 팔-PEG-Gly-이리노”를 포함하는 예시적인 조성물은 4개 팔 콘쥬게이트를 포함하는 조성물로서 특성화될 수 있으며, 여기에서 조성물 내 4개 팔 콘쥬게이트의 적어도 90%는


[0275] (i) 하기 화학식으로 포함되는 구조를 가지며,

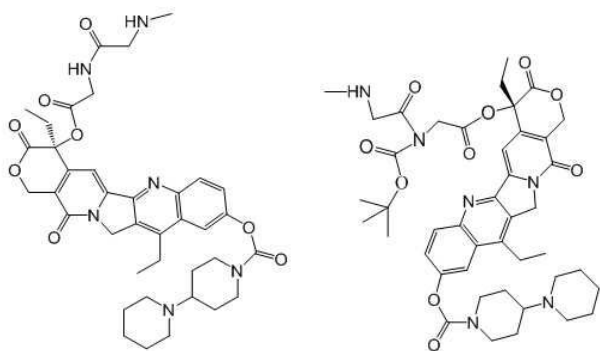
[0276]  $C-[CH_2-O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2-C(O)-Term]_4$

[0277] 여기에서,

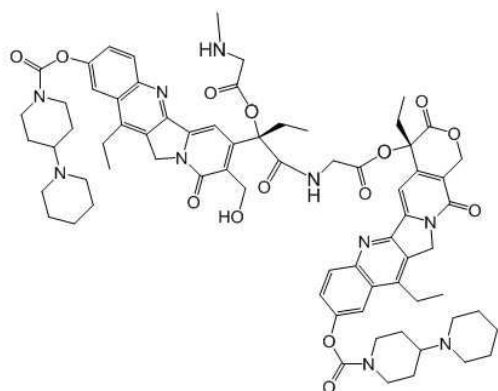
[0278] 각각의 경우에서 n은 5 내지 약 150(예컨대, 약 113)이고,



[0279] 각각의 경우에서 Term은 -OH, -OCH<sub>3</sub>, , -NH-CH<sub>2</sub>-C(O)-OH, -NH-CH<sub>2</sub>-C(O)-OCH<sub>3</sub>,



[0280]



[0281]

[0282]

및  $\text{-NH-CH}_2\text{-C(O)-O-}$ 이리노(“GLY-이리노”)로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기에서 이리노는 이리노테칸의 잔기이고,

[0283]

(ii) 각각의 Term에 있어서, 조성물 내 4개 팔 콘쥬게이트의 적어도 90%이고, 이의 적어도 90%는  $\text{-NH-CH}_2\text{-C(O)-O-}$ 이리노이다.

[0284]

통상적으로, 반드지는 아니지만, 중합체 팔의 수는 수용성 중합체 코어에 공유부착된 활성제 분자의 수에 해당할 것이다. 즉, 특정 수의 중합체 팔(예컨대, 변수 “q”에 해당함)을 가지고, 각각 반응성 작용기(예컨대, 카복시, 활성화된 에스테르, 예를 들어 석신이미딜 에스테르, 벤조트리아졸릴 카보네이트 등)를 말단에서 가지는 중합체 시약의 경우에, 해당하는 콘쥬게이트에서 수용성 중합체 코어에 공유부착될 수 있는 활성제(예를 들어 이리노테칸)의 최적화된 수는 가장 바람직하게 “q”이다. 즉, 최적화된 콘쥬게이트는 약물 부하 값(load value)이 1.00(q)(또는 100%)인 것으로 고려된다. 바람직한 실시형태에서, 다중 팔 중합체 콘쥬게이트는 약물 부하의 정도가 0.90(q)(또는 90%) 이상인 것을 특징으로 한다. 바람직한 약물 부하는 0.92(q) 이상; 0.93(q) 이상; 0.94(q) 이상; 0.95(q) 이상; 0.96(q) 이상; 0.97(q) 이상; 0.98(q) 이상; 및 0.99(q) 이상 중 하나 이상을 만족한다. 가장 바람직하게, 다중 팔 중합체 콘쥬게이트에 대한 약물 부하는 100%이다. 다중 팔 수용성 중합체 콘쥬게이트 혼합 산성 염을 포함하는 조성물은 중합체 코어에 부착된 1개의 활성제를 가지는 분자 콘쥬게이트, 중합체 코어에 부착된 2개의 활성제 분자를 가지는 분자 콘쥬게이트, 중합체 코어에 부착된 3개의 활성제를 가지는 분자 콘쥬게이트 등의 혼합물을, 최대 중합체 코어에 부착된 “q” 활성제를 가지는 콘쥬게이트를 포함하는 혼합물을 포함할 수 있다. 생성된 조성물은 조성물 내에 함유된 콘쥬게이트 중에 대하여 평균화된, 전체적인 약물 부하값을 가질 것이다. 이상적으로, 조성물은 대부분, 예컨대 약물이 완전히 부하된 중합체 콘쥬게이트(즉, “q” 팔에 대하여 “q” 활성제 분자를 가지는 것, 즉 각각의 팔에 대하여 단일 활성제 분자를 가지는 것)의 50% 초과, 그러나 보다 바람직하게 60% 초과, 보다 더 바람직하게 70%, 훨씬 더 바람직하게 80% 초과, 가장 바람직하게 90% 초과를 포함할 것이다.

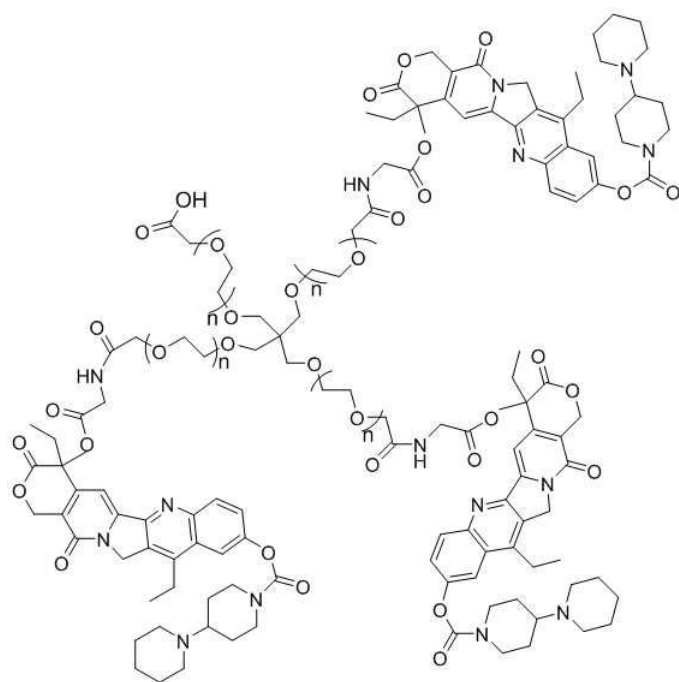
[0285]

설명한 바와 같이 다중 팔 중합체 콘쥬게이트가 4개 중합체 팔을 포함하는 경우에서, 다중 팔 중합체 당 공유부착된 약물 분자의 수의 이상적인 값은 4이고, 이러한 콘쥬게이트의 조성물에서의 평균을 기술하는 것에 대하여, 다중 팔의 중합체에 부하된 약물 분자의 값(즉, 백분율)이 이상적인 값의 약 90% 내지 약 100%의 범위일 것이다. 즉, (4개 팔의 중합체 조성물의 부분으로서) 주어진 4개 팔의 중합체에 공유부착된 약물 분자의 평균 수는 통상적으로 완전히 부하된 값의 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 및 100%이다. 이는 다중 팔 중합체 콘쥬게이트 당 D의 평균 수가 약 3.60 내지 4.0의 범위인 것에 해당한다.

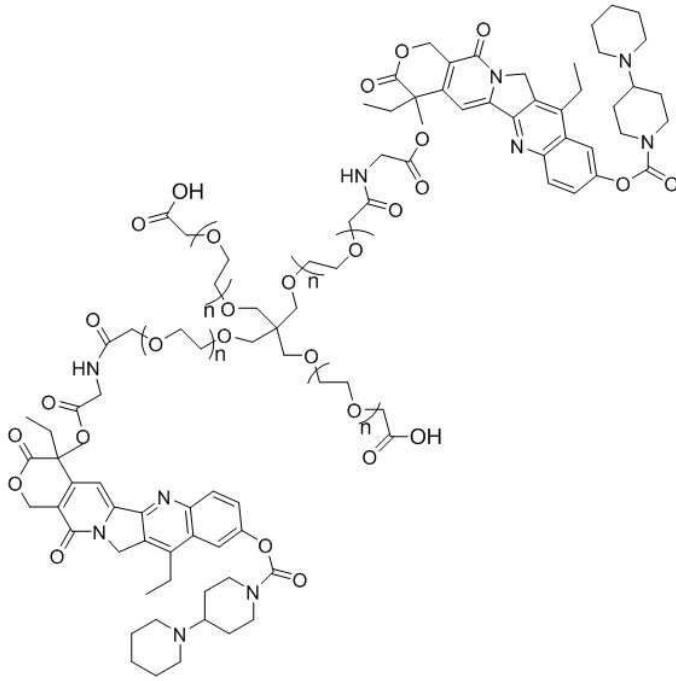
[0286] 또 다른 실시형태에서, 예컨대 중합체 팔의 수가 약 3 내지 약 8의 범위인 다중 팔 중합체 콘쥬게이트 조성물에 대하여, 조성물에 존재하는 종의 대부분, (예컨대, 50% 초과, 보다 바람직하게는 60% 초과, 보다 더 바람직하게는 70% 초과, 훨씬 더 바람직하게는 80% 초과, 가장 바람직하게는 90% 초과)은 중합체 코어에 부착된 약물 분자의 이상적인 수(“q”)를 가지는 것 또는 중합체 코어에 부착된 (“q”) 및 (“q-1”) 약물 분자의 조합을 가지는 것이다.

[0287] 특정 예에서, 본원에 기술된 바와 같이 다중 팔 중합체 콘쥬게이트가 제조되며, 생성된 콘쥬게이트는 상기 제공된 범위의 맥락 내에서 높은 정도의 치환 또는 약물 부하를 나타낸다. 이렇게 제조된 예시적인 콘쥬게이트는 일반적으로 적어도 90%의 약물 부하값을 가질 것이고, 통상적으로 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 초과, 그리고 일부 경우에서 100%의 완전 부하 값의 약물 부하 값을 가질 것이다. 특히, 예컨대 본원에 제공된 알콕실화 방법에 따라서 제조된 다중 팔 중합체 출발 물질로부터 제조된 다중 팔 중합체 콘쥬게이트는, 적어도 부분적으로 중합체 출발 물질의 순도로 인하여 더 높은 약물 치환 값을 나타낼 수 있다. 예로서, 본원에 제공된 알콕실화 방법에 따라서 제조된 4개 팔-PEG-OH로부터 제조된 4개 팔-PEG-CM-SCM(예컨대, 분자량이 약 10kDa 초과임)은, 다른 상업적으로 이용가능한 4개 팔-PEG-OH 출발 물질(예컨대 더 적은 저분자량 중합체 불순물을 가짐)로 얻어지는 것보다 4개 팔-PEG-CM-SCM 반응물 물질에 존재하는 특정 중합체 종에 대하여 평균적으로 더 높은 수준의 순도를 가질 것이다. 다중 팔 PEG 출발 물질, 특히 더 높은 분자량의 물질의 순도 수준은, 중합체 출발 물질에 존재하는 원하지 않는 중합체 물질이 이후의 변형 단계에서 “함께 운반되는” 경우에 최종 콘쥬게이트 생성물의 순도에 기여할 수 있다. 특히, 탈보호 글리신-이리노테칸과 같은 활성제와 커플링시키는 고수율 반응 단계, 예컨대 카복시메틸화가 있는 합성 방법을 이용하는 것에 있어서, 중합체 불순물의 양이 상대적으로 많은 중합체 출발 물질의 이용은 생성된 콘쥬게이트 종의 순도 및 약물 부하 값에, 임의의 경우에는 몇%로 영향을 줄 수 있다. 게다가, 저분자량 콘쥬게이트는 보다 빠르게 제거될 것이므로, 오히려 최종 혼합 염 콘쥬게이트에서 저분자량 중합체 콘쥬게이트 종의 소량의 존재는 생물학적 이용가능성을 낮출 수 있다. 따라서 본원에 기술된 알콕실화 방법을 사용하여 제조된 출발 물질로부터 제조된 중합체 콘쥬게이트는, 최대 예컨대 20%(예컨대, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% 또는 20%)까지, 저분자량 또는 다른 중합체 불순물을 포함하는, 상업적으로 이용가능한 다중 팔 출발 물질로부터 제조된 중합체 콘쥬게이트보다 더 높은 생물학적 이용가능성을 나타낼 수 있다.

[0288] 상기한 바에 따라서, 부분적 혼합 염(및 이를 함유하는 조성물)은 완전히 약물 부하된 구조(즉, 4개 중합체 팔의 각각에 공유 부착된 글리신-변형 이리노테칸 분자를 가짐)에 더하여, 하기 구조 중 임의의 하나 이상을 포함할 수 있다:

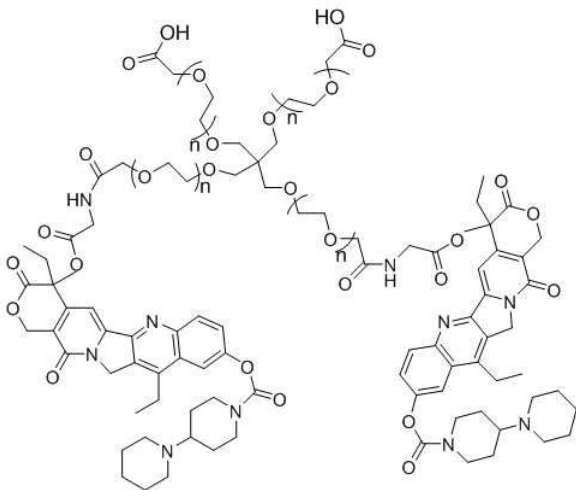


[0289] ;



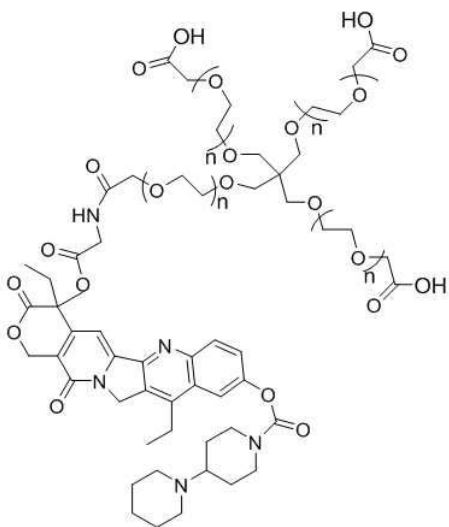
[0290]

;



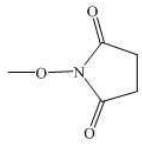
[0291]

; 및

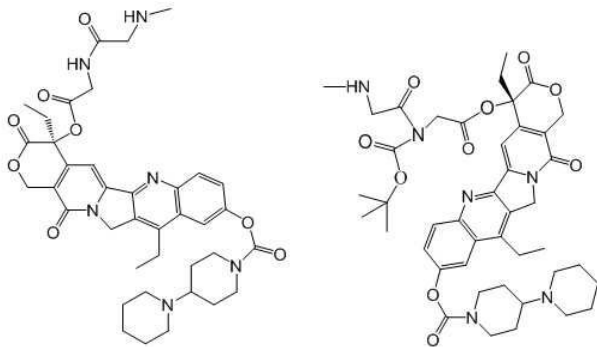


[0292]

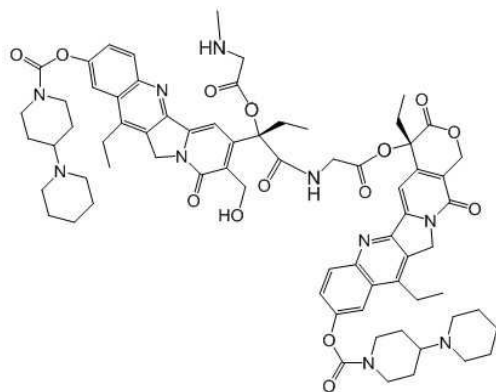
[0293] 카복실산을 가지는(그리고 따라서 약물, 예컨대 이리노테칸에 공유 부착되지 않은) 상기에 나타낸, 주어진 중합체 팔 말단에 있어서, 4개 팔-PEG-CM(-CH<sub>2</sub>C(O)-) 팔로부터 확장된 다른 가능한 말단은 -OH, -OCH<sub>3</sub>,



,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{OH}$ ,  $\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{OCH}_3$ ,



[0294]



[0295]

[0296]

을 포함한다.

[0297]

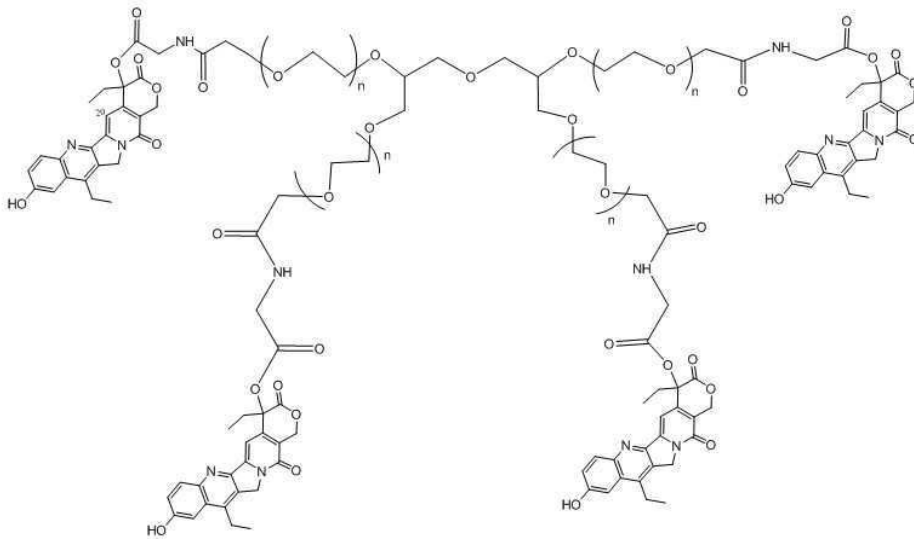
본원에 제공된 다중 팔 중합체 콘쥬게이트 조성물은 이러한 조성물에 포함된 콘쥬게이트의 입의 및 모든 입체 이성질체 형태를 포함하는 것으로 의도된다. 콘쥬게이트의 특정 실시형태에서, 콘쥬게이션된 형태 예를 들어 4개 팔-PEG-Gly-이리노의 형태일 때 이리노테칸의 C-20에서 입체화합은 원래대로 남아 있으며, 즉 C-20은 콘쥬게이션된 형태에서 (S)-배열을 유지한다. 예컨대, 실시예 4를 참조한다.

[0298]

또 다른 바람직한 다중 팔 구조는 각각의 팔의 중합체 부분과 활성제 사이에서 개재하는 글리신 링커를 가지는 카복실메틸 변형된 4개 팔-펜타에리트리톨 PEG이며(중합체 부분과 링커는 상기 나타냄), 이 때 활성제는 7-에틸-10-하이드록시-캄토테신이다. 게다가, 다중 팔 중합체가 (i) 완전히 부하되어 있을 뿐만 아니라 (ii) 상기 중합체에 공유부착된 3개의 7-에틸-10-하이드록시-캄토테신 분자, (iii) 상기 중합체에 공유부착된 2개의 7-에틸-10-하이드록시-캄토테신 분자, 및 (iv) 4개 팔 중합체 코어에 공유부착된 1개의 7-에틸-10-하이드록시-캄토테신 분자를 가지는 실시형태가 본원에 포함된다.

[0299]

또 다른 대표적인 다중 팔 콘쥬게이트 구조는 중합체 코어에 공유부착된 7-에틸-10-하이드록시-캄토테신(SN-38) 분자를 가지는 카복실메틸 변형된 4개 팔 글리세롤 이량체(3,3'-옥시디프로판-1,2-디올) PEG이다. 다중 팔 중합체 코어가 약물로 완전히 부하(즉, 중합체 코어에 공유부착된 4개의 7-에틸-10-하이드록시-캄토테신 분자를 가짐)되거나 덜 완전히 부하(즉, 중합체 코어에 공유부착된 1개, 2개 또는 3개의 7-에틸-10-하이드록시-캄토테신 분자를 가짐)된 실시형태가 본원에 포함된다. 각각의 중합체 팔에 공유부착된 약물(즉, 7-에틸-10-하이드록시-캄토테신)을 가지는 콘쥬게이트가 하기에 나타내어져 있다.



[0300]

[0301] 또 다른 예시적인 실시형태에서, 콘쥬게이트는 중합체 코어에 공유부착된 이리노테칸 분자를 이리노테칸 분자를 가지는 카복실메틸 변형된 4개 팔 글리세롤 이량체(3,3'-옥시디프로판-1,2-디올) PEG를 포함하는 다중 팔 구조이다. 다중 팔 중합체 코어가 약물로 완전히 부하(즉, 중합체 코어에 공유부착된 4개의 이리노테칸 분자를 가짐)되거나, 또는 덜 완전히 부하(즉, 중합체 코어에 공유부착된 1개, 2개 또는 3개 이리노테칸 분자를 가짐)된 실시형태가 본원에 포함된다.

[0302]

#### 혼합 염의 파라미터

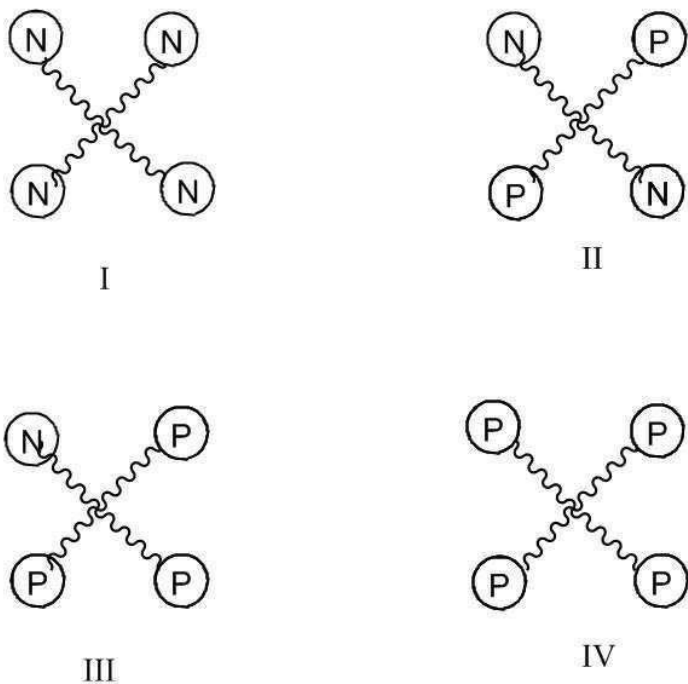
[0303]

대상 조성물은 특히 부분적 혼합 산성 염일 수 있다. 즉, 콘쥬게이트 내(및 벌크 조성물 내) 염기성 질소 원자가 2개의 상이한 반대 음이온을 가지는 프로톤화 질소 원자(산성 염으로도 지칭됨)와 함께 프로톤화 또는 비프로톤화 형태로 개별적으로 존재할 수 있도록 혼합 염 콘쥬게이트가 조성물에 제공된다. 하나의 음이온은 강 무기산, 예를 들어 염산, 황산, 질산, 인산, 아질산 등의 콘쥬게이트 염기에 상당하고, 다른 음이온은 강 유기산, 예를 들어 트리플루오로아세트산의 콘쥬게이트 염기에 상당한다. 대상 혼합 산성 염 조성물은 안정적이고 재생가능하게 제조된다.

[0304]

본원에 제공된 바와 같은 혼합 산성 염은 이의 벌크 또는 마크로 특성을 특징으로 한다. 즉, 콘쥬게이트 내 염기성 질소 원자(즉, 아미노 기)는 개별적으로 중성(비프로톤화) 또는 프로톤화 형태로 존재하며, 프로톤화 형태는 2개의 상이한 가능한 반대이온 중 하나와 연관되어 있다. 본 조성물이 벌크 특성에 기반하는 것을 특징으로 하지만, 상이한 개별적인 분자 종이 벌크 조성물 내에 포함된다. 실시예 1에 기술된 예시적인 4개 팔 중합체 콘쥬게이트, 즉 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K를 취하면, 혼합 산성 염 생성물은 다수의 개별적인 분자 종 중 임의의 종을 포함한다. 하나의 분자 종은 각각의 중합체 팔이 중성 형태인, 즉 아미노기가 비프로톤화형인 이리노테칸 분자를 포함하는 것이다. 하기 구조 I을 참조한다. 다른 분자 종은 각각의 중합체 팔이 프로톤화 형태로 이리노테칸 분자를 포함하는 것이다. 하기 구조 IV를 참조한다. 추가적인 분자 종은 중합체 팔 중 3개가 프로톤화 형태인 이리노테칸을 포함하고, 하나의 중합체 팔은 중성 형태로 이리노테칸 분자를 포함한다(구조 III). 다른 분자 종에서, 4개의 중합체 팔 중 2개는 중성 형태로(즉, 아미노기가 비프로톤화된 상태임) 이리노테칸 분자를 포함하고, 4개 중합체 팔 중 2개는 프로톤화 형태로 이리노테칸 분자를 포함한다(구조 II). 첫번째 “모두 중성”인 형태를 제외한 상기 기술한 모든 분자 종 내에서, 분자의 하위 종은 반대이온의 상이한 조합을 포함할 수 있다. 하기 도식은 다양한 가능한 조합을 예시하며, 하기 표는 각각의 구조에 상응하는 프로톤화 산성 염의 가능한 조합을 나타낸다.





**(P)**는 프로톤화된 상태를 나타낸다

**(N)**는 비프로톤화된 상태 또는 중성 상태를 나타낸다

I P 없음	II P, P 조합	III P, P, P, 조합	IV P, P, P, P 조합
모두 비프로톤화 형태, 즉, 동일	TFA, TFA TFA, Cl Cl, Cl	TFA, TFA, TFA Cl, Cl, Cl TFA, Cl, Cl Cl, TFA, TFA	Cl, Cl, Cl, Cl TFA, TFA, TFA, TFA Cl, TFA, TFA, TFA Cl, Cl, TFA, TFA TFA, Cl, Cl, Cl

실시에 1 및 실시예 6에 설명된 바와 같이, 임의의 예시적인 중합체 전구약물 콘주게이트는 염산 및 트리플루오로아세트산 모두의 혼합 산성 염으로서 획득된다. 실시예 1에서, 염산은 활성제 분자의 산성 염 형태의 사용에 의해 도입되어 결과 중합체 콘주게이트를 형성하지만, (임의의 강산이 사용될 수 있지만)트리플루오로아세트산은 탈보호 단계에서 반응 혼합물에 도입된다. 활성제(또는 실시예 1에 설명된 바와 같은 변형된 활성제)의 수용성 중합체 시약으로의 공유 부착 및 염기로의 처리 후에, 심지어 추가적인 정제 단계가 수행된 경우에, 생성되는 콘주게이트는, 하기에 보다 상세하게 기술되는, 놀라우면서도 유리한 특성을 가지는 부분적 혼합 산성 염으로서 예상밖으로 그리고 재생가능하게 수득된다. 심지어 반복된 정제 후, 생성된 콘주게이트에 예시적인 강 무기산인 염산 및 트리플루오로아세트산의 지속적이고 반복가능한 결합 결합이 있음이 발견되었다. 예컨대, 실시예 2의 표 1 및 실시예 6의 표 2를 참조한다.

본원에 기술된 혼합 산성 염 콘주게이트는 바람직하게 상당히 잘 한정된 비율 및 범위의 각각의 성분(즉, 유리 염기, 무기산 염, 유기산 염)을 포함한다. 혼합 산성 염 생성물의 특징은 물론 이용된 합성 조건에 대한 변화에 따라 다를 수 있다. 실시예 1에 기술된 방법에 따라 제조된 조성물을 보면, 중합체 콘주게이트 혼합 산성 염은 유리 염기 (또는 비프로톤화) 질소와 비교하여(활성제에서 염기성 질소 원자에 대하여 계산됨), 프로톤화 형태로 염기성 질소 원자의 상대적인 몰 양이 가장 큰 것으로 일정하게 회수된다. 따라서, 콘주게이트의 활성제 부분에서 모든 염기성 질소가 비프로톤화된다면, 해당하는 몰%는 100일 것이다. 하나의 실시형태에서, 부분적 혼합 염 조성물은 (염산염 및 유리 염기와 비교하여) TFA 염의 상대적인 몰 양이 가능 큰 것으로 특성화된다. 또 다른 특정 실시형태에서, 부분적 혼합 염 조성물은 (TFA 염과 비교하여) 통상적으로 하이드로할릭산의 더 적은

상대적인 몰양을, 그리고 비프로톤화(유리 염기) 질소의 훨씬 더 적은 상대적인 몰양을 포함하는 것으로 특성화된다. 하나의 실시형태에서, 부분적 혼합 염 조성물은 약 30mol% 내지 75mol% TFA 염, 약 15mol% 내지 45mol% 하이드로할릭산, 및 2mol% 내지 55mol% 유리 염기를 포함한다. 이러한 상대적인 양은 물론 혼합 산성 염을 제조하는 공정 조건에서의 변형으로 다양화할 수 있다. 예를 들어, 또 다른 실시형태에서, 트리플루오로아세트산 염의 mol%는 약 45 내지 70의 범위이고, 염산염의 mol% 약 20 내지 38의 범위이며, 유리 염기의 mol%는 10 내지 35의 범위이다. 일반적으로, 제조된 콘쥬게이트의 보다 이른 배치(batch)에 대하여, 콘쥬게이트 내 활성제 염기성 질소(예컨대, 아미노) 기는 트리플루오로아세트산 염으로서 가장 높은 mol%로, 염산염으로서 2번째로 높은 mol%에, 유리 염기로서 3번째 또는 가장 적은 mol%로서 존재한다. 임의의 실시형태에서, 콘쥬게이트 내 염산염 및 유리 염기의 mol%는 거의 동일하다. 시험된 로트에 대하여 콘쥬게이트 내 트리플루오로아세트산 염, 염산염 및 유리 염기의 평균적인 상대적 몰 양을 취하여, 평균적으로 생성물은 약 50mol% 트리플루오로아세트산 염, 약 30mol% 염산염, 및 약 20mol% 유리 염기를 포함하였다.

[0309] 이제 실시예 6에 대하여 살펴보면, 혼합된 산성 염 콘쥬게이트가 제조되고, 이 때 4개의 상이한 로트 중에서 각각의 TFA 염, 염산염, 및 비프로톤화 물질은 높은 수준의 일관성을 나타냄을 확인할 수 있다. 실시예 1의 결과와 유사하게, 중합체 콘쥬게이트 혼합 산성 염은 유리 염기 (또는 비프로톤화) 질소와 비교하여(활성제에서 염기성 질소 원자에 대하여 계산됨), 프로톤화 형태로 염기성 질소 원자의 상대적인 몰 양이 가장 큰 것으로 일정하게 회수된다. 표 2에 요약된 로트에서, 부분적 혼합 염 조성물은 TFA 염 및 유리 염기와 비교하여 HCl 염의 가장 큰 상대적인 몰 양을 가진다. 또 다른 특정 실시형태에서, 부분적 혼합 염 조성물은 HCl 염과 비교하여 통상적으로 TFA 염의 더 적은 상대적인 몰 양, 및 비프로톤화(유리 염기) 질소의 훨씬 더 적은 양을 포함하는 것으로서 특성화될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 부분적 혼합 염 조성물은 적어도 약 20mol% TFA, 또는 적어도 약 25mol% TFA를 포함할 것이다. 혼합 염 조성물 내 TFA 염의 예시적인 범위는 약 20mol% 내지 45mol%, 약 24mol% 내지 38mol%, 또는 심지어 35mol% 내지 65mol%의 범위일 수 있다. 염산염에 대하여, 임의의 실시형태에서 조성물은 약 35mol% 내지 65mol% 염산염, 또는 약 32mol% 내지 60mol% 염산염, 또는 바람직하게 약 35mol% 내지 57mol% 염산염을 가질 수 있다.

[0310] 본원에 기술된 혼합 산성 염 콘쥬게이트는 일반적으로 콘쥬게이트의 순수한 HCl 염 또는 유리 염기 형태보다 안정성이 더 큰 것으로 밝혀졌다. 예컨대, 예시적인 콘쥬게이트인 4개 팔-PEG-GLY-IRT의 다양한 양의 염 및 유리 염기 형태를 포함하는 조성물에 대한 스트레스 안정성 시험의 결과를 나타내는 실시예 3 및 도 1을 참조한다. 가수분해에 대한 안정성의 증가 및 최종 콘쥬게이트 생성물 내 염의 몰 비율 증가 사이에서 정적 상관관계가 관찰되었다. 그래프의 기울기를 기초로, 유리 염기 함량이 증가할수록 생성물 안정도는 감소한다는 것을 결정할 수 있다. 시간 경과에 따른 생성물의 감소와 이리노데칸의 증가 간의 상관관계를 관찰하였고, 이에 의해 이용된 조건 하에서 관찰된 분해 방식은 에스테르 결합 가수분해이었음을 결정하게 된다.

[0311] 도 2는 더 큰 정도의 프로톤화 아민기(즉, 산성 염)를 가지는 콘쥬게이트에 대하여 가수분해에 대한 안정성(또는 저항성)이 더 크다는 것을 설명한다. 예를 들어, 14mol% 이상의 유리 염기를 포함하는 콘쥬게이트 생성물은 상응하는 산 염 풍부 생성물보다 가수분해에 대하여 특히 안정성이 더 낮았음을 보였다.

[0312] 추가적으로, 도 3에 예시한 바와 같이, 염산염이 풍부한 생성물은 측정가능한 양의 유리 염기를 포함하는 혼합 염 형태보다 수용성 중합체 백본의 절단에 보다 취약하다는 것을 보인다. 실제로, 혼합 염 콘쥬게이트의 분해는 오히려 중합체 백본의 절단보다 주로 약물의 가수분해 방출에 기인하는 것으로 보인다. 그러나 이러한 백본 분해는 가속 스트레스 조건 하에서만 관련된 것으로 보인다.

[0313] 관찰된 2가지 방식의 분해는 염기/유리 염기 함량에 대한 분해에 대한 안정성 또는 저항성에 대하여 상반된 경향을 나타내는 것으로 보이므로, (반드시 그런 것은 아니지만) 이는 극단적인 완전 염 또는 완전 유리 염기 중 한 가지보다 전반적인 안정성이 더 큰 염 조성물의 바람직한 영역을 나타낼 수 있다. 게다가, 예비 연구에 기초하여, 혼합 염은 유리 염기 또는 염산염 형태보다 안정성이 다소 더 크고, 따라서 보다 통상적인 순수한 염기 또는 이의 단일 염 형태 중 임의의 것보다 예상치 못한 우수성을 나타내는 것으로 보인다.

[0314] 또한, 콘쥬게이트의 혼합 염 형태는 높은 로트-대-로트 일관성으로 제조되고, 즉 최종 콘쥬게이트 생성물 내 트리플루오로아세트산염, 하라이드(또는 다른 적합한 무기산 음이온) 및 유리 염기의 비교적 일정한 몰 비율을 가지도록 제조된다. 실시예 2의 표 2에서 볼 수 있는 바와 같이, 약물 염기성 질소기의 약 50mol%는 트리플루오로아세트산과 연관된다. 이러한 mol%는 로트-대-로트에서 매우 일관되게 발견된다. 유사하게, 콘쥬게이트 약물 아미노(또는 다른 염기성 질소) 기의 약 30mol%는 염산과 매우 일관되게 결합, 즉 HCl 염으로서 제공된다. 결과적으로 또한 콘쥬게이트에서 약물 아미노(또는 다른 염기성 질소) 기의 유리 염기 형태를 안정적이고 재생가능하

게 제조하게 된다. 약간 변형된 제조 방법에 기초한 실시예 6에서 제공된 결과를 보면, 프토통화 및 비프로톤화 중, 및 프로톤화 중의 실제 상대적인 몰 양, 즉 염산염에 대한 TFA의 차이에도 불구하고, 혼합 산성 염은 재생 가능하게 제조되었음을 확인할 수 있다.

[0315] 이들 종합적인 결과는, 유리 염기 단독 또는 다른 것이 없을 때 어느 하나의 염에 대한 수용성 중합체-활성제 콘쥬게이트(하나의 실시형태에서, 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K)의 부분적 혼합 염의 예상치 않은 이점을 나타낸다. 혼합 염은 유리 염기 또는 염산염보다 안정성이 더 큰 것으로 보이며, 따라서 이는 통상적인 순수한 염기 또는 이의 순수한 염 형태 중 하나보다 이점을 보임을 나타낸다.

#### [0316] 혼합 염 콘쥬게이트 - 형성 방법

[0317] 수용성 중합체 콘쥬게이트의 혼합 산성 염은, 당업계에 공지되어 있는 것과 결합하여 본원에 제시된 안내를 고려하여 상업적으로 이용가능한 출발 물질로부터 용이하게 제조될 수 있다. 상기 기술된 바와 같이, 혼합 염 중합체-활성제 콘쥬게이트는, 콘쥬게이트 형태일 때, 각각 하나 이상의 염기성 질소 원자, 예를 들어 아미노기를 가지는 하나 이상의 활성제 분자에 공유 부착된 수용성 중합체를 포함한다. 생성된 콘쥬게이트의 아민기는 1차, 2차 또는 3차 아미노기일 수 있다.

[0318] 선형, 분지형 및 다중 팔의 수용성 중합체 시약이 상기 기술한 바와 같이 다수의 상업적 공급원으로부터 입수가 가능하다. 대안적으로, 다중 팔 반응성 PEG 중합체와 같은 PEG 시약은 본원에 기술된 바와 같이 합성적으로 제조될 수 있다.

[0319] 부분적 혼합 산성 염은 활성화된 중합체, 예를 들어 활성화된 PEG의 공유 부착에 대한 공지된 화학 커플링 기술을 사용하여 형성될 수 있다(예를 들어, 문헌[Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications, American Chemical Society, Washington, DC (1997)]; 및 미국 특허공개 제2009/0074704호 및 제2006/0239960호를 참조). 본 발명에 따른 혼합 산성 염을 얻기 위한 적합한 작용기, 링커, 보호기 등의 선택은 부분적으로 활성제 상의 작용기 및 중합체 출발 물질에 좌우될 것이고, 이는 본 개시 내용을 기초로 하여 당업자에게 명백할 것이다. 부분적 혼합 산성 염의 임의의 특징을 고려하여, 상기 방법은 무기 산 부가 염의 형태로 아민(또는 다른 염기성 질소) 함유 활성제의 제공, 및 트리플루오로아세트산 처리 단계를 포함한다. 대안적으로, 합성 경로에서 콘쥬게이트 생성물 또는 중간체는 무기산과 반응하여 공정의 이후 단계에서 무기산 부가 염을 형성하고, 이에 의하여 (트리플루오로아세테이트에 더하여) 제2 반대이온을 반응 내로 도입할 수 있다. 합성 방법의 내용에서 “활성제”에 대한 언급은 활성제에 공유 부착된 링커를 가지고, 수용성 중합체와의 부착을 용이하게 하도록 선택적으로 변형된 활성제를 포함하는 것으로 의미된다.

[0320] 일반적으로, 상기 방법은 (i) 트리플루오로아세트산(TFA)을 이용한 처리에 의해 보호된 형태인 아민(또는 다른 염기성 질소) 함유 활성제의 무기 산성 염을 탈보호하여 탈보호된 혼합 산성 염을 형성하는 단계, (ii) 염기의 존재 시 단계 (i)의 탈보호된 무기 산성 염을 수용성 중합체 시약과 커플링시켜 중합체-활성제 콘쥬게이트를 형성하는 단계, 및 (iii) 중합체-활성제 콘쥬게이트를 회수하는 단계를 포함한다. 생성된 중합체-활성제 콘쥬게이트 조성물은 유리 염기, 산성 염 및 TFA 염 형태의 조합으로 존재하는 하나 이상의 아미노(또는 다른 염기성 질소 함유)기를 가짐을 특징으로 한다. 따라서, 상기 생성물은 무기산 염 및 트리플루오로아세테이트 염 둘 다, 및 비프로톤화된 형태 또는 유리 염기 형태인 콘쥬게이트 내 염기성 기의 부분을 포함한다. 따라서, 무기산염 및 트리플루오로아세트산의 합한 몰 양은 콘쥬게이트 생성물에 포함된 염기성 아미노 또는 다른 질소의 총 양보다 적다.

[0321] 바람직한 활성제, 즉 캠토테신의 부류 중 하나를 보면, 캠토테신 패밀리 내 화합물의 20-하이드록실기는 입체 장애를 받으므로, 단일 단계 콘쥬게이션 반응은 상당한 수득물로 성취하기에는 어렵다. 결과적으로, 바람직한 방법은 생물활성 출발 물질, 예컨대 이리노테칸 염산염의 20-하이드록실기를 수용성 중합체와의 반응에 적합한 더 짧은 링커 또는 스페이서 부분과 반응시키는 것이다. 이러한 접근법은 많은 소분자, 특히 새로운 반응성 중합체에 접근하기 어려운 공유 부착 자리를 가지는 것에 적용가능하다. 에스테르 연결을 형성하기 위해 하이드록실기와 반응하기 위한 바람직한 링커는 t-BOC-글리신 또는 보호된 아미노기 및 이용가능한 카복실산기를 가지는 다른 아미노산, 예를 들어 알라닌, 글리신, 이소류신, 류신, 페닐알라닌 및 발린을 포함한다(문헌[Zalipsky *et al.*, "Attachment of Drugs to Polyethylene Glycols", *Eur. Polym. J.*, Vol. 19, No. 12, pp. 1177-1183 (1983)]을 참고). 이용가능한 카복실산기 또는 하이드록실기와 반응성인 다른 작용기를 가지고 보호된 아미노기를 가지는 다른 스페이서 또는 링커 부분은 또한 상기 기술된 아미노산 대신에 사용될 수 있다.

- [0322] 통상적인 불안정한 보호기는 t-BOC 및 FMOC(9-플루오레닐메틸옥시카보닐)를 포함한다. t-BOC는 실온에서 안정적이고 트리플루오로아세트산 및 디클로로메탄의 희석 용액으로 용이하게 제거된다. FMOC는 아민의 농축 용액(보통 N-메틸피롤리돈 중 20% 내지 55% 피페리딘)에 의해 용이하게 제거되는 염기의 불안정한 보호기이다.
- [0323] 이 실시예에서, N-보호된 글리신의 카복실기는 커플링화제(예컨대, 디사이클로헥실카보디이미드(DCC)) 및 염기 촉매(예컨대, 디메틸아미노피리딘(DMAP) 또는 다른 적합한 염기)의 존재하에 이리노테칸 염산염(또는 다른 적합한 캄토테신, 예를 들어 7-에틸-10-하이드록시-캄토테신, 또는 임의의 다른 활성화제)의 20-하이드록실기와 반응하여 N-보호된 링커 변형된 활성화제, 예컨대 t-Boc-글리신-이리노테칸 염산염을 제공한다. 염산염이 예시되어 있지만, 다른 무기산 염을 사용할 수 있다. 바람직하게, 각각의 반응 단계는 불활성 분위기 하에서 수행된다.
- [0324] 그 다음 단계에서, 아미노 보호기, 즉 t-BOC(N-tert-부톡시카보닐)은 적합한 반응 조건 하에서 트리플루오로아세트산을 이용한 처리에 의해 제거된다. 이 단계에서 트리플루오로아세트산이 통상적으로 반응 혼합물 내로 도입된다. 생성물은 링커 변형된 활성화제, 예컨대 20-글리신-이리노테칸 TFA/HCl이다. 예시적인 반응 조건은 실시예 1에 기술되어 있고, 당업자에 의해 통상적인 최적화로 더 최적화될 수 있다. 선택적으로, 탈커플링된 생성물 내 무기산 및 트리플루오로아세트산의 물 양은 적합한 분석 방법, 예를 들어 HPLC 또는 이온 크로마토그래피에 의해 측정되어 커플링 단계에서 정확성 및 생성물 일관성을 보다 크게 할 수 있다.
- [0325] 그 다음 탈보호된 활성화제(선택적으로 링커가 변형됨), 예컨대 20-글리신-이리노테칸 TFA/HCl은 커플링제(예컨대, 하이드록시벤질트리아졸(HOBT)) 및 염기(예컨대, DMAP, 트리메틸 아민, 트리에틸 아민 등)의 존재하에 원하는 중합체 시약, 예컨대 4개 팔 펜타에리트리톨-PEG-석신이미드(또는 임의의 다른 유사하게 활성화된 에스테르 대응물)와 커플링되어 원하는 콘주게이트를 형성한다. 상기 방법의 하나의 실시형태에서, 콘주게이션 단계에 첨가된 염기의 양은 약 1.0배 내지 2.0배, 또는 약 1.0배 내지 1.5배, 또는 약 1.0배 내지 1.05배의 범위이고, TFA의 물 수 및 무기산의 물수의 합은 출발 물질, 이 경우에 20-글리신-이리노테칸 TFA/HCl에 대하여 결정된다. 20-글리신-이리노테칸 TFA/HCl의 산성 염 함량에 대한 염기의 양을 조절함으로써, TFA, 무기산(예컨대, HCl) 및 염기의 상대적으로 일정한 비율이 커플링 단계에서 유지되고, 이에 의하여 TFA 및 무기산 함량의 범위가 일관적으로 좁은 부분적 혼합 산성 염 콘주게이트를 형성한다. 바람직하게, 콘주게이트 조성물 내 무기 부가 염, 트리플루오로아세트산 염, 및 유리 염기의 상대적 물 양이 배치(batch)에 따라 약 25% 이하, 훨씬 더 바람직하게는 약 15% 이하로 다르도록, 생성된 부분적 혼합 산성 염은 재생가능하게 제조된다. 이러한 결정을 하기 위하여, 상기 일관성의 측정은 적어도 5개(예컨대, 5개 내지 7개)의 배치에 대하여 측정하였고, 이때 명백하게 범위 밖인 실패한 배치는 계산에서 배제하였다.
- [0326] 콘주게이션 단계가 과량 염기의 존재하에 수행되지만, 놀랍게도 생성된 콘주게이션은 부분적 혼합 산성 염으로서 안정적으로 형성되며, 즉 콘주게이션 내 염기성 아미노 또는 다른 질소 함유 기의 상당한 양이 유리 염기 형태이기보다는 프로톤화된다는 것이 발견된다. 커플링 단계에 대한 반응 수득률은 통상적으로 높으며, 약 90% 초과(예컨대, 평균적으로 약 95%)이다.
- [0327] 부분적 혼합 산성 염 콘주게이트가 예컨대 에테르(예컨대, 메틸 tert-부틸 에테르, 디에틸 에테르) 또는 다른 적합한 용매를 이용한 침전에 의해 회수된다. 생성물은 임의의 적합한 방법에 의해 추가로 정제될 수 있다. 정제 및 분리 방법은 침전 후 여과 및 건조뿐만 아니라 크로마토그래피를 포함한다. 적합한 크로마토그래피 방법은 겔 여과 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피 및 Biotage Flash 크로마토그래피를 포함한다. 정제의 한 가지 바람직한 방법은 재결정화이다. 예를 들어, 부분적 혼합 산성 염을 적합한 단일 또는 혼합 용매 시스템(예컨대, 이소프로판올/메탄올) 중에 용해하고, 그 다음 결정화할 수 있다. 재결정화는 여러 번 수행될 수 있으며, 결정은 또한 결정이 불용성 또는 단지 약간만 용해되는(예컨대, 메틸 tert-부틸 에테르 또는 메틸-tert-부틸 에테르/메탄올) 적합한 용매로 세척될 수 있다. 정제된 생성물은 선택적으로 추가로 공기 건조 또는 진공 건조될 수 있다. 심지어 반복된 정제시, 상기 생성물은 통상적으로 유리 염기로서보다 혼합 산성 염으로서 회수된다. 심지어 염기를 이용한 추가적인 처리시, 콘주게이트는 본원에 기술된 특징을 갖는 부분적 혼합 산성 염의 형태로 남아 있다.
- [0328] 생성된 콘주게이트는 부분적 혼합 염이고, 즉 이 때 임의의 염기성 질소 원자는 중성 또는 유리 염기 형태이고, 다른 염기성 질소 원자, 예컨대 아미노기는 프로톤화된다. 프로톤화 아민기는 상이한 음이온과 함께 산성 염의 형태이며, 하나의 음이온은 무기산의 콘주게이트 염기에 상당하고, 다른 음이온은 트리플루오로아세테이트(또는 앞서 기술한 바와 같은 유기산의 콘주게이트 염기)이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 부분적 혼합 염은 벌크 생성물 내 포함된 개별적인 분자 종을 필수적으로 지칭하기 보다는 벌크 생성물로서 지칭된다. 따라서, 특정 콘주게이트 구조에 따라서, 혼합 염에 포함된 개별적인 분자 종은 상기 기술된 바와 같이 유리 염기 및 프로톤화 형



태인 아민기를 포함할 것이다. 대안적으로, 혼합 염은 분자 중(예컨대, 모든 아민기가 유리 염기 형태인 것, 모든 아민기가 프로톤화 형태인 것, 무기산의 염과 트리플루오로아세트산 또는 다른 적합한 유기산의 염 중 하나, 또는 이들 모두의 혼합물, 상기한 것의 다양한 조합 등)의 혼합물을 포함할 수 있으며, 벌크 생성량의 특징은 본원에 기술된 바와 같다. 콘쥬게이트가 단지 하나의 활성제 아민기를 포함하는 중합체 콘쥬게이트인 경우에, 혼합 염은 반드시 벌크 생성물이 분자 중의 혼합물이어서 본원에 일반적으로 기술된 바와 같이 혼합 염에 이르게 된 것이어야 한다.

[0329] 바람직하게, 혼합 산성 염 생성물은 산소, 습기 및 빛 중 임의의 하나 이상에 대한 노출로부터 생성물을 보호하는데 적합한 조건 하에서 저장된다. 다수의 저장 조건 또는 포장 프로토콜 중 임의의 것이 저장 동안 산성 염 생성물을 적합하게 보호하는데 이용될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 생성물은 불활성 분위기(예컨대, 아르곤 또는 질소) 하에서 하나 이상의 폴리에틸렌 백에 넣어 포장하고, 알루미늄이 안에 덧대어진 폴리에스테르 열 접착성 백에 둔다.

[0330] 다수의 4개 팔-PEG-Gly-이리노에 대하여 측정된 대표적인 TFA 염, 염산염 및 유리 염기의 mol%는 표 1(실시예 2) 및 표 2(실시예 6)에 요약되어 있다. 볼 수 있는 바와 같이, 뜻밖에도 염기를 이용한 처리 및 반복된 정제 후에 콘쥬게이트 생성물이 단일의 비프로톤화 콘쥬게이트 종이 아니라 혼합 산성 염으로 분리된다.

### [0331] 혼합 염 - 혼합 염 콘쥬게이트를 포함하는 약학 조성물

[0332] 부분적 혼합 산성 염 콘쥬게이트는 수의학 용도 및 인간의 의학적 용도를 위한 약학 제형 또는 조성물의 형태일 수 있다. 예시적인 제형은 통상적으로 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 및 선택적으로 임의의 다른 치료 성분, 안정화제 등과 조합한 부분적 혼합 산성 염 콘쥬게이트를 포함할 것이다. 담체(들)는 제형의 다른 성분과 혼화가능하고 수용자/환자에게 지나치게 해롭지 않다는 의미에서 약학적으로 허용되어야 한다. 부분적 혼합 산성 염 콘쥬게이트는 선택적으로 벌크 또는 습기 및 산소에 대한 노출로부터 생성물을 보호하는 포장을 포함하는 그릇 또는 용기 내 단위 투여형의 형태로 포함된다.

[0333] 약학 조성물은 중합체 부형제/염가제 또는 담체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈, 유도체화 셀룰로오스 예를 들어 하이드록시메틸셀룰로오스, 하이드록시에틸셀룰로오스, 및 하이드록시프로필메틸셀룰로오스, 피콜(중합체 당), 하이드록시에틸전분(HES), 텍스트레이트(예컨대, 사이클로텍스트린, 예를 들어 2-하이드록시프로필-β-사이클로텍스트린 및 설포부틸에테르-β-사이클로텍스트린), 폴리에틸렌 글리콜 및 펙틴을 포함할 수 있다. 상기 조성물은 희석제, 완충제, 결합제, 붕해제, 점증제, 윤화제, 보존제(예를 들어 항산화제), 향미제, 맛 차폐제(taste-masking agent), 무기염(예컨대, 염화나트륨), 항균제(예컨대, 벤잘코늄 클로라이드), 감미제, 대전방지제, 계면활성제(예컨대, "TWEEN 20" 및 "TWEEN 80"과 같은 폴리소르베이트, 및 F68 및 F88과 같은 플루로닉, BASF로부터 입수가능함), 소르비탄 에스테르, 지질(예컨대, 인지질, 예를 들어 레시틴 및 다른 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 지방산 및 지방산 에스테르, 스테로이드(예컨대, 콜레스테롤)), 및 킬레이팅제(예컨대, EDTA, 아연 및 기타 적합한 양이온)를 추가하여 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 조성물에서의 사용에 적합한 다른 약학적 부형제 및/또는 첨가제는 문헌["Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19<sup>th</sup> ed., Williams & Williams, (1995)], ["Physician's Desk Reference", 52<sup>nd</sup> ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998)], 및 ["Handbook of Pharmaceutical Excipients", Third Ed., Ed. A.H. Kibbe, Pharmaceutical Press, 2000]에 열거되어 있다.

[0334] 혼합 산성 염은 경구, 직장, 국부, 코, 눈, 또는 비경구용(예를 들어, 복강내, 정맥내, 피하, 또는 근육내 주사) 투여에 적합한 조성물로 제형화될 수 있다. 혼합 산성 염 조성물은 편리하게 단위 투여량 형태로 제공될 수 있고, 약제학 분야에서 잘 알려진 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 모든 방법은 산성 염을 하나 이상의 부성분을 구성하는 담체와 결합시키는 단계를 포함한다.

[0335] 하나의 특정 실시형태에서, 혼합 산성 염, 예컨대 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K 하이드로할라이드는 주사용 멸균 1회용 바이알 중 동결건조된 형태로 제공된다. 하나의 실시형태에서, 1회용 바이알에 포함된 콘쥬게이트 생성물의 양은 이리노테칸 100mg 용량에 상당한다. 보다 구체적으로, 동결건조된 조성물은 pH 3.5에서 락테이트 완충제와 결합된 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K를 포함한다. 즉, 동결건조된 조성물은, 예컨대 이리노테칸 100mg 용량에 상당하는 양으로 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K를 락트산 약 90mg과 합하여지고, 용액의 pH는 산 또는 염기의 첨가에 의해 3.5로 조절함으로써 제조된다. 그 다음, 생성된 용액은 멸균 조건 하에서 동결건조되고, 생성된 분말은 사용 전에 -20℃에서 저장된다. 정맥내 주입 전에, 동결건조된 조성물은 텍스트로스 용액, 예컨대 5%(w/w)

텍스트로스 용액과 합하여진다.

- [0336] 제형 내 혼합 산성 염(즉, 활성제)의 양은 이용된 구체적인 활성제, 활성, 콘주게이트의 분자량, 및 투여 형태, 표적 환자 집단 및 다른 고려 사항과 같은 다른 인자에 따라 다를 것이며, 일반적으로 당업자에 의해 용이하게 결정될 것이다. 제형 내 콘주게이트의 양은 화합물, 예컨대 이리노테칸 또는 SN-38과 같은 알칼로이드 항암제를 이를 필요로 하는 환자에게 치료적 유효량을 전달하여, 예컨대 암 치료용 화합물과 연관된 적어도 하나의 치료 효과를 얻는데 필요한 양일 것이다. 실제로, 이는 특정 콘주게이트, 콘주게이트의 활성, 치료될 이상의 중증도, 환자 집단, 제형의 안정성 등에 따라 매우 다양할 것이다. 조성물은 일반적으로 약 1중량% 내지 약 99중량% 정도의 콘주게이트, 통상적으로 약 2중량% 내지 약 95중량% 정도의 콘주게이트, 보다 통상적으로 약 5중량% 내지 85중량% 정도의 콘주게이트를 함유할 것이며, 또한 조성물 내에 함유된 부형제/첨가제의 상대적인 양에 좌우될 것이다. 보다 구체적으로, 조성물은 통상적으로 콘주게이트를 2중량%, 5중량%, 10중량%, 20중량%, 30중량%, 40중량%, 50중량%, 60중량% 이상 중 적어도 하나의 양으로 함유할 것이다.
- [0337] 경구 투여용에 적합한 조성물은 개별 단위, 예를 들어 캡슐, 사체, 정제, 로젠지 등으로서 제공될 수 있으며, 각각은 분말 또는 과립; 또는 수성 리큐어 또는 비수성 액체, 예를 들어 시럽, 엘릭시르, 에멀전, 물약(draught) 등 중의 현탁액으로서 소정 양의 콘주게이트를 함유한다.
- [0338] 비경구 투여용에 적합한 제형은 편리하게, 수용자의 혈액과 등장성이도록 제형화될 수 있는 혼합 산성 염 콘주게이트의 멸균 수성 제조물을 포함한다.
- [0339] 비강 분무 제형은 다중 팔 중합체 콘주게이트의 정제된 수용액을 보존제 및 등장화제와 함께 포함한다. 이러한 제형은 바람직하게 비점막과 양립가능한 적절한 pH 및 등장성 상태로 조절된다.
- [0340] 직장 투여용 제형은 적합한 담체, 예를 들어 코코아 버터, 또는 수소화 지방 또는 수소화 지방 카복실산과 함께 좌약으로서 제공된다.
- [0341] 안과용 제형은, pH 및 등장성 인자가 바람직하게는 눈에 일치하도록 조절되는 것을 제외하고, 비강 분무와 유사한 방법에 의해 제조된다.
- [0342] 국부용 제형은 하나 이상의 매질, 예를 들어 미네랄 오일, 석유, 폴리하이드록시 알코올 또는 국부용 제형에 사용되는 다른 염기에 용해 또는 현탁된 다중 팔 중합체 콘주게이트를 포함한다. 상기 언급된 바와 같은 다른 부성분의 첨가가 바람직할 수 있다.
- [0343] 또한 에어로졸로서 예컨대 흡입에 의한 투여에 적합한 약학 제형이 제공된다. 이러한 제형은 원하는 다중 팔 중합체 콘주게이트 또는 이의 염의 용액 또는 현탁액을 포함한다. 원하는 제형은 작은 챔버에 놓여서 분무(nebulize)될 수 있다. 분무(nebulization)는, 상기 콘주게이트 또는 이의 염을 포함하는 다수의 액적 또는 고체 입자를 형성하는 압축 공기에 의해 또는 초음파 에너지에 의해 이루어질 수 있다.
- [0344] **혼합 염- 혼합 염 콘주게이트를 사용하는 방법**
- [0345] 본원에 기술된 혼합 산성 염은 임의의 동물, 특히 인간을 포함한 포유동물에서 비변형된 활성제에 반응성인 임의의 이상을 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있다. 하나의 대표적인 혼합 산성 염으로서, 항암제인 이리노테칸을 포함하는 4개 팔-펜타에리트리톨릴-PEG-글리신-이리노테칸은 특히 다양한 유형의 암을 치료하는데 유용하다.
- [0346] 부분적 혼합 산성 염 콘주게이트, 특히 소분자 약물이 항암제, 예를 들어 본원에 기술된 바와 같은 캄토테신 화합물(예컨대, 이리노테칸 또는 7-에틸-10-하이드록시-캄토테신) 또는 다른 온콜리틱 화합물인 부분적 혼합 산성 염 콘주게이트는 고형 종양, 예를 들어 유방암, 난소암, 대장암, 위암, 악성 흑색종, 소세포폐암, 비소세포폐암, 갑상선암, 신장암, 담관암, 뇌종양, 자궁경부암, 상악동암, 방광암, 식도암, 호지킨병, 부신피질암 등을 치료하는데 유용하다. 상기 혼합 산성 염으로 치료가능한 추가적인 암은 림프종, 백혈병, 횡문근육종, 신경아세포종 등을 포함한다. 상기 언급한 바와 같이, 상기 혼합 염 콘주게이트는 특히 고형 종양에서 표적화 및 축적하는데 효과적이다. 상기 혼합 염 콘주게이트는 또한 HIV 및 다른 바이러스의 치료에 유용하다.
- [0347] 대표적인 콘주게이트, 예를 들어 4개 팔-펜타에리트리톨릴-PEG-글리신-이리노테칸은 또한 하나 이상의 항암제를 이용한 치료에 대하여 난치인 것으로 나타난 암이 있는 환자를 치료하는데 사용될 때 특히 유리한 것으로 나타났다.
- [0348] 치료 방법은 본원에 기술된 바와 같은 부분적 혼합 산성 염 조성물 또는 제형의 치료적 유효량을 치료를 필요로 하는 포유동물에게 투여하는 것을 포함한다.



- [0349] 추가적인 방법은 부분적 혼합 산성 염 조성물을 투여함으로써 (i) 안트라사이클린 및/또는 탁산계 치료법에 저항성인 전이성 유방암, (ii) 백금 저항성 난소암, (iii) 전이성 자궁경부암, 및 (iv) K-Ras가 돌연변이된 유전자 상태인 환자의 대장암의 치료를 포함한다.
- [0350] 전이성 유방암의 치료에 있어서, 본원에 제공된 바와 같은 4개 팔-펜타에리트리톨릴-PEG-글리신-이리노테칸과 같은 콘쥬게이트의 혼합 산성 염은 국소적으로 진행된 전이성 유방암이 있는 환자에게 치료적 유효량으로 투여되며, 이 때 상기 환자는 안트라사이클린 및/또는 탁산계 화학요법제를 이용하여 이전에 2회 이하의 (성공하지 못한) 치료를 받은 적이 있다.
- [0351] 백금 저항성 난소암에 대하여, 본원에 제공된 바와 같이 조성물은 국소적으로 진행되거나 또는 전이성인 난소암이 있는 환자에게 치료적 유효량으로 투여되며, 이 때 상기 환자는 6달 미만의 무진행 간격이 있는 백금계 치료법 동안 종양 진행을 보였다.
- [0352] 또 다른 접근법에서, 혼합 산성 염(예컨대, 실시예 1의 것)이 국소적으로 진행된 대장암이 있는 개체에게 투여되며, 이 때 상기 대장암(들)은 K-Ras 발암유전자 돌연변이(K-Ras 돌연변이형)가 있어서 상기 종양이 EGFR-억제제, 예를 들어 세특시맵에 반응하지 않는다. 대상체는 이전의 5-FU 함유 치료법을 실패한 개체이고, 또한 이리노테칸 투여 경험이 없다.
- [0353] 임의의 구체적인 혼합 산성 염의 치료적 유효 투여량은 콘쥬게이트마다, 환자마다 다를 것이며, 환자의 상태, 이용된 특정 활성제의 활성, 암 유형, 및 전달 경로와 같은 인자들에 좌우될 것이다.
- [0354] 캄토테신형 활성제, 예를 들어 이리노테칸 또는 7-에틸-10-하이드록시-캄토테신에 대하여, 약 0.5mg 캄토테신/kg 체중 내지 약 100mg 캄토테신/kg 체중, 바람직하게는 약 10.0mg/kg 내지 약 60mg/kg의 투여량이 바람직하다. 다른 약학적 활성제와 결합하여 투여될 때, 훨씬 더 적은 양의 혼합 산성 염이 치료적으로 유효할 수 있다. 이리노테칸의 혼합 산성 염의 투여에 있어서, 이리노테칸의 투여량은 통상적으로 약  $50\text{mg/m}^2$  내지 약  $350\text{mg/m}^2$ 의 범위일 것이다.
- [0355] 치료 방법은 또한 본원에 기술된 바와 같은 혼합 산성 염 조성물 또는 제형(예컨대, 활성제가 캄토테신 유형의 분자인 경우)의 치료적 유효량을 제2 항암제와 함께 투여하는 것을 포함한다. 바람직하게, 혼합 산성 염의 형태인 이러한 캄토테신계 콘쥬게이트는 물론 미국 특허 제6,403,569호에 기술된 바와 같이 5-플루오로우라실 및 폴린산과 조합하여 투여된다.
- [0356] 혼합 산성 염 조성물은 하루에 1번 또는 여러 번, 바람직하게는 하루에 1번 이하로 투여될 수 있다. 치료의 지속기간은 2주 내지 3주의 기간 동안 1일에 1번일 수 있고, 수개월 또는 수년의 기간 동안 계속될 수 있다. 일일량은 개별 투여 단위의 형태로 1회 또는 여러 개의 소량 투여 단위로 투여되거나, 또는 특정 간격으로 세분된 투여량의 다중 투여로 투여될 수 있다.
- [0357] 본 발명은 이의 바람직한 구체적인 실시형태와 함께 기술되었지만, 상기 설명 및 하기 실시예는 본 발명의 범주를 예시하는 것일 뿐, 범주를 제한하는 것이 아님이 이해되어야 한다. 본 발명의 범주 내에서 다른 양태, 이점 및 변형이 본 발명이 속하는 분야의 당업자에게 명백할 것이다.
- [0358] **실시예**
- [0359] 본 발명의 실시는 달리 지시되지 않는다면, 당업계의 기술에 속하는 유기 합성 등의 통상적인 기술을 이용할 것이다. 이러한 기술은 문헌에 충분히 설명되어 있다. 시약 및 재료는 명확하게 반대로 언급되지 않는다면 상업적으로 입수가능하다. 예를 들어 문헌[M. B. Smith 및 J. March, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure*, 6th Ed. (New York: Wiley-Interscience, 2007), *supra*] 및 [Comprehensive Organic Functional Group Transformations II, Volumes 1-7, Second Ed.: A Comprehensive Review of the Synthetic Literature 1995-2003 (Organic Chemistry Series), Eds. Katritzky, A.R., et al., Elsevier Science]을 참조한다.
- [0360] 하기 실시예에서, 사용된 수(예컨대, 양, 온도 등)에 대하여 정확성을 확보하도록 노력하였으나, 일부 실험 오차 및 편차가 고려되어야 한다. 달리 지시되지 않는다면, 온도는 °C이고, 압력은 해수면에서 또는 해수면 근처의 압력이다.

[0361] 하기 실시예는 본 발명의 임의의 양태 및 이점을 설명하는 것이나, 본 발명은 어떤 방식으로든 하기 기술된 특정 실시형태에 제한되는 것으로 고려되어서는 안된다.

[0362] **약어**

[0363]	Ar	아르곤
[0364]	CM	카복실메틸 또는 카복시메틸렌( $-\text{CH}_2\text{COOH}$ )
[0365]	DCC	1,3-디사이클로헥실카보디이미드
[0366]	DCM	디클로로메탄
[0367]	DMAP	4-(N,N-디메틸아미노)피리딘
[0368]	GLY	글리신
[0369]	HCl	염산
[0370]	RP-HPLC	역상 고성능 액체 크로마토그래피
[0371]	IPA	이소프로필 알코올
[0372]	IRT	이리노테칸
[0373]	IPC	이온쌍 크로마토그래피 ion pair chromatography
[0374]	MeOH	메탄올
[0375]	MTBE	메틸 <i>tert</i> -부틸 에테르
[0376]	MW	분자량
[0377]	NMR	핵자기공명
[0378]	PEG	폴리에틸렌 글리콜
[0379]	RT	실온
[0380]	SCM	석신이미딜카복실메틸( $-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{N}$ -석신이미딜)
[0381]	TEA	트리에틸아민
[0382]	TFA	트리플루오로아세트산
[0383]	THF	테트라하이드로푸란

[0384] 재료 및 방법

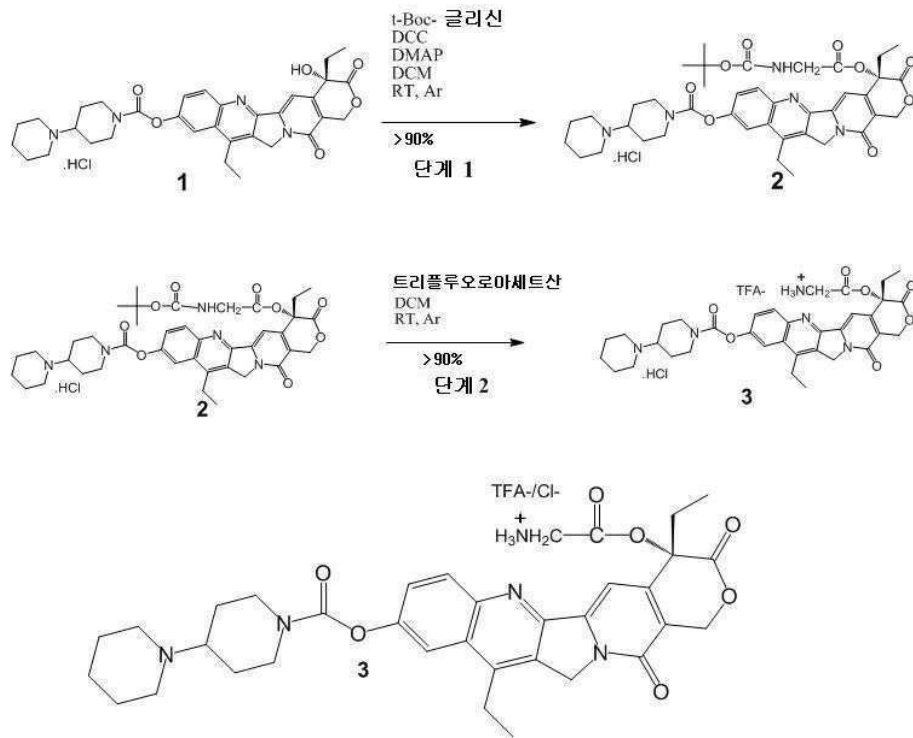
[0385] 펜타에리트리톨릴계 4개 팔-PEG<sub>20K</sub>-OH는 NOF 사(社)(NOF Corporation, 일본)로부터 입수하였다. 4개 팔-PEG<sub>20K</sub>-OH는  $\text{C}-(\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H})_4$ (여기에서 각각의 n은 113임)의 구조를 가진다.

[0386] 모든 <sup>1</sup>HNMR 데이터는 Bruker 사가 제조한 300MHz 또는 400MHz NMR 분광계에 의해 생성되었다.

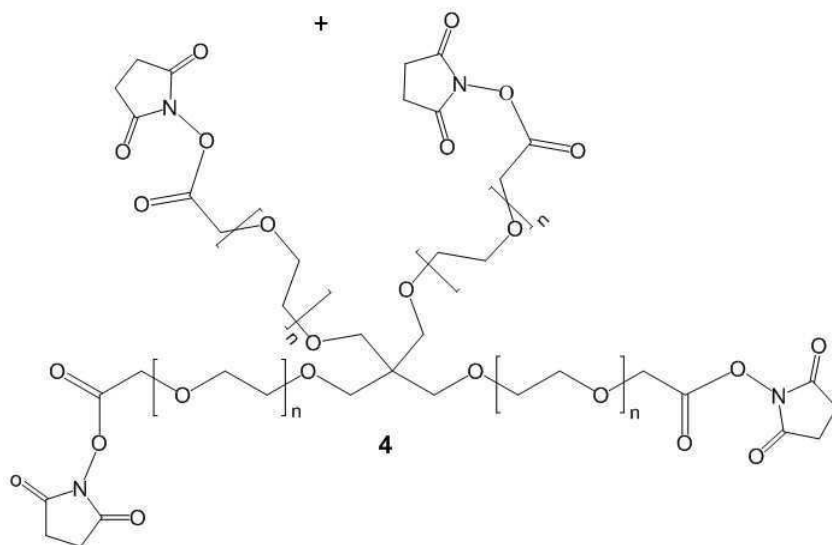
[0387] **실시예 1**

[0388] 제조예 1: 펜타에리트리톨릴-4개 팔-(PEG-1-메틸렌-2 옥소-비닐아미노 아세테이트 연결-이리노테칸)-20K, 즉 "4개 팔-PEG-GLY-이리노-20K" 혼합 산성 염의 제조

[0389] 반응식:



[0390]



[0391]



[0392]



해 반응 용액 내 DCM을 아세토니트릴로 대체하였다. 용매 교환 후, 생성물 함유 용액을 MTBE(23kg)의 약 50% 미만의 부피로 첨가하고 결정화 온도(35℃)에서 충분히 교반하였다. 혼합은 30분 내지 1시간 동안 계속하였다. 생성된 고체를 여과하여 덩어리를 MTBE로 세척하였다.

[0402] 젖은 덩어리를 진공 건조하여 단계 3에서의 사용을 위한 글리신-이리노테칸 염 분말을 수득하였다. 생성물의 트리플루오로아세테이트 및 염화물 함량은 전도도 검출기가 있는 이온 크로마토그래피에 의해 측정하였다. (수득률 95% 초과).

[0403] 단계 3. 4개 팔-PEG-CM-SCM을 사용한 글리신-이리노테칸의 폐길화

[0404] 단계 2로부터의 글리신-이리노테칸·TFA/HCl 염 분말을 반응조에 첨가하고 여기에 DCM(약 23L)을 첨가하였다. 혼합물을 약 10분 내지 30분 동안 교반하고 글리신-이리노테칸·TFA/HCl 염을 DCM에 분산시켰다. 그 다음 트리에틸 아민(글리신-이리노테칸 TFA/HCl 염 분말 내 (HCl + TFA) 약 1.05mol)을 서서히 (포트 온도가 24℃ 이하에서 유지되는 속도로) 첨가하였고, 생성된 혼합물을 10분 내지 30분 동안 교반하여 GLY-IRT(글리신 변형 이리노테칸) 유리 염기를 용해시켰다.

[0405] 4개 팔-PEG-SCM-20kD의 전체 양(6.4kg)의 약 80%를 최대 30분에 걸쳐 반응조에 첨가하였다. PEG 시약의 용해 후, 반응 진행을 IPC에 의해 모니터링하였다. (반응이 안정기에 도달한 것으로 보일 때 비콘주게이션된 GLY-IRT의 양이 5% 초과인 경우, 그 다음 4개 팔-PEG SCM의 남은 20%를 반응조에 첨가하고, 미반응 GLY-IRT의 일정한 값이 관찰될 때까지 반응 진행을 모니터링하였다,

[0406] 1시간 내지 1.5시간에 걸쳐 실온에서 교반된 MTBE(113.6L)에 반응 용액을 첨가함으로써 미정제 생성물을 침전시켰고, 그 후 교반하였다. 생성된 혼합물을 교반기가 있는 필터 드라이어로 옮겨서 모액(mother liquor)을 제거하였다. 침전물(미정제 생성물)을 약 10℃ 내지 25℃에서 최소한으로 간헐적 교반하면서 부분적으로 진공건조시켰다.

[0407] 그 다음 미정제 생성물을 반응조에 넣고, 여기에 IPA(72L) 및 MeOH(8L)를 첨가한 후, 최대 30분 동안 교반하였다. 열을 가하여 50℃ 포트 온도에서 외관상 완전한 용해(맑은 용액)를 이룬 후, 30분 내지 60분 동안 교반하였다. 그 다음 용액을 37℃까지 냉각하고, 이를 수 시간 동안 유지시킨 다음, 20℃까지 냉각하였다. 혼합물을 교반된 필터 드라이어로 옮기고, 여과함으로써 모액을 제거하여 필터 상에 덩어리를 형성하였다. 상기 덩어리를 IPA 및 30% MeOH 중 70% MTBE로 세척하고 부분적으로 진공 건조하였다. 냉각 전에, 4개 팔-PEG-Gly-IRT를 함유하는 맑은 IPA/MeOH 용액을 50℃에서 인라인(in-line) 필터(1um)를 사용하여 여과하여 마지막(3번째) 결정화에서 임의의 잠재적인 미립자를 제거한다는 점을 제외하고, 상기 과정을 추가로 2번 반복하였다.

[0408] 세척한 젖은 덩어리로부터 3개의 대표적인 샘플을 취하고, NHS 수준을 NMR을 사용하여 측정하였다. 젖은 덩어리를 진공 건조하였다.

[0409] 생성물("API")을 불활성 분위기 하에서 이중 백으로 밀봉 포장하였고, 빛에 노출없이 -20℃에서 저장하였다. 생성물 수득률은 약 95%이었다.

## [0410] 실시예 2

### [0411] 혼합 염으로서 "4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K" 생성물의 특성화

[0412] 실시예 1로부터의 생성물을 이온 크로마토그래피(IC 분석)에 의해 분석하였다. 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K의 다양한 생성물 로트에 대한 IC 분석 결과에 대하여는 하기 표 1을 참조한다.

**표 1**

[0413] PEG에 결합된 이리노테칸의 mol%

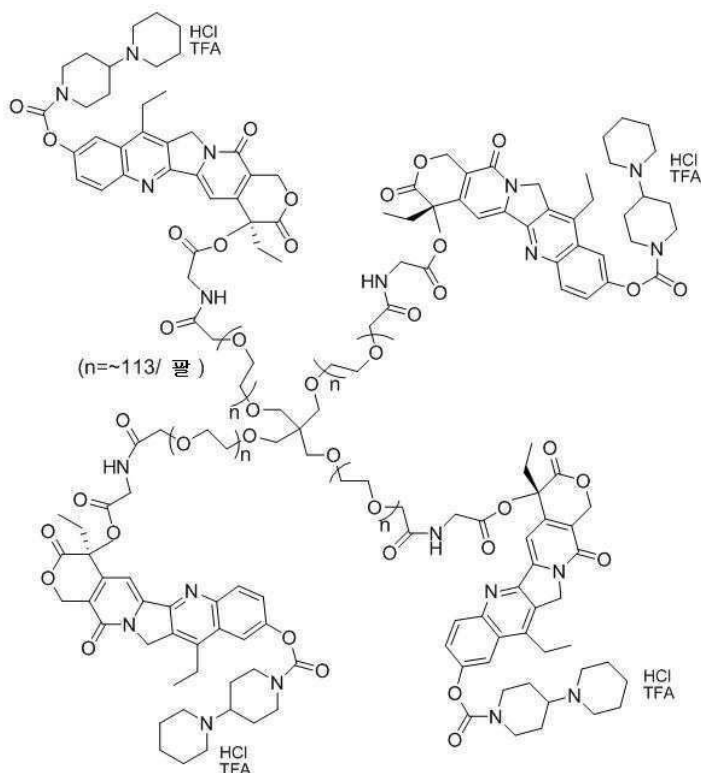
로트 번호	TFA 염	HCl 염	유리 염기
010	59	36	5 (낮음)
020	64 (높음)	30	6
030	27 (낮음)	24	4 9(높음)
040	53	26	21
050	54	26	20
060	57	28	15

070	53	33	14
080	53	27	20
090	44	19	36
100	33	41	26
최종 7개 로트의 평균	50	29	22

[0414] 표 1에 제공된 IC 결과를 기초로 하여, 실시예 1에서 형성된 생성물인 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K는 생성물 중 콘쥬게이션된 이리노테칸 분자에 기초하여 약 50mol% TFA 염, 30mol% HCl 염, 및 20mol% 유리 염기의 부분적 혼합 염임을 확인할 수 있다. 염의 혼합물은 생성물의 재결정화를 (1회 내지 3회) 반복한 후에도 관찰되었다. 상기 분석된 다양한 생성물 로트에서, 조성물 내 이리노테칸의 약 35mol% 내지 65mol%는 TFA 염으로서 프로톤화되고, 조성물 내 이리노테칸의 약 25mol% 내지 40mol%는 HCl 염으로서 프로톤화되는 반면, 이리노테칸의 잔여 5mol% 내지 35mol%는 비프로톤화(즉, 유리 염기로서)됨을 확인할 수 있다.

[0415] 생성물의 일반화된 구조는 하기 나타내어져 있으며, 여기에서 이리노테칸 부분은 생성물의 혼합 염의 표시로서 HCl 및 TFA와 결합하여, 유리 염기 형태로서 나타내어져 있다.

[0416] [구조식 VI]



[0417]

[0418] 실시예 3

[0419] 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K의 스트레스 안정성 연구

[0420] 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K 생성물 조성물을 평가하기 위하여 안정성 연구를 수행하였다. 프로톤화 이리노테칸의 다양한 양을 함유하고 TFA 대 HCl의 양이 상이한 조성물을 시험하였다.

[0421] 스트레스 안정성 연구

[0422] API 포장 상태를 시뮬레이션하기 위하여 시험예 1에서 형성된 생성물, 즉 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K인 화합물 5(약 1g 내지 2g)를 PEG PE '월톱(whirl top)' 백으로 칭량하고 다른 '월톱' 백으로 넣었다. 하나의 연구(결과는 도 1에 나타냄)에서, 샘플을 25℃/60%RH로 4주 동안 인공 기후실(environmental chamber)에 두었다. 다른 연구에서, 샘플을 40℃/75%RH로 최대 수개월까지 인공 기후실에 두었다(결과는 도 2 및 도 3에 나타냄). 연구



기간에 걸쳐서 주기적으로 샘플을 취하고 분석하였다.

#### [0423] 결과

[0424] 연구 결과는 도 1, 도 2 및 도 3에 나타나 있다. 도 1에서, 25℃, 60% 상대 습도에서 저장된 샘플에 대하여 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K 피크 면적 비율을 시간에 대하여 플롯팅하였다. 나타낸 데이터는 99% 초과 HCl 염(1% 미만의 유리 염기, 삼각형), 94% 전체 염(6% 유리 염기, 정사각형), 및 52% 전체 염(48% 유리 염기, 원)으로 이루어진 샘플에 대한 것이다. 그래프의 기울기는 유리 염기 함량이 증가함에 따라서 생성물의 안정성이 감소함을 나타낸다. 이용된 스트레스 조건(즉, 최대 28일 동안 25℃) 하에서, 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K 피크 면적의 감소는 유리 이리노테칸의 증가와 연관되어 있으며, 이는 분해 방식이 주로 이리노테칸 방출을 위한 에스테르 결합의 가수분해를 통하는 것임을 나타낸다. 관찰된 결과를 기초로 하여, 생성물 내 유리 염기의 양이 더 많아질수록 가수분해에 대한 안정성이 감소하게 됨을 나타낸다. 따라서, 더 높은 정도의 프로톤화된 이리노테칸을 함유하는 생성물은 더 낮은 정도의 프로톤화된 이리노테칸(mol%를 기준으로 함)을 함유하는 생성물보다 가수분해에 대하여 안정성이 더 높음을 나타낸다.

[0425] 도 2 및 도 3은 40℃, 75% 상대 습도에서 저장된 99% 초과 HCl 염(1% 미만 유리 염기, 정사각형)을 함유하는 샘플 및 86% 전체 염(14% 유리 염기, 다이아몬드)으로 이루어진 샘플로부터 얻은 다른 세트의 데이터를 나타낸다. 도 2는 2가지 샘플 모두에 대하여 3개월에 걸쳐서 유리 이리노테칸의 증가를 나타낸다. 이러한 데이터는 앞서 기술한 연구로부터의 데이터(도 1에 요약되어 있음)와 일관되며, 이는 유리 염기 함량이 더 높은 생성물은 가수분해에 대하여 안정성이 더 낮음을 나타낸다. 도 3은 3개월에 걸쳐서 동일한 샘플에 대하여 더 작은 PEG 종에서의 증가를 나타낸다. 더 작은 PEG 종에서의 증가는 PEG 백본이 분해되어 다수의 PEG 종을 제공함을 나타낸다. 이러한 데이터는 HCl 염에 상응하는 생성물이 14% 유리 염기를 함유하는 혼합 염 샘플보다 PEG 백본 분해가 더 일어나기 쉽다는 것을 나타낸다. 따라서, 이론에 한정되는 것으로 의도하는 것은 아니지만, 부분적 혼합 염은 주로 약물의 가수분해적 방출에 의해 분해되지만, 염산염은 상이한 메커니즘, 즉 중합체 백본의 분해에 의해 분해되는 것으로 보인다. 이러한 예비 결과를 기초로 하여, 상기 부분적 혼합 염 생성물은 염산염 보다 더 바람직한 것으로 보인다.

[0426] 요약하면, 관찰된 2가지 방식의 분해는 염/유리 염기 함량에 대하여 상반된 경향을 나타낸다. 뜻밖에도, 이러한 결과는 통상적으로 극단적인 완전한 염 및 완전한 유리 염기 중 하나에 비하여 향상된 전반적인 안정성을 가질 수 있는 염 조성물의 영역이 있다는 것을 시사한다. 상기 결과는 또한 유리 염기 단독 또는 다른 것이 없을 때의 어느 염에 비하여 부분적 혼합 염인 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K의 예시치 않은 이점을 나타낸다. 상기 혼합 염은 유리 염기 또는 염산염보다 더 우수한 안정성을 가진 것으로 나타났고, 이는 혼합 염의 보다 통상적인 순수한 염 또는 순수한 염기 형태보다 우수함을 나타낸다.

#### [0427] 실시예 4

#### [0428] 키랄성 연구

[0429] 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K에서 이리노테칸의 탄소-20의 키랄성(chirality)을 결정하였다.

[0430] 판매 회사의 자료에 상세히 나타내어져 있는 바와 같이, 이리노테칸 염산염 출발 물질은 광학적으로 (S)-배열에서 C-20으로 활성적이었다. 이리노테칸에서 C-20 위치는 용이하게 이온화하지 않는 3차 알코올을 가지며, 따라서 이 위치는 극한(강산) 조건 하에서 제외하고 라세미화하는 것으로 예측되지 않는다. 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K 내 C-20에서 키랄성을 확인하기 위하여, 키랄 HPLC 방법을 화학적 가수분해를 통하여 생성물로부터 방출된 이리노테칸을 분석하는데 사용하였다.

[0431] 생성된 크로마토그램에 기초하여, 어떠한 (R)-거울상이성질체도 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K 샘플에 대하여 검출되지 않았다. 하기 가수분해에서, 콘주게이트로부터 방출된 이리노테칸은 (S)-배열인 것으로 확인되었다.

#### [0432] 실시예 5

#### [0433] 가수분해 연구

[0434] 모든 폐길화된 이리노테칸 종을 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K의 부분으로 간주하고, 각각의 종은 깨끗하게 가수분해하여 순도가 99% 초과인 이리노테칸을 생성하였다. 게다가, 주로 완전히 약물 부하된 DS4 종(4개 중합체 팔의 각각에 공유 부착된 약물) 및 부분적으로 치환된 종인 DS3(3개의 중합체 팔에 공유 부착된 약물), DS2(중합체 팔 중 2개에 공유 부착된 약물) 및 DS1 종(단일 중합체 팔에 공유 부착된 약물)은 모두 동일한 비율로 가수분해

되어 유리 약물인 이리노테칸을 방출한다.

- [0435] 실험을 실행하여 트랜스에스테르화( $\text{CH}_3\text{OH}$  중  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $20^\circ\text{C}$ ) 및 수성 가수분해( $\text{pH}$  10,  $20^\circ\text{C}$ ) 조건 하에서 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K 중 이리노테칸 함유 PEG 종의 운명을 결정하였다. 트랜스에스테르화 반응은 45분 후에 99% 초과가 완료되었다. 수성 가수분해 반응은 24시간 이내에 99% 초과가 완료되었다. 두가지 반응 유형 모두에 있어서, 이리노테칸을 사용한 대조 반응을 동일한 조건 하에서 실행하여 일부 인공물 피크를 관찰하였다. 인공물 피크에 대한 조절 후, 두가지 경우 모두에서 생성된 이리노테칸은 크로마토그래피 순도가 99% 초과이었다.
- [0436] 이러한 결과에 기초하여, 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K 중 본질적으로 모든 폐길화 종이 이리노테칸을 방출하는 것으로 결론지었다. 수성 가수분해 반응으로부터 시간 경과에 따라 취한 HPLC의 오버레이는 DS4에서 DS3에서 DS2에서 DS1에서 이리노테칸으로의 전환을 나타낸다. 이러한 모든 종은 가수분해하여 이리노테칸을 방출한다. 모노-, 디-, 트리- 및 테트라-치환된 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K 종으로부터 가수분해를 통하여 이리노테칸의 방출을 입증하는 도 4를 참조한다.
- [0437] 추가적인 실험을 수행하여 돼지 카복시펩티다아제 B의 존재하에 수성 완충제( $\text{pH}$  8.4) 및 인간 혈장에서 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K, DS4, 및 이의 덜 치환된 중간체, DS3, DS2 및 DS1의 주요 성분에 대하여 가수분해 비율을 측정하였다. 돼지 카복시펩티다아제 B의 존재하에 수성 완충제( $\text{pH}$  8.4)가수분해는 효소계 가수분해를 실행하는 시도였다. 이후에 효소없이  $\text{pH}$  8.4에서 대조 실험은 가수분해가  $\text{pH}$ 에 의해 일어나고, 따라서 화학적 가수분해임을 나타내었다. 그럼에도 불구하고, 이러한 데이터는 인간 혈장에서 실행한 가수분해로부터 획득한 데이터와 비교를 위하여 중요하다. 이들 실험은 다양한 성분의 가수분해율이 유의하게 상이하지 않고 이론적 예측값에 비해서 나음을 보였다. 추가적인 실험은 인간 혈장에서 4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K의 주요 성분(DS4, DS3, DS2 및 DS1)에 대하여 가수분해 비율을 측정하였다. 이들 실험은 또한 다양한 성분이 동일한 비율로 가수분해되고, 이론적 예측값에 비해서 나음을 보인다.
- [0438] 도 5 및 도 6은 화학적 가수분해(효소의 존재시) 및 혈장 가수분해 각각에 대하여 실험 데이터에 대한 이론적 가수분해 비율을 나타내는 그래프를 제시한다. 두가지 경우 모두에서, 이론적 예측값은 그 다음 더 낮은 동족체 및 유리 이리노테칸(즉,  $\text{DS4} > \text{DS3} > \text{DS2} > \text{DS1}$ )을 생성하는 동족체 각각의 종의 가수분해에 대한 동일한 비율에 기초한다.
- [0439] 실시예 6
- [0440] 제조예 2: 펜타에리트리톨릴-4개 팔-(PEG-1-메틸렌-2 옥소-비닐아미노 아세테이트 연결-이리노테칸)-20K, 즉 "4개 팔-PEG-Gly-이리노-20K" 혼합 산성 염의 제조
- [0441] 단계 1. Boc-글리신-이리노테칸 염산염(Gly-IRT HCl)의 합성
- [0442] 파트 1: 이리노테칸 염산염 3수화물(IRT.HCl.3H<sub>2</sub>O)의 건조
- [0443] IRT · HCl · 3H<sub>2</sub>O(45.05g, 66.52mmol)을 반응기로 충전하였다. 무수 N,N-디메틸포름아미드(DMF)(IRT · HCl · 3H<sub>2</sub>O 666mL, 14.7mL/g, DMF 수 함량 300ppm이하)를 반응기로 충전하였다. 천천히 교반하면서, 반응기를  $60^\circ\text{C}$ (재킷 온도(jacket temperature))까지 가열하였다. 이리노테칸(IRT)을 완전히 용해 시킨 후(5분 내지 10분), 진공을 서서히 적용하여 5mbar 내지 10mbar에 도달하였고, DMF를 증류하여 제거하였다. 응축된 증류액(DMF)의 부피가 초기 DMF 충전량의 85% 내지 90%가 될 때, 진공을 제거하였다. 헵탄(1330mL, 30.0mL/g IRT · HCl · 3H<sub>2</sub>O 1330mL, 30.0mL/g, 수 함량 50ppm 이하)을 반응기로 도입하고, 재킷 온도를  $50^\circ\text{C}$ 까지 낮추었다. 증류물의 부피가 헵탄의 초기 충전량의 약 90%가 될 때까지 헵탄을 진공 증류하였다(100mbar 내지 150mbar). 2회 더 헵탄 증류의 주기를 실행하였다(2회의 1330mL 헵탄 충전 및 증류). 용매 상 샘플을 반응기로부터 제거하고 가스 크로마토그래피를 사용하여 DMF 함량에 대하여 분석하여 샘플의 DMF 함량이 3% w/w 미만임을 확보하였다. (잔류 DMF가 3.0% w/w 초과인 경우, 제4의 공비증류 주기를 실행함). 생성된 슬러리를 커플링 반응(파트 2)에 사용하였다.
- [0444] 파트 2: 커플링 반응: Boc-gly-IRT · HCl의 제조
- [0445] 디클로로메탄(IRT · HCl · 3H<sub>2</sub>O 1330mL, 29.5mL DCM/g)을 잔여 헵탄(IRT HCl에 대한 잔여 헵탄의 대략적인 질량 비율은 3이었음) 내 무수 IRT · HCl(1.0당량)의 슬러리를 포함하는, 교반 중인 반응기로 충전하였다. 반응 내용물을 15분 내지 30분 동안 교반하였고, 배치 온도를  $17^\circ\text{C}$ 에서 유지하였다. Boc-글리신(14.0g, 79.91mmol, 1.2당량) 및 DMAP(0.81g, 6.63mmol, 0.1당량)를 고체로서 반응기로 충전하였다. DCC의 DCM 용액(디클로로메탄의 40mL 중 1.5당량)을 제조하였고, 15분 내지 30분에 걸쳐 반응기로 첨가하였으며 생성된 반응 혼합물을  $17^\circ\text{C}$ (배

치 온도)에서 2시간 내지 3시간 동안 교반하였다. 완료를 확실히 하기 위하여 반응을 HPLC에 의해 모니터링하였다. 미리 제조한 퀀칭 용액을 반응 혼합물에 충전하여 약간의 남아있는 DCC를 퀀칭하였다. 간단하게, 미리 제조한 퀀칭 용액은 DCM(IRT · HCl · 3H<sub>2</sub>O 15.3mL, 0.34mL/g) 중 TFA(IRT · HCl · 3H<sub>2</sub>O 1.53mL, 0.034mL/g) 및 IPA(IRT · HCl · 3H<sub>2</sub>O 3.05mL, 0.068mL/g)를 혼합함으로써 제조된 디클로로메탄 중 TFA 및 IPA의 미리 혼합한 용액이고, 전환이 적어도 97%일 때 5분 내지 10분에 걸쳐 상기 퀀칭 용액을 반응기 V1에 첨가하였다. 내용물을 추가 30분 내지 60분 동안 교반하여 퀀칭시켰다. DCU 함유 반응 혼합물을 1마이크론 필터를 통해 다른 반응기로 여과하였다. 반응 여과액을 진공 하 35℃에서 1/3 부피로 증류시켰다. 이소프로필 알코올(IPA)(IRT · HCl · 3H<sub>2</sub>O 490.5mL, 10.9mL/g)을 농축된 혼합물에 첨가하고 혼합물을 30분 내지 60분 동안 50℃(재킷 온도)에서 교반하였다. 생성된 균질 용액을 초기 IPA 충전 부피의 약 85%까지 진공 증류에 의해 농축하였고, 생성된 농축물을 20℃(재킷 온도)까지 냉각시켰다. IPA 내 반응 혼합물을 60분 내지 80분에 걸쳐 20℃에서 헵탄(1750mL, 38.8mL 헵탄/g IRT · HCl · 3H<sub>2</sub>O)으로 옮겼다. Boc-gly-IRT HCl 침전물을 함유하는 생성된 슬러리를 추가 60분 내지 90분 동안 교반하였고, 생성물을 여과에 의해 수집하였다. 반응 플라스크를 헵탄(2회, 490mL, 20.0mL 헵탄/g IRT · HCl · 3H<sub>2</sub>O)으로 세정하고 생성물 덩어리를 린스로 세척하였다. 젖은 덩어리를 진공 하 20℃ 내지 25℃에서 최소한 12시간 동안 건조하였다. 수득률: 57.13g(110%, 잔여 용매 때문에 높음).

[0446] 단계 2. 글리신-이리노테칸 염산염-트리플루오로아세테이트(Gly-IRT HCl-TFA)(탈보호)의 합성

[0447] 적절한 크기의 반응기에 건조한 Boc-gly-IRT · HCl(41.32g, 52.5mmol, 단계 1에서 얻음)을 불활성 분위기 하에서 첨가하였다. 무수 DCM(347mL, Boc-gly-IRT · HCl의 g 당 DCM 8.4mL)을 반응기에 첨가하고 내용물을 완전히 용해할 때까지 17℃에서 교반하였다(약 15분 내지 30분). TFA(61.98mL, 691.5mmol, Boc-gly-IRT · HCl의g 당 1.5mL)를 플라스크에 15분 내지 30분에 걸쳐서 첨가하고 3.0시간 동안 계속 혼합하였다. 반응을 HPLC에 의해 완료에 대하여 모니터링하였다(한계: 97% 이상). 반응물을 아세트니트릴(347mL, Boc-gly-IRT · HCl의 g 당 ACN 8.4mL)로 희석하였다. 재킷 온도를 15℃로 설정하고 반응 혼합물을 최종 잔여 포트 부피가 초기 아세트니트릴 충전량(약 295mL 내지 305mL)의 약 85%가 될 때까지 진공 하에서 농축하였다. 생성된 아세트니트릴 용액을 메틸tert-부틸 에테르(MTBE, 1632mL, Boc-gly-IRT · HCl의 g 당 MTBE 39.5mL)를 포함하는 반응기에 30분 내지 60분에 걸쳐서 천천히 첨가하였다. 침전된 생성물을 30분 동안 약하게 혼합하고, 여과에 의해 수집하였다. 반응기를 MTBE(410mL)로 세정하고, gly-IRT · HCl/TFA 여과 덩어리를 린스로 세척하였다. 생성물을 진공 하에서 17℃에서 최소한 12시간 동안 건조하였다. 수득률: 42.1g(102%).

[0448] 단계 3. 4개 팔PEG20K-이리노테칸 염산염-트리플루오로아세테이트의 합성

[0449] Gly-IRT HCl-TFA(10.0g)를 250mL 반응기에 충전하고 아르곤으로 플러싱하였다. 재킷 온도를 20℃로 설정하였다. DCM(166mL) 및 TEA(2.94g)를 첨가하였다. 용액을 10분 동안 혼합하였다. 4개 팔-PEG20K-SCM의 초기 충전물을 (47.6g)에 첨가하고 30분 동안 반응 혼합물을 교반하였다. 샘플을 취하고 HPLC에 의해 분석하였다. HPLC 데이터는 남아있는 Gly-IRT이 18%임을 나타내었다. 4개 팔-PEG20K-SCM(10.7g)의 이차 충전물을 반응 혼합물에 첨가하고 용액을 약 2시간 동안 교반하였다. HPLC 분석을 위하여 샘플을 취하였다. HPLC 분석 데이터는 남아있는 Gly-IRT이 1.5%임을 나타내었다. 그 다음 반응 용액을 MTBE(828mL)에 서서히 첨가하여 생성물을 침전시켰다. 침전물을 30분 동안 교반하고 여과를 통해 수집하였다. 젖은 덩어리를 30% 메탄올/70% MTBE(830mL)의 혼합물로 세척하였다. 그 다음 생성물을 30% 메탄올/70% MTBE(642mL)의 혼합물을 포함하는 반응기에 충전시키고, 혼합물을 20℃에서 20분 동안 교반하였다. 혼합물을 여과하고 젖은 덩어리를 필터상에서 30% 메탄올/70% MTBE(642mL)의 혼합물로 세척하였다. 생성물을 진공 하 20℃에서 건조하였다.

[0450] 건조한 생성물을 에틸 아세테이트(642mL)를 포함하는 반응기에 충전하였다. 혼합물을 35℃까지 가열하여 완전한 용해를 이루었다. 따뜻한 용액을 필요하다면 여과하여 용해되지 않은 미립자를 제거하였고, 그 다음 교반하면서 10℃까지 냉각시켰다. 침전된 4개 팔PEG20K-글리신-이리노테칸 염산염-트리플루오로아세테이트 생성물을 여과하고 젖은 덩어리를 필터상에서 30% 메탄올/70% MTBE(642mL)의 혼합물로 세척하였다. 그 다음 생성물을 진공 하 20℃에서 건조하였다. 수득률: 54g(약 85%).

[0451] 상기 공정에 따라 제조한 다양한 로트를 염 조성에 대하여 이온 크로마토그래피에 의해 분석하였다.

[0452]

PEG에 결합한 이리노테칸의 mol%

로트 번호	TFA 염	HCl 염	유리 염기
로트 1	34	41	25
로트 2	31	45	24
로트 3	30	49	21
로트 4	29	48	23

표 3

[0453]

표 2에서의 배치에 대한 평균 및 표준편차

	평균	sd	2sd	3sd	4SD
TFA, mol%	31	2.4	4.8	7.2	9.6
Cl, mol%	46	3.5	7.1	10.6	14.2
유리염기, mol%	23	1.0	1.9	2.9	3.9

[0454]

표 2의 결과로부터 알 수 있는 바와같이, 기술된 바에 따라 제조된 배치는 TFA 염, 염산염 및 유리 염기의 일정한 비율을 보인다. 배치 정보의 검토에 기초하여, 글리신-이리노테칸 TFA/HCl 중간체에서 더 높은 염화물 함량이 최종 혼합 염 콘쥬게이트 생성물 내 염화물 함량을 더 높게 하는 것으로 보인다. 염화물 함량이 상당히 일정한 이리노테칸 염산염과 같은 출발 물질을 이용함으로써, 염화물 함량이 상당히 일정한 글리신-이리노테칸 TFA/HCl 염을 제조할 수 있다.

[0455]

배치 정보의 추가 검토에 기초하여, 단계 3에서 이용된 TEA 당량수가 더 높을수록, 최종 혼합 염 콘쥬게이트 생성물 내 TFA 함량이 더 낮고 보다 적게 염화물 함량이 더 낮은 것으로 보인다. 예를 들어 이온 크로마토그래피에 의해 분석 전에 중간체를 더 많이 용해시킴으로써 아마도 용이하게되는, 중간체, 즉 gly-이리노테칸 TFA/HCl의 염화물 및 TFA 함량의 측정은 예컨대 최종 반응 단계에서 첨가된 트리에틸아민의 양에서 화학양론의 보다 정확한 측정을 가능하게 할 수 있다.

[0456]

상기 내용에 기초하여, 혼합 산성 염 콘쥬게이트의 TFA의 바람직한 범위는 약 20mol% 내지 45mol%, 바람직하게는 약 22mol% 내지 40mol%이다. 염산염 함량에 대하여, 혼합 산성 염 콘쥬게이트에서 바람직한 범위는 약 30mol% 내지 65mol% 염화물, 또는 약 32mol% 내지 60mol% 염화물, 또는 약 35mol% 내지 57mol% 염화물이다.

[0457]

## 실시예 7

[0458]

## 염 비율이 상이한 4개팔 PEG-GLY-이리노-20K 물질의 스트레스 안정성 연구

[0459]

단기간(4주)의 안정성 연구를 하기 표 4에 요약된 바와 같이 염 농도가 다양한 4개 팔-PEG20K-gly-이리노테칸 상에서 수행하였다. “순수”한 염산염은 가장 왼쪽 컬럼에 나타내었고, 비프로톤화, 유리 염기 형태는 가장 오른쪽 컬럼에 나타냈었으며, 그 중간에 분해를 다양하게 하여 나타내었다. 연구는 본질적으로 실시예 3에 기술된 바와 같이 온도(습도 조절 없이 -20℃, 습도 조절 없이 5℃, 60% 상대 습도에서 25℃, 75% 상대 습도에서 40℃) 범위에 걸쳐서 수행하였다.

표 4

[0460]

샘플 정보

샘플	HCl	중간체	대표	중간체	유리 염기
로트 번호	로트 A	로트 B	로트 C	로트 D	로트 E
Cl	0.59%	0.43%	0.26 %	0.11%	NQ
TFA	NQ	0.25%	0.56%	0.07%	NQ
Cl(mol%)	103.8%	75.6%	44.6%	18.9%	NQ
TFA(mol%)	NQ	13.6%	30.6%	3.9%	NQ
전체 염(mol%)	103.8%	89.2%	75.2%	22.8%	0%



[0461] HCl 염(로트 A)에 대하여, 온도 범위에 걸쳐서 평가될 때 4주 기간에 걸쳐서 전체 생성물 관련 중은 40℃에서 98.7%에서 97.0%로 변화하였지만, 유리 이리노테칸은 0.4%에서 1.25%로 변화하였다. 유리 염기(로트 D)에 대하여, 온도 범위에 걸쳐서 평가될 때 4주 기간에 걸쳐서 전체 생성물 관련 중은 40℃에서 99.8% 내지 62.5%로 변화하였지만, 유리 이리노테칸은 0.3%에서 31.4%로 변화하였다.

[0462] 낮은 온도 조건 하에서, 즉 -20℃ 및 5℃에서 평가될 때 4주 기간에 걸쳐서 각각의 물질에 대하여 최소한의 분해가 관찰되었다. 25℃에서 평가될 때, 약물의 가수분해 방출을 가장 많이 보인 유리 염기 물질로 시험한 각각의 종에서 가수분해가 관찰되었다. 40℃에서 동일하게 관찰되었고, 이 때 가장 많은 양의 유리 염기를 가지는 조성물은 이에 대응하여 이리노테칸 가수분해 속도가 가장 빠름을 입증하였다. 고온 조건 하, 즉 40℃에서는 PEG 백분의 절단이 검출되었다.

#### [0463] 실시예 8

##### [0464] 1.9kg 규모에서 펜타에리트리톨계-4개 팔-PEG-20K의 제조

[0465] 재료 및 방법. 얻을 수 있는 수합량은 중합체 디올 불순물을 초래하므로, 이 가장 낮은 매우 높은 등급의 에틸렌 옥사이드를 사용해야 했다. 주의: 에틸렌 옥사이드는 수분과 폭발적으로 반응하여 반응중 누설될 수 있는 매우 반응성이 큰 화합물이므로, 전달 장치를 조심스럽게 피하여야 한다. 또한, 직원 작업이 보호 장비 뒤에서 또는 병커 안에서 이루어지는 것을 포함하여 작업시에 주의를 하여야 한다.

[0466] 무수 톨루엔(4L)을 2갤런 재킷형 스테인리스스틸 압력 반응기에서 2시간 동안 환류시켰다. 다음에, 용매의 일부분(3L)을 대기압 하에서 증류하여 제거하였다. 그 다음에 잔여 톨루엔을 배출시키고, 반응기 재킷을 통해 스틱을 통과시키고 3mmHg 내지 5mmHg의 감압을 적용함으로써 반응기를 밤새 건조시켰다. 다음에 반응기를 실온까지 냉각시키고, 무수 톨루엔(4L)으로 채웠으며, 펜타에리트리톨계 4개 팔-PEG-2K(SUNBRIGHT PTE®-2000 펜타에리트리톨, 분자량 약 2,000달톤, NOF 사; 200g, 0.100mol)를 첨가하였다. 용매를 감압 하에서 증류하여 제거하고, 그 다음 반응기를 건조 질소 대기 하에서 30℃까지 냉각시켰다. 1L의 분자체-건조 톨루엔(물 함량 약 5ppm) 및 액체 나트륨-칼륨 합금(Na 22%, K 78%; 1.2g)을 반응기에 첨가하였다. 반응기를 110℃까지 가온하고 반응 온도를 110℃ 내지 120℃에서 유지하면서 에틸렌 옥사이드(1,800g)를 3시간에 걸쳐 계속 첨가하였다. 다음에, 반응기의 내용물을 2시간 동안 약 100℃에서 가열하고, 그 다음 온도를 약 70℃까지 낮추었다. 과량의 에틸렌 옥사이드 및 톨루엔을 감압 하에서 증류하여 제거하였다. 증류 후, 반응기의 내용물을 감압 하에 두고 질소 살포를 실행하여 미량의 에틸렌 옥사이드를 제거하였다. 인산(1N)을 첨가하여 염기성 잔여물을 중화시키고, 생성물을 감압 하에서 건조시켰다. 마지막으로, 생성물을 반응기에서 물기를 없애고 여과하여 냉각 후에 1,900g의 백색 고체를 제공하였다. 겔 여과 크로마토그래피(GFC)를 적용하여 알코실화 중합체 생성물, 즉 펜타에리트리톨계 4개 팔-PEG-20K를 특성화하였다. 이러한 분석 방법은 분자량에 따라 성분이 분리된 조성물의 크로마토그램을 제공하였다. Shodex KW-803 GFC 컬럼(300 x 8mm) 및 시차굴절계 검출기가 장착된 Agilent 1100 HPLC 시스템을 사용하였다. 이동상(0.1M NaNO<sub>3</sub>)의 유속은 0.5ml/분이었다. GFC 크로마토그램은 도 7에 나타나 있다.

[0467] GFC 분석은 4개 팔-PEG-20K 생성물이 고분자량 생성물 0.42%, 4개 팔-PEG-20K 99.14%, HO-PEG(10K)-OH 0.44%를 포함함을 나타내었다.

#### [0468] 실시예 9

##### [0469] 상업적으로 이용가능한 4개 팔-PEG-20K의 분석

[0470] NOF 사는 상업적 PEG를 제공하는데 있어서 현재 선두이다. 따라서 새로운 상업적으로 이용가능한 펜타에리트리톨계 4개 팔-PEG-20K(SUNBRIGHT PTE®-20,000, 분자량 약 20,000달톤, NOF 사)를 입수하여 겔 여과 크로마토그래피(GFC)를 사용하여 분석하였다. Shodex KW-803 GFC 컬럼(300 x 8mm) 및 시차굴절계 검출기가 장착된 Agilent 1100 HPLC 시스템을 사용하였다. 이동상(0.1M NaNO<sub>3</sub>)의 유속은 0.5ml/분이었다. GFC 크로마토그램은 도 8에 나타나 있다.

[0471] GFC 분석은 이러한 상업적 4개 팔-PEG-20K 생성물이 고분자량 생성물 3.93%, 4개 팔-PEG-20K 88.56%, HO-PEG(10K)-OH 3.93%, HO-PEG(5K)-OH 3.58%를 포함함을 나타내었다.

[0472] 실시예 10

[0473] 15kg 규모에서 알콕실화가능 올리고머인 펜타에리트리톨계 4개 팔-PEG-2K의 제조

[0474] 20갤런 재킷형 스테인리스스틸 압력 반응기를 95℃에서 95kg의 탈이온화수로 2회 세척하였다. 세척수를 제거하고, 반응기 재킷을 통해 스팀을 통과시키고 감압(3mmHg 내지 5mmHg)을 적용함으로써 반응기를 밤새 건조시켰다. 반응기를 무수 톨루엔 25kg으로 채웠으며, 용매의 일부분을 감압 하에서 증류하여 제거하였다. 그 다음에, 잔여 톨루엔을 배출시키고 반응기를 감압 하에 계속 두었다. 다음에 반응기를 실온까지 냉각시키고, 무수 톨루엔(15L)으로 채웠으며, 펜타에리트리톨(1,020g)을 첨가하였다. 용매의 일부(약 8L)를 감압 하에서 증류하여 제거하였고, 그 다음 반응기를 건조 질소 대기 하에서 30℃까지 냉각시켰다. 액체 나트륨-칼륨 합금(Na 22%, K 78%; 2.2g)을 반응기에 첨가하였다. 반응 온도를 150℃ 내지 155℃에서 유지하면서 무수 에틸렌 옥사이드(14,080g)를 3시간에 걸쳐 계속 첨가하였다. 다음에, 반응기의 내용물을 30분 동안 약 150℃에서 가열하고, 그 다음 온도를 약 70℃까지 낮추었다. 과량의 에틸렌 옥사이드 및 톨루엔을 감압 하에서 증류하여 제거하였다. 증류 후, 반응기의 내용물을 감압 하에 두고 질소 살포를 실행하여 미량의 에틸렌 옥사이드를 제거하였다. 마지막으로, 생성물을 반응기에서 물기를 없애고 14,200g의 점성 액체를 제공하였다. 겔 여과 크로마토그래피(GFC)를 적용하여 생성물, 즉 펜타에리트리톨계 4개 팔-PEG-2K를 특성화하였다. 이러한 분석 방법은 분자량에 따라 성분이 분리된 조성물의 크로마토그램을 제공하였다. Shodex KW-803 GFC 컬럼(300 x 8mm) 및 시차굴절계 검출기가 장착된 Agilent 1100 HPLC 시스템을 사용하였다. 이동상(0.1M NaNO<sub>3</sub>)의 유속은 0.5ml/분이었다.

[0475] GFC 분석은 4개 팔-PEG-2K 생성물이 검출한계 미만에서 저분자량 또는 고분자량의 불순물이 있는 약 100%의 순도를 나타내었다.

[0476] 실시예 11

[0477] 20kg 규모에서 펜타에리트리톨계 4개 팔-PEG-20K의 제조

[0478] 20갤런 재킷형 스테인리스스틸 압력 반응기를 95℃에서 95kg의 탈이온화수로 2회 세척하였다. 물을 배출하고, 반응기 재킷을 통해 스팀을 통과시키고 3mmHg 내지 5mmHg의 감압을 적용함으로써 반응기를 밤새 건조시켰다. 반응기를 톨루엔 25kg으로 채웠으며, 용매의 일부분을 감압 하에서 증류하여 제거하였다. 그 다음에, 잔여 톨루엔을 배출시키고 반응기를 감압 하에 계속 두었다. 다음에 반응기를 실온까지 냉각시키고, 무수 톨루엔(21L)으로 채웠으며, 실시예 10에서 앞서 분리한 알콕실화가능 올리고머인 펜타에리트리톨계 4개 팔-PEG-2K(2,064g)를 첨가하였다. 용매의 일부(16L)를 감압 하에서 증류하여 제거하였고, 그 다음 반응기를 건조 질소 대기 하에서 30℃까지 냉각시켰다. 4L의 분자체-건조 톨루엔(물 함량 약 5ppm) 및 액체 나트륨-칼륨 합금(Na 22%, K 78%; 1.7g)을 첨가하고, 반응기를 110℃까지 가온하였다. 다음에 반응 온도를 145℃ 내지 150℃에서 유지하면서 에틸렌 옥사이드(19,300g)를 5시간에 걸쳐 계속 첨가하였다. 다음에, 반응기의 내용물을 30분 동안 약 140℃에서 가열하고, 그 다음 온도를 약 100℃까지 낮추었다. 빙초산(100g)을 첨가하여 촉매를 중화시켰다. 과량의 에틸렌 옥사이드 및 톨루엔을 감압 하에서 증류하여 제거하였다. 증류 후, 반응기의 내용물을 감압 하에 두고 질소 살포를 실행하여 미량의 에틸렌 옥사이드를 제거하였다. 마지막으로, 생성물을 반응기에서 물기를 없애고 20,100g의 백색 고체를 제공하였다. 겔 여과 크로마토그래피(GFC)를 적용하여 알콕실화 중합체 생성물, 즉 펜타에리트리톨계 4개 팔-PEG-20K를 특성화하였다. 이러한 분석 방법은 분자량에 따라 성분이 분리된 조성물의 크로마토그램을 제공하였다. Shodex KW-803 GFC 컬럼(300 x 8mm) 및 시차굴절계 검출기가 장착된 Agilent 1100 HPLC 시스템을 사용하였다. 이동상(0.1M NaNO<sub>3</sub>)의 유속은 0.5ml/분이었다.

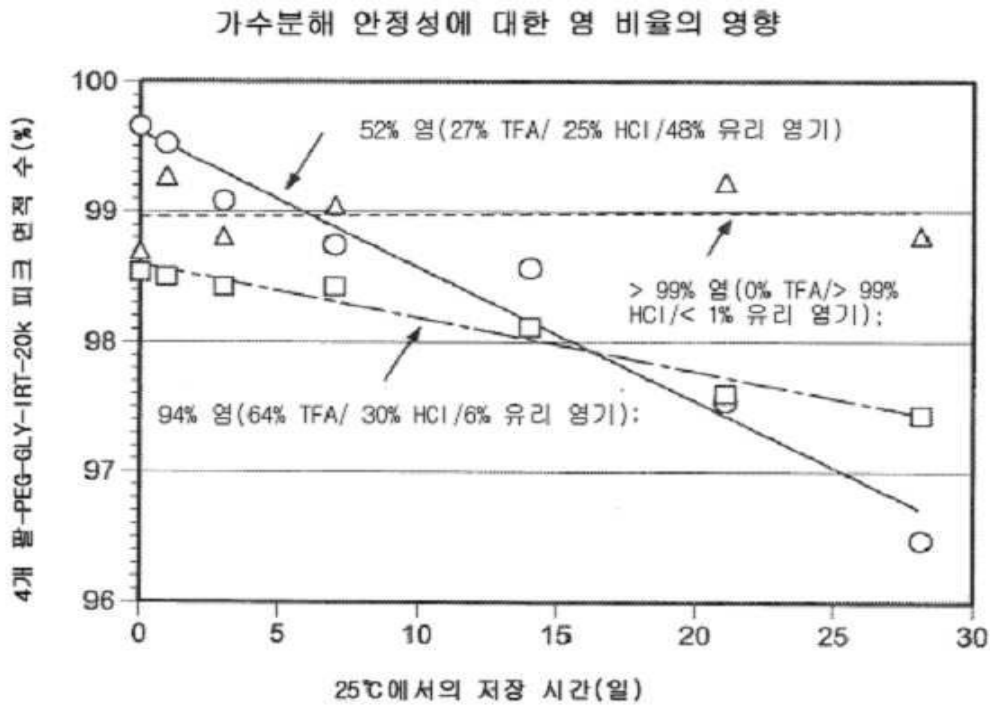
[0479] GFC 분석은 4개 팔-PEG-20K 생성물이 고분자량 생성물 0.75%, 4개 팔-PEG-20K 97.92%, HO-PEG(10K)-OH 1.08%, HO-PEG(5K)-OH 0.48%를 포함함을 나타내었다.

[0480] 본원에 제시된 본 발명(들)은 특정한 예시적인 실시형태에 대하여 기술되었다. 그러나, 상기 설명은 본 발명은 예시적인 실시형태로 본 발명을 한정하고자 하는 것이 아니며, 당업자는 상기 명세서 내에 기술된 바와 같이 본 발명의 정신 및 범주 내에서 변형이 이루어질 수 있음을 인지해야 한다.

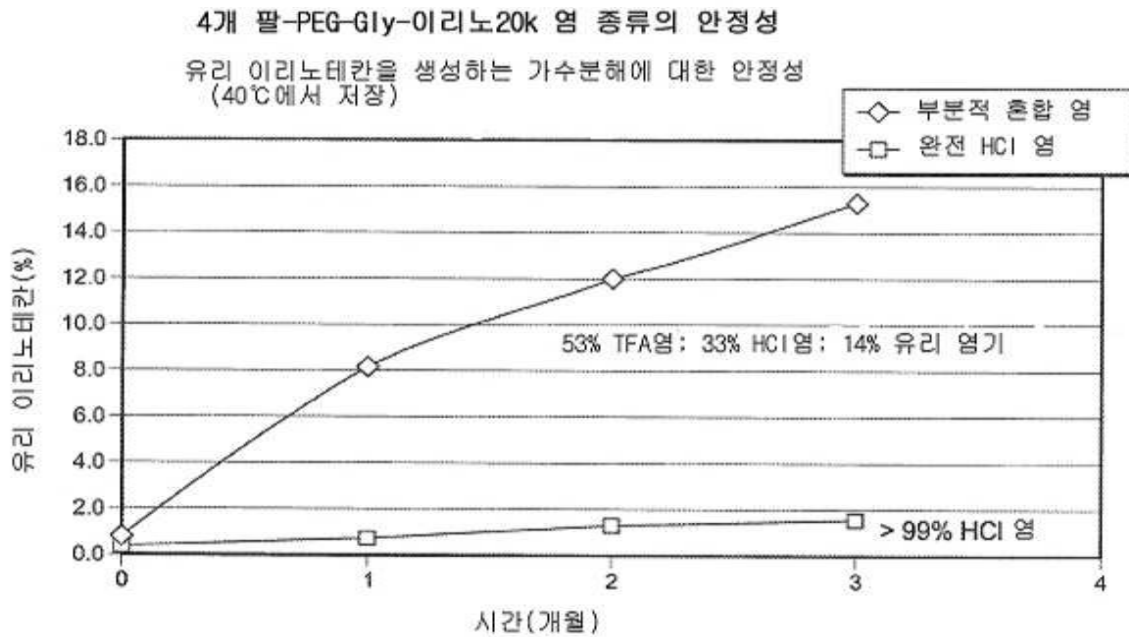


도면

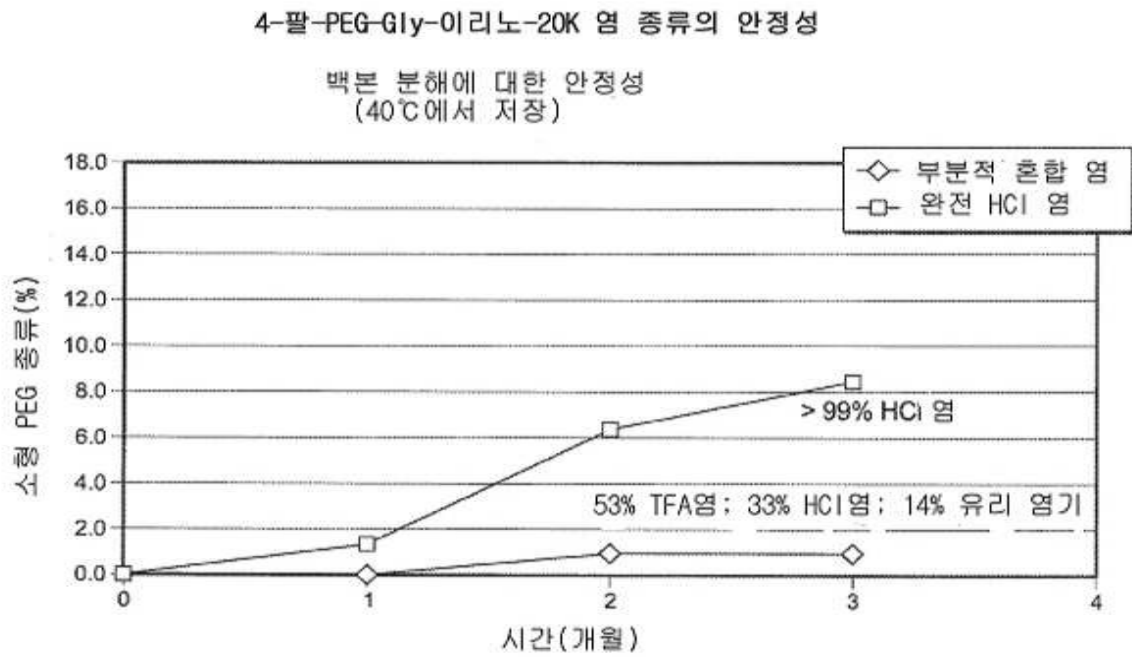
도면1



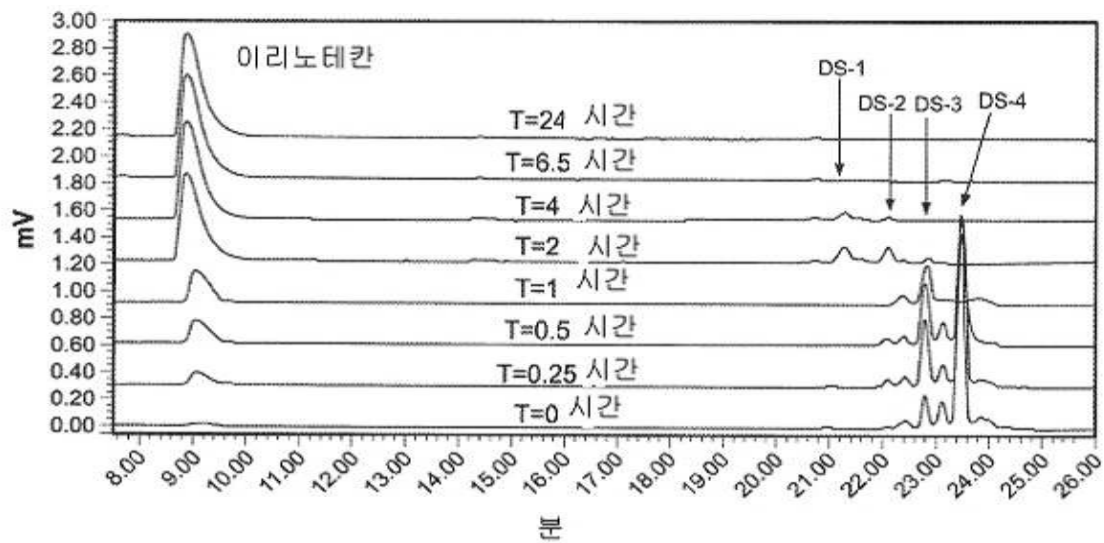
도면2



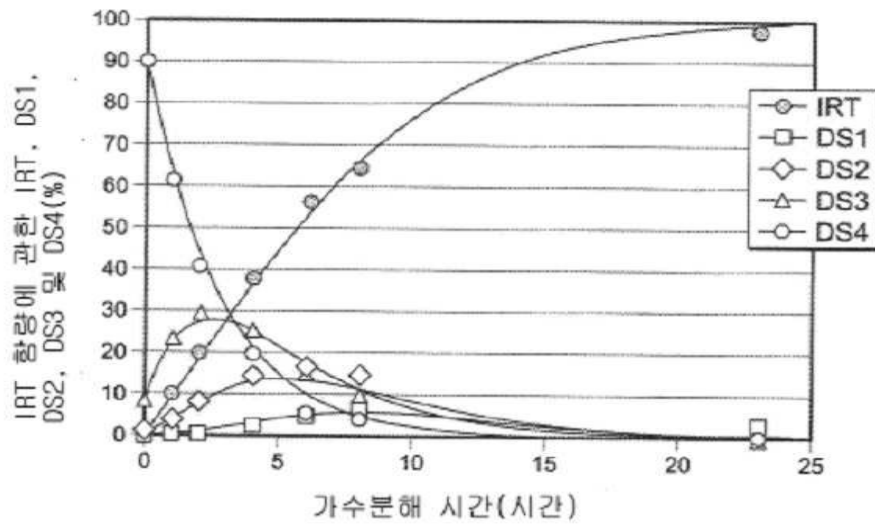
도면3



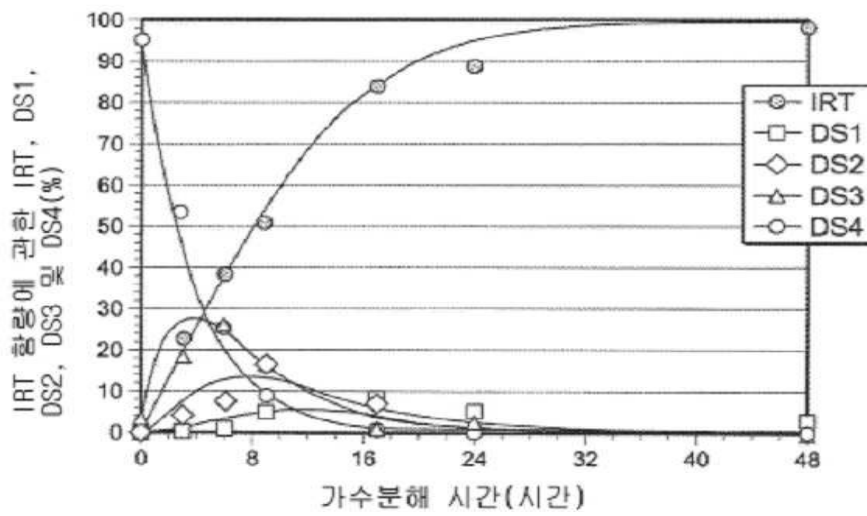
도면4



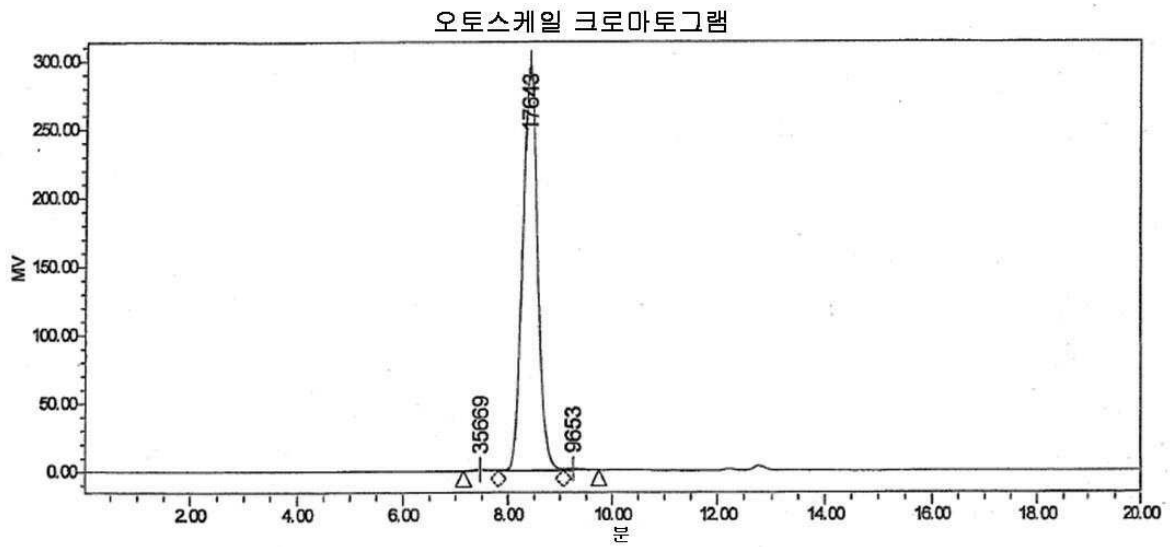
도면5



도면6

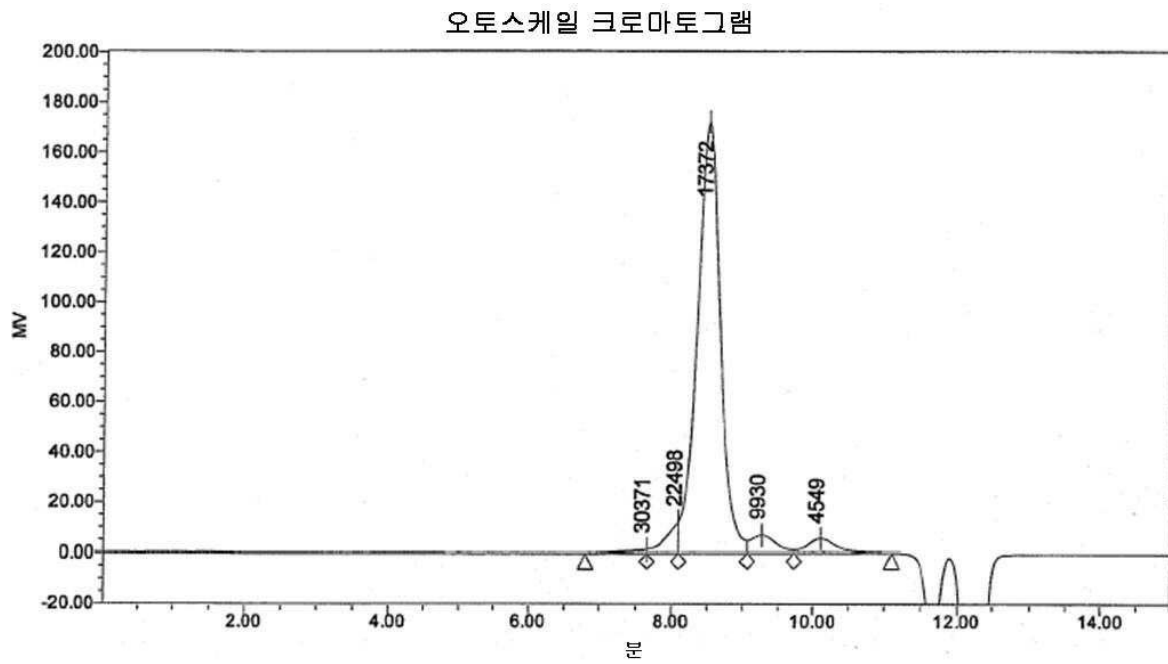


도면7



	% 면적	보유 시간	Mp	
1	0.42	7.465	35,669	고분자량 생성물
3	99.14	8.404	17,643	4 개 팔-PEG-20K
4	0.44	9.251	9,653	HO-PEG(10K)-OH

도면8



	% 면적	보유 시간	Mp	
1	0.60	7.650	30,371	고분자량 생성물
2	3.33	8.100	22,498	고분자량 생성물
3	88.56	8.495	17,372	4 개 팔-PEG-20K
4	3.93	9.273	9,930	HO-PEG(10K)-OH
5	3.58	10.106	4,549	HO-PEG(5K)-OH