



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년11월01일
(11) 등록번호 10-1671537
(24) 등록일자 2016년10월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08G 63/06 (2006.01) *A61K 47/48* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C08L 67/02* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2011-7004008
- (22) 출원일자(국제) 2009년08월11일
심사청구일자 2014년04월29일
- (85) 번역문제출일자 2011년02월22일
- (65) 공개번호 10-2011-0052648
- (43) 공개일자 2011년05월18일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2009/004618
- (87) 국제공개번호 WO 2010/019233
국제공개일자 2010년02월18일
- (30) 우선권주장
61/087,826 2008년08월11일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
WO2004060967 A1
JP2003518178 A

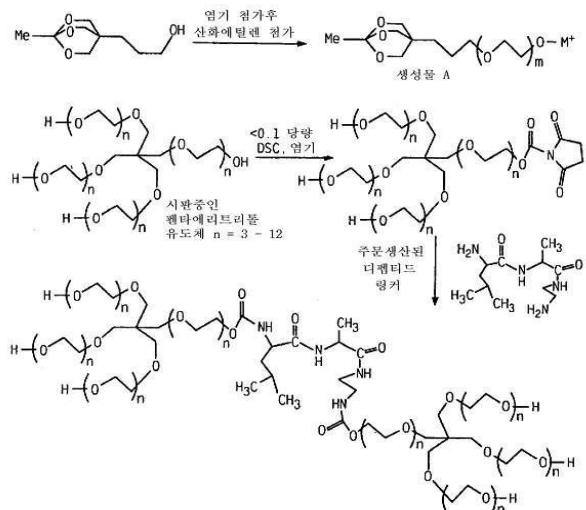
- (73) 특허권자
넥타르 테라퓨티스
미국 94158 캘리포니아주 샌프란시스코 사우스 미
선 베이 불러바드 455 스위트 100
- (72) 발명자
코즐로브스키 안토니
미국 35811 엘라배마주 헌츠빌 페리팩스 스트리트
2209
맥매너스 사무엘 피
미국 35802 엘라배마주 헌츠빌 타코마 트레일
8867
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 33 항

심사관 : 이강영

(54) 발명의 명칭 **다분지형 중합체 알카노에이트 컨쥬케이트****(57) 요약**

다른 측면들 중에서도, 본원에는 알카노에이트-링커를 포함하는 다분지형 중합체 컨쥬케이트, 이와 같은 컨쥬케이트를 포함하는 조성물, 및 이것들을 제조 및 투여하는 관련 방법에 관하여 개시되어 있다. 이러한 컨쥬케이트를 사용하는 치료 방법과 이와 관련된 용도도 개시되어 있다. 본 발명의 컨쥬케이트는 약물 담지 효율이 높은 형태로서 제조된다.

대 표 도 - 도1a

(72) 발명자

릭스-소티어 제니퍼

미국 35802 앨라배마주 헌츠빌 스모크 라이즈 로드
7917

선 샤오밍

미국 35758 앨라배마주 매디슨 레인보우 글렌 서클
102

장 웬

미국 35758 앨라배마주 매디슨 토크넘 웨이 142

(30) 우선권주장

61/106,928 2008년10월20일 미국(US)

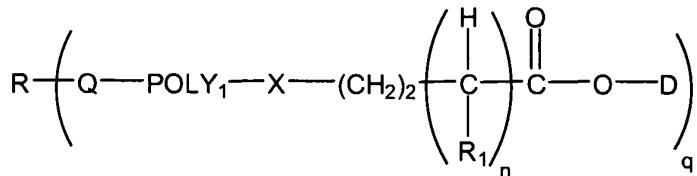
61/113,328 2008년11월11일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

다음과 같은 구조식을 가지는 다분지형 중합체 접합체(Conjugate):



식 중:

R은 3 ~ 150개의 탄소 원자를 포함하는 유기 중심 라디칼이고;

Q는 링커이며;

POLY₁은 수용성 및 비펩티드성 중합체 분절이고;

X는 임의의 스페이서이며;

각각의 경우, R₁은 H, 저급 알킬 및 전자 끄는 기로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

n은 1~7의 정수이며;

D는 분자량 800달톤 미만인 탁산 또는 캠토테신의 잔기이고;

q는 3 이상임.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 R은 3개~ 25개의 탄소 원자를 가지는 것인 다분지형 중합체 접합체.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 R은 선형 또는 환형인 것인 다분지형 중합체 접합체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 R은 Q와 함께 취하여 졌을 때, 폴리올, 폴리티올 또는 폴리아민의 잔기인 것인 다분지형 중합체 접합체.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 R은 "q" 분지에 대해서 Q와 함께 취하여 졌을 때, 글리세롤, 트리메틸올프로판, 펜타에리트리톨, 솔비톨 또는 글리세롤 올리고머의 잔기인 것인 다분지형 중합체 접합체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 Q는 가수 분해에 안정한 것인 다분지형 중합체 접합체.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 Q는 1개 ~ 10개의 원자를 함유하는 것인 다분지형 중합체 접합체.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 상기 Q는 $-O-$, $-S-$, $-NH-$ 및 $-NH-C(O)$ 로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 다분지형 중합체 접합체.

청구항 10

제1항, 제7항 또는 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 POLY₁은 폴리(알킬렌 글리콜), 폴리(올레핀 알코올), 폴리(비닐파롤리돈), 폴리(하이드록시알킬메타크릴아미드), 폴리(하이드록시알킬메타크릴레이트), 다당류, 폴리(a-하이드록시산), 폴리(아크릴산), 폴리(비닐 알코올), 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리(N-아크릴로일모르폴린) 또는 이들의 공중합체 또는 삼량체로 이루어진 군으로부터 선택되는 중합체인 것인 다분지형 중합체 접합체.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 POLY₁은 폴리에틸렌글리콜인 것인 다분지형 중합체 접합체.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 POLY₁은 선형인 것인 다분지형 중합체 접합체.

청구항 13

제1항, 제7항 또는 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 POLY₁의 중량 평균 분자량은 200 ~ 30,000달톤의 범위인 것인 다분지형 중합체 접합체.

청구항 14

제1항, 제7항 또는 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 접합체의 중량 평균 분자량은 20,000달톤 이상인 것인 다분지형 중합체 접합체.

청구항 15

제1항, 제7항 또는 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 X의 원자 길이는 1 ~ 50 원자인 것인 다분지형 중합체 접합체.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 X의 원자 길이는 1 ~ 25 원자인 것인 다분지형 중합체 접합체.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 X는 $-O-$ 인 것인 다분지형 중합체 접합체.

청구항 18

제1항, 제7항 또는 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 q값은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 다분지형 중합체 접합체.

청구항 19

제1항, 제7항 또는 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 “q” 중합체 분자(-Q-POLY₁-X-(CH₂)₂-(CHR₁)_nC(O)OD)는 각각 동일한 것인 다분지형 중합체 접합체.

청구항 20

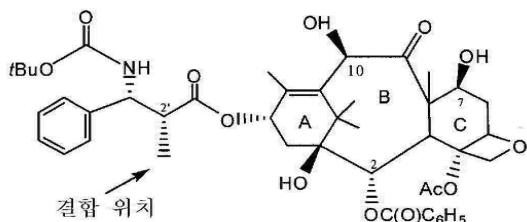
삭제

청구항 21

제1항, 제7항 또는 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 D는 파클리탁셀 또는 도세탁셀의 잔기인 것인 다분지형 중합체 접합체.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 D는 다음과 같은 구조식을 가지는 것인 다분지형 중합체 접합체:

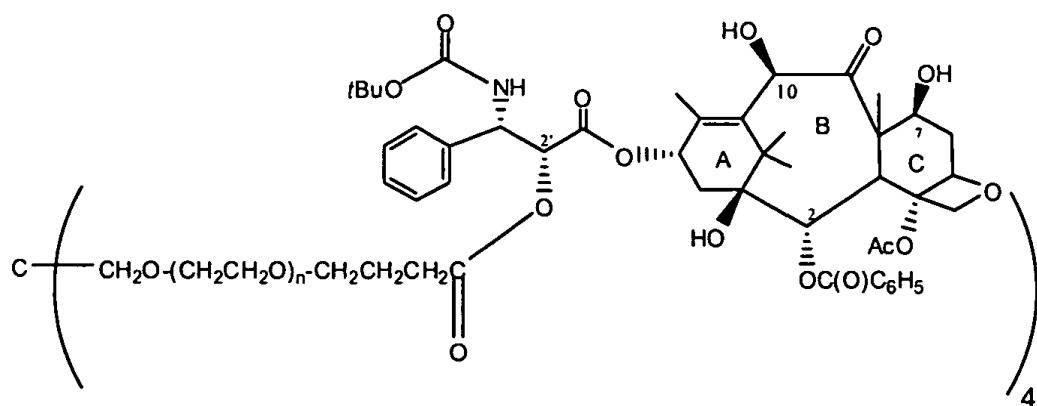


청구항 23

제22항에 있어서, 상기 q는 3 또는 4인 것인 다분지형 중합체 접합체.

청구항 24

제21항에 있어서, 다음과 같은 구조식을 가지는 것인 다분지형 중합체 접합체:



식 중, n은 40 ~ 500임.

청구항 25

제24항에 있어서, 전체 공칭 평균 분자량은 10,000 ~ 80,000의 범위인 다분지형 중합체 접합체.

청구항 26

제1항, 제7항 또는 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 R₁은 메틸, 에틸, 프로필, n-부틸, 이소프로필 및 이소부틸로부터 선택되는 것인 다분지형 중합체 접합체.

청구항 27

제1항, 제7항 또는 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 R₁은 할로겐화물, 니트릴, -NO₂ 및 -CF₃로부터 선택되는 것인 다분지형 중합체 접합체.

청구항 28

제1항, 제7항 또는 제8항 중 어느 하나의 항에 의한 다분지형 중합체 접합체와 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 29

제24항에 의한 다분지형 중합체 접합체와 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

제1항, 제7항 또는 제8항 중 어느 하나의 항에 의한 접합체를 치료학적 유효량으로 포함하는, 하나 이상의 암성 고형 종양이 발병한 것으로 진단받은 포유동물 피험체 내에서 암을 치료하기 위한 약학 조성물.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 암성 고형 종양의 종류는 결장암, 유방암, 전립선암 및 비소세포 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

청구항 36

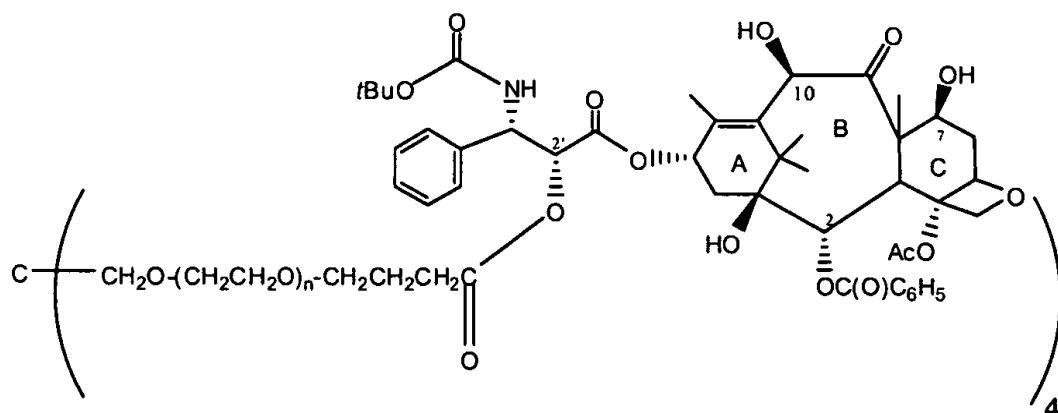
제24항에 의한 접합체를 치료학적 유효량으로 포함하는, 도세탁셀 처리에 반응을 보이는 증상에 대해서 포유동물 피험체를 치료하기 위한 약학 조성물.

청구항 37

제29항에 있어서, 상기 접합체는 약물 담지율이 92% 이상인 것을 특징으로 하는 것인 조성물.

청구항 38

다음과 같은 구조식을 가지는 다분지형 중합체 접합체:



식 중, n은 40 ~ 500의 범위임.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 접합체의 중량 평균 분자량은 20,000달톤인 것인 다분지형 중합체 접합체.

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

발명의 설명

기술 분야

관련 출원들에 대한 상호 참조 문헌

[0001] 본 출원은 가특허 출원 제 61/087,826호(2008년 8월 11일 출원); 가특허 출원 제 61/106,928호(2008년 10월 20일 출원); 및 가특허 출원 제 61/113,328호(2008년 11월 11일 출원)에 대한 우선권의 이익을 주장하고, 상기 출원들의 내용은 각각 본원에 그 전체로서 명백하게 참고문헌으로 포함된다.

발명의 분야

[0004] 본 출원은 일반적으로 다분지형의 수용성 중합체 및 상용하는 이것의 약물 컨쥬케이트에 관한 것이다. 구체적으로, 본 출원은 다른 어떤 특징들 중에서도 알카노에이트 결합을 통해 다분지형 중합체에 약물이 공유 결합되어 있는 다분지형 중합체 컨쥬케이트에 관한 것이다. 뿐만 아니라, 본 출원에는 이와 같은 컨쥬케이트를 포함하는 약학 조성물과, 이러한 컨쥬케이트와 관련 조성물을 제조, 조제, 투여 및 사용하는 방법에 관하여도 개시되어 있다.

배경 기술

[0005] 수 년간, 생물학적으로 활성인 제제, 특히, 소분자 약물의 전달을 개선하고자 하는 방법들이 다수 제안되어 왔다. 약학 제제의 조제 및 전달과 관련된 문제점으로서 몇 가지 예를 들자면 약학 제제의 수용성이 떨어진다는 점, 독성이 있다는 점, 생체 적합성이 낮다는 점, 불안정하다는 점, 그리고 생체 내 분해가 빠르다는 점들을 포함할 수 있다. 약학 제제의 전달능을 개선하고자 하는 방법들이 다수 고안되었지만, 어떠한 방법에도 단점이 존재했다. 예를 들어, 이러한 문제점을 중 하나 이상을 해결하거나 적어도 완화하고자 일반적으로 사용되었던 약물 전달 방법으로서는, 약물 캡슐화(drug encapsulation)(예를 들어, 리포좀, 중합체 매트릭스 또는 단분자 미셀 내 캡슐화), 수용성 중합체 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜에의 공유 결합(즉, 컨쥬케이트화)(즉, PEG 또는 PEG화) 및 유전자 표적화제(gene targeting agent)를 사용하는 방법 등을 포함한다.

[0006] PEG화는 수용성이 떨어지는 소분자 치료제의 생체 적합성과 조제의 용이성을 개선시키기 위해 제한된 정도로 이용되고 있다. 예를 들어, 수용성 중합체 예를 들어, PEG는 아틸린산(artilinic acid)에 공유 결합되어 이것의 수용성을 개선하였다(미국 특허 제6,461,603호를 참조). 이와 유사하게, PEG는 트리아진계 화합물 예를 들어, 트리멜라몰에 공유 결합되어 이것의 수중 가용성을 개선하고 화학적 안정성을 증진하였다(국제 특허 출원 공개 WO 제02/043772호를 참조). PEG를 비스인돌릴 말레이미드에 공유 결합하는 방법은 이와 같은 화합물의 수용성이 좋지 않음으로 인한 낮은 생체 적합성을 개선하는데 사용되고 있다(국제 특허 출원 공개 WO 제03/037384호를 참조). 비스테로이드 소염 약물(NSAIDs)의 중합체 컨쥬케이트와 아편상 길항제의 중합체 컨쥬케이트도 제조되고 있다(각각 미국 특허 출원 공개 제2007/0025956호 및 제2006/0105046호를 참조). 하나 또는 두개의 캠토테신 분

자가 선형 폴리에틸렌 글리콜에 공유 결합되어 있는 캠토테신 전구 약물도 제조되고 있다(미국 특허 제 5,880,131호를 참조).

[0007] 임의의 약물 예를 들어, 알칼로이드는 용해되기(즉, 조제되기) 어렵기로 유명하다. 이와 같은 알칼로이드로서는 탁산 예를 들어, 도세탁셀과, 캠토테신 예를 들어, 이리노테칸을 포함한다. 캠토테신(종종 "CPT"라고 약칭됨)은 캠토데카 아큐미나타(*Camptotheca acuminata*)(나이사세아에; Nyssaceae)나무와 이 나무 껍질로부터 처음으로 분리된 식물 독성(phytotoxic) 알칼로이드로서, 항종양 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이 화합물은 20 S 배열을 하고 있는 락톤 고리 E 내 비대칭 중심을 가지는 5환 고리계를 갖는다. 이와 같은 5환 고리계는 피롤로 [3, 4-b]퀴놀린(고리 A, B 및 C), 컨쥬케이트화된 피리돈(고리D), 및 20-하이드록실기를 가지는 6원 락톤(고리 E)을 포함한다. 이 화합물의 수중 불용성으로 인하여, 캠토테신은 처음에 임상학적으로 나트륨 염을 형성하도록 개방된 락تون 고리를 가지는 수용성 카복실레이트 염의 형태로 평가되었다. 나트륨 염은 캠토테신 자체에 비하여 수용성이 훨씬 개선되었지만, 독성이 지나치게 강하였고 생체 내 항암 활성도 매우 미미한 것으로 밝혀져, 이와 같은 방법에는 적절치 못한 것으로 밝혀졌다. 고형 종양과 림프종이 진행된 환자 치료용인 선형 PEG-파클리탁셀 화합물에 대한 제1단계 임상 실험이 2001년도에 시작되었으며, 실험은 이미 마쳐진 상태이다.

[0008] 캠토테신과 이의 다수의 유도체들과 관련된 낮은 수용성을 다루기 위한 노력의 일환으로, A-고리 및/또는 B-고리를 유도체화하거나, 20-하이드록실을 에스테르화하여, 세포 독성 활성을 유지하면서 수용성을 개선하고자 하는 합성 방법이 다수 회 시도된 바 있다. 예를 들어, 토포데칸(9-디메틸아미노메틸-10-하이드록시 CPT)과 이리노테칸(7-에틸-10[4-(1-피페리디노)-1-피페리디노]카보닐옥시 CPT)(CPT-11이라고도 알려짐)는, 임상학적으로 유용한 활성을 나타낸 바 있는 두 가지 수용성 CPT 유도체이다. 임의의 캠토테신 유도체 예를 들어, 10-하이드록시캠토테신 및 11-하이드록시캠토테신을 선형 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 에스테르 결합시켜 컨쥬케이트화하는 방법은 수용성 전구 약물을 형성하는 수단인 것으로 기술된 바 있다(미국 특허 제6,011,042호를 참조). 여기에 사용된 방법은 방향족 하이드록실 함유 화합물과 활성화된 중합체를 반응시키는 것을 골자로 한다.

[0009] 다수의 소분자 치료제 예를 들어, 전술한 치료제, 특히, 종양 분해제(oncolytics)의 임상학적 유효성은 몇 가지 요인들 예를 들어, 투여량 관련 독성에 의해 제한된다. 예를 들어, 이리노테칸과 기타 캠토테신 유도체는 알칼리성 조건 하에서 E-고리 락تون을 원치 않게 가수 분해한다. 뿐만 아니라, 이리노테칸을 투여할 경우 문제를 일으킬 수 있는 다수의 부작용 예를 들어, 백혈구 감소증, 호중구 감소증 및 설사를 유발한다. 부작용 중 설사가 심해짐으로 인하여, 통상적인 비변형 형태로 투여될 수 있는 이리노테칸의 투여량은 극도로 제한되어, 이 약물과 이와 같은 종류에 속하는 다른 약물의 효능은 억제된다.

[0010] 전술한 바와 같이 관련 부작용들이 심각해지면, 이러한 약물들을 더 이상 효능이 기대되는 치료제로서 사용 및 개발하는 것을 중단하기에 충분한 이유가 될 수 있다. 소분자들을 이용할 때 직면하게 되는 또 다른 문제점으로서는 소멸률이 높다는 점과, 항암제로서 사용되는 경우에는 종양 투과 시간 및 종양 내 체류 시간이 최소화된다는 것을 포함한다. 중합체 결합의 사용과 관련된 방법에서는, 치료학적 유효 투여량이 전달될 수 있도록 하기 위해서 활성 제제의 분자량에 대한 중합체 크기의 균형을 임상학적으로 유용한 비율로 맞춰야 한다. 마지막으로, 변형 또는 약물 전달능 강화 활성 제제를 합성할 경우 합리적인 수득량을 얻어내야 하며, 생성물을 반복적으로 제조하여 이 제조 방법들이 경제적으로도 유리해야 한다. 그러므로, 부작용 및 종종 독성 부작용을 감소할 수 있는 약물, 구체적으로 소분자 약물, 더욱 구체적으로 종양 분해제를 효과적으로 전달하기 위한 새로운 방법이 필요할 뿐만 아니라, 동시에 이 약물의 제조 방법과 효능을 개선하고 조제를 용이하게 만들 필요가 있다. 더욱 중요한 점은 약물에 내성을 갖는 종양에 효과적인 종양 분해 생성물을 제공할 필요가 있다는 것이다. 구체적으로, 전술한 바와 같이 약물 전달 방법, 예를 들어, 부작용을 줄임과 동시에 소멸 시간을 감소시킴으로써 생체적 합성의 균형을 최적으로 유지하고, 생체 활성과 효능이 있는 약물 전달 방법을 개선할 필요가 있는 것이다.

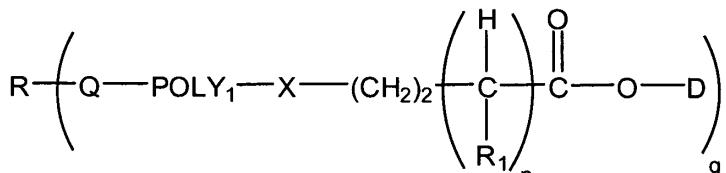
발명의 내용

과제의 해결 수단

[0011] 발명의 개요

[0012] 제1 측면에 있어서, 본 출원에서는 다음과 같은 구조식을 가지는 다분지형 중합체 컨쥬케이트를 제공한다:

[0013] [화학식 I]



[0014]

상기 식 중,

R은 약 3~약 150개의 탄소 원자를 포함하는 유기 중심 라디칼이고; Q는 링커이며; POLY₁은 수용성 및 비펩티드성 중합체 분절이고; X는 선택적으로 존재하는 스페이서이며; 각각의 경우, R₁은 H, 저급 알킬 및 전자 끄는 기로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고; n은 1~7 범위의 정수(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6 및 7로부터 선택됨)이며; D는 분자량 약 800달톤 미만인 소분자의 잔기이고; q는 3 이상이다.

[0017] 본원에 개시된 이하 구체예들은 각각 하나씩 고려될 수 있거나, 또는 구체적인 조합이 이러한 조합 내에 포함된 특정 구체예들과 상호 불일치하지 않는 한, 하나 이상의 임의의 추가 구체예와 함께 고려될 수 있다.

[0018] 상기 화학식 I의 화합물을 참고로 하는 특정 구체예에서, D는 항암제이다.

[0019] 또 다른 구체예에서, 변수 "R"은 약 3~약 25개의 탄소 원자를 가지는 유기 중심 라디칼이다. 추가의 구체예에서, R은 선형이거나 환형일 수 있다. 추가의 구체예에서, R은 포화 지방족 중심이다. 예시적인 다분지형 중합체 컨쥬케이트는 "q" 분지들 각각에 대하여 Q와 함께 취하여졌을 때 R이 폴리올, 폴리티올 또는 폴리아민의 잔기인 컨쥬케이트들을 포함한다. 하나 이상의 특정 구체예에서, "q" 분지들 각각에 대하여 Q와 함께 취하여졌을 때 R은 글리세롤, 트리메틸올프로판, 웬타에리트리톨, 솔비톨 또는 글리세롤의 올리고머의 잔기이다.

[0020] 또 다른 구체예에서, 링커 "Q"는 가수 분해에 대해 안정하다. Q에 관한 특정 구체예로서는 다음의 것들을 포함한다: 하나 이상의 구체예에서, Q는 약 1 ~ 약 10개의 원자를 함유하고; 다른 구체예에서 Q는 -O-, -S-, -NH-, -C(O)-NH- 및 -NH-C(O)-로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0021] 또 다른 구체예에서, POLY₁은 폴리(알킬렌 글리콜), 폴리(올레핀 알코올), 폴리(비닐파롤리돈), 폴리(하이드록시알킬메타크릴아미드), 폴리(하이드록시알킬메타크릴레이트), 다당류, 폴리(a-하이드록시산), 폴리(아크릴산), 폴리(비닐 알코올), 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리(N-아크릴로일모르폴린) 또는 이들의 공중합체 또는 삼량체로 이루어진 군으로부터 선택되는 중합체이다.

[0022] 바람직한 구체예에서, POLY₁은 폴리에틸렌 글리콜이다.

[0023] POLY₁에 관한 추가 구체예로서는 다음의 경우를 포함한다: 하나 이상의 구체예에서, POLY₁은 선형이고; 또 다른 구체예에서, POLY₁의 중량 평균 분자량은 약 200 ~ 약 30,000달톤의 범위이다.

[0024] 추가의 구체예에서, 컨쥬케이트의 중량 평균 분자량은 약 20,000달톤 이상이며, 예를 들어, 분자량 범위 약 20,000 ~ 약 80,000달톤에 있다.

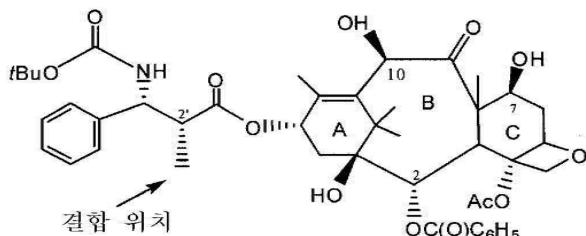
[0025] 변수 "X"(이는 선택적으로 존재함)에 관한 특정 구체예로서는 다음의 경우를 포함한다. 하나 이상의 구체예에서, X의 원자 길이는 약 1원자 ~ 약 50 원자이다. 또 다른 구체예에서, X의 원자 길이는 약 1원자 ~ 약 25 원자이다(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 원자로부터 선택되거나 또는 이 범위 내). 추가의 구체예에서, X는 산소("-O-")이다. 특정 구체예에서, POLY₁은 구조식 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 에 해당하는 선형 폴리에틸렌 글리콜이고, X는 산소("-O-")이다.

[0026] 변수 "R₁"과 관련된 추가 구체예로서는 다음의 경우를 포함한다. 하나 이상의 구체예에서, R₁은 H이다. 또 다른 구체예에서, R₁은 모든 경우의 "n"에 대하여 H이다. 또 다른 구체예에서, 각각의 경우(즉, (~C(H)R₁)의 "n" 각각에 대하여) 각 R₁은 메틸, 에틸, 프로필, n-부틸, 이소프로필 및 이소부틸로부터 독립적으로 선택된다. 또 다른 구체예에서, 각 R₁은 독립적으로 할로겐화물(예를 들어, 플루오르화물, 염화물, 브롬화물 및 요오드화물), 니트릴, -NO₂ 및 -CF₃로부터 선택된다. 바람직한 구체예에서, R₁은 수소이다. 또 다른 구체예에서, R₁은 카

보넓에 인접하고 있는 알파 탄소에 위치할 경우에만 수소 이외의 것이다. 추가의 구체예에서, R₁은 상기 알파 탄소에 위치할 경우 메틸이다.

[0027] 다시 변수 "q"로 돌아와서, 이 "q"와 관련된 특정 구체예로서는 다음의 경우를 포함한다. 하나 이상의 구체예에서, q값은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 구체예에서, q는 3 또는 4이다. 또 다른 구체예에서, "q" 중합체 분자[-Q-POLY₁-X-(CH₂)₂-(CHR₁)_nC(O)OD]는 각각 동일하다.

[0028] 컨쥬케이트의 소분자 부분에 관한 구체예로서는 다음의 경우를 포함한다. 하나 이상의 구체예에서, 소분자의 분자량은 약 250 ~ 700달톤의 범위이다. 또 다른 구체예에서, D는 탁산 또는 캠토테신의 잔기이다. 또 다른 구체예에서, D는 파클리탁셀 또는 도세탁셀의 잔기이다. 하나 이상의 구체예에서, D는 다음과 같은 구조식을 가진다:

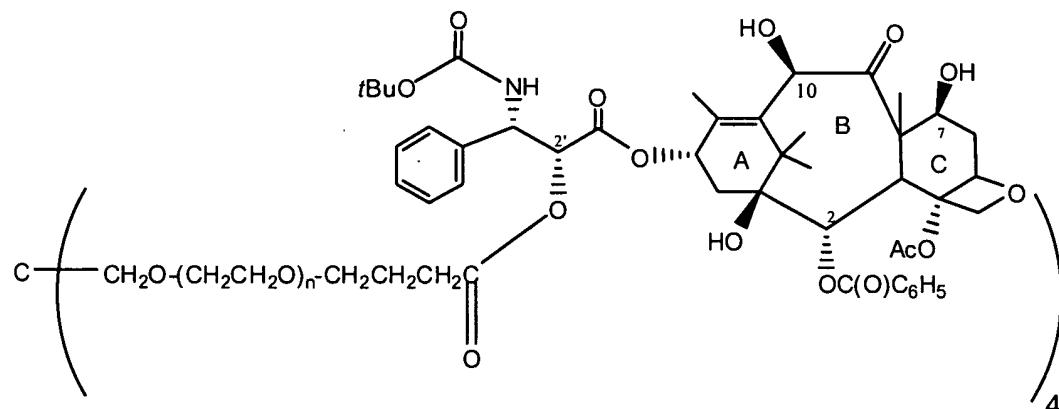


[0029]

또 다른 구체예에서, 다분지형 중합체 컨쥬케이트는 다음과 같은 구조식을 가진다:

[0030]

[화학식 Ia]



[0031]

상기 식 중, n은 약 40 ~ 약 500의 범위이다. 상기 구조식과 관련된 구체예에서, 컨쥬케이트의 전체 중량 평균 분자량은 약 10,000 ~ 약 80,000의 범위이다.

[0032]

제2의 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 다분지형 중합체 컨쥬케이트와 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0033]

다분지형 중합체 컨쥬케이트가 상기 화학식Ia의 화합물에 해당하는 관련 구체예에 있어서, 래트를 대상으로 한 1회 투여 연구에서 평가된 바에 따르면, 상기 조성물은 도세탁셀에 비하여 독성이 2배 이상 감소되는 것을 알 수 있다. 또 다른 구체예에서, 상기 컨쥬케이트의 약물 담지율(drug loading)은 92% 이상인 것을 특징으로 한다. 또 다른 구체예에서, 상기 화학식 Ia의 화합물에 해당하는 다분지형 중합체 컨쥬케이트는, H460, LoVo 또는 LS174T 마우스 이종 이식편 모델 중 어느 하나의 경우, 최대 내성 용량(MTD)에서 평가하였을 때의 종양 성장 지연 백분율(percentage tumor growth delay; TGD)이 도세탁셀을 투여하여 측정된 결과의 1.5배 이상인 것을 추가의 특징으로 한다.

[0034]

제3의 측면에서, 본 발명은 다분지형 중합체 컨쥬케이트의 투여를 필요로 하는 포유동물 피험체에 이를 전달하는 방법을 제공한다. 이 방법은 본원에 제공된 바와 같은 다분지형 중합체 컨쥬케이트를 치료학적 유효량만큼 포유동물 피험체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0035]

제4의 측면에서, 본 발명은 포유동물 피험체에 발생한 암을 치료하는 방법을 제공한다. 본 방법은 본원에 제공

된 컨쥬케이트(이 경우, D는 항암제)를 상기 피험체 체 내에서 고형 종양의 성장을 억제하는데 효과적인 기간 동안, 하나 이상의 암성 고형 종양이 발생한 것으로 진단된 피험체에 치료학적 유효량만큼 투여하는 단계를 포함한다.

[0038] 상기 제4의 측면과 관련된 구체예에서, 암성 고형 종양 유형은 결장암, 유방암, 전립선암 및 비소세포 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

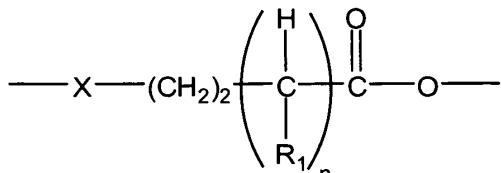
[0039] 제5의 측면에서, 본 발명은 도세탁셀 처리에 반응을 보이는 증상에 대해 포유동물 피험체를 치료하는 방법을 제공하는데, 여기서, 이 방법은 본원에 제공된 다분지형 중합체 컨쥬케이트를 치료학적 유효량만큼 피험체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0040] 본 발명은 또한 전술한 방법과 관련된 용도를 제공한다.

[0041] 제6의 측면에서, 다분지형 중합체 컨쥬케이트는 다음과 같은 구조식을 가진다:

[0042] $R(-Q-POLY_1-Y-D)_q$,

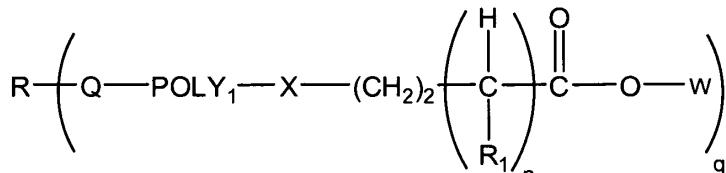
[0043] 상기 식 중, R은 약 3 ~ 약 150개의 탄소 원자를 가지는 유기 중심 라디칼이고, Q는 링커이며, POLY₁은 수용성 및 비펩티드성 중합체이고, Y는 가수 분해 가능한 결합을 포함하는 스페이서로서, 가수 분해 가능한 결합이 가수 분해될 때 D가 방출되며; D는 소문자이고, q는 3 이상으로서, 다음과 같은 구조식을 가지는 Y를 포함한다는 개선점이 제공된다:



[0044]

상기 식 중, X는 본원에 추가로 상술된 바와 같은 스페이서이며; R₁은 H, 저급 알킬 및 전자 끄는 기로 이루어진 군으로부터 선택되고, n은 1 ~ 5의 정수이다.

[0046] 제7의 측면에서, 본 발명은 다음과 같은 구조식을 가지는 다분지형 중합체 구조물을 제공한다.



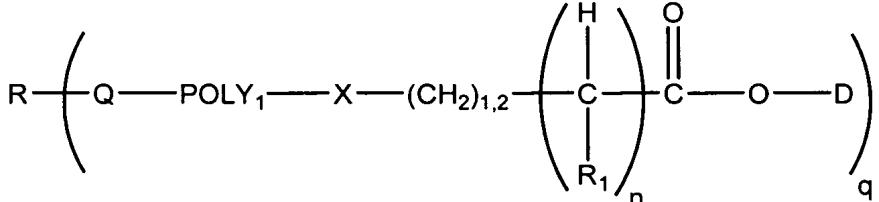
[0047]

[0048] 상기 식 중, R은 약 3 ~ 약 150개의 탄소 원자를 포함하는 유기 중심 라디칼이고; Q는 링커이며; POLY₁은 수용성 및 비펩티드성 중합체 분절이고; X는 스페이서이며; 각 R₁은 H, 저급 알킬 및 전자 끄는 기로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고; n은 1 ~ 7의 정수이며; q는 3 이상이고; W는 D, H 및 활성화 에스테르로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서, D는 문자량이 약 800달톤 미만인 소문자의 잔기다. 이와 같은 다분지형 중합체 구조물을 포함하는 조성물에 있어서, 평균적으로 본 조성물 내에 존재하는 모든 종을 고려하였을 때, W는 0.92(q) 이상의 값에서 D와 동일한 것이 바람직하다.

[0049] 제8의 측면에서, 본 발명은 다분지형 중합체 약물 컨쥬케이트를 제조하는 방법을 제공한다. 본 방법은 에스테르 결합을 통하여 소분자 약물을 다분지형 수용성 중합체 구조에 컨쥬케이트화하여 다분지형 수용성 중합체 약물 컨쥬케이트를 형성하는데 효과적인 조건 하에서, 본원에 개시된 화학적 방법의 한계 내에서 “q” 중합체 분자를 가지는 다분지형 수용성 중합체 구조물(각 분자는 말단부에 반응성 카복실산기 또는 활성화된 에스테르 균등체를 가짐)과, 소분자 약물의 입체 장애된 2차 또는 3차 알코올의 “q” 균등체 또는 그 이상의 부분을 반응시키는 단계를 포함하는데, 여기서, 상기 중합체 분자 중 92% 이상에는 소분자 약물이 공유 결합되어 있다. 상기 컨쥬케이트는 중합체 분자 각각에 존재하는 에스테르 결합에 인접한 곳에 링커를 보유하는데, 여기서, 상기 링커에는 이웃하는 기와 에스테르 카보닐이 상호 작용하여 소분자 약물을 치환할 수 있는 5원 또는 6원의 환형 생성물을 형성할 수 있는 작용기가 존재하지 않는 것이 바람직하다.

[0050] 상기 제8의 측면과 관련된 특정 구체예에서, 상기 링커는 구조식 $-(\text{CH}_2)_2(\text{CR}_1\text{H})_n\text{C}(\text{O})-\text{O}-$ 를 가지는 알카노에이트 링커로서, 여기서, 각각의 경우에 R_1 은 H, 저급 알킬 및 전자 끄는 기로부터 독립적으로 선택되고, n은 1 ~ 7의 정수이다. 또 다른 구체예에서, 반응 단계 이전에, 상기 링커는 약물이나 중합체 분자 각각에 공유 결합되어 있다.

[0051] 제9의 측면에서, 본 발명은 다음과 같은 구조식을 가지는 다분지형 중합체 컨쥬게이트 또는 시약을 제공한다:



[0052]

[0053] 상기 식에 나타낸 각각의 변수들은 전술한 바와 같다. 전술한 바와 관련된 하나의 특정 구체예에서, 상기 구조는 X에 인접하는 위치에 2개보다는 하나의 메틸렌기를 보유하며, n은 1이고, R_1 은 저급 알킬기이거나 전자 끄는 기이다. 4-분지형-PEG-메틸프로피온산은 이와 같은 다분지형 중합체 컨쥬게이트 또는 시약을 제공하는데 유용한 대표적인 구조물이다.

[0054] 본 발명의 방법과 조성물 등에 관한 추가의 구체예는 이하 발명의 상세한 설명, 도면, 실시예 및 청구항을 통하여 분명해질 것이다. 전술한 바와 이하 상세한 설명에서 알 수 있는 바와 같이, 본원에 개시된 각각의 특징과 모든 특징들, 및 이러한 특징들을 2가지 이상 조합한 각각의 조합 및 모든 조합은 본원에 개시된 바의 범위 내에 포함되며, 단, 이와 같은 조합에 포함된 특징들은 서로 부합한다. 뿐만 아니라, 임의의 특징 또는 이들 특징들의 조합은 본 발명의 임의의 구체예로부터 특별히 배제될 수 있다. 본 발명의 추가 측면들과 이점들은 특히, 이하에 기술된 실시예 및 첨부 도면들을 함께 고려하였을 때, 이하 상세한 설명 및 청구항에 제시되어 있다.

[0055] 본 발명의 이와 같은 대상 및 특징들과 기타 대상 및 특징들은 이하 상세한 설명을 참고로 하여 읽을 때 더욱 완전히 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0056] 도 1a ~ 1c는 디펩티드 결합 펜타에리트리톨릴 중심 함유 다분지형 중합체의 예시적인 합성 과정을 나타낸 것이다.

도 2a 및 2b는 실시예 13에 상세히 기술된 바와 같이, LS174T(대장결장) 종양을 이식한 후 도세탁셀(탁소텔; Taxotere®) 또는 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC 중 어느 하나로 처리한 마우스에 있어서 시간 경과에 따른 종양 부피 중앙값(median tumor volume; MTV)을 나타낸 그래프이다. 도 2a는 도세탁셀 또는 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC 중 어느 하나의 투여량에 변화를 주면서 마우스에 투여한 경우의 투여량 반응 곡선을 나타낸 것이고; 도 2b는 도세탁셀 또는 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC 중 어느 하나를 최대 내성 용량(maximum tolerated dose; MTD)만큼 투여한 마우스에 있어서 시간 경과에 따른 LS174T 종양 부피 중앙값을 그래프로 나타낸 것이다.

도 3a 및 3b는 실시예 13에 상세히 기술된 바와 같이, H460 종양을 이식한 후 도세탁셀(탁소텔; Taxotere®) 또는 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC 중 어느 하나로 처리한 마우스에 있어서 종양 성장 지연 현상(tumor growth delay; TGD)이 상당 수준 강화되었음을 도시하고 있다. 도 3A는 도세탁셀 또는 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC 중 어느 하나의 투여량에 변화를 주면서 마우스에 투여하였을 경우의 투여량 반응 곡선을 나타낸 것이며; 도 3B는 최대 내성 용량(MTD)과 대조군 용량만큼을 투여하였을 때의 결과를 비교한 것이다.

도 4a 및 4b는 실시예 13에 상세히 기술한 바와 같이, LoVo 종양을 이식한 후 도세탁셀(탁소텔; Taxotere®) 또는 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC를 처리한 마우스에 있어서 시간 경과에 따른 종양 부피 중앙값을 나타낸 그래프이다. 도 4a는 도세탁셀 또는 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC 중 어느 하나의 투여량에 변화를 주면서 마우스에 투여한 경우의 투여량 반응 곡선을 나타낸 것이고; 도 4b는 마우스에 도세탁셀 또는 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC 중 어느 하나로 최대 내성

용량(MTD)만큼 투여하였을 경우 대 대조군 용량만큼 투여하였을 경우의 MTD 비교 결과를 나타내는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0057] 본 발명의 다양한 측면들은 이하에서 보다 자세하게 기술될 것이다. 그러나, 이러한 측면들은 다수의 상이한 형태로 구체화될 수 있으며, 본원에 제시된 구체예들에 한정되어 해석되어서는 안 될 것이고, 오히려, 이와 같은 구체예들은 본원에 개시된 바를 철저하고 완전하게 되도록 하고, 또한 본 발명의 범위를 당업자에게 분명하게 알리기 위해서 제공되는 것이다.
- [0058] 본원에 있어서 상기 또는 이하에 인용된 모든 간행물, 특히 및 특허 출원들은 그 전체로서 참고문헌으로 포함된다.
- [0059] 정의
- [0060] 본 명세서에 사용된, 단수 형태는 문장 내에서 달리 명시하지 않는 한 복수를 나타내기도 한다는 사실을 주의해야 할 것이다. 그러므로, 예를 들어, “중합체”라는 용어에는 하나의 중합체와 2개 이상의 동일하거나 상이한 중합체를 포함하며, “컨쥬게이트”라는 용어에는 하나의 컨쥬게이트와 2개 이상의 동일하거나 상이한 컨쥬게이트를 포함하고, “부형제”라는 용어에는 하나의 부형제와 2개 이상의 동일하거나 상이한 부형제를 포함한다.
- [0061] 본 발명을 기술 및 청구항에 있어서, 다음과 같은 용어는 이하에 기술된 정의에 따라서 사용될 것이다.
- [0062] “작용기”란, 보통의 유기 합성 조건 하에서 그것이 결합된 실체와 다른 실체 사이에 공유 결합을 형성하는데 사용될 수 있는 기로서, 통상적으로는 추가의 작용기를 보유하고 있다. 작용기는 일반적으로 다수 개의 결합(들) 및/또는 이종 원자(들)를 포함한다. 본 발명의 중합체에 사용하기 바람직한 작용기에 관하여는 이하에 기술되어 있다.
- [0063] “반응성”이란 용어는, 통상의 유기 합성 조건 하에서 용이하게 반응하거나 또는 합리적인 속도로 반응하는 작용기를 의미하는 것이다. 이는 반응을 진행시키기 위해서 강력한 촉매와 반응하지 않거나 이러한 촉매 또는 비합리적인 반응 조건을 필요로 하지 않는 기(즉, “비반응성” 기 또는 “비활성” 기)와는 대조적인 기이다.
- [0064] 반응 혼합물 중 분자상에 존재하는 작용기를 참고로 하였을 때, “용이하게 반응하지 않는”이란 용어는, 반응 혼합물 중에서 원하는 반응을 나타내는데 효과적인 조건 하에 기가 거의 변형되지 않은 것을 나타내는 것이다.
- [0065] 카복실산의 “활성화된 유도체”란, 친핵체와 용이하게 반응하고, 일반적으로는 유도체화되지 않은 카복실산보다 더욱 용이하게 반응하는 카복실산 유도체를 의미한다. 활성화된 카복실산으로서는 예를 들어, 산 할로겐화물(예를 들어, 산 염화물), 무수물, 카보네이트 및 에스테르를 포함한다. 상기 에스테르로서는 예를 들어, 이미다졸릴 에스테르와 벤조트리아졸 에스테르, 및 이미드 에스테르 예를 들어, N-하이드록시숙신이미딜(NHS) 에스테르를 포함한다. 활성화된 유도체는 카복실산과 다양한 시약들 중 하나 예를 들어, 벤조트리아졸-1-일옥시 트리페놀리디노포스포늄 혼합물(예를 들어, PyBOP)과 함께 1-하이드록시 벤조트리아졸(HOBt) 또는 1-하이드록시-7-아자벤조트리아졸(HOAT); 0-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 혼합물(예를 들어, HATU); 또는 염화 비스(2-옥소-3-옥사졸리디닐)포스핀(BOP-CI)과 함께 인시튜 반응시킴으로써 생성될 수 있다.
- [0066] 작용기의 “화학 균등체(chemical equivalent)”란, 본질적으로 작용기와 동일한 종류의 반응성을 갖는 기다. 예를 들어, SN2 반응을 수행하는 하나의 작용기는 이러한 특성을 가지는 다른 작용기의 작용성 균등체인 것으로 간주된다.
- [0067] “보호기”란, 임의의 반응 조건 하에서 분자 내 특정 화학 반응성 작용기의 반응을 방지 또는 차단하는 부위이다. 보호기는 보호되는 화학 반응기의 유형과 적용될 반응 조건, 그리고 분자 내에 추가의 반응기 또는 보호기가 존재하는지 여부에 따라서 달라질 것이다. 보호될 수 있는 작용기들로서는 예를 들어, 카복실산 기, 아미노기, 하이드록실 기, 티올 기 및 카보닐 기 등을 포함한다. 카복실산에 대한 대표적 보호기로서는 에스테르(예를 들어, p-메톡시벤질 에스테르), 아미드 및 히드라지드를 포함하고; 아미노 기에 대한 대표적 보호기로서는 카바메이트(예를 들어, tert-부톡시카보닐) 및 아미드를 포함하며; 하이드록실 기에 대한 대표적 보호기로서는 에테르 및 에스테르를 포함하고; 티올 기에 대한 대표적 보호기로서는 티오에테르 및 티오에스테르를 포함하며; 카보닐 기에 대한 대표적 보호기로서는 아세탈 및 케탈을 포함한다. 이와 같은 보호기들은 당업자에게 널리 공지되어 있으며, 예를 들어, 문헌[T.W. Greene and 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 이 참고문헌에 인용된 문헌에도 개시되어 있다.

[0068] “보호형”의 작용기란, 보호기를 보유하는 작용기를 의미한다. 본원에 사용된 “작용기” 또는 이의 임의의 유의어는 이 작용기의 보호형을 포함하는 의미이다.

[0069] 본원에 사용된 “PEG” 또는 “폴리(에틸렌 글리콜)”이란, 임의의 수용성 폴리(에틸렌 옥사이드)를 포함하는 의미이다. 통상적으로, 본 발명에 사용된 PEG는, 말단 산소(들)가 예를 들어, 합성에 의한 변형시 치환되었는지 여부, 즉 예를 들어, 인접하는 작용기들의 동일성 여부에 따라서 다음의 2가지 구조식들 중 하나를 포함할 것이다: $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ 또는 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n-1}\text{CH}_2\text{CH}_2-$. 변수 (n)은 통상적으로 3 ~ 약 3,000의 범위이고, 전체 PEG의 말단 기와 구조는 다양할 수 있다. PEG 또는 이 PEG분절을 포함하는 컨쥬게이트가 상기 화학식 I의 화합물 내 스페이서 또는 링커(이하 보다 상세히 기술됨)를 추가로 포함할 때, 상기 스페이서(X) 또는 링커(Q)를 포함하는 원자는 PEG 분절에 공유 결합될 경우, (i) 산소-산소 결합(-O-O-, 과산화물 결합), 또는 (ii) 질소-산소 결합(N-O, O-N)을 형성하지 않는다. 본 발명에 사용되는 PEG는 이하 더욱 상세히 기술되어 있는 바와 같이 분자량, 구조 또는 형태가 다양한 PEG들을 포함한다.

[0070] 본 발명의 중합체에 관한 내용 중 “수용성” 또는 “수용성 중합체 분절”이란, 실온에서 수 중 가용성인 임의의 분절 또는 중합체이다. 통상적으로, 수용성 중합체 또는 분절은 필터링 후 동일한 용액에 빛을 투과시킬 경우 약 75% 이상, 더욱 바람직하게는 약 95% 이상을 투과시킬 것이다. 중량을 기준으로 하였을 때, 수용성 중합체 또는 이 중합체의 분절은 수 중 약 35중량% 이상 가용성인 것이 바람직할 것이며, 수 중 약 50중량% 이상 가용성인 것이 더욱 바람직할 것이고, 수 중 약 70중량% 가용성인 것이 더더욱 바람직할 것이며, 수 중 약 85중량% 가용성인 것이 더더욱 바람직할 것이다. 그러나, 수용성 중합체 또는 분절은 수 중 약 95중량% 가용성이거나 또는 수 중 완전히 가용성인 것이 가장 바람직하다.

[0071] “말단 캡핑(end-capping)” 기 또는 “말단이 캡핑된(end-capped)” 기란, 중합체 예를 들어, PEG의 말단 부에 존재하는 비활성 기이다. 말단 캡핑 기는 통상의 합성 반응 조건 하에서 화학 변형을 용이하게 수행하지 않는 기이다. 말단 캡핑 기는 일반적으로 알콕시 기 즉, -OR이며, 여기서, R은 1~20개의 탄소로 이루어진 유기 라디칼로서, 바람직하게는 저급 알킬(예를 들어, 메틸, 에틸) 또는 벤질이다. 예를 들어, 말단이 캡핑된 PEG는 통상적으로 구조 $\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ 를 포함할 것이며, 식 중, R은 상기 정의한 바와 같다. 대안적으로, 말단 캡핑 기는 또한 검출 가능한 라벨을 포함하는 것이 유리할 수도 있다. 중합체가 검출 가능한 라벨을 포함하는 말단 캡핑 기를 가지는 경우, 중합체 및/또는 이 중합체와 커플링되는 부위(예를 들어, 활성 제제)의 양 또는 위치는 적당한 검출기를 사용하여 측정할 수 있다. 이와 같은 라벨로서는 형광 물질, 화학 발광 물질, 효소 라벨링에 사용되는 부위, 비색 물질(예를 들어, 염료), 금속 이온, 방사성 부위 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0072] 중합체에 있어서 “자연에서 생성되지 않는(non-naturally occurring)”이란 용어는, 그 자체로는 자연에서 발견되지 않는 중합체를 의미한다. 그러나, 자연에서 생성되지 않는 중합체는 전체 중합체 구조물이 자연에서 발견되지 않는 한, 자연에서 생성되는 하나 이상의 서브유닛 또는 이 서브유닛의 분절을 포함할 수 있다.

[0073] 수용성 중합체 예를 들어, PEG에 관한 내용 중 “분자 질량”이란, 통상적으로 크기 배제 크로마토그래피, 광산란 기술 또는 수 중이나 유기 용매 중 고유 점성 측정법에 의해 측정되는, 중합체의 공청 평균 분자 질량을 의미한다. 수용성 중합체 예를 들어, PEG에 관한 내용 중 분자량은 수 평균 분자량 또는 중량 평균 분자량 중 어느 하나로서 표시할 수 있다. 달리 언급이 없는 한, 본원의 분자량에 대한 모든 표시들은 수 평균 분자량을 의미한다. 수 평균 분자량이든 중량 평균 분자량이든 두 분자량은 젤 투과 크로마토그래피 기술을 사용하여 측정될 수 있다. 분자량 수치를 측정하는 다른 방법은 예를 들어, 말단 기 분석법 또는 총괄성(예를 들어, 어는 점 내림, 끓는 점 오름 또는 삼투압) 측정법을 사용하여 수 평균 분자량을 측정하는 방법, 또는 광산란 기술, 초 원심 분리나, 점도 측정법을 사용하여 중량 평균 분자량을 측정하는 방법도 사용할 수 있다. 본 발명의 중합체는 통상적으로 복잡 분산성(polydisperse)으로서(즉, 중합체의 수 평균 분자량과 중량 평균 분자량이 동일하지 않음), 다분산 수치가 예를 들어, 약 1.2 미만, 약 1.15 미만, 약 1.10 미만, 약 1.05 미만 및 약 1.03 미만으로 낮은 다분산 수치를 가진다. 본원에 사용된 기준들은 종종 중량 평균 분자량 또는 수 평균 분자량을 가지는 단일 수용성 중합체에 대해 정해질 것이며, 이와 같은 기준들은 단일 수용성 중합체가 지정 분자량을 가지는 수용성 중합체의 조성물로부터 얻어진 것임을 의미한다는 것을 이해할 것이다.

[0074] 본원에 사용된 “링커”란 용어는, 상호 결합부(interconnecting moiety) 예를 들어, 유기 라디칼 중심 및 중합

체 분절, 즉, POLY₁을 결합하는데 사용되는 원자 또는 원자들의 집합체를 의미한다. 링커부는 가수 분해에 안정할 수 있거나, 또는 생리학적으로 가수 분해 가능하거나 효소에 의해 분해 가능한 결합을 포함할 수 있다.

[0075] 본원에 사용된 “스페이서”라는 용어는, 상호 결합부 예를 들어, 알카노에이트 결합의 디메틸렌 기 형성 부분과 POLY₁을 소분자 약물인 D에 결합시키는데 사용되는 원자 또는 원자들의 집합체를 의미한다. 스페이서 부위는 가수 분해에 안정할 수 있거나, 또는 생리학적으로 가수 분해 가능하거나 또는 효소에 의해 분해 가능한 결합을 포함할 수 있다.

[0076] “가수 분해 가능한” 결합은 생리학적 조건 하에서 물과 반응하는(즉, 가수 분해되는) 비교적 약한 결합이다. 결합이 수 중에서 가수 분해되는 경향은 2개의 중앙 원자들을 연결하는 결합의 일반적인 유형에 의존적일 뿐만 아니라, 이와 같은 중앙 원자에 결합된 치환기에도 의존적일 것이다. 가수 분해에 불안정한 결합의 예로서는 카복실레이트 에스테르, 포스페이트 에스테르, 무수물, 아세탈, 케탈, 아실옥시알킬 에테르, 이민, 오르토에스테르, 웨티드 및 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0077] “효소에 의해 분해 가능한 결합” 이란, 하나 이상의 효소에 의해 분해되는 결합을 의미한다. 이러한 결합에는 하나 이상의 효소들이 작용하여 분해를 진행시켜야 한다.

[0078] “가수 분해에 안정한” 연결 또는 결합이란, 수 중에서 실질적으로 안정한 화학 결합, 통상적으로는 공유 결합을 의미하는 것으로서, 즉, 장기간 생리학적 조건 하에서, 가수 분해가 측정할 수 있는 정도로는 진행되지 않는 결합을 말한다. 가수 분해에 안정한 결합들의 예로서는 다음의 것들을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다: 탄소-탄소 결합(예를 들어, 지방족 사슬 내), 에테르, 아미드 및 우레탄 등. 일반적으로, 가수 분해에 안정한 결합은 생리학적 조건 하에서 가수 분해율이 하루에 약 1 ~ 2% 미만인 결합이다. 각 화학 결합들의 가수 분해율은 대부분의 표준 화학 교과서에서 찾아볼 수 있다.

[0079] 중합체의 형태 또는 전체 구조에 있어서 “다분지형” 이란, 중합체의 “중심” 분자 또는 구조에 3개 이상의 중합체 함유 “분지”가 연결되어 있는 경우를 의미한다. 그러므로, 다분지형 중합체는 그것의 배열 및 중심 구조에 따라서, 3개의 중합체 분지, 4개의 중합체 분지, 5개의 중합체 분지, 6개의 중합체 분지, 7개의 중합체 분지, 8개의 중합체 분지 또는 그 이상의 중합체 분지를 가질 수 있는 것이다. 고분지 중합체에 있어서 하나의 특정 유형으로서는 수지상(dendritic) 중합체 즉, 덴드리머가 있는데, 이 덴드리머는 본 발명의 목적을 위해서 다분지형 중합체의 구조와는 구별되는 구조를 가지는 것으로 간주한다. 다시 말해서, 본원에 언급된 다분지형 중합체에서는 덴드리머를 확실하게 제외한다. 뿐만 아니라, 본원에 제공된 다분지형 중합체는 가교되지 않은 중심을 가진다.

[0080] “덴드리머”란, 모든 결합들이 규칙적인 분지 패턴으로 각각 분지점을 제공하는 반복 단위와 함께 중앙 초점 또는 중심부로부터 방사상으로 뻗어나가는, 구상이면서 크기가 균일한 단순 분산 중합체이다. 덴드리머는 통상적으로 나노 규모의 다단계 가공 공정을 이용하여 형성된다. 각 단계는 이전 단계 생성물의 복잡성보다 2배 이상 복잡한 신규의 “생성물”을 생성한다. 덴드리머는 임의의 수지상 특성 예를 들어, 덴드리머를 다른 유형의 중합체와 구별되도록 만드는 중심부 캡슐화(core encapsulation) 특성을 나타낸다.

[0081] “분지점” 이란, 중합체가 선형 구조로부터 하나 이상의 추가 중합체 분지로 분지화되거나 또는 갈라지는, 하나 이상의 원자를 포함하는 분기점을 의미한다. 다분지형 중합체는 분지들이 규칙적으로 반복되지 않아 덴드리머를 형성하는 한, 하나의 분지점 또는 다수 개의 분지점을 가질 수 있다.

[0082] “실질적으로” 또는 “본질적으로”란, 어느 주어진 양의 거의 전부 또는 전부 예를 들어, 95% 이상에 해당하는 경우를 의미한다.

[0083] “알킬” 이란, 통상적으로 길이가 약 1 ~ 20 원자의 범위인 탄화수소 사슬을 의미한다. 이러한 탄화수소 사슬은 포화된 것이 바람직하나, 반드시 그러해야 하는 것은 아니며, 분지형 사슬 또는 직선형 사슬일 수 있으나, 통상적으로는 직선형 사슬인 것이 바람직하다. 대표적인 알킬 기로서는 메틸, 에틸, 이소프로필, n-부틸, n-펜틸, 2-메틸-1-부틸, 3-펜틸 및 3-메틸-3-펜틸 등을 포함한다. 본원에 사용된 “알킬”에는 탄소 원자가 3개 이상일 경우 시클로알킬이 포함된다.

[0084] “저급 알킬” 이란, 1 ~ 6개의 탄소 원자를 함유하는 알킬 기를 의미하는 것으로서, 직선형 사슬 또는 분지형 사슬일 수 있으며, 예를 들어, 메틸, 에틸, n-부틸, i-부틸 및 t-부틸일 수 있다.

[0085] “시클로알킬” 이란, 포화 또는 불포화 환형 탄화수소 사슬을 의미하는 것으로서, 예를 들어, 가교형, 융합형 또는 나선상의 환형 화합물, 바람직하게는 3 ~ 약 12개, 더욱 바람직하게는 3 ~ 약 8개의 탄소 원자로 이루어진

화합물을 포함한다.

- [0086] “비간섭성 치환기”란, 문자 내에 존재할 때 통상적으로 그 문자 내에 함유된 다른 작용기와 반응하지 않는 기이다.
- [0087] 예를 들어, “치환된 알킬”에서와 같이 “치환된”이란 용어는 어느 부위(예를 들어, 알킬기)가 하나 이상의 비간섭성 치환기 예를 들어, C₃-C₈ 시클로알킬 예를 들어, 시클로프로필 및 시클로부틸 등; 할로 예를 들어, 플루오로, 클로로, 브로모 및 요오도; 시아노; 알콕시, 저급 페닐; 치환된 페닐 등으로 치환된 경우를 의미한다. 페닐 고리 상 치환에 있어서, 치환기는 임의의 배향(즉, 오르토, 메타 또는 파라)일 수 있다.
- [0088] “알콕시”란, -O-R 기를 의미하며, 식 중, R은 알킬 또는 치환된 알킬, 바람직하게는 C₁-C₂₀ 알킬(예를 들어, 메톡시, 에톡시 및 프로필옥시 등), 바람직하게는 C₁-C₇이다.
- [0089] 본원에 사용된 “알케닐”이란, 하나 이상의 이중 결합을 포함하며, 길이가 1 ~ 15 원자인 분지형 또는 비 분지형 탄화수소 기를 의미하는 것으로서 예를 들어, 에테닐(비닐), 2-프로펜-1-일(알릴), 이소프로페닐 및 3-부텐-1-일 등이 있다.
- [0090] 본원에 사용된 “알키닐”이란 용어는, 하나 이상의 삼중 결합을 포함하며, 길이가 2 ~ 15 원자인 분지형 또는 비분지형 탄화수소 기를 의미하는 것으로서 예를 들어, 에티닐, 1-프로피닐, 3-부틴-1-일 및 1-옥탄-1-일 등이 있다.
- [0091] “아릴”이란, 각각 5개 또는 6개의 중심 탄소 원자를 함유하는 하나 이상의 방향족 고리를 의미한다. 아릴은 나프тиль의 경우와 같이 융합될 수 있거나, 또는 비페닐의 경우와 같이 융합되지 않을 수 있는 다수의 아릴 고리를 포함한다. 아릴 고리들은 하나 이상의 환형 탄화수소, 헤테로아릴 또는 복소환 고리와 융합되거나 융합되지 않을 수 있다. 본원에 사용된 “아릴”에는 헤테로아릴을 포함한다.
- [0092] “헤테로아릴”이란, 1 ~ 4개의 이중 원자 바람직하게는 N, O 또는 S, 또는 이들의 조합을 함유하는 아릴 기이다. 헤테로아릴 고리는 또한 하나 이상의 환형 탄화수소 고리, 복소환 고리, 아릴 고리 또는 헤테로아릴 고리와 융합될 수도 있다.
- [0093] “복소환” 또는 “복소환의”란, 5 ~ 12개의 원자 바람직하게는 5 ~ 7개의 원자로 이루어진 하나 이상의 고리로서, 불포화 특성 또는 방향성을 가지거나 가지지 않으며, 탄소가 아닌 고리 원자를 하나 이상 가지는 고리를 의미한다. 바람직한 이중 원자로서는 황, 산소 및 질소를 포함한다.
- [0094] “치환된 헤테로아릴”이란 치환기로서 하나 이상의 비간섭성 기를 가지는 헤�테로아릴을 의미한다.
- [0095] “치환된 복소환”이란, 비간섭성 치환기로 형성된 하나 이상의 측면 사슬을 가지는 복소환이다.
- [0096] “친전자체”란, 친전자성 중앙 즉, 친핵체와 반응할 수 있는 전자를 끌어당기는 중앙을 가지는, 이온, 원자 또는 이온성일 수 있는 원자들의 집합체를 의미한다.
- [0097] “친핵체”란, 친핵성 중앙 즉, 친전자성 중앙을 끌어당기며 친전자체와 반응할 수 있는 중앙을 가지는, 이온, 원자 또는 이온성일 수 있는 원자들의 집합체를 의미한다.
- [0098] 본원에 사용된 “활성 제제”로서는 생체 내 또는 시험관 내에서 입증될 수 있는 몇몇 약리학적 효과, 종종 유리한 효과를 제공하는 임의의 제제, 약물 및 화합물 등을 포함한다. 본원에 사용된 활성 제제라는 용어에는 또한 환자의 체 내에서 국소적으로 또는 전신에 효과를 나타내는 임의의 생리학적 또는 약리학적으로 활성인 물질이 포함된다.
- [0099] “약학적으로 허용 가능한 부형제” 또는 “약학적으로 허용 가능한 담체”란, 본 발명의 조성물에 포함될 수 있으며, 환자에 대해 독성학상 유해한 작용을 거의 나타내지 않는 부형제를 의미한다.
- [0100] 본원에서 “약리학적 유효량”, “생리학적 유효량” 및 “치료학적 유효량”은 호환 사용가능한 용어들로서, 혈류 내 또는 표적 조직이나 체 내 특정 위치에 활성 제제 및/또는 컨쥬게이트를 원하는 수준으로 제공할 필요가 있는, 약학 제제 중에 존재하는 활성 제제의 양을 의미한다. 정확한 양은 다수의 인자들 예를 들어, 약학 제제의 특정 활성 제제, 성분 및 물리적 특성과, 대상 환자 집단, 환자에 관한 고려 사항들 등에 의존적일 것이며, 본원에 제공된 정보를 바탕으로 하여 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있고, 관련 문헌에서도 찾아볼 수 있다.

- [0101] 본 발명의 중합체에 관한 내용 중 “다작용성” 이란, 3개 이상의 작용기를 가지는 중합체를 의미하는 것으로서, 여기서, 상기 작용기는 동일하거나 상이할 수 있으며, 통상적으로 중합체 말단부에 존재한다. 본 발명의 다작용성 중합체는 통상적으로 약 3 ~ 100개의 작용기들, 또는 3 ~ 50개의 작용기들, 또는 3 ~ 25개의 작용기들 또는 3 ~ 15개의 작용기들, 또는 3 ~ 10개의 작용기들을 함유할 것이고 즉, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 작용기들을 함유한다. 통상적으로, 본 발명의 중합체 컨쥬케이트를 제조하는데 사용된 중합체 전구체에 있어서, 이 중합체는 각 분자의 말단에 가수 분해 가능한 에스테르 결합을 통해 활성 제제 부위와 커플링하는데 적당한 작용기를 가지는 중합체 분자를 3개 이상 가진다. 통상적으로, 이러한 작용기들은 동일하다.
- [0102] 본원에서 호환 사용된 “이작용성” 또는 “2작용성” 이란, 어떤 실체가 그것의 내부, 통상적으로 중합체 말단부에 포함되는 작용기를 2개 가지는 중합체인 경우를 의미한다. 작용기가 동일할 경우, 이와 같은 실체를 동종 이작용성 또는 동종 2작용성이라고 한다. 작용기가 상이할 경우, 중합체를 이종 이작용성 또는 이종 2작용성이라고 한다.
- [0103] 본원에 기술된 염기성 또는 산성 반응물로서는 이 반응물의 중성의 하전된 임의의 상응하는 염 형태를 포함한다.
- [0104] “폴리올레핀 알코올” 이란, 올레핀 중합체 주쇄를 포함하고, 중합체 주쇄에 다수 개의 현수성 하이드록실기가 결합되어 있는 중합체를 의미하는 것으로서 예를 들어, 폴리에틸렌이 있다. 예시적인 폴리올레핀 알코올로는 폴리비닐 알코올이 있다.
- [0105] 본원에 사용된 “비펩티드성” 이란, 중합체 주쇄에 펩티드 결합이 실질적으로 존재하지 않는 경우를 의미한다. 그러나, 중합체는 반복 단량체 서브유닛을 따라서 일정 간격으로 존재하는 펩티드 결합을 최소한의 수만큼(예를 들어, 약 50개의 단량체 단위당 약 1개 이하의 펩티드 결합) 포함할 수 있다.
- [0106] 본원에서 “피험체”, “개체” 또는 “환자”라는 용어는 호환 사용되고 있는 것으로서, 척추 동물 바람직하게는 포유동물을 의미한다. 포유동물로서는 젖과 동물, 설치류, 유인원, 인간, 가축, 뱃저용 동물 및 애완 동물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이와 같은 피험체는 통상적으로(필수적인 것은 아님), 본 발명의 중합체를 본원에 개시된 바와 같은 중합체-활성 제제 컨쥬케이트의 형태로 투여하여 예방 또는 치료될 수 있는 증상을 앓고 있거나 앓기 쉽다.
- [0107] 특히 주어진 양에 있어서 “약” 이란 용어는, 편차가 ± 5%인 경우를 포함하는 의미이다.
- [0108] 특정 증상의 “치료법” 또는 “치료”란, 다음의 경우들을 포함한다: (1) 증상을 예방하는 것 즉, 증상에 노출될 수 있거나 이러한 증상이 발생할 소인이 되어, 아직 그 증상을 경험하거나 나타내고 있지는 않은 피험체 내에서, 증상이 진행되지 않도록 만들거나 또는 증상이 나타나더라도 강도가 낮게 나타나거나 또는 보다 낮은 정도로 나타나도록 만드는 것과, (2) 증상을 억제하는 것 즉, 증상의 진행을 지연시키거나 또는 증상을 반전시키는 것.
- [0109] “선택적” 또는 “선택적으로”란, 이하 기술된 조건이 발생할 수 있거나 없는 경우를 의미하는 것으로서, 그 조건이 발생하는 경우와 그 조건이 발생하지 않는 경우 둘 다를 포함하는 것이다.
- [0110] “소분자”란 통상적으로 분자량이 약 1000달톤 미만, 바람직하게는 약 800달톤 미만인 유기, 무기 또는 유기 금속 화합물로 광범위하게 정의될 수 있다. 본 발명의 소분자로서는 분자량이 약 1000 미만인 기타 생체 분자들 및 올리고펩티드를 포함한다.
- [0111] (본원에 제공된 컨쥬케이트에 있어서) 예를 들어, 소분자의 “잔기”란, 본원에 제공된 다분지형 중합체에 소분자(또는 이 소분자의 활성화된 형태의 것 또는 화학적으로 변형된 형태)를 공유 결합시킴으로써 형성된 공유 결합에 이르기까지, 변형되지 않은 소분자의 잔기 또는 일부를 의미한다. 예를 들어, 소분자 부위와 다분지형 중합체 사이의 가수 분해 가능 에스테르 결합을 가수 분해할 때, 소분자 자체가 방출된다. 예를 들어, 화학식 I의 화합물을 참고로 하였을 때, 하이드록실 기를 포함하는 소분자 약물(비공식적으로 구조식 D-OH로 표시함)에 있어서, 소분자의 잔기는 “D”에 해당할 것이고, 이것은 하이드록실 기 즉, -OH를 제거 또는 치환할 때 남게 되는 소분자의 일부인 것이다. 유기 중심 분자를 참고로 하였을 때, 이하 “R”에 관한 예가 제공된다. R이 3개의 하이드록실을 가지는 분자(트리올; R-(OH)₃로 표시)의 잔기인 경우, 화학식 I의 화합물을 참고로 하였을 때, 각 중합체 분자에 대한 R-(O~)에 있어서 q는 폴리올의 잔기인 것으로 간주하고, 이 경우, R은 링커 Q와 함께 트리올의 잔기인 것으로 간주한다. 상기 예에서, 산소(O)는 링커 Q에 해당한다.
- [0112] “폴리올”은 2개 초과의 하이드록실기를 함유하는 알코올로서, 이 경우, 접두사 “폴리”는 중합체 구조라기보

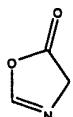
다는 임의의 구조적 특징이 다수 개 존재함을 나타내는 것이다. 이와 유사하게, 폴리티올은 2개 초파의 티올(-SH) 기를 함유하는 티올이고, 폴리아민은 2개 초파의 아미노기를 함유하는 아민이다.

[0113] 다분지형 중합체 컨쥬게이트 - 이웃하는 기의 상호 작용 및 이의 회피

본원에 제공된 다분지형 중합체 컨쥬게이트는 “전구 약물”이라고도 칭한다. 본원에 있어서 “전구 약물”이란 용어는, 변형된 형태의 약물을 의미하는 것으로서, 이 경우 그 변형은 통상적으로 약물과 화학 부(예를 들어, 중합체) 사이의 공유 결합을 포함한다. 전구 약물은 생체 내에서 효소에 의하거나 또는 효소에 의하지 않고 그 것의 활성 약물 형으로 전환된다.

소분자의 다분지형 중합체 컨쥬게이트에 관하여는 이전에 개시된 바 있다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제 2005/0112088호 및 제2007/0197575호를 참조. 상기 출원 공개에 개시된 다분지형 중합체 컨쥬게이트에 관하여 임의로 예시된 구체예는 활성 제제 예를 들어, 캠토테신 분자를 다분지형 중합체 주체에 연결하는 아미노산 링커 예를 들어, 글리신을 포함한다. 아미노산 링커 예를 들어, 글리신은 자체의 2작용성과 시험관 내 및 생체 내 가수 분해의 용이성으로 인하여 선호되고 있다. 아미노산 링커로 인해서 형성된 에스테르 결합은 글리신 부에 인접하여 존재하는 작용기의 전자 끌기 특성의 활성화로 인해 신속하게 가수 분해된다. 그러나, 이와 같은 링커로 인해 가수 분해 속도가 유리하게 개선될 수는 있지만, 본 발명의 발명자들은 이웃하는 작용기의 상호 작용의 결과, 이러한 링커를 최종 다분지형 중합체 컨쥬게이트 내에서 차선의 상태로 만들 수 있는 임의의 환경 하에서 문제를 일으킬 수 있다는 사실을 발견하였다.

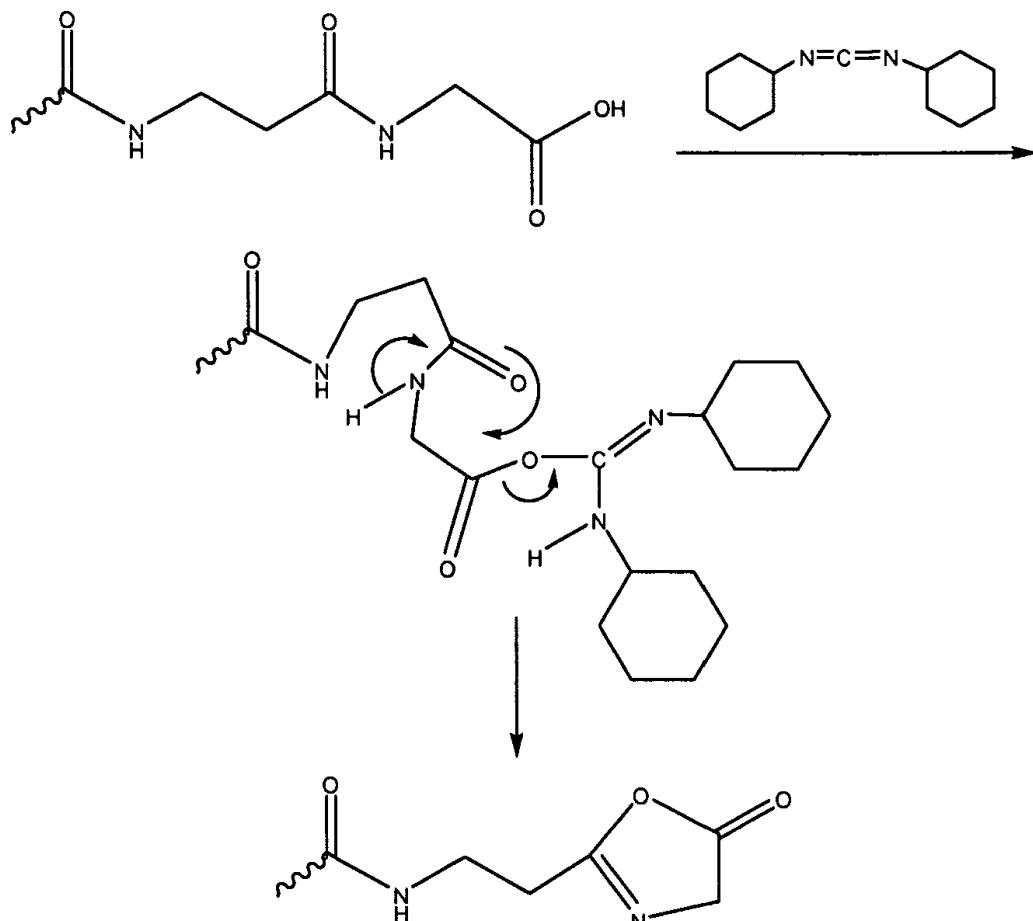
[0116] 이웃하는 기가 어떻게 처리되는지를 이해하고 (예를 들어, 문헌[Capon and McManus, *Neighboring Group Participation*, Plenum Press, New York, 1975] 참조), 이와 같은 처리 과정의 잠재적 진행 가능성을 파악한 결과, 본 발명의 발명자들은 (다른 무엇보다도) 상기와 같이 이해한 사항들을 염두에 두고, 신규의 컨쥬게이트, 시약 그리고 합성 방법을 고안하였다. 무엇보다도, 본 발명의 다분지형 중합체 컨쥬게이트는 아즈락톤을 형성할 수 있는 이웃 기들 간 상호 작용을 막고/막거나 감소시켜, 최종 다분지형 중합체 약물 컨쥬게이트 내 약물 담지 상태가 차선이 되도록 만든다. 아즈락톤은 α -아실아미노산의 무수물인 화합물이고, 기본적인 고리 구조는 5-옥



사졸론 형 예를 들어, 이다.

[0117]

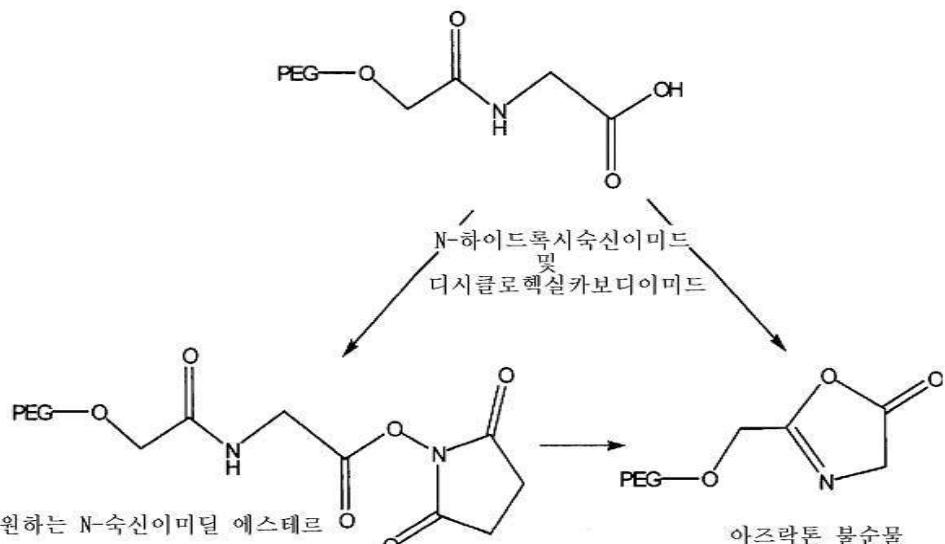
아즈락톤은 예를 들어, 측합체의 존재 하에서, 카복실산의 활성 에스테르를 형성하고자 할 때 형성될 수 있다.



[0118]

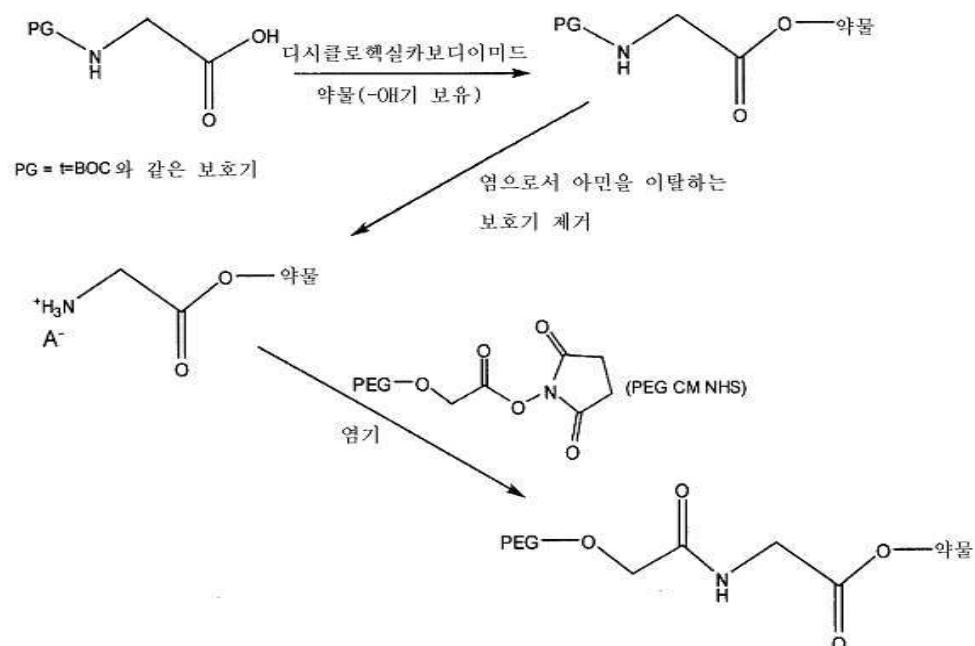
[0119]

아즈락톤은 다수의 유사한 방법을 통해 형성될 수 있다(예를 들어, 문헌[Benoiton et al. (1981) "Oxazolones from 2-alkoxycarbonyl amino acids and their implication in carbodiimide-mediated reactions in peptide synthesis" Can. J. Chem., 59:384]을 참조). 카복실산의 활성 에스테르 예를 들어, 화학양론 양 미만의 양만큼의 N-하이드록시숙신이미드 에스테르를 형성하기 위한 상기 반응을 고려하였을 때, 예를 들어, 화학양론 양 미만의 양만큼의 N-하이드록시 숙신이미드가 활성화 과정에 사용되면, 상기 기작에 의해 카보디이미드의 탈수 작용이 아즈락톤을 형성하게 한다는 것을 예상할 수 있을 것이다. 뿐만 아니라, N-하이드록시숙신이미드 에스테르가 상응하는 카복실산의 활성화된 형태이므로, 아즈락톤은 또한 산으로부터 아즈락톤을 형성시키는 기작과 유사한 기작을 통해 활성 에스테르로부터 형성될 수도 있다. 이후, 원하는 생성물을 양호한 수득량으로 합성함에 있어서, 아즈락톤의 형성을 막는 것과, 실질적으로 불순물이 존재하지 않는 해당 조성물을 예를 들어, 실질적으로 아즈락톤 함유 불순물이 존재하지 않는 해당 조성물은, 본원에 제공된 컨쥬케이트, 조성물 및 방법에 있어서 하나의 비 제한적 목적이 된다.



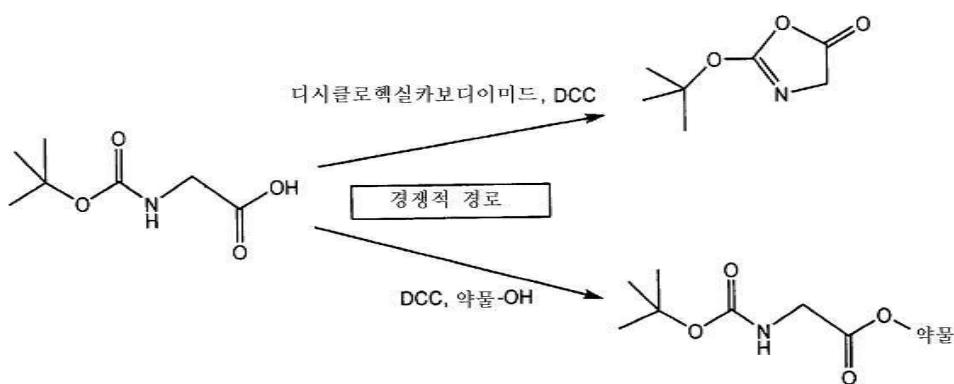
[0120]

미국 특허 출원 공개 제2005/0112088호에 개시된 바와 같이, 글리신 링커를 통하여 약물이 다분지형 중합체에 공유 결합되어 있는 다분지형 중합체 전구 약물에 관한 하나 이상의 구체예에 의하면, 글리신은 처음에 하이드록시 기를 함유하는 약물에 컨쥬게이트화된다. 이후, 글리신 유도체화 약물은 이하 반응식에 도시된 바와 같이, 카복시메틸 PEG(PEG CM)의 활성 에스테르(예를 들어, NHS)에 컨쥬게이트화된다.



[0122]

전술한 사항들을 바탕으로 하였을 때, 아즈락톤은 t-BOC-보호 글리신이 약물 알코올과 반응하는 단계에서 형성될 수 있음을 알 수 있다. 이에 관하여는 이하 반응식에 도시하였다. 아즈락톤 형성은 비교적 소량으로 형성되더라도 이와 같은 방법의 효율에 악영향을 미칠 수 있을 뿐만 아니라, 동시에 반응성 불순물을 생성할 수도 있다.



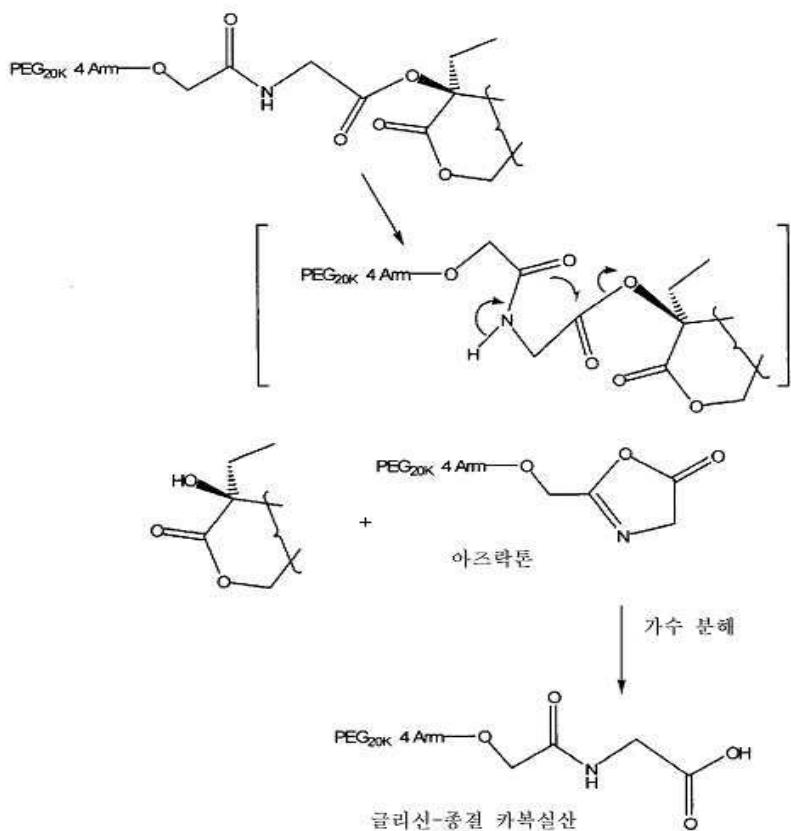
[0124]

[0125]

전술한 사항들은 본 발명에 개시된 사항과 관련되어 있다. 다양한 글리신-컨쥬게이트화 약물 알코올 분자 예를 들어, 4-분지-PEG-CM 활성 에스테르를 보유하는 캠토테신을 컨쥬게이트화할 때, 4분지형 PEG 중합체의 말단 기 치환 횟수는 차선 수준이었음을 알 수 있었다. 이와 같은 치환의 횟수(최적 약물 담지율에는 못 미침)는 재현 가능하지만, 평균적으로 약물이 컨쥬게이트화된 4개의 중합체 분자 전부보다는 적은 수의 분자를 보유하는 생성물이 생산되었다(즉, 4분지형 중합체에 대해서 이상적인 횟수보다는 적은 횟수로 치환이 일어났다). 이상적으로 본원에 기술된 바와 같은 다분지형 중합체는 평균적으로 각 중합체 분자 상에 약물이 치환되어 있어서, 다분지형 중합체 주쇄는 “전체가 담지” 된 것이고, 이에 따라서 중합체의 다분지 특성을 전부 이용한 것이다(예를 들어, 실시예 3 ~ 5와 실시예 2, 6, 7, 8, 9, 10 및 12를 비교 참조).

[0126]

중합체 분자에 공유 결합된 적이 전혀 없는 약물 부위가 다분지형 중합체의 소정의 중합체 분자가 치환될 수 있다. 뿐만 아니라, 에스테르 형성 후 약물 부위가 없어지더라도 다분지형 중합체의 소정의 중합체 분자가 치환될 수 있다. 이와 관련하여, 약물 부위 예를 들어, 캠토테신 알코올은 이탈기로서 작용을 하며, N-하이드록시숙신 이미드 에스테르와의 반응과 유사한 방식으로 분리된다. 아즈락톤은 이하에 도시된 바와 같이 이웃하는 우레탄 기의 반응 참여 가능성으로 인해 중간체가 될 수 있다.



[0127]

[0128]

N-하이드록시숙신 이미드는 일반적으로 알코올(예를 들어, 이리노테칸이나 캠토테신에 존재하는 알코올)보다 더욱 유효한 이탈기인 것으로 생각되는 반면에, 입체 장애 현상은 3차 알코올을 가지는 분자(예를 들어, 이리노테

신 또는 캠토테신) 내에서 상기 과정을 진행시키는 추진력이 될 수 있다. 예시된 실시예에 기술된 결과는, 종결기(terminating group)가 아즈락톤 또는 이의 가수 분해 생성물 즉, 글리신-종결 PEG 분지임을 말해주고 있다.

[0129] 아즈락톤이 형성될 경우, 이는 내인성 단백질의 아민 기와 반응하여 생체 내에서 원치 않는 컨쥬게이트를 형성 할 수 있으므로, 불순물로서 취급된다(미국 특허 제 5,321,095호를 참조).

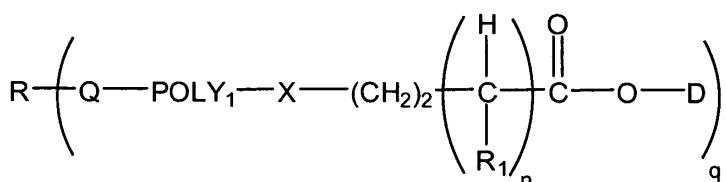
[0130] 본원에 개시된 컨쥬게이트, 시약 및 방법은 무엇보다도 불순물이 생성되지 않으면서 약물 담지율을 증가시킬 수 있다는 이점을 갖는 것으로 생각된다. 뿐만 아니라, 변형되지 않은 컨쥬게이트는 컨쥬게이트화되지 않은 약물을 단독으로 사용하는 경우에 비하여 효능을 상당 수준 증가시킴과 동시에, 생체 내 항암 활성이 우수하고, 독성을 감소시킨다는 사실을 보여주고 있다.

[0131] 이와 같은 컨쥬게이트의 특징에 관하여는 이하에 더욱 상세히 기술될 것이다.

중합체 컨쥬게이트의 구조적 특징

[0133] 전술한 바와 같이, 본원에 제공된 컨쥬게이트는 다분지형 즉, 3개 이상의 분지를 가지는 중합체를 포함하는데, 이 경우 상기 컨쥬게이트는 다음과 같이 일반화된 구조식을 가진다:

[0134] [화학식 I]



[0135] 상기 식 중,

[0136] [0137] R은 약 3 ~ 약 150개의 탄소 원자를 포함하는 유기 중심 라디칼이고; Q는 링커이며; POLY₁은 수용성이고 비펩티드성인 중합체 분절이고; X는 선택적으로 존재하는 스페이서이며; 각각의 경우, R₁은 독립적으로 H, 저급 알킬 및 전자 끄는 기로 이루어진 군으로부터 선택되고; n은 1 ~ 7의 정수이며; D는 분자량 약 800달톤 미만인 소분자의 잔기 바람직하게는 소분자 약물 잔기이고; q는 3 이상이다. 상기 다분지형 중합체의 각 분지는 서로 독립적이다. 즉, 상기 다분지형 중합체의 “q” 분지는 각각 상이한 Q, POLY₁, X, R₁ 및 n등으로 이루어질 수 있다. 이와 같은 구체예는 통상적으로 다음과 같이 일반화된 구조식으로 나타내진다: R[(-Q₁-POLY_{1A}-X₁-(CH₂)₂(CR_{1A}H)_{n1}C(O)-O-D₁)(-Q₂-POLY_{1B}-X₂-(CH₂)₂(CR_{1B}H)_{n2}C(O)-O-D₂)(-Q₃-POLY_{1C}-X₃-(CH₂)₂(CR_{1C}H)_{n3}C(O)-O-D₃) ⋯], (여기서, 각 분지는 중앙에 위치하는 유기 중심 라디칼로부터 유래함). 그러나, 일반적으로, 다분지형 전구 약물의 각 분지는 동일하며, 소정의 예외의 경우에 관하여는 이하 더욱 상세히 기술될 것이다.

[0138] 전술한 색션에 기술된 바와 같이, 다분지형 중합체는 알카노에이트 분절 즉, -X-(CH₂)₂(CR₁H)_nC(O)-O-D 부위 내에 존재하는 알카노에이트 분절의 특징을 가지고 있다. 알카노에이트는 이웃하는 기(예를 들어, 링커 기, “X”로부터 유래하는 기)의 참여를 방지하거나 감소시키는데 충분한 길이와 특성을 갖는다. (예를 들어, R₁이 알킬인 경우) 알파 또는 베타 알킬 기 등은 입체 장애를 제공하여 최종 활성 에스테르 시약의 선택성을 개선함에 있어서 중요한 역할을 할 수 있다. 뒷받침하는 실시예에서 살펴볼 수 있는 바와 같이, 알카노에이트 링커를 사용하면 약물 담지 효율이 높은, 예시적인 다분지형 중합체 약물 컨쥬게이트를 효과적으로 얻을 수 있다.

[0139] 이하, 화학식 I의 화합물을 이루는 각 가변 구성원들에 관하여 상세히 기술하고자 한다. 해당 컨쥬게이트와 관련하여 본원에 개시된 각 구성원들은 해당 다분지형 중합체 시약으로 유사하게 확장되는데, 여기서, 화학식 I의 화합물에 있어서 소분자의 잔기로서 제시된 D는 예를 들어, 활성화된 에스테르와 상응하는 작용기 또는 H로 치환될 수 있다.

[0140] 유기 중심, “R”

[0141] 화학식 I의 화합물에 있어서, R은 약 3 ~ 약 150개의 탄소 원자를 가지는 유기 중심 라디칼이다. 바람직하게, R은 약 3 ~ 약 50개의 탄소 원자를 함유하며, 더욱 바람직하게, R은 약 3 ~ 약 10개의 탄소 원자를 함유한다. 다시 말해서, 하나의 구체예에서, R은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 다수의 탄소 원자들을 보유할 수 있다. 유기 중심은 물론 사용된 특정 중심 분자에 따라서 하나 이상의 이중 원자들(예를 들

어, O, S 또는 N)을 선택적으로 함유할 수도 있다. R은 선형 또는 환형일 수 있으며, 통상적으로는 3개 이상의 독립 중합체 분지들로부터 유래할 수 있는데, 이 경우, 상기 분지들 중 하나 이상에는 활성 제제 부위가 공유 결합되어 있다. 바람직한 유기 중심 분자들은 포화된 지방족 분자이다. 화학식 I의 화합물을 참고로 하였을 때, “q”는 “R”로부터 유래하는 중합체 분지들의 수에 해당한다. 몇몇 경우, 중합체 분지들 중 하나 이상에는 활성 제제가 공유 결합되어 있을 수 없지만, 통상적으로 종결되지 못한 합성 과정 또는 가수 분해로 인하여 생성되는 말단부에 비교적 미반응성이거나 반응하지 않는 작용기를 가질 수 있다. 이러한 경우 D는 존재하지 않으며, 중합체 분지들 중 적어도 하나의 개별 구조는 전구체 형태(또는 그것의 유도체)를 갖는데, 즉, 말단부에 활성 제제 D가 아닌, 작용기를 갖는다. 그러나, 본원에 제공된 다분지형 컨쥬케이트의 특히 유리한 하나의 특징은, 다분지형 중합체의 수용성 중합체 분지 각각에 약물이 담지되는 정도이다. 바람직하게는, 임의의 잠재적 이웃 기간 상호 작용이 일어나지 않으므로, (다분지형 중합체 조성물 중) 다분지형 중합체의 약물 담지 정도는 약 92% 초과이다. 예를 들어, q 중합체 분지를 가지는 다분지형 중합체 컨쥬케이트에 있어서, (다분지형 중합체 조성물 중) 평균 약물 담지율은 0.92(q) 이상인 것이 바람직 할 것이다. 더욱 바람직하게, 본원에 제공된 바와 같은 다분지형 중합체 컨쥬케이트의 (다분지형 중합체 조성물 중) 약물 담지 정도는 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 이상이거나 또는 심지어 99% 이상일 것이다.

[0142]

중앙의 중심 유기 라디칼 R은 원하는 수만큼의 수용성 및 비펩티드성 중합체 분지와 거의 일치하는 수만큼의 중합체 결합 위치들을 다수 개 제공하는 개별 분자에 해당한다. 바람직하게, 다분지형 중합체 구조물의 중앙 중심 분자는 중합체 결합에 적당한 하이드록실, 티올 또는 아미노 기를 3개 이상 보유하는 폴리올, 폴리티올 또는 폴리아민의 잔기이다. “폴리올”은 다수(3개 이상)의 유용한 하이드록실 기를 포함하는 분자이다. “폴리티올”은 다수(3개 이상)의 티올 기를 보유하는 분자이다. “폴리아민”은 다수(3개 이상)의 유용한 아미노 기를 포함하는 분자이다. 원하는 중합체 분지의 개수에 따라서, (POLY_1 을 공유 결합시키기 이전의) 전구체 폴리올, 폴리아민 또는 폴리티올은 통상적으로 각각 3 ~ 약 25개의 하이드록실 기 또는 아미노 기 또는 티올 기를 포함할 것이며, 바람직하게는 3 ~ 약 10개(즉, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개)의 하이드록실 기, 아미노 기 또는 티올 기를 포함할 것이고, 가장 바람직하게는 3 ~ 약 8개(예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개)의 하이드록실 기, 아미노 기 또는 티올 기를 포함할 것인데, 여기서, 상기 하이드록실 기 또는 아미노 기 또는 티올 기는 POLY_1 과의 공유 결합에 적당하다. 폴리올, 폴리아민 또는 폴리티올은 또한 기타 보호 또는 비보호 작용기들을 포함할 수도 있다. 폴리올이나 폴리아민으로부터 유래하는 유기 중심에 초점을 맞추었을 때, 각 하이드록실 기 또는 아미노 기 사이의 간섭 원자의 수는 다양할 수 있지만, 바람직한 중심부는 각각의 하이드록실 기 또는 아미노 기 사이에 길이 약 1 ~ 약 20개, 바람직하게는 약 1 ~ 약 5개의 간섭 중심 원자 예를 들어, 탄소 원자를 가지는 중심이다. 메틸렌 기 자체는 총 3개의 원자를 함유하지만, 간섭 중심 원자 및 길이를 참고로 하였을 때, 예를 들어, $-\text{CH}_2-$ 의 길이는 1개 간섭 원자인 것으로 간주하는데, 그 이유는, H들은 탄소 상의 치환체로서, 예를 들어, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 는 길이가 2 탄소 원자인 것으로 간주하기 때문이다. 특정 폴리올 또는 폴리아민 전구체는 원하는 수만큼의 최종 컨쥬케이트 내 중합체 분지들에 의존적이다. 예를 들어, 4개의 작용기를 가지는 폴리올 또는 폴리아민 중심 분자 Q는, 이 중심 분자로부터 뻗어나온 4개의 중합체 분지를 가지며 활성 제제에 공유 결합되어 있는 화학식 I의 화합물로부터 전구 약물을 제조하는데 적당하다.

[0143]

전구체 폴리올 또는 폴리아민 중심은 통상적으로 중합체로 작용화되기 이전에는 구조식 $\text{R}-(\text{OH})_p$ 또는 $\text{R}-(\text{NH}_2)_p$ 를 가질 것이다. 화학식 I의 화합물에 있어서 p 값은 q 값에 해당하는데, 그 이유는 모 중심 유기 분자 내 각 작용기, 통상적으로 $-\text{OH}$ 또는 $-\text{NH}_2$ 가 입체적으로 접근 가능하고 반응성을 가질 경우, 이 작용기는 중합체 분지인 POLY_1 에 공유 결합하기 때문이다. 화학식 I의 화합물 중 변수 “Q”는 R과 합하여졌을 때 통상적으로 본원에 개시된 바와 같은 중심 유기 라디칼 잔기를 나타낸다. 즉, 바람직한 유기 중심 분자를 특히 명칭으로 설명할 때, 중심 분자는 예를 들어, 양자를 제거한 이후의 형태인 라디칼 형태로서보다는 그것의 전구체 형태로 기술된다. 그러므로, 예를 들어, 만일 유기 중심 라디칼이 웬타에리트리톨로부터 유래하면, 전구체 폴리올은 구조 $\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_4$ 를 가지며, 유기 중심 라디칼은 Q와 함께 $\text{C}(\text{CH}_2\text{O}-)_4$ 에 해당하고, 여기서, Q는 0이다. 중심은 가교되지 않은 것으로서 POLY_1 과 합하여졌을 때 성상 중합체로 형성되지 않는다.

[0144]

중합체 중심으로 사용하기 바람직한 예시적 폴리올로서는 1 ~ 10개의 탄소 원자와 3 ~ 10개의 하이드록실 기를 가지는 지방족 폴리올을 포함하고 예를 들어, 트리하이드록시알칸, 테트라하이드록시알칸, 폴리하이드록시 알킬 에테르, 폴리하이드록시알킬 폴리에테르 등을 포함한다. 지환형 폴리올로서는 직선형 사슬 또는 폐환 당류 및 당알코올 예를 들어, 만니톨, 솔비톨, 이노시톨, 자일리톨, 큐브라키톨(quebrachitol), 트레이itol, 아라비톨, 에

리트리톨, 아도니톨, 둘시톨, 파코즈, 리보즈, 아라비노즈, 자일로즈, 릭소즈, 람노즈, 갈락토즈, 글루코즈, 프럭토즈, 솔보즈, 만노즈, 피라노즈, 알트로즈, 탈로즈, 타기토즈, 피라노시드, 수크로즈, 락토즈 및 말토즈 등을 포함한다. 지방족 폴리올에 관한 추가 예로서는, 글루코즈, 리보즈, 만노즈, 갈락토즈의 유도체 및 관련 임체 이성체를 포함한다. 방향족 폴리올 예를 들어, 1,1,1-트리스(4'-하이드록시페닐) 알칸 예를 들어, 1,1,1-트리스(4-하이드록시페닐)에탄 및 2,6-비스(하이드록시알킬)크레슬 등도 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 기타 중심 폴리올로서는 폴리하이드록시크라운 에테르, 시클로텍스트린, 텍스트린 및 기타 탄수화물(예를 들어, 단당류, 올리고당 및 다당류, 전분 및 아밀라제)을 포함한다.

[0145]

바람직한 폴리올로서는 글리세롤, 트리메틸올프로판, 웬타에리트리톨, 디웬타에리트리톨, 트리웬타에리트리톨, 글리세롤, 트리메틸올프로판, 웬타에리트리톨, 디웬타에리트리톨, 트리웬타에리트리톨의 에톡시화 형을 포함한다. 또한, 솔비톨과 같은 환원당 및 예를 들어, 디글리세롤, 트리글리세롤 및 헥사글리세롤 등과 같은 글리세롤 올리고머도 바람직하다. 21개의 분지를 가지는 중합체는 21개의 유용한 하이드록실 기를 가지는 하이드록시프로필- β -시클로텍스트린을 사용하여 합성될 수 있다. 뿐만 아니라, 평균 24개의 하이드록실 기를 가지는 폴리글리세롤은 시판되고 있다.

[0146]

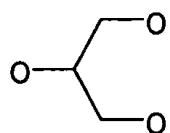
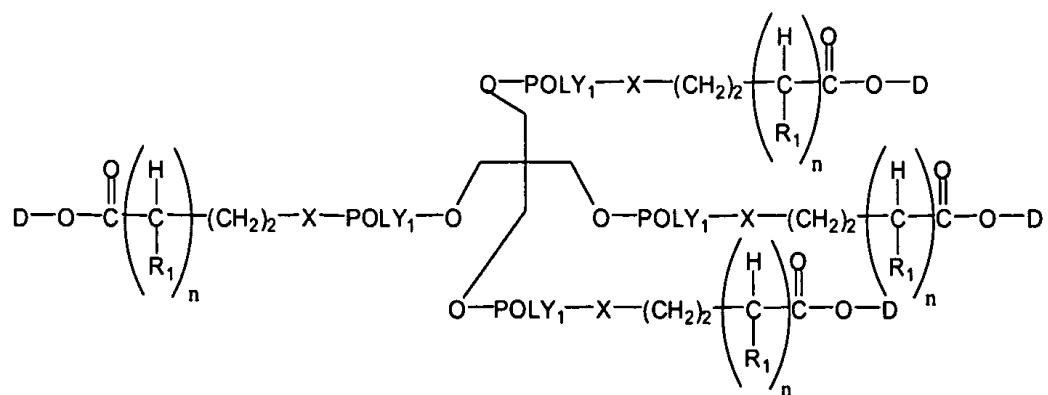
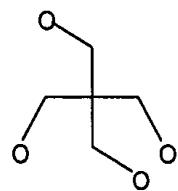
대표적인 폴리아민으로서는 지방족 폴리아민 예를 들어, 디에틸렌 트리아민, N,N',N"-트리메틸디에틸렌 트리아민, 웬타메틸 디에틸렌 트리아민, 트리에틸렌 테트라민, 테트라에틸렌 웬타민, 웬타에틸렌 헥사민, 디프로필렌 트리아민, 트리프로필렌 테트라민, 비스-(3-아미노프로필)-아민, 비스-(3-아미노프로필)-메틸아민, 및 N,N-디메틸-디프로필렌-트리아민을 포함한다. 본 발명에 사용될 수 있는 자연 생성 폴리아민으로서는 푸트레신, 스페르미딘 및 스페르민을 포함한다. 본 발명에 사용하기 적당한 다수의 적당한 웬타민, 테트라민, 올리고아민 및 웬타미딘 유사체에 관하여는 본원에 참고문헌으로 포함되어 있는 문헌[Bacchi et al. (2002) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(1):55-61]에 기술되어 있다.

[0147]

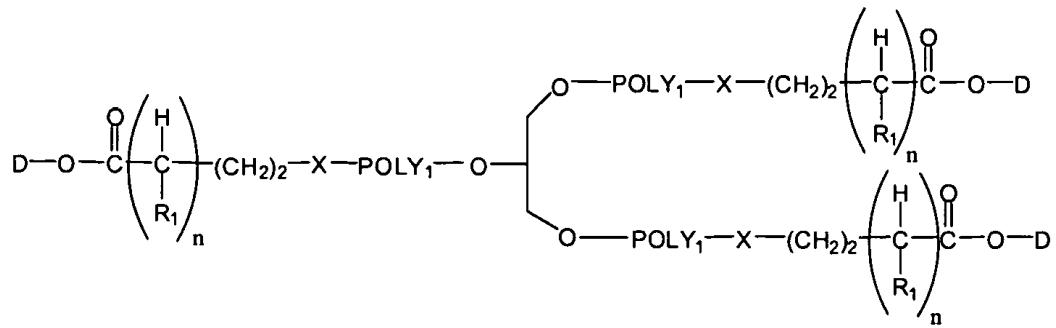
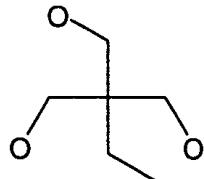
이하, 컨쥬게이트의 유기 라디칼 부분, 즉, R에 해당하는 구조와 이의 이상적인 컨쥬게이트의 구조에 관하여 예시되어 있는데, 단, 여기서 모 폴리올 내 하이드록실 기는 각각 중합체 분지로 변형되었으며, 각 중합체 분지는 약물과 공유 결합되어 있다고 가정한다. 이하 도시한 폴리올 유래의 유기 라디칼은 산소를 포함하며, 화학식 I의 화합물에 관한 내용 중, 중합체 분지는 Q로 간주한다는 사실에 주목해야할 것이다. 예를 들어, 폴리올 유래 유기 라디칼 중 모든 하이드록실 기들이 반드시 중합체 분지의 일부를 이루어야 하는 것은 아니다. 이하 예시적인 실시예에 있어서, Q는 0인 것으로 표시되어 있지만, 이것은 마찬가지로 S, -NH-, 또는 -NH-C(O)-에 해당하는 것으로도 간주할 수도 있다. 뿐만 아니라, 마지막 2개의 예시적인 중심의 구조식에서는 2작용성 링커 예를 들어, 도시한 바와 같은 이황화물 또는 디펩티드로 상호 연결된 2개의 폴리올 중심을 나타낸다. 예시적인 중심 분자 중 임의의 것을 사용하여 유사한 구조물을 구체화할 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 다분지형 중합체 알카노에이트 컨쥬게이트를 제조하는데 적당한 추가의 다분지형 중합체의 예에 관하여 개시되고, 그 내용이 본원에 참고문헌으로 포함되어 있는 국제 특허 출원 공개 WO 제2007/098466호를 참조.

[0148]

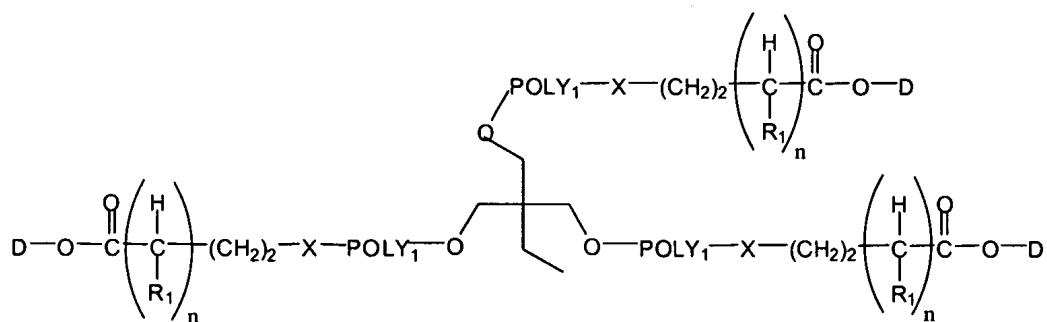
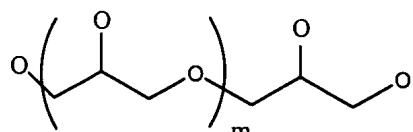
유기 라디칼* / 예시적 컨쥬게이트(*는 Q 포함)



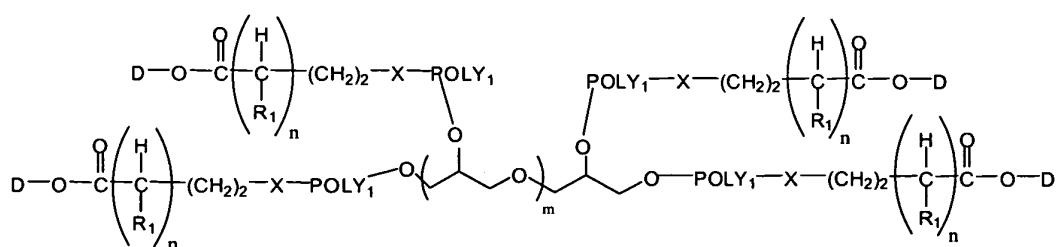
[0149]

**III-A**

[0150]

**IV-A**

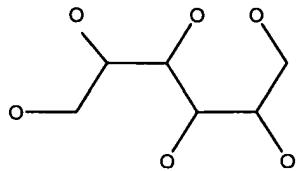
[0151]

**V-A**

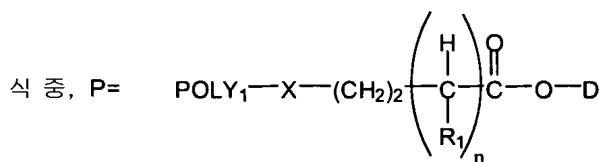
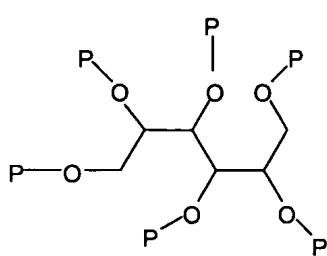
[0152]

[0153]

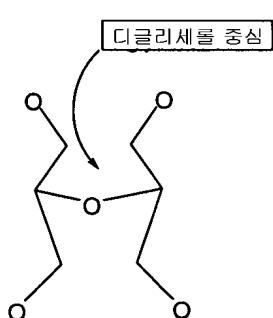
m= 0 ~ 40, 바람직하게 0 ~ 10 또는 0 ~ 5(예를 들어, 0, 1, 2, 3, 4, 5)



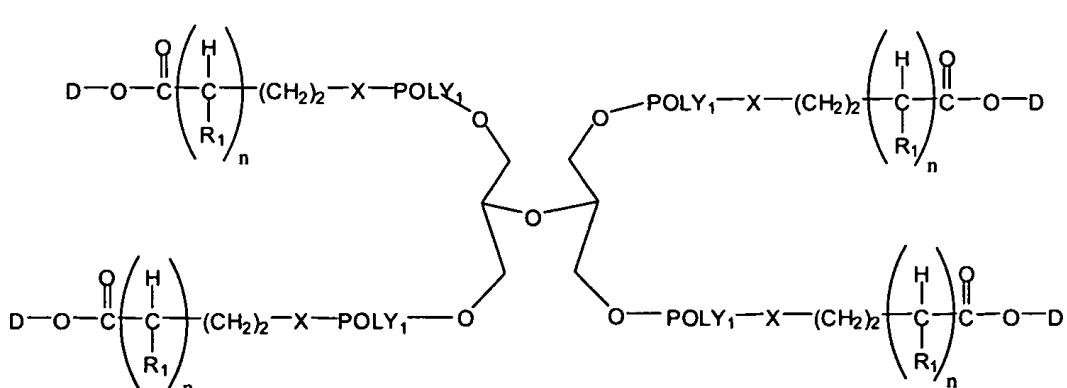
VI



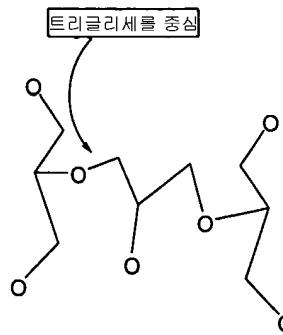
VI-A



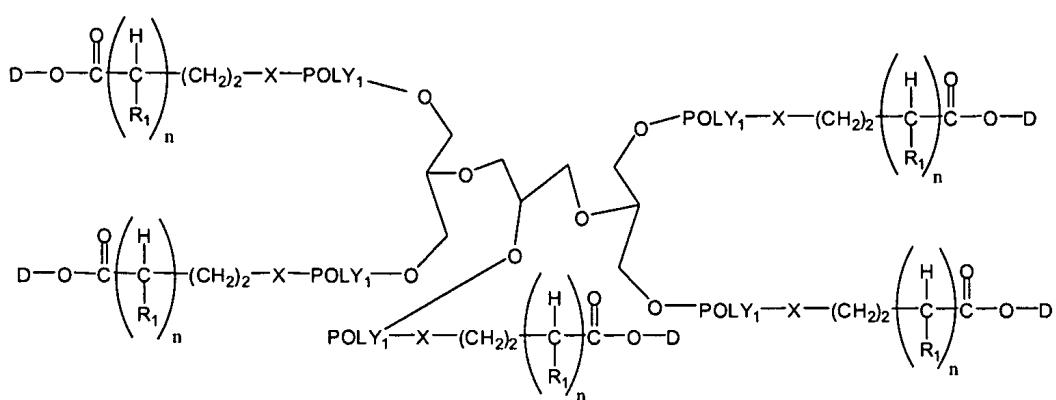
VII



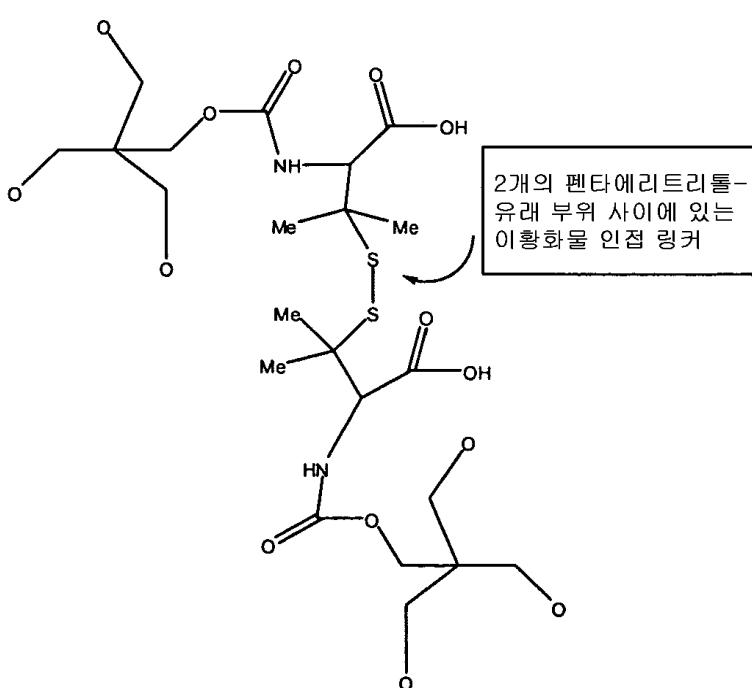
[0157]



VIII

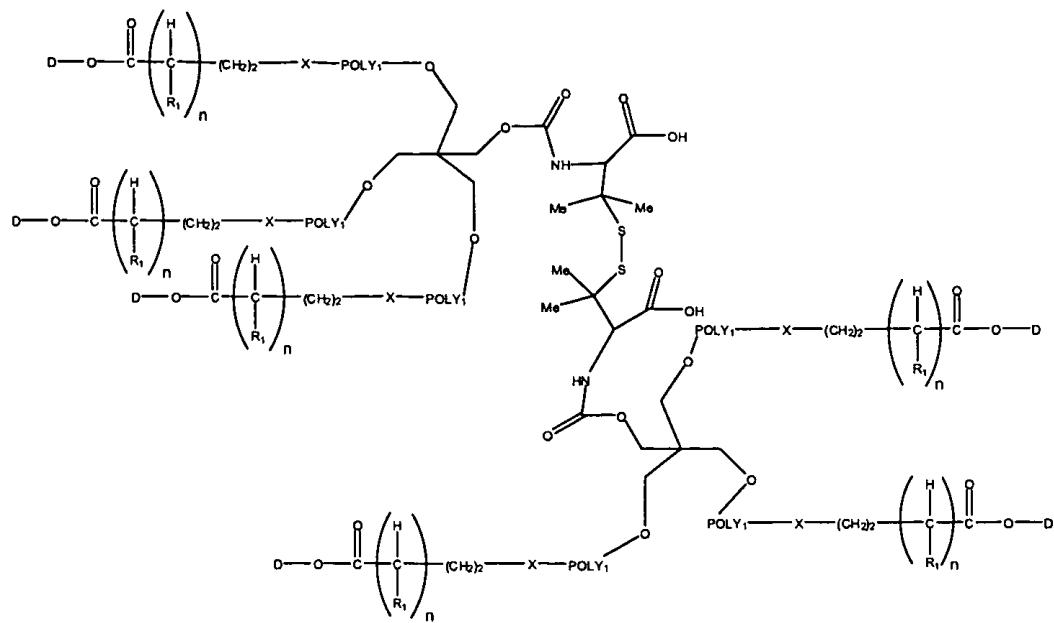


VIII-A



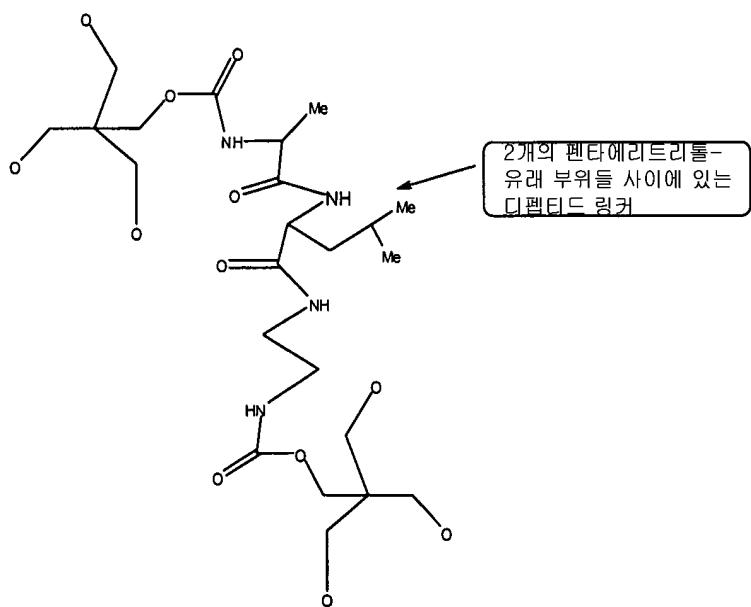
IX

[0159]



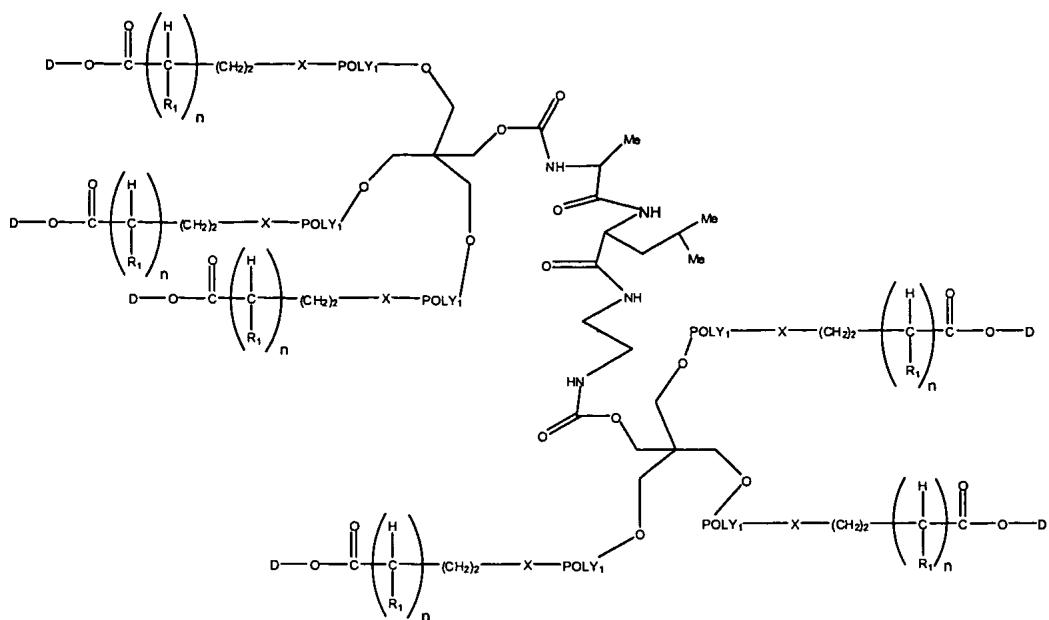
IX-A

[0161]



X

[0162]

**X-A**

[0163]

본원에 개시된 다분지형 중합체 알카노에이트 컨쥬게이트를 제조하는데 적당한 추가의 다분지형 중합체 출발 물질($R-(Q-POLY_1)_q$ 에 해당함)은 예를 들어, NOF 코포레이션(일본)에서 카탈로그를 통하여 시판되고 있으며, 상기 카탈로그는 본원에 참고문헌으로 포함되어 있다.

[0165]

대안적으로, 다분지형 중합체 약물을 제조하는데 사용되는 다분지형 중합체 시약은 합성에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 다수의 적당한 폴리올 중심 물질 중 임의의 것은 화학 제품 공급 업체 예를 들어, 알드리치(Aldrich)(미주리주 세인트루이스 소재)로부터 구입할 수 있다. 고도로 유도체화된 폴리올 중 임의의 것 예를 들어, 평균 24개의 하이드록실 기를 가지는 폴리글리세롤도 하이퍼폴리머스 게엠베하(Hyperpolymers GmbH)로부터 구입할 수 있다. 폴리올의 말단 하이드록실은 처음에 예를 들어, 강염기를 사용하여 그것의 음이온 형태로 전환되며, 그 결과 중합 과정을 개시하는데 적당한 위치가 제공되고, 이후, 단량체 서브 유닛 예를 들어, 산화 에틸렌이 중심 상에 직접 중합된다. 각 분지 내 중합체 사슬의 길이가 원하는 수준에 이르게 될 때까지 사슬을 계속 연장시키다가, 예를 들어, 급랭 과정에 의해 사슬의 연장 반응을 종결시킬 수 있다.

[0166]

또 다른 연구 방법에 있어서, 활성화된 다분지형 중합체 시약은 처음에 원하는 폴리올 중심 물질을 제공한 후, 적당한 조건 하에서 이 폴리올과 원하는 길이의 이종 2작용성 PEG메실레이트를 반응시켜 합성함으로써 제조될 수 있으며, 여기서, 비메실레이트 PEG 말단부는 폴리올 중심과 반응하지 못하도록 선택적으로 보호된다. 이후, 결과로 생성된 다분지형 중합체는 추가의 변형 과정 또는 활성 제제와의 직접 커플링에 적당하게 되며, 추후 필요에 따라서 탈보호될 수도 있다.

[0167]

폴리아미노 중심을 주성분으로 하는 다분지형 중합체 시약은 예를 들어, 아실화제 예를 들어, NHS 에스테르, 탄산 숙신이미딜, BTC 에스테르 등으로 활성화된 중합체 시약에 직접 커플링되어, 아미드 링커, Q를 가지는 다분지형 중합체의 전구체를 생성함으로써 제조될 수 있다. 대안적으로, 아미노 기를 다수 가지는 중심 분자는 환원적 아민화(예를 들어, 환원제 예를 들어, 시안화수소화붕산나트륨을 사용하는 아민화)에 의해서 알데히드 중결 중합체 예를 들어, PEG와 커플링될 수 있으며, 그 결과, 내부 아민 링커 Q를 가지는 다분지형 중합체의 전구체가 얻어진다.

[0168]

디펩티드 결합된 펜타에리트리톨릴 중심 함유 다분지형 중합체의 예시적 합성법에 관하여는 도 1a ~ 1c에 도시하였다.

[0169]

전술한 합성 방법에서는 중합체 PEG가 대표적인 중합체인 것으로 기술하였으나, 이와 같은 방법은 또한 본원에 개시된 기타 수용성 중합체에도 동일하게 적용된다.

[0170]

결합 Q 및 X

[0171]

유기 라디탈 R과 중합체 분절 POLY₁ 사이, 또는 POLY₁과 알카노에이트 부위 사이의 결합은, R과 POLY₁ 내에 함유

된 다양한 반응기들 간의 반응으로 형성된다. 본 발명의 중합체 컨쥬게이트를 제조하는데 유용한 결합용 화학물질의 예에 관하여는 문헌[Wong, S.H., (1991), "Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking", CRC Press, Boca Raton, FL] 및 [Brinkley, M. (1992) "A Brief Survey of Methods for Preparing Protein Conjugates with Dyes, Haptens, and Crosslinking Reagents", in *Bioconjug. Chem.*, 3, 2013]에서 찾아볼 수 있다. 다분지형 중합체 컨쥬게이트의 알카노에이트 부분은 소분자 활성 제제에 가수 분해될 수 있는 결합(즉, 에스테르 결합)을 제공하며, 그 결과, 시간이 경과함에 따라서 다분지형 중합체 중심으로부터 활성 제제가 방출된다.

상기 예들 중 임의의 것에 있어서, 단순한 시클로알킬렌 기 예를 들어, 1,3- 또는 1,4-시클로헥실렌은 2개, 3개 또는 4개의 임의의 탄소 알킬렌 기를 치환할 수 있다. 그러나, 본 출원의 목적을 위해서는, 일련의 원자들은 수용성 중합체 분절과 바로 인접하여 존재하되, 이와 같은 일련의 원자들이 다른 단량체와는 인접하여 존재하지 않을 경우, 이 일련의 원자들은 스페이서 부위가 아니므로, 제안된 스페이서 부위는 중합체 사슬의 순수한 연장부를 나타낼 것이다. 본원에 개시된 스페이서 또는 링커는 또한 상기 기들 중 임의의 기를 임의의 배향으로 2개 이상 조합하여 포함할 수 있다.

화학식 I의 화합물을 참고로 하였을 때, Q는 링커, 바람직하게는 가수 분해에 안정한 링커이다. 통상적으로, Q는 하나 이상의 이종 원자 예를 들어, O, 또는 S, 또는 NH를 함유하는데, 여기서 R에 근접하여 존재하는 Q 내부 원자를 R과 합하였을 때, 이것은 통상적으로 중심 유기 라디칼 R의 잔기를 나타낸다. 일반적으로, Q는 1 ~ 약 10개의 원자들, 또는 1 ~ 약 5개의 원자들을 함유한다. Q는 통상적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 중 하나의 개수만큼의 원자들을 함유한다. 예시적인 Q는 O, S, -NH- 및 -NH-C(O)-를 포함하는 것이 바람직하다. Q는 산소인 것이 바람직한데, 이는 곧, 유기 중심 분자가 폴리올임을 의미하는 것이다.

화학식 I의 화합물을 다시 참고로 하였을 때, X는 알카노에이트 분절의 디메틸렌 기와 POLY₁을 연결하는 스페이서이다. 일반적으로 말해서, 상기 스페이서의 원자 길이는 약 1 ~ 약 50 원자이거나, 더욱 바람직하게는 약 1 ~ 약 25 원자이거나, 또는 더더욱 바람직하게는 약 1 ~ 약 10 원자이다. 통상적으로, 스페이서의 원자 길이는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 원자 사슬 길이를 고려할 때, 전체 길이를 결정하는 원자들만을 고려한다. 예를 들어, 치환기는 스페이서 길이 결정에 거의 영향을 미치지 않으므로, 구조식 $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{인}$ 스페이서의 사슬 길이는 11 원자이다. 스페이서 X는 가수 분해에 안정하거나 가수 분해에 의해 분해될 수 있다. 특정 구체예에 있어서, 예를 들어, POLY₁이 폴리에틸렌 글리콜일 때, 예를 들어, 이하 첨부된 실시예에 제공된 예시적 알카노에이트 컨쥬게이트와 이와 상응하는 다분지형 중합체 시약의 몇몇 예에 있어서, X는 산소이다. 예를 들어, POLY₁이 구조식 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 에 해당할 때, X는 산

소 즉, -O-에 해당할 수 있으며, 그 결과, 번거로움을 피하기 위해 "X" 즉, 산소를 포함하는 최종 구조물은 -(CH₂CH₂O)_n-와 같이 간략하게 나타낼 수 있다.

[0176] 또 다른 구체예에서, X는 구조식 Y-Z를 가지며, 식 중 Y는 Z에 공유 결합되어 있는 스페이서 단편으로서 가수 분해에 의해 분해 가능한 결합이다. 임의의 구체예에서, Z 자체는 가수 분해에 의해 분해될 수 있는 결합을 구성할 수 없지만, Y와 합하여질 때, 또는 Y의 최소한의 일부와 합하여질 때, 가수 분해에 의해 분해될 수 있는 결합을 형성한다.

[0177] 스페이서 X에 관한 보다 구체적인 구체예에서, Y는 구조식 -(CR_xR_y)_a-K-(CR_xR_y)_b-(CH₂CH₂O)_c-를 가지며, 식 중 각각의 경우, R_x 및 R_y는 각각 독립적으로 H이거나 또는 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴 및 치환된 아릴로 이루어진 군으로부터 선택된 유기 라디칼이고, a는 0 ~ 12의 범위이고(즉, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12일 수 있음), b는 0 ~ 12의 범위이며(즉, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12일 수 있음), K는 -C(O)-, -C(O)NH-, -NH-C(O)-, -O-, -S-, O-C(O)-, C(O)-O-, O-C(O)-O-, O-C(O)-NH-, NH-C(O)-O-로부터 선택되고, c는 0 ~ 25이며, Z는 C(O)-O-, O-C(O)-O-, -O-C(O)-NH-, 및 NH-C(O)-O-로부터 선택된다. K 및 Z의 구체적인 구조는 a, b 및 c의 각 값에 따라서 달라질 것이므로, 다음과 같은 결합들 중 어느것도 스페이서 X: -O-O-, NH-O-, NH-NH-의 전체 구조를 형성하지 못한다.

[0178] 스페이서 X에 관한 또 다른 구체예에서, Y는 구조식 -(CR_xR_y)_a-K-(CR_xR_y)_b-(CH₂CH₂NH)_c-를 가지며, 식 중, 변수들은 전술한 바와 같다. 임의의 경우에 있어서, 스페이서 X에 짧은 산화 에틸렌 또는 에틸 아미노 단편이 존재하면, 전구 약물 컨쥬게이트를 제조할 때 양호한 수득량을 획득할 수 있는데, 그 이유는 링커가 존재하면 다분지형 반응성 중합체로 인한 입체 장애, 활성 제제의 구조 또는 이 둘 다를 조합한 경우와 관련된 문제점들이 발생하는 것을 막는데 도움을 줄 수 있기 때문이다. 바람직하게, c는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0179] 각각의 경우에 있어서, R_x 및 R_y는 독립적으로 H 또는 저급 알킬인 것이 바람직하다. 하나의 구체예에서, R_x 및 R_y는 각각 H이다. 또 다른 구체예에서, "a"는 0 ~ 5의 범위이고 즉, 0, 1, 2, 3, 4 또는 5로부터 선택된다. 또 다른 구체예에서, b는 0 ~ 5의 범위이고 즉, 0, 1, 2, 3, 4 또는 5로부터 선택된다. 또 다른 구체예에서, c는 0 ~ 10의 범위이다. 또 다른 구체예에서, K는 -C(O)-NH이다. 본원에 개시된 구체예들 중 임의의 것은 일반화된 화학식 I의 화합물에 적용될 뿐만 아니라, 구체예들을 특별히 조합한 경우까지 확대됨을 의미한다.

[0180] 스페이서 X가 존재하는 경우, 특히, 이웃하는 임의의 기간에 상호 작용이 일어나는 것을 막기에 충분한 만큼의 알카노에이트기가 존재하는 것이므로, 이 스페이서 X는 또한 아미노산, 이산 또는 삼산 등, 또는 펩티드 또는 올리고펩티드에 해당할 수도 있다. 적당한 아미노산으로서는 아미노산 예를 들어, 알라닌, 발린, 루신, 이소루신, 글리신, 트레오닌, 세린, 시스테인, 메티오닌, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 아스파르트산, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 히스티딘, 프롤린 등과, 비자연 생성 아미노산을 포함한다.

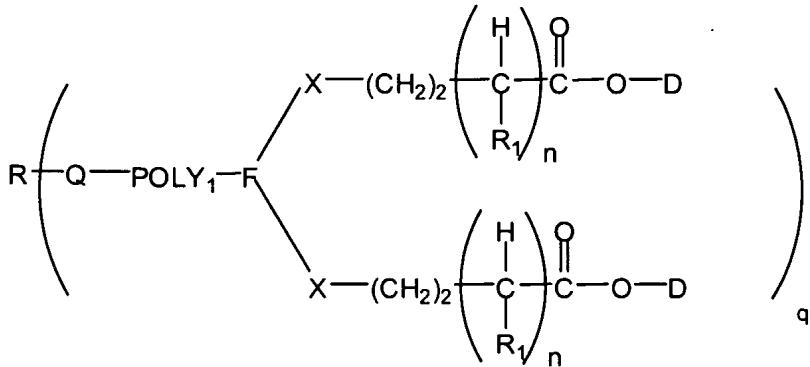
[0181] 스페이서가 존재할 경우, 이 스페이서는 산소(-O-)인 것이 바람직하다.

[0182] 중합체, POLY₁

[0183] 화학식 I의 화합물에 있어서, POLY₁은 수용성 및 비펩티드성 중합체를 나타낸다. 각 중합체 분자는 동일한 중합체를 포함하는 것이 바람직하겠지만, 화학식 I의 화합물 각 중합체 분자 내 POLY₁은 독립적으로 선택된다. 다시 말해서, 다분지형 중합체 컨쥬게이트의 각 분자 내에 존재하는 각 POLY₁은 동일한 것이 가장 바람직하다. 각각의 분자 즉, 화학식 I의 화합물의 각 "(-Q-POLY₁-X-D)" 역시 동일한 것이 바람직하다. 비펩티드성이며 수용성인 다수의 중합체들 중 임의의 것은 본 발명에 의한 컨쥬게이트를 형성하는데 사용될 수 있다. 적당한 중합체의 예로서는 폴리(알킬렌 글리콜), 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리(올레핀 알코올), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(하이드록시알킬메타크릴아미드), 폴리(하이드록시알킬메타크릴레이트), 다당류, 폴리(a-하이드록시산), 폴리(아크릴산), 폴리(비닐알코올), 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리(N-아크릴로일모르폴린) 예를 들어, 본원에 그 전체가 참고문헌으로 포함된 미국 특허 제5,629,384호에 개시된 것과, 이것들 중 임의의 하나 또는 그 이상의 것의 공중합체, 삼량체 및 혼합물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0184] 바람직하게, POLY₁은 폴리에틸렌 글리콜 즉, PEG이다. POLY₁은 다수의 기하학적 구조 또는 형태를 갖는 것들 중

임의의 것일 수 있으며, 예를 들어, 선형 사슬, 분지형 사슬, 포크형 사슬 등을 포함하나, 이 POLY₁은 선형(즉, 전체 다분지형 구조의 각 분지 내에서) 또는 포크형인 것이 바람직하다. “포크형” 중합체 배열을 가지는 다분지형 중합체 전구 약물의 바람직한 구조는 다음과 같다:



XII

[0185] F는 포크화기(forking group)를 나타내며, 나머지 변수들은 전술한 바와 같다. 포크화 기 F 내 포크화 지점은(-CH)를 포함하거나 또는(-CH)이지만, 질소 원자(N)일 수도 있다. 이와 같은 방식으로, 각각의 중합체 분지는 포크화되어 하나보다는 두개의 공유 결합되어 방출 가능한 활성 제제 부위들을 가지게 된다.

[0186] 화학식 XII에 나타낸 형태를 가지는 다분지형 중합체를 제조하는데 유용한 포크형 중합체의 예에 관하여는 미국 특허 제6,362,254호에 개시되어 있다.

[0187] POLY₁이 PEG일 때, 이것의 구조는 통상적으로 -(CH₂CH₂O)_n-를 포함하는데, 이는 또한 -(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂-로도 표시될 수 있으며, 식 중 n은 약 5 ~ 약 400, 바람직하게는 약 10 ~ 약 350, 또는 약 20 ~ 약 300의 범위이다. 본원에 제공된 다분지형 중합체 컨쥬케이트의 바람직한 구체예에서, POLY₁은 선형 폴리에틸렌 글리콜이다.

[0188] 본원에 개시된 다분지형 구체예에서, 각각의 중합체 분지 즉, POLY₁의 문자량은 통상적으로 다음의 문자량들 중 하나에 해당한다: 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 7500, 8000, 9000, 10000, 12,000, 15000, 17,500, 18,000, 19,000 또는 20,000달톤 이상. 본원에 개시된 다분지형 중합체 배열의 전체 문자량(다시 말해서, 다분지형 중합체의 전체 문자량)은 일반적으로 다음의 문자량들 중 하나에 해당한다: 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 100,000달톤 이상.

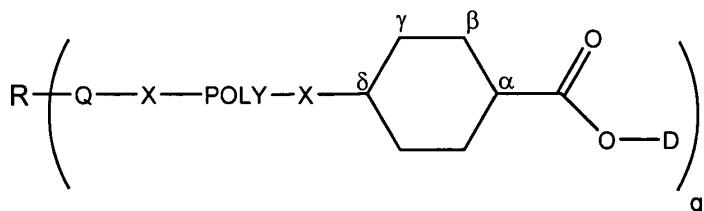
[0189] 통상적으로, 본 발명의 다분지형 중합체의 전체 문자량은 약 800 ~ 약 80,000달톤, 또는 약 900 ~ 약 70,000달톤의 범위이다. 본 발명의 다분지형 중합체의 기타 바람직한 문자량 범위는, 본 발명의 컨쥬케이트의 고분자량 구체예에 있어서 약 1,000 ~ 약 40,000달톤, 또는 약 5,000 ~ 약 30,000달톤, 또는 심지어 약 20,000 ~ 약 80,000달톤이다.

알카노에이트 분절

[0190] 본원에 제공된 다분지형 중합체 컨쥬케이트는 q 중합체 분지 내에 알카노에이트 분절을 포함한다. 알카노에이트 분절은 양 컨쥬케이트에 제공되며, 궁극적으로는 약물을 방출한다. 뿐만 아니라, 알카노에이트 구조는 약물 담지율을 최적의 수준에 못 미치게 만들고, 다분지형 중합체 컨쥬케이트 조성물 중에 원하지 않는 불순물을 형성할 수 있는, 이웃 기간에 일어날 수 있는 상호 작용을 방지하도록 디자인된다. 이러한 상호 작용 방지 특성은 알카노에이트 분절의 길이와, 이 분절에 포함된 작용기 및 특정 원자들에 의해 제공된다. 화학식 I의 화합물에 나타낸 q 중합체 분지들은 각각 알카노에이트 분절 내에서 종결되는데, 여기서, 소분자 약물(또는 -수소나 활성 에스테르 작용기)은 (알카노에이트의 일부를 형성하는) 에스테르 결합에 의해서 중합체 분지에 공유 결합된다. 상기 알카노에이트 분절은 구조식 -(CH₂)₂-(CHR₁)_nC(O)-O-D를 가지며, 식 중 각각의 경우에 있어서 R₁은 독립적으로 H, 저급 알킬, 알킬렌 또는 전자 끄는 기이고, n은 1 ~ 약 7의 정수이다. R₁에서 살펴볼 수 있는 바와 같이,

카보닐에 대해서 알파, 베타 및 감마 등의 위치에 있는 탄소는 예를 들어, 저급 알킬, 알킬렌 또는 전자 끄는 기로 독립적으로 치환될 수 있다. 주로 알파 위치에 있으며, 종종 베타 또는 감마 위치에 있을 수도 있는 치환기 예를 들어, 메틸 기 등과 같은 기는 입체 장애를 일으켜서 시약의 선택성을 더욱 잘 조절할 수 있으므로, 이러한 치환기와 친핵성 기 예를 들어, 약물 분자 상에 존재하는 기(예를 들어, 알코올, 티올)의 반응성은 감소하게 된다. 이와 같은 치환기는 다분지형 컨쥬케이트의 가수 분해 안정성을 추가로 조절할 수 있다(예를 들어, 그 내용이 본원에 참고문헌으로 포함되어 있는 미국 특허 제6,495,659호를 참조). 통상적으로, 알파 위치에 알킬기가 존재하면, 인접한 에스테르 결합에 대한 가수 분해 안정성은, 알킬기가 존재하지 않는 알카노에이트에서 관찰되는 가수 분해 안정성에 비하여 더욱 개선될 것이다.

[0193] R_1 은 예를 들어, H이거나, 또는 1 ~ 약 6개의 탄소 원자들을 함유하는 알킬기일 수 있다. 저급 알킬기는 직선형 사슬 또는 분지형 사슬 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, i-프로필, n-부틸, i-부틸, sec-부틸, t-부틸, 펜틸 또는 i-펜틸 등일 수 있다. 만일 알킬렌 기가 예를 들어, 알파 위치에서 치환되고, 예를 들어, 멘타 위치에서 다시 결합하면, 구조식은 이하 나타낸 바와 같이 본질적으로 환형인 알카노에이트 기를 갖게 된다.



[0194]

[0195] 대안적으로, R_1 은 전자 끄는 기(EWG), 예를 들어, 할로겐화물(예를 들어, F, Cl, Br 또는 I), 니트릴, $-NO_2$, CF_3 , $-SO_3$ 또는 당업계에 일반적으로 공지된 임의의 기타 EWG일 수 있다. 정수 n 은 통상적으로, 1, 2, 3, 4, 5, 6 및 7로부터 선택되는 수이다.

[0196] 그러므로, 부분 $-(CHR_1)_n-$ 는 $-CHR_1-$, $-CHR_1-CHR_1-$, $-CHR_1-CHR_1-CHR_1-$, $-CHR_1-CHR_1-CHR_1-CHR_1-$, $CHR_1-CHR_1-CHR_1-CHR_1-$, $CHR_1-CHR_1-CHR_1-CHR_1-CHR_1-$, $-CHR_1-CHR_1-CHR_1-CHR_1-CHR_1-$, $-CHR_1-CHR_1-CHR_1-CHR_1-CHR_1-CHR_1-$ 중 임의의 것에 해당할 수 있으며, 식 중, 각 사슬 내 각 R_1 은 독립적으로 선택된다. 하나의 특정 구체예에서, 상기 각각의 구조식 중 R_1 은 각각 수소이다. 또 다른 구체예에서, 상기 각각의 경우에 있어서, 각 R_1 은 알파 위치에 있거나 카보닐에 인접하여 존재하는 경우를 제외하고는 수소이며, 이러한 경우, 특정한 R_1 은 단독으로 저급 알킬이다. 또 다른 추가의 구체예에서, 상기 각각의 구조식들 중 각 R_1 은, 알파 위치에 있거나 카보닐에 인접하여 존재하는 경우를 제외하고는 수소이며, 이러한 경우 특정한 R_1 은 단독으로 전술한 바와 같이 EWG이다.

[0197] 활성 제제, D

[0198] 화학식 I로 돌아와서, D는 소분자 활성 제제의 잔기를 나타내며, q(중합체 분자의 수)는 약 3 ~ 약 50의 범위이다. 예시적 범위는, 약 3 ~ 약 10, 약 11 ~ 약 25, 약 26 ~ 약 40, 또는 약 41 ~ 약 50이다. 바람직하게, q는 약 3 ~ 약 25의 범위이다. 더욱 바람직하게, q는 3 ~ 약 10으로서 예를 들어, q는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 중 어느 하나의 값을 가진다. 바람직한 구체예에서, q는 4이다. 활성 제제 잔기 D는 본원에 개시된 다분지형 중합체에 공유 결합하기 적당한 하이드록실 작용기를 하나 이상 함유하여 가수 분해 가능한 에스테르 결합을 형성하므로, 가수 분해 시, 활성 제제는 변형되지 않은 형태로 방출된다.

[0199] 본 발명의 하나의 구체예에 의하면, 다분지형 중합체 컨쥬케이트는 약 3 ~ 약 25개의 활성 제제 분자들이 공유 결합되어 있는 것을 특징으로 한다. 더욱 구체적으로, 상기 컨쥬케이트는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25개의 활성 제제 분자가 공유 결합되어 있다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 컨쥬케이트는 수용성 중합체와 공유 결합된 활성 제제 분자들을 약 3 ~ 약 8개 갖는다. 통상적으로, 반드시 그래야 하는 것은 아니지만, 중합체 분자들의 수는 수용성 중합체에 공유 결합된 활성 제제의 수와 일치할 것이다. 다시 말해서, 임의의 수만큼의(예를 들어, q) 중합체 분자를 가지는 중합체의 경우, 각각은 그 말단부에 반응성 알카노에이트 작용기를 가지며, 결과로 생성되는 컨쥬케이트 내에서 공유 결합된 활성 제제의 수는 q인 것이 가장 바람직하다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 다분지형 중합체 컨쥬케이트를 포함하는 조성물은 약물 담지율이 92% 이상인 것을 특징으로 한다. 다시 말해서, q개의 중합체 분자를 가지는 다분지형 중합체 컨쥬케이트를 함유하는 조성물에 있어서, 이 조성물은 종 당 평균 약물 담지율이 평균 0.92(q) 이상

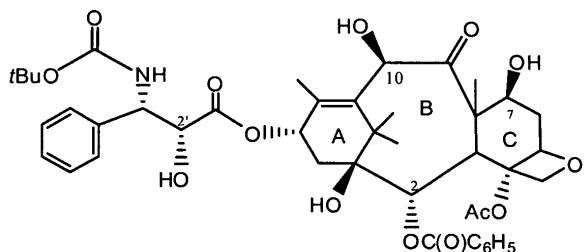
인 것을 특징으로 한다. 다시 말해서, 본 발명의 조성물은 종 당 약물 담지율이 다음과 같거나 또는 그 이상인 것을 특징으로 한다: 0.92(q) 이상; 0.93(q) 이상; 0.94(q) 이상; 0.95(q) 이상; 0.96(q) 이상; 0.97(q) 이상; 0.98(q) 이상; 0.99(q) 이상; 및 1(q).

[0200] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 컨쥬게이트는 중앙 유기 라디칼 중심에서 유래하는 다수의 중합체 분지를 갖는다기 보다는, 현수성 활성 제제 부위가 공유 결합되어 있는 수용성 중합체인 것을 특징으로 하며, 각각의 활성 제제 부위는 본원에 개시된 바와 같은 분해성 결합 예를 들어, 알카노에이트 결합에 의해 공유 결합되어 있다. 이와 같은 구체예에서, 중합체 전구 약물 컨쥬게이트의 구조는 일반적으로 $\text{POLY}_1(-X-(\text{CH}_2)_2(\text{CR}_1\text{H})_n\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{D})_q$ 로 표시할 수 있고, 식 중, 각각의 약물 잔기는 알카노에이트 링커를 통하여 POLY_1 에 공유 결합되어 있으며, 변수 POLY_1 , X, R_1 , n, D 및 q는 전술한 바와 같고, 중합체, 통상적으로 선형 중합체는 “q” 개의 활성 제제 잔기가 알카노에이트 링커-약물 부위와 연결된 스페이서 X를 통해 통상적으로 특정한 길이만큼 이 중합체 사슬을 따라서 결합되어 있다.

[0201] 특정 구체예에서, 활성 제제 부위 또는 잔기는 문자량이 약 1000 미만인 소분자이다. 또 다른 추가의 구체예에서, 소분자 약물의 문자량은 약 800 미만이거나, 심지어는 약 750 미만이다. 또 다른 구체예에서, 소분자 약물의 문자량은 약 500 미만이거나, 몇몇 경우에 있어서는 약 300 미만이다.

[0202] 바람직한 활성 제제 부위는 항암제이다. 특히 바람직한 활성 제제 부위는 하나 이상의 하이드록실기를 보유하는 (즉, 알카노에이트 결합을 형성하는데 적당한) 중앙 분해제이다. 특히 바람직한 활성 제제 부위는 알칼로이드 세포 독성 제제 예를 들어, 탁산과 캠토테신, 그리고 빈카 알칼로이드 빙크리스틴, 비노렐빈, 빈블라스틴 및 빈데신이다.

[0203] 활성 제제의 하나의 바람직한 군은 캠토테신이다. 바람직한 구체예에서, D는 탁산 또는 탁산 유도체 예를 들어, 파클리탁셀 또는 도세탁셀이다. 본원의 목적을 위하여, “탁산” 이란 용어에는 테르펜의 탁산 군에 속하는 모든 화합물을 포함한다. 그러므로, 탁솔(파클리탁셀), 3'-치환tert-부톡시-카보닐-아민 유도체(탁소텔) 등과 예를 들어, 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)에서 시판되고 있는 기타 유사체도 본원의 범위 내에 포함된다. 하나의 특히 바람직한 D로서는 도세탁셀이 있으며, 이 경우, 2번 위치에 있던 H는 최종 다분지형 중합체 컨쥬게이트 내에는 존재하지 않는다:

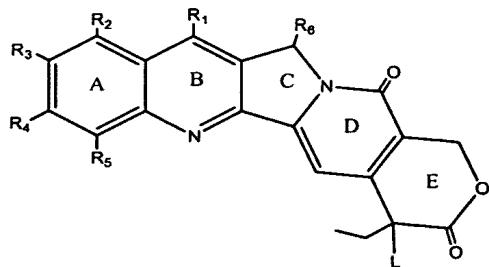


[0204]

[0205] 기타 바람직한 탁산으로서는 탁산 골격의 2번 위치에서 변형이 진행될 수 있는 것들 예를 들어, 본원의 임의의 구체예 및 부속 실시예들에 개시된 것들이 있다.

[0206] 뿐만 아니라, 탁산 예를 들어, 도세탁셀도 본원의 범위 내에 포함되며, 이 경우, 다분지형 알카노에이트 주체와의 결합은 탁산 골격 내 임의의 -OH위치에서 일어날 수 있다.

[0207] 활성 제제의 기타 바람직한 군으로서는 캠토테신이 있다. 하나의 구체예에서, 본 발명에 사용되는 캠토테신의 구조식은 다음과 같다:

**XIII**

[0208]

상기 식 중,

[0210]

R_1-R_5 는 각각 독립적으로 수소; 할로; 아실; 알킬(예를 들어, C1-C6 알킬); 치환된 알킬; 알콕시(예를 들어, C1-C6 알콕시); 치환된 알콕시; 알케닐; 알키닐; 시클로알킬; 하이드록실; 시아노; 니트로; 아지도; 아미도; 하이드라진; 아미노; 치환된 아미노(예를 들어, 모노알킬아미노 및 디알킬아미노); 하이드록시카보닐; 알콕시카보닐; 알킬카보닐옥시; 알킬카보닐아미노; 카바모일옥시; 아릴설포닐옥시; 알킬설포닐옥시; $-C(R_7)=N-(O)_iR_8$ (식 중, R_7 은 H, 알킬, 알케닐, 시클로알킬 또는 아릴이고, i 는 0 또는 1이며, R_8 은 H, 알킬, 알케닐, 시클로알킬 또는 복소환임); 및 $R_9C(O)O-$ (식 중, R_9 는 할로겐, 아미노, 치환된 아미노, 복소환, 치환된 복소환임), 또는 $R_{10}-O-(CH_2)_m-$ (식 중, m 은 1 ~ 10의 정수이고, R_{10} 은 알킬, 페닐, 치환된 페닐, 시클로알킬, 치환된 시클로알킬, 복소환, 또는 치환된 복소환임)으로 이루어진 군으로부터 선택되고; 또는 R_2 는 R_3 와 함께, 또는 R_3 는 R_4 와 함께, 치환 또는 비치환 메틸렌디옥시, 에틸렌디옥시 또는 에틸렌옥시를 형성하고;

[0211]

R_6 은 H 또는 OR' 이며, 식 중, R' 은 알킬, 알케닐, 시클로알킬, 할로알킬 또는 하이드록시알킬이고;

[0212]

L은 다분지형 중합체 컨쥬게이트에의 결합 위치이다.

[0213]

상기한 바에 의하면, 비록 L은 20 고리 위치에 존재하는 것으로 표시되었지만, 결합 위치는 캠토테신 구조 내 임의의 적당한 위치일 수 있다.

[0214]

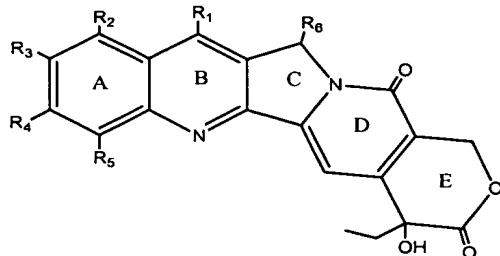
본원에 사용된 “캠토테신 화합물” 이란 용어에는 식물성 알칼로이드 20(S)-캠토테신과, 이의 약학적으로 활성인 유도체, 유사체 및 대사 물질을 포함한다. 캠토테신 유도체의 예로서는 9-니트로-20(S)-캠토테신, 9-아미노-20(S)-캠토테신, 9-메틸-캠토테신, 9-클로로-캠토테신, 9-플루오로-캠토테신, 7-에틸 캠토테신, 10-메틸-캠토테신, 10-클로로-캠토테신, 10-브로모-캠토테신, 10-플루오로-캠토테신, 9-메톡시-캠토테신, 11-플루오로-캠토테신, 7-에틸-10-하이드록시 캠토테신(SN38), 10,11 -메틸렌디옥시 캠토테신, 및 10,11 -에틸렌디옥시 캠토테신, 및 7-(4-메틸피페라지노메틸렌)-10,11-메틸렌디옥시 캠토테신, 7-에틸-10-(4-(1-피페리디노)-1-피페리디노)-카보닐옥시-캠토테신, 9-하이드록시-캠토테신, 및 11-하이드록시-캠토테신을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 특히 바람직한 캠토테신 화합물로서는 캠토테신, 이리노테칸 및 토포테칸을 포함한다.

[0215]

변형되지 않았으며 치환되지 않은 식물성 알칼로이드 캠토테신은 자연 추출물을 정제하여 얻을 수 있거나, 또는 스텔린 암 연구 재단(Stehlin Foundation for Cancer Research; 텍사스주 휴스톤 소재)으로부터 입수할 수 있다. 치환된 캠토테신은 문헌에 공지된 방법들을 이용하여 얻을 수 있거나, 또는 상업적 공급처로부터 입수할 수 있다. 예를 들어, 9-니트로-캠토테신은 수퍼진, 인코포레이션(SuperGen, Inc.; 캘리포니아주 산 라몬 소재)으로부터 입수할 수 있으며, 9-아미노-캠토테신은 파마슈티컬스(캘리포니아주 샌디에고 소재)로부터 입수할 수 있다. 캠토테신과 다양한 유사체 및 유도체는 또한 표준적인 정밀 화학 공급처 예를 들어, 시그마 케미컬스(Sigma Chemicals)로부터 입수할 수 있다.

[0216]

임의의 바람직한 캠토테신 화합물의 구조식은 다음과 같이 일반화하여 나타낸다:

**XI**

[0217]

상기 식 중,

[0219]

R₁ ~ R₅ 은 각각 독립적으로 수소; 할로; 아실; 알킬(예를 들어, C1-C6 알킬); 치환된 알킬; 알콕시(예를 들어, C1-C6 알콕시); 치환된 알콕시; 알케닐; 알키닐; 시클로알킬; 하이드록실; 시아노; 니트로; 아지도; 아미도; 하이드라진; 아미노; 치환된 아미노(예를 들어, 모노알킬아미노 및 디알킬아미노); 하이드록시카보닐; 알콕시카보닐; 알킬카보닐옥시; 알킬카보닐아미노; 카바모일옥시; 아릴설포닐옥시; -C(R₇)=N-(O)_i-R₈(식 중, R₇은 H, 알킬, 알케닐, 시클로알킬 또는 아릴이고, i는 0 또는 1이며, R₈은 H, 알킬, 알케닐, 시클로알킬 또는 복소환임); 및 R₉C(O)O-(식 중, R₉은 할로겐, 아미노, 치환된 아미노, 복소환, 치환된 복소환임), 또는 R₁₀-O-(CH₂)_m-(식 중, m은 1 ~ 10의 정수이며, R₁₀은 알킬, 페닐, 치환된 페닐, 시클로알킬, 치환된 시클로알킬, 복소환 또는 치환된 복소환임)으로 이루어진 군으로부터 선택되고; 또는 R₂는 R₃ 와 함께, 또는 R₃는 R₄와 함께, 치환 또는 비치환 메틸렌디옥시, 에틸렌디옥시 또는 에틸렌옥시를 형성하며;

[0220]

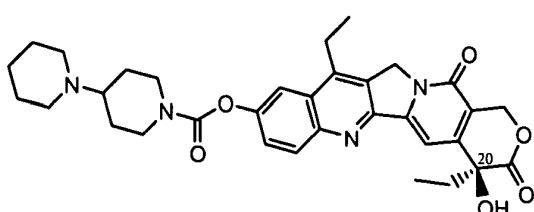
R₆은 H 또는 OR'이며 식 중, R'은 알킬, 알케닐, 시클로알킬, 할로알킬 또는 하이드록시알킬이다.

[0221]

예시적인 치환기로서는 하이드록실, 아미노, 치환된 아미노, 할로, 알콕시, 알킬, 시아노, 니트로, 하이드록시카보닐, 알콕시카보닐, 알킬카보닐옥시, 알킬카보닐아미노, 아릴(예를 들어, 페닐), 복소환 및 글리코실 기를 포함한다.

[0222]

예를 들어, 하나의 구체예에서, D는 이리노테칸이며, 이 경우 20 위치 하이드록실 상에 존재하는 H는 최종 다분지형 전구 약물 컨쥬게이트에는 존재하지 않는다.



[0223]

대안적으로, D는 SN-38이다.

[0225]

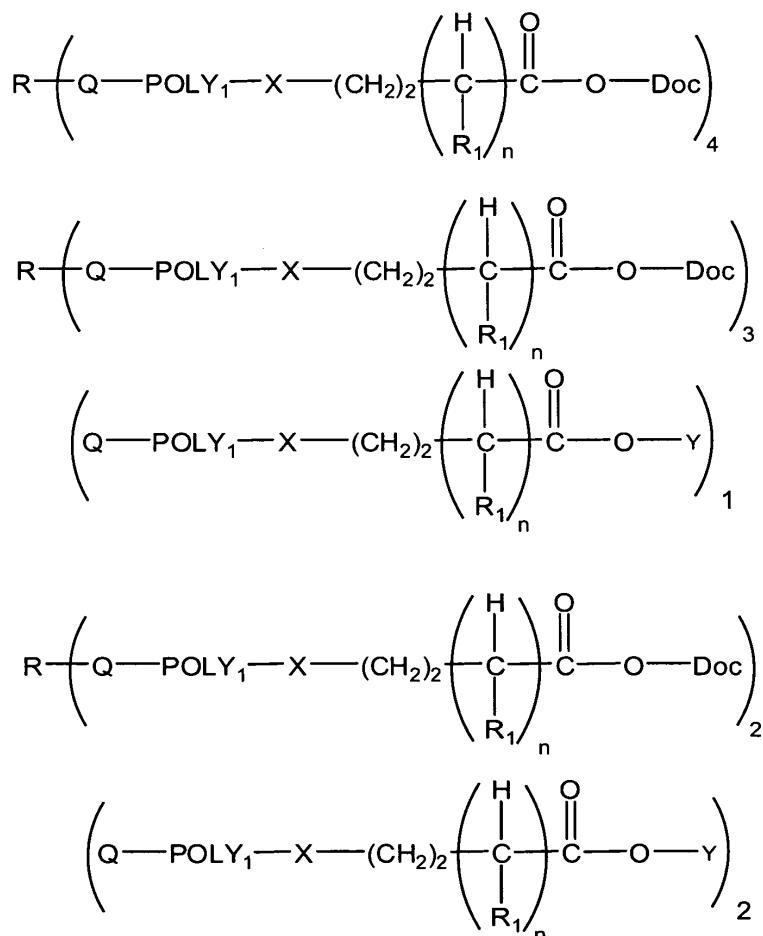
더욱 구체적으로, 활성 제제 예를 들어, 소분자, 올리고펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질 모의체, 단편 또는 유사체, 스태로이드, 뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드, 전해질 등은 다수의 구조물 군 중 어느 하나의 군에 속할 수 있고, 통상적으로는 다분지형 중합체에 공유 결합하기 적당한 하나 이상의 유리 하이드록실 기 등(즉, “핸들(handle)”)을 함유한다.

[0226]

대안적으로, 약물은 적당한 “핸들” 을 도입하거나, 바람직하게는 존재하는 작용기들 중 하나를 본원에 개시된 알카노에이트 결합을 형성하는데 적당한 작용기로 전환시켜 개질된다. 이상적으로, 이와 같은 개질은 활성 제제의 치료 효과 또는 활성에 유의한 정도로 악영향을 미치지 않아야 한다. 다시 말해서, 본 발명의 다분지형 중합체에 활성 제제를 더욱 효과적으로 결합시키기 위해 임의로 개질하면, 이 활성 제제의 생체 활성을 개질 전의 공지된 모 활성 제제의 생체 활성에 비하여 약 30% 이하만큼 감소하여야 한다. 더욱 바람직하게, 본 발명의 다분지형 중합체에 활성 제제를 더욱 효과적으로 결합시키기 위해 임의로 개질하면, 이 활성 제제의 활성을 개질 전의 공지된 모 활성 제제의 활성에 비하여 약 25%, 20%, 15%, 10% 또는 5% 이하만큼 감소하는 것이

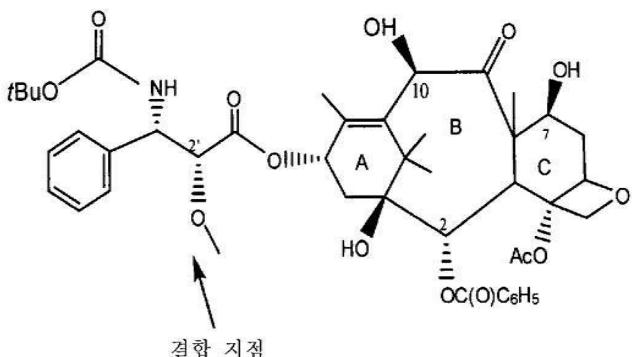
바람직하다.

- [0227] 상기에 예로 든 약물들은 사용 가능한 유사체, 작동제, 길항제, 억제제, 이성체, 다형체 및 이것들의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 의미이다.
- [0228] 전구 약물 컨쥬케이트의 조성물 / 군집
- [0229] 전술한 바와 같이, 임의의 경우에 있어서, 본원에 개시된 바와 같은 다분지형 중합체 컨쥬케이트를 포함하는 조성물은 중합체 분지들 중 하나 이상에 약물 D가 존재하지 않는 일종의 전구 약물을 함유할 수 있다. 이러한 경우는 예를 들어, 약물 D를 보유하는 다분지형 반응성 중합체의 불완전한 반응에 의해 유발될 수 있다. 종종, 화학양론적으로 유리한 경우, 즉, 반응성 중합체 분지들의 수에 비하여 많은 약물을 이용하는 경우, 이 반응을 완결시키는 것이 어려울 수 있으므로, 생성물은 혼합 중합체 종들을 포함할 수 있다. 그러나, 본 발명의 알카노에이트 링커를 사용하여 본원에 제공된 바와 같은 다분지형 중합체 전구 약물 조성물의 특성을 규명할 때 최종 컨쥬케이트에 대한 약물 담지 정도(즉, 백분율)는 큰 것이 유리한데, 이 담지 정도는 92% 이상 예를 들어, 약 92% ~ 100%인 것이 통상적이다.
- [0230] 그러나, 완벽함을 추구하기 위하여, 임의의 경우 본 발명의 조성물은 일반적으로 $R(-Q_1-POLY_1-X_1-(CH_2)_2(CR_1H)_nC(O)-O-D)_q$ 로 표시되는 다분지형 중합체 컨쥬케이트를 포함할 수 있음에 주목하여야 할 것이며, 식 중, 하나 이상의 중합체 분지들은 약물을 포함하지 않는다. 출발 다분지형 중합체 시약의 각 분지에 알칸산 작용기가 결합되어 있다고 가정하였을 때, 결과로 생성된 컨쥬케이트는 그것의 각 중합체 분지에 약물이 공유 결합되어 있을 수 있으며, 바람직하게는 공유 결합되어 있을 것이며, 대안적으로는 약물 D를 포함하지 않을 수도 있다. 변수 D는 소문자로서, 여기서, D_1 은 D가 존재함을 나타내며, D_0 는 D가 존재하지 않음을 나타낸다. 그러므로, 예를 들어, 조성물은 $R(-Q-POLY_1-X-(CH_2)_2(CR_1H)_nC(O)-O-D)_m (-Q-POLY_1-X-(CH_2)_2(CR_1H)_nC(O)-O-D_0)_s$ 을 포함할 수 있으며, 식 중, $m+s=q$ 이고, 유일한 단서조항은 m (약물이 결합되어 있는 중합체의 수)이 1 이상(예를 들어, 1 ~ q)인 것이다. 그러므로 m 은 0 ~ ($q-1$)의 범위일 것이다. 약물이 존재하지 않을 때, 즉, D_0 일 때, 중합체 분지는 작용기 Y에서 종결되는 것이 통상적일 것이며, 여기서, Y는 -H 또는 해당 알칸산 또는 활성화된 카복시숙신이미드의 유도체(반응 생성물)이다. 더욱 구체적으로, 본 발명의 조성물은 다음과 같은 구조식을 가지는 다분지형 중합체 컨쥬케이트 종을 하나 이상 포함할 수 있다:
- [0231] $R(-Q-POLY_1-X-(CH_2)_2(CR_1H)_nC(O)-O-D)_m (-Q-POLY_1-X-(CH_2)_2(CR_1H)_nC(O)-O-Y)_s$
- [0232] 여기서, Y는 H 또는 상응하는 알칸산이나 활성화된 카복시숙신이미드의 유도체에 해당한다. 전체적인 특성을 파악할 때, m 이 0.92(q) 이상인 조성물이 바람직하다. 이상적으로, 활성 제제를 정량적으로 치환하는 경우, s 는 0이고 m 은 q 이다.
- [0233] 예시한 바와 같이, 다분지형 중합체 컨쥬케이트가 4개의 중합체 분지들을 함유하는 경우, 다분지형 중합체 당 공유 결합된 약물 분자 수의 이상적인 값은 4이며, 다분지형 중합체 당 약물 분자의 평균 수치는 이상적 수치의 약 92% ~ 약 100%의 범위이다. 이는 다분지형 중합체 컨쥬케이트 당 D의 평균 수치가 약 3.68 ~ 4.0인 것과 상응하는 결과이다.
- [0234] 또 다른 구체예에서, 예를 들어, 중합체 분지 수가 약 3 ~ 약 8의 범위인 다분지형 중합체 컨쥬케이트 조성물에 있어서, 이 조성물에 존재하는 대부분의 종으로서는 중합체 중심에 이상적인 개수(“ q ”)만큼의 약물 분자가 결합되어 있는 것, 또는 중합체 중심에 (“ q ”) 및 (“ $q-1$ ”)개의 약물 분자들이 함께 결합되어 있는 것이 있다.
- [0235] 예를 들어, 본 발명에 의한 바람직한 다분지형 중합체 전구 약물 조성물은 이하와 같은 컨쥬케이트 종들 중 하나 이상을 포함할 수 있으며:



[0236]

[0237] 등, 상기 식 중, O-Doc는 이하의 것과 같고:



[0238]

[0239] 바람직하게는 주로 첫번째 종을 포함하는데, 즉, 각각의 중합체 분지에 약물, 이 경우에는 도세탁셀이 공유 결합되어 있는 종을 주로 포함한다. 다시 말해서, 본원에 제공된 바와 같은 다분지형 중합체 컨쥬케이트는 각 중합체 분지에 활성 제제가 공유 결합되어 있어서, 본질적으로 이 중합체 분지를 각각에서 활성 제제가 정량 치환되는 것이 가장 바람직하다. 이와 같은 구체예에서, 본 발명의 조성물은, 다분지형 중합체 당 약물 분자의 평균 개수가 그것의 이상적인 개수에 본질적으로 해당하는 것(즉 이상적인 수치와 본질적으로 100% 일치하는 것)을 특징으로 한다.

[0240]

본원에 개시된 바는 그것이 단독으로 기술되어 있든, 또는 전구 약물 조성물을 형성하는 일부로서 기술되어 있든 간에, 본원에 개시된 각각의 전구 약물 종들을 포함하는 의미이다.

[0241]

하나의 예시적이고도 바람직한 컨쥬케이트 즉, 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC에 관하여는 실시예 2에 기술되어 있다. 즉, 바람직한 구체예에 있어서, 본원에 제공된 바와 같은 다분지형 중합체 컨쥬케이트는 펜타에리트리톨 유래 중심

(따라서, R-Q-는 펜타에리트리톨릴에 해당함), PEG 즉, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 에 해당하는 POLY₁, 산소 0에 해당하는 X 값, 및 부타노에이트에 해당하는 알카노에이트 링커부를 보유하므로, n은 1이고, R₁은 H이며, q는 4이다. 실시예 2에 기술된 바와 같이, 4분지형 중합체 컨쥬게이트에 대한 치환율은 약 98 ~ 100%이다. 약물 담지 정도에 대한 또 다른 특성 규명 결과는 실시예 11에 제공하였다(예를 들어, 표 1 참조). 실시예 11에 제공된 비교 데이터에서 살펴볼 수 있는 바와 같이, 글리신-결합 및 카복시메틸렌 결합 다분지형 컨쥬게이트에 대한 평균 약물 담지율은 매우 낮은데 (평균적으로 이상 수치의 약 75% ~ 약 80%), 이는 곧, 본 발명의 알카노에이트 결합 다분지형 중합체 컨쥬게이트에 관한 수치와, 전반부에 기술한 다분지형 중합체 컨쥬게이트에 비하여 개선된 점이 있음을 말해주는 것이다.

[0242]

알카노에이트 링커를 포함하는 또 다른 예시적 다분지형 중합체 컨쥬게이트를 제조하는 방법에 관하여는 실시예 12에 기술하였다. 이러한 컨쥬게이트는 다음과 같은 특징들을 갖는다: 펜타에리트리톨릴 중심(예를 들어, R-Q가 펜타에리트리톨릴에 해당하는 경우), 수용성 및 비펩티드성 중합체 분절, POLY₁즉, PEG, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-$, 스페이서, X 즉, 산소, q 값(4), 그리고 다음과 같은 알카노에이트 링커들: a-메틸프로파노에이트, a-메틸펜타노에이트, 헥사노에이트, 옥타노에이트 및 데카노에이트.

[0243]

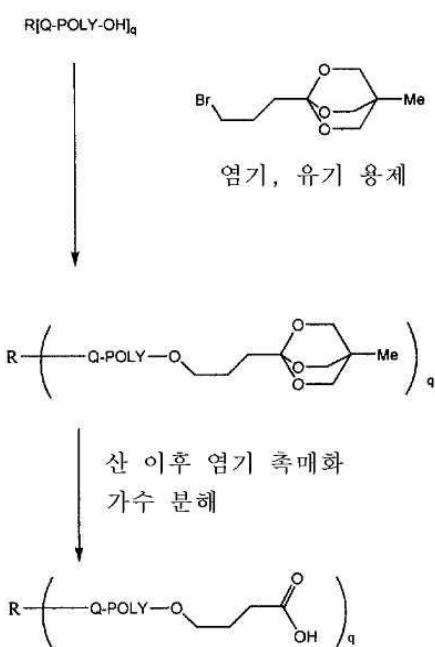
다분지형 중합체 전구 약물 컨쥬게이트의 합성 방법

[0244]

다분지형 반응성 중합체 예를 들어, 본 발명의 컨쥬게이트를 제조하기 위한 중합체는 본원에 제시된 지침을 고려하였을 때, 화학 합성 업계에 공지되어 있는 것들과 커플링된, 시판중인 출발 물질로 용이하게 제조할 수 있다.

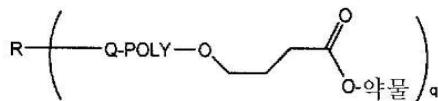
[0245]

펜타에리트리톨 중심 또는 글리세롤 중심을 보유하고 있는 하이드록실 종결 다분지형 PEG는 NOF 코포레이션으로부터 시판되고 있다. 이러한 다분지형 PEG는 작용화하여 활성 제제 상에 존재하는 하이드록실 기와 커플링되는 해당 알카논산을 제조함으로써 본원에 제공된 컨쥬게이트를 제조하는데 직접 사용될 수 있다(예를 들어, 4-ARM-PEG-부탄산을 합성한 후 실시예 2에 기술된 바와 같이 컨쥬게이트화하는 과정이 기술되어 있는 실시예 1을 참조). 여기에 기술된 방법에서, 다분지형 4-ARM-PEG-OH 출발 물질은 강염기의 존재 하에서 보호된 브로모 부탄산과 반응하여, 원하는 다분지형 PEG 알칸산 시약을 형성한다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 US 제 2005/0036978호를 참조. 이와 같은 방법은 임의의 다분지형 PEG-OH 출발 물질을 제조하는데 사용할 수 있다. 결과로 생성된 다분지형 중합체 알칸산은, 예를 들어, 디이소프로필카보디이미드(DIC)와 같은 적당한 측합체를 사용하였을 경우 표적 하이드록실 함유 약물에 커플링될 수 있다. 이 과정을 이하에 개략적으로 나타내었다:



[0246]

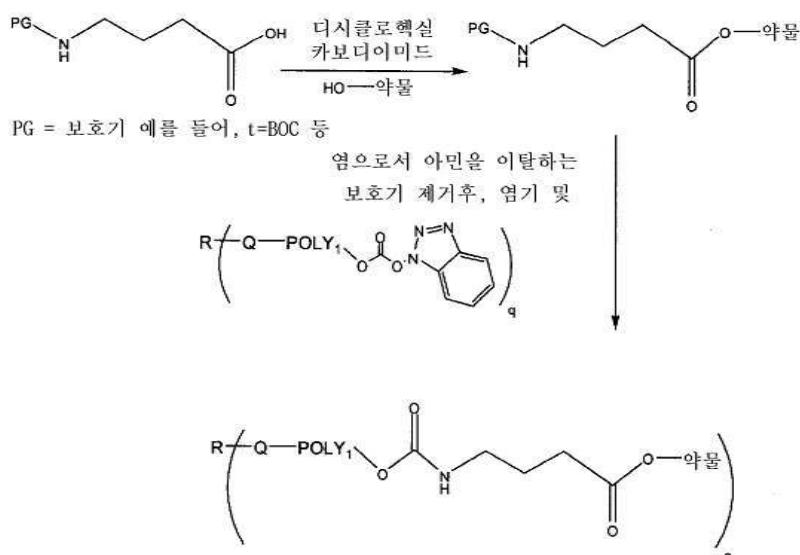
↓
축합제 예를 들어, DIC
약물-OH



[0247]

[0248]

대안적인 방법에 있어서는, 약물을 작용화하여 알칸산 부위를 포함하도록 만든 다음, 이를 다분지형 중합체에 공유 결합시켜 본원에 개시된 컨쥬게이트를 합성한다. 이 방법에 관하여는 이하에 예시하였으며, 여기서는, PEG BTC 활성 에스테르가 사용되며 최종적으로 링커와 PEG 분절 사이에 우레탄 결합이 형성된다. 당업자들은 본원에 개시된 방법에 다수의 변형을 가하여 구체화할 수 있다.



[0249]

[0250]

본원에 개시된 방법들은 반응물과 생성물의 정확한 구조에 다수의 변형을 가할 수 있을 만큼 충분히 융통성을 발휘할 수 있다. 예를 들어, 치환 반응에서 각각의 브롬화알킬 대신에 염화알킬 또는 메실레이트를 사용할 수 있다. 뿐만 아니라, 시범을 보이기 위해서 활성 NHS 에스테르를 사용할 경우, 기타 활성 에스테르 예를 들어, p-니트로페놀레이트 또는 BTC를 사용할 수도 있다. 또한, 연장 기(extender group) 특히, 에틸렌옥시 서브 유닛을 함유하는 기를 중심 다분지형 PEG 구조와 종결 링커 사이에서 제2의 링커로 사용할 수 있다. 적당한 작용기, 링커 및 보호기 등을 선택하여 본 발명에 따른 다분지형 중합체 전구 약물을 합성하는 것은 부분적으로, 활성 제제 및 다분지형 중합체 출발 물질 상 작용기에 의존적일 것이며, 이는 본원의 내용을 바탕으로 하였을 때 당업자에게 명백할 것이다.

[0251]

전구 약물 생성물도 추가로 정제될 수 있다. 정제 및 분리 방법으로서는 침전 후 여과 및 건조하고, 크로마토그래피를 수행하는 방법을 포함한다. 적당한 크로마토그래피 방법으로서는 젤 여과 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피 및 바이오티지 플래시 크로마토그래피(Biotage Flash chromatography)를 포함한다.

[0252]

약학 조성물

본 발명은 수의학적 용도 및 의학적 용도 둘 다로 사용되는 약학 제형 또는 조성물을 제공하는데, 이는 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 본 발명의 다분지형 중합체 컨쥬게이트 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 하나 이상 포함하며, 선택적으로 기타 치료제 성분 또는 안정화제 등도 포함할 수 있다. 담체(들)는 제제의 다른 성분들과 함께 존재할 수 있을 뿐만 아니라 이 담체를 투여받는 피험체에 지나치게 유해하지 않아야 한다는 점에서 약학적으로 허용 가능하여야 한다. 본 발명의 조성물은 또한 중합체 부형제 / 첨가제 또는

담체 예를 들어, 폴리비닐피롤리돈, 유도체화된 셀룰로스 예를 들어, 하이드록시메틸셀룰로스, 하이드록시에틸셀룰로스, 및 하이드록시프로필메틸셀룰로스, 피콜(Ficolls)(중합체 당), 하이드록시에틸전분(HES), 텍스트레이트(예를 들어, 시클로텍스트린 예를 들어, 2-하이드록시프로필-b-시클로텍스트린 및 설포부틸에테르-b-시클로텍스트린), 폴리에틸렌 글리콜, 및 펙틴을 포함할 수도 있다. 본 발명의 조성물은 희석제, 완충제, 결합제, 봉해제, 중점제, 윤활제, 보존제(항산화제 포함), 풍미제, 맛 차단제, 무기염(예를 들어, 염화나트륨), 항미생물제(예를 들어, 염화벤잘코늄), 감미제, 대전 방지제, 계면 활성제(예를 들어, 폴리솔베이트 예를 들어, "TWEEN 20" 및 "TWEEN 80" 및 플루로닉 예를 들어, F68 및 F88(BASF사 제품)), 솔비탄 에스테르, 지질(예를 들어, 인지질 예를 들어, 레시틴 및 기타 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 지방산 및 지방산 에스테르, 스테로이드(예를 들어, 콜레스테롤)) 및 칼레이트화제(예를 들어, EDTA, 아연 및 기타 적당한 양이온)를 추가로 포함할 수도 있다. 본 발명에 의한 조성물에 사용하기 적당한 기타 약학적 부형제 및/또는 첨가제에 관하여는 문헌["Remington: The Science & Practice of Pharmacy," 19th ed., Williams & Williams, (1995)], 및 ["Physician's Desk Reference," 52nd ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998)], 및 ["Handbook of Pharmaceutical Excipients," Third Ed., Ed. A.H. Kibbe, Pharmaceutical Press, 2000]에 나열되어 있다.

[0254] 본 발명의 전구 약물은 경구, 직장, 국소, 비강, 눈 또는 비경구(예를 들어, 복강내, 정맥내, 피하 또는 근육내 주사) 투여용으로 적당한 조성물로 제형화될 수 있다. 본 발명의 조성물은 편리하게 단위 투여형으로 제공될 수 있으며 약업계에 널리 공지된 방법들 중 임의의 방법으로 제조될 수도 있다. 모든 방법들은 활성 제제 또는 화합물(즉, 전구 약물)을 하나 이상의 보조 성분들을 구성하는 담체와 합하는 단계를 포함한다. 일반적으로, 본 발명의 조성물은 활성 화합물을 액상 담체와 합하여 용액이나 혼탁액으로 만들거나, 또는 대안적으로 활성 화합물을 고체, 선택적으로는 미립자 생성물을 형성하기 적당한 제형 성분들과 합한 후, 이 생성물을 원하는 전달형으로 성형함으로써 제조된다. 본 발명의 고체 제형은 미립자일 경우, 통상적으로 크기가 약 1 나노미터 ~ 약 500 마이크론의 범위인 입자들을 포함할 것이다. 일반적으로, 정맥 내 투여용 고체 제형의 경우, 입자 지름은 통상적으로 약 1nm ~ 약 10 마이크론의 범위일 것이다. 주사 전 수성 비이를 중 재구성되는 멸균 동결 건조 조성물이 특히 바람직하다.

[0255] 바람직한 제형으로서는 활성 제제 D가 도세탁센인 다분지형 중합체 컨쥬케이트를 포함하는 고체 제형이 있다. 고체 제형은 통상적으로 정맥 내 주입 전 5% 텍스트로스 주사액 또는 0.9% 염화나트륨 주사액으로 희석된다.

[0256] 제형 중 다분지형 중합체 컨쥬케이트의 양은 사용된 특정 활성 제제, 이 제제의 활성, 컨쥬케이트의 분자량, 및 기타 요인들 예를 들어, 투여형, 대상 환자 집단 및 기타 고려 사항에 따라서 달라질 것이며, 일반적으로는 당업자에 의해 용이하게 결정될 것이다. 제형 중 컨쥬케이트 양은 화합물 예를 들어, 알칼로이드 항암제를 이것의 투여를 필요로 하는 환자에게 치료학적 유효량만큼 전달하여, 예를 들어, 암 치료용 화합물과 관련된 치료 효과들 중 하나 이상의 효과를 나타내는데 필요한 양일 것이다. 실제로, 이 양은 특정 컨쥬케이트, 이 컨쥬케이트의 활성, 치료될 증상의 중증도, 환자 집단, 제형의 안정성 등에 따라서 크게 차이가 날 것이다. 조성물은 일반적으로 약 1중량% ~ 약 99중량% 중 임의의 함량만큼의 컨쥬케이트, 통상적으로 약 2중량% ~ 약 95중량%의 컨쥬케이트, 그리고 더욱 통상적으로는 약 5중량% ~ 85중량%의 컨쥬케이트를 함유할 것이며, 또한 이 함량은 조성물 중 함유된 부형제/첨가제의 상대량에 따라서도 달라질 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명의 조성물은 통상적으로 컨쥬케이트를 다음과 같은 비율 중 하나 이상의 비율로 함유할 것이다: 2 중량%, 5 중량 %, 10 중량 %, 20 중량 %, 30 중량 %, 40 중량 %, 50 중량 %, 60 중량 %, 또는 그 이상.

[0257] 경구 투여용으로 적당한 본 발명의 조성물은 각각 소정량의 컨쥬케이트를 분말이나 과립의 형태로 함유하는 개별 단위 예를 들어, 캡슐, 사쉐, 정제 또는 로젠지 등으로 제공될 수 있거나; 또는 수성 또는 비수성 액체 중 혼탁액 예를 들어, 시럽, 엘릭시르, 에멀젼 또는 물약 등으로 제공될 수 있다.

[0258] 비경구 투여용으로 적당한 제형은 편리하게 수용 개체의 혈액과 등장성이도록 제형화될 수 있는 전구 약물 컨쥬케이트의 멸균 수성 제제를 포함한다.

[0259] 비강 스프레이 제형은 보존제 및 등장제와 함께 다분지형 중합체 컨쥬케이트의 정제된 수용액을 포함한다. 이러한 제형들은 pH를 비강 점막 pH와 일치하도록 만들고 등장 상태가 되도록 삼투압을 맞추는 것이 바람직하다.

[0260] 직장 투여용 제형은 적당한 담체 예를 들어, 코코아 버터 또는 수소화 지방 또는 수소화 지방산 카복실산을 포함하는 좌제로서 제공될 수 있다.

[0261] 안구 내 투여형은, pH 및 등장 인자들을 눈의 pH 및 삼투압과 일치하도록 맞추는 것이 바람직하다는 점을 제외

하고는, 비강 내 스프레이 제조 방법과 유사한 방법으로 제조된다.

[0262] 국소 투여형은 하나 이상의 매질 예를 들어, 미네랄 오일, 석유, 폴리하이드록시 알코올 또는 국소 제형용으로 사용되는 기타 베이스 중에 용해 또는 혼탁된 다분지형 중합체 컨쥬게이트를 포함한다. 상기와 같은 기타 보조 성분을 첨가하는 것이 바람직할 수 있다.

[0263] 에어로졸로서 투여하기 적당한 약학 제형은 또한 예를 들어, 흡입으로써 투여된다. 이와 같은 제형들은 원하는 다분지형 중합체 컨쥬게이트 또는 이의 염의 용액 또는 혼탁액을 포함한다. 원하는 제형은 소형 챔버 내에 담겨 분사될 수 있다. 분사는 본 발명의 컨쥬게이트 또는 이의 염을 포함하는 액체 소적 또는 고체 입자를 다수 형성하기 위해 압축 공기 또는 초음속 에너지로 실행될 수 있다.

[0264] 다분지형 중합체 전구 약물 컨쥬게이트의 특징

[0265] 약물 투여시 적어도 부분적으로 약물에 전신 지속 노출되는지 여부를 판단하기 위해, 상이한 동물 모델에서 본원에 의한 예시적 다분지형 중합체 전구 약물의 약동학적 특성들을 평가하였다. 본원에 제공된 실시예들은 다양한 생체 내 연구에 의해 밀받침되는 바와 같이, 본원에 개시된 특징들을 가지는 다분지형 전구 약물을 투여할 때, 약물 예를 들어, 도세탁셀에 전신 지속 노출 되며, 또한 약물에 지속적으로 다양 노출되는 것이 본원의 전구 약물에서 관찰되는 항종양 효과를 증강시키는데 효과적임을 입증하고 있다.

[0266] 예시한 바와 같이, 실시예 14에는 래트에 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀과 도세탁셀을 투여하였을 때의 효과가 기술되어 있다. 본원에 개시된 결과들을 바탕으로 하면, 래트에 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 투여하면, 소멸률이 낮아지고 분포 부피도 작아져서, 길이가 긴 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀의 최종 반감기가 약 65 시간이 됨을 알 수 있다. 균등체 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 투여 후 혈장 중 도세탁셀 C_{max}는, 도세탁셀을 투여하였을 경우에 비하여 약 6배 낮아지는 반면에, AUC는 비슷하다. 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 투여 후 혈장 중 도세탁셀 반감기는, 도세탁셀을 투여하였을 경우에 비하여 약 4배 길어지는 것으로 보아(168시간 대 40시간), 이는 전구 약물 투여시 도세탁셀이 전신 지속 노출된다는 사실을 입증하는 것이다.

[0267] 본원에 개시된 예시적인 전구 약물을 투여 시, 약물(예를 들어, 도세탁셀)에 전신 지속 노출된다는 사실을 추가로 지지하는 것의 일환으로, 실시예 15는 개에 투여하였을 때에도 유사한 결과를 나타낸다는 것을 보여주고 있다. 특히, 실시예 15는 길이가 긴 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀의 최종 반감기가 31 시간임을 보여준다. 균등체 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀과 도세탁셀 투여형을 투여한 후 혈장 중 도세탁셀 C_{max} 및 AUC는 각각 약 110배 및 약7배 감소한다. 더욱이, 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 투여 후 혈장 중 도세탁셀 반감기는 도세탁셀을 투여한 후에 관찰되는 혈장 중 도세탁셀 반감기보다 약 8배 길어졌음을 알 수 있다(199 시간 대 25시간).

[0268] 얻어진 약동학적 데이터를 대상으로 집단 모델링법(Population modeling method)을 수행한 결과, 실시예 16에 기술된 종과 투여량에 관계없이, 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 투여한 후 혈장 중 도세탁셀 농도는 도세탁셀을 투여한 후의 혈장 중 도세탁셀 농도에 비하여 장기간 그리고 더욱 오랫동안 유지된다는 사실이 추가로 뒷받침되었다.

[0269] 본원의 예시적 전구 약물의 항종양 활성을 관찰한 결과 및 그 활성이 증가하였다는 사실에 관하여는 이하 상세한 설명과 실시예에 더욱 상세히 기술되어 있다.

[0270] 사용 방법

[0271] 본원에 제공된 다분지형 중합체 전구 약물은 임의의 동물 구체적으로, 포유동물 예를 들어, 인간에서 발생하는 변형되지 않은 활성 제제에 반응하는 임의의 증상을 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있다.

[0272] 본 발명의 다분지형 중합체 컨쥬게이트는 항암제로서 특히 유용한데, 즉, 본원에 제공된 각각의 생체 내 연구에 의해 입증되는 바와 같이, 임의의 고형 종양의 성장을 상당 수준 늦추는데 유효한 것으로 보인다. 다시 말해서, 소분자 약물이 항암제 예를 들어, 캠토테신 화합물이거나 기타 종양 분해 약물 예를 들어, 도세탁셀일 때, 본원에 제공된 컨쥬게이트는 암을 치료하는데 사용될 수 있다. 본원에 제공된 다분지형 중합체 알카노에이트 컨쥬게이트를 투여함으로써 치료하는 방법에 적당한 암의 종류로서는 유방암, 난소암, 결장암, 대장결장암, 전립선암, 위암, 악성 흑색종, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 갑상선암, 신장암, 담관암, 뇌암, 두경부 암, 럼프종, 백혈병, 횡문근육종 및 신경아세포종 등을 포함한다. 본 발명의 다분지형 중합체 컨쥬게이트는 고형 종양을 표적화하고 이 고형 종양 내에 축적되는데 특히 효과적이다. 다분지형 중합체 컨쥬게이트는 또한 HIV와 기타 바이

러스의 치료에 유용하다.

[0273] 다분지형 중합체 컨쥬케이트는 또한 난치성 암 즉, 기타 여러가지 치료법에 반응하지 않는 암이 발병한 환자에서 항종양 활성을 개선시킬 수도 있다. 뿐만 아니라, 다분지형 중합체 컨쥬케이트를 투여함에 따른 추가의 이점은, 변형되지 않은 활성 제제를 투여한 경우와 비교하였을 때 환자 체 내 골수 억제 현상이 발생할 가능성이 감소한다는 점이다.

[0274] 본 발명의 치료 방법은 본원에 제공된 다분지형 중합체 컨쥬케이트를 함유하는 조성물 또는 제형을 이것의 투여를 필요로 하는 포유동물에게 치료학적으로 유효량만큼 투여하는 단계를 포함한다. 임의의 특정 다분지형 중합체 컨쥬케이트의 치료학적 유효 투여량은 컨쥬케이트에 따라서, 그리고 환자에 따라서 달라질 것이며, 환자의 상태, 사용된 특정 활성 제제의 활성, 전달 경로 및 치료될 증상과 같은 요인들에 따라서 달라질 것이다.

[0275] 캠토테신류 활성 제제의 경우, 그 투여량은 체중 1kg당 캠토테신 약 0.5 ~ 약 100mg, 바람직하게는 체중 1kg당 약 10.0 ~ 약 60mg이다. 탁산류 활성 제제의 경우, 그 투여량은 탁산 부위의 양을 기준으로 하였을 때, 약 5 ~ 약 500mg/m², 바람직하게는 약 25 ~ 약 125mg/m²이다. 기타 약학적으로 활성인 제제와 함께 투여될 때에는, 이보다 훨씬 적은 양의 다분지형 중합체 컨쥬케이트만이 치료학적으로 유효할 수 있다. 상기 제시한 범위는 예시적인 것으로서, 당업자는 임상 경험과 구체적인 치료 징후를 바탕으로 하여 다분지형 중합체 컨쥬케이트의 최적 투여량을 결정할 것이다.

[0276] 치료 방법은 또한, 제2 항암제와 함께, 본원에 개시된 항암제 예를 들어, 캠토테신 또는 탁산 화합물의 다분지형 중합체 컨쥬케이트를 포함하는 조성물 또는 제형을 치료학적 유효량으로 투여하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 대장결장암을 치료함에 있어서, 캠토테신류 또는 도세탁셀류 화합물의 다분지형 중합체 전구 약물을, 화학요법제 예를 들어, 5-플루오로우라실 또는 루코보린 젤로다, 또는 제제 예를 들어, 아바스틴, 엘비툭스®(Erbitux®)(세툭시맙) 또는 벡티빅스™(Vectibix™)(파니투무맙)와 함께 투여할 수 있다. 유방암 치료에 있어서, 치료 방법은 본원에 개시된 다분지형 중합체 컨쥬케이트를, 선택적으로는 젤로다, 파클리탁셀, 도세탁셀 또는 아브락산과 함께 투여하는 단계를 포함한다. 폐암의 치료에 있어서, 치료 방법은 본 발명의 다분지형 중합체 컨쥬케이트를 투여함과 동시에, cis-플라틴, 카보플라틴, 켐시타빈, 알림프타 및 도세탁셀을 투여하는 단계를 포함할 수 있다(후자의 경우, 다분지형 중합체 컨쥬케이트 자체는 도세탁셀을 포함하지 않음).

[0277] 하나의 구체예에서, 본원에 개시된 바와 같은 다분지형 중합체 캠토테신 함유 컨쥬케이트는 미국 특허 제 6,403,569호에 개시된 바와 같이, 5-플루오로우라실 및 엽산과 함께 투여된다.

[0278] 본 발명의 다분지형 중합체 컨쥬케이트는 1일 1회 또는 수 회, 바람직하게는 1일 1회 이하로 투여하는 것이 바람직하다. 예시적 투여 스케줄로서는 1주일에 1회, 2주일에 1회 또는 3주일에 1회를 포함한다. 유지량의 경우에는, 3주일에 1회보다 훨씬 적은 횟수 예를 들어, 1개월에 1회 투여될 수 있다. 치료 지속 기간은 2 ~ 3주의 기간 동안 1일 1회일 수 있으며, 수 개월 내지 심지어는 수년 동안 지속될 수도 있다. 1일 투여량은 개별 투여 단위 형태 또는 이보다 적은 양의 투여 단위를 여러 개로 나눈 형태로 단일 투여될 수 있거나, 또는 임의의 간격을 두고 세부적으로 나눈 투여형들을 복수 회 나누어 투여함으로써 투여될 수 있다.

[0279] 본원에 제공된 다분지형 중합체 컨쥬케이트는, 다분지형 중합체 알카노에이트 주체를 포함하지 않는 해당 비변형 소분자 약물을 투여할 경우에 비하여, 효능과 내약성이 개선되고, 비이를 관련 독성이 감소된다.

[0280] 본 발명을 뒷받침하고 있는 실시예에는 다양한 종류의 암에 대한 생체 내 다양한 마우스 이종 이식편 모델 내에서의 대표적인 다분지형 중합체 알카노에이트 컨쥬케이트 항종양 활성에 관하여 예시되어 있다. 실시예 13에 상세히 기술되어 있는 바와 같이, 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC는 도세탁셀 자체를 투여하였을 경우보다 H460 및 LS174T 마우스 이종 이식편 모델 내에서 항종양 활성이 훨씬 증가하였음을 알 수 있다. 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC에 대해 관찰된 3개의 세포주 중 2개의 세포주에서는 부분적인 퇴행 현상을 보였던 반면에, 도세탁셀에 대해 관찰된 세포주에서는 퇴행 현상이 나타나지 않았다. 뿐만 아니라, 실시예 13에 나타낸 바와 같이, H460, LoVo 및 LS174T 이종 이식편 모델에서, 최대 내성 용량으로 투여하였을 때, 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC에 대한 종양 성장 지연율(TGD)은 도세탁셀에 대한 종양 성장 지연율보다 2.5배, 2.0배 및 1.6배 증가하였는데, 이러한 점들은 모두 본원에 제공된 다분지형 컨쥬케이트가 훨씬 우수함을 입증하는 것이다.

[0281] 본 발명은 본원의 바람직한 특정 구체예들과 함께 기술되었으며, 또한 전술한 상세한 설명 및 이하 실시예들은 본 발명의 범위를 예시하고자 하는 의도로 기술되었지 본 발명의 범위를 한정하고자 하는 목적으로 기술된 것은 아님을 이해해야 할 것이다. 본 발명의 범위에 포함되는 기타 측면, 이점 및 변형예는 본 발명이 속하는 분야의

당업자들에게 명백할 것이다.

[0282] 실시예

달리 언급이 없는 한, 본 발명을 실시함에 있어서는 당업자에게 통상적인 유기 합성 기술등을 사용할 것이다. 이와 같은 기술들은 문헌에 자세히 기술되어 있다. 시약과 재료는 특별히 반대로 언급되어 있지 않다면 시판되는 것을 사용한다(예를 들어, 문헌[M. B. Smith and J. March, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure*, 6th Ed. (New York: Wiley-Interscience, 2007), 상동, 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 참조).

[0284] 이하 실시예에서는, 사용된 수치(예를 들어, 양, 온도 등)에 정확성을 기하기 위해 노력하였으나, 일부 실험상의 오차와 편차를 고려할 필요도 있다. 달리 지정하지 않는 한, 온도는 °C로 나타내었고, 압력은 해수면에서 측정한 대기압 또는 이 대기압과 가까운 기압으로 나타내었다.

[0285] 이하 실시예에서는 본 발명의 임의의 측면들과 이점들을 기술하고 있으나, 본 발명은 이하 기술된 특정 구체예에 한정되는 것으로 간주하여서는 절대 안된다.

[0286] 축약어

[0287] CM 카복시메틸 또는 카복시메틸렌(-CH₂COOH)

[0288] DCC 1,3-디시클로헥실카보디이미드

[0289] DCM 디클로로메탄

[0290] DIC N,N'-디이소프로필카보디이미드

[0291] DPTS 4-(디메틸아미노)-피리디늄-p-톨루엔설포네이트

[0292] DMF 디메틸포름아미드

[0293] DMAP 4-(N,N-디메틸아미노)페리딘

[0294] DMSO 설록시화디메틸

[0295] DI 탈이온화된

[0296] HCl 염산

[0297] HOBT 하이드록시벤질트리아졸

[0298] HPLC 고성능 액체 크로마토그래피

[0299] IPA 이소프로필 알코올

[0300] K 또는 kDa 칼로달톤

[0301] MALDI-TOF 매질 보조 레이저 탈착 여기 비행 시간 질량 분석기

[0302] MeOH 메탄올

[0303] MW 분자량

[0304] NMR 핵 자기 공명법

[0305] RT 실온

[0306] SCM 숙신이미딜카복시메틸(-CH₂-COO-N-숙신이미딜)

[0307] SDS-PAGE 도데실 황산나트륨-폴리아크릴아미드 겔 전기 영동

[0308] SEC 크기 배제 크로마토그래피

[0309] TFA 트리플루오로아세트산

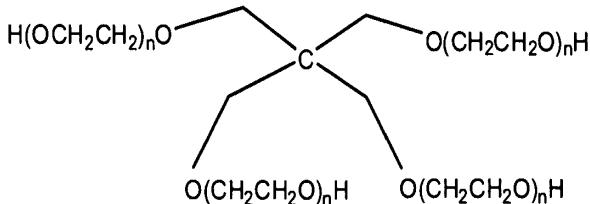
[0310] THF 테트라하이드로푸란

[0311] TLC 박막 크로마토그래피

[0312] 재료 및 방법

[0313] 중화 인민 공화국의 항저우 HETD Pharm & Chem Co., Ltd로부터 도세탁셀(탁소텔®)을 구입하였다.

[0314] 펜타에리트리톨계 4-ARM-PEG_{10K}-OH, 4-ARM-PEG_{20K}-OH, 4-ARM-PEG_{30K}-OH, 및 4-ARM-PEG_{40K}-OH를 NOF 코포레이션(일본)으로부터 구입하였다. 4-ARM-PEG_{20K}-OH는 이하에 나타낸 바와 같은 구조를 갖는, 구조식 C-(CH₂O-(CH₂CH₂O)_nH)₄을 갖는다:



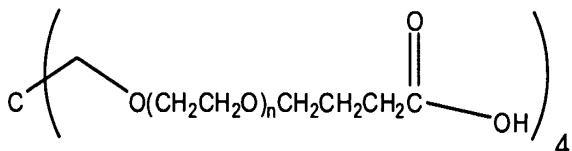
[0315]

[0316] 각각의 분지에 있어서, 변수 "n"은 PEG 평균 분자량 2.5, 5, 7.5 또는 10 킬로달톤에 해당하는 단량체 서브유닛들의 수를 나타내므로, 4-분지 구조에 대한 약칭은 각각 분자량 10, 20, 30 또는 40 킬로달톤인 분자의 종합체 부분에 대한 전체 평균 분자량을 나타낸다.

[0317] 모든 ¹HNMR 데이터는 브룩커(Bruker)에 의해 제조된 300 또는 400 MHz NMR 분광계를 사용하여 얻어진 것이다.

[0318] 실시예 1

[0319] 4-ARM-PEG_{20K}-부탄산("4-ARM-PEG_{20K}-BA")의 합성



[0320]

[0321] 톨루엔(750ml) 중 펜타에리트리톨계 4-ARM-PEG_{20K}-OH(100.0g, 0.020당량)(NOF 코포레이션) 용액을 150ml의 톨루엔을 증류하여 공비 건조하였다. 여기에 *tert*-부탄올(60ml, 0.060몰) 중 *tert*-부톡시화칼륨 1.0M 용액 및 1-(3-브로모프로필)-4-메틸-2,6,7-트리옥사비시클로[2.2.2]옥탄(12.6g, 0.052몰)을 첨가하고, 그 혼합물을 밤새도록 아르곤 대기 하에 70°C에서 교반하였다. 감압 하에서 용제를 증류하고, 잔류물을 증류수(1,000ml) 중에 용해하였다. 5% 인산을 사용하여 이 용액의 pH를 2로 맞추고, 용액을 실온에서 15분 동안 교반하였다. 그 다음, 여기에 1M 수산화나트륨을 첨가하여 pH를 12로 다시 맞춘 후, 1M 수산화나트륨을 주기적으로 첨가하여 pH를 12로 유지시키면서 이 용액을 2시간 동안 교반하였다. 이후, 여기에 5% 인산을 가하여 pH를 3으로 맞추고, 생성물을 디클로로메탄으로 추출하였다.

[0322] 추출물을 무수 황산마그네슘에서 건조하고 여과한 다음, 이를 이소프로필 알코올에 첨가하였다. 감압 하에서, 침전된 생성물을 여과에 의해 분리하고 건조하였다.

[0323] 수득량 95.0g. ¹H NMR (d₆-DMSO): δ 1.72 ppm (q, CH₂-CH₂-COO-), 2.24 ppm (t, -CH₂-COO-), 3.51 ppm (s, PEG 주쇄). 치환율 = ~100% (이는 곧, NMR 방법의 정확도 내에서, 4-ARM-PEG 출발 물질의 각 분지 말단에 존재하는 각 OH-기가, 상응하는 부탄산으로 전환되었음을 의미함).

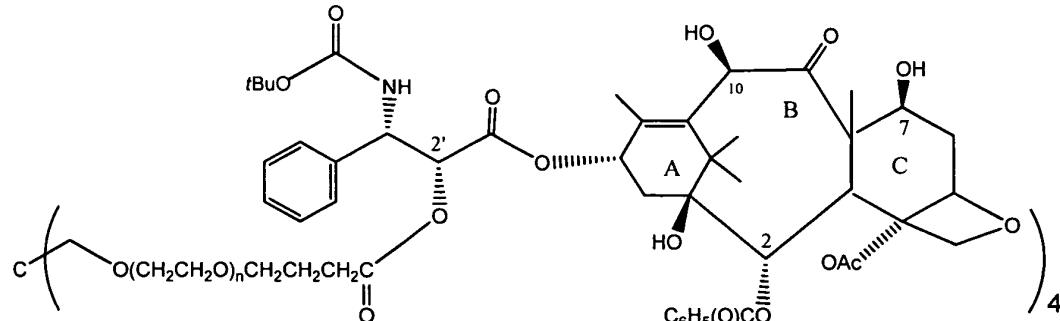
[0324]

실시예 2

[0325]

4-ARM-PEG_{20K}-부타노에이트 결합 도세탁셀 컨쥬게이트

[0326]

("4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC")의 합성

[0327]

[0328]

4-ARM-PEG_{20K}-부탄산(5.0g, 0.0010당량, 실시예 1) 용액에 도세탁셀(1.0g, 0.0012몰)과, 무수 디클로로메탄 60ml 중 p-톨루엔설�onium 4-디메틸아미노페리딘 염(0.15g, 0.00051몰), N,N'-디이소프로필카보디이미드(0.63g, 0.005몰)을 첨가한 다음, 이 혼합물을 아르곤 대기 하에 실온에서 밤새도록 교반하였다. 감압 하에서 용체를 증류하였다. 잔류물을 디클로로메탄(7.5ml) 중에 용해하고, 이를 이소프로필 알코올과 디에틸 에테르의 1:1 혼합물(100ml)에 첨가하였다. 감압 하에서, 침전된 생성물을 여과하고 건조하였다. 침전을 반복 수행한 결과, 백색 고체 생성물 3.8g이 얻어졌다.

[0329]

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.06 (s, 12H), 1.16 (s, 12H), 1.27 (s, 36H), 1.68 (s, 12H), 1.84 (m, 8H), 2.20-2.60 (m, 14H), 3.30-3.80 (m, ~1900H), 3.90 (d, 4H), 4.12 (d, 4H), 4.20 (m, 4H), 4.26 (d, 4H), 4.97 (d, 4H), 5.15 (s, 4H), 5.28 (s, 4H), 5.38 (m, 8H), 5.62 (d, 4H), 6.30 (t, 4H), 7.24 (m, 8H), 7.30 (m, 8H), 7.44 (m, 8H), 7.54 (m, 4H), 8.04 (d, 8H).

[0330]

용제 CDCl₃ 중에서 생성물을 NMR 분석한 결과, 4ARM-PEG_{20K}-부탄산(4-ARM-PEG_{20K}-BA)의 각 분자에는 도세탁셀 4 분자가 결합되어 있음을 알 수 있었다. 치환율: 약 98 ~ 100%.

[0331]

실시예 3

[0332]

4-ARM-PEG_{20K}-글리신(펜타에리트리톨릴-4-ARM-

[0333]

(PEG-1-메틸렌-2-옥소-비닐아미노아세트산)-20K)

[0334]

("4-ARM-PEG_{20K}-CM-GLY")의 합성

[0335]

이하 실시예는 실시예 1에 기술된 4-ARM-PEG-OH 출발 물질 상 약물(즉, 도세탁셀)의 치환 발생 정도를 비교하기 위한 기초 자료로서 제공되는 것으로서, 즉, 4-ARM-PEG_{20K}-부탄산의 경우와 4-ARM-PEG_{20K}-CM-글리신의 경우를 비교한 결과이다.

[0336]

A. 4-ARM-PEG_{20K}-아세트산(4-ARM-PEG_{20K}-CM)의 합성

[0337]

톨루엔(750ml) 중 펜타에리트리톨릴 4-ARM-PEG_{20K}-OH(100.0g, 0.020당량)(NOF 코포레이션) 용액을 150ml의 톨루엔을 증류하여 공비 건조하였다. tert-부탄올(60ml, 0.060몰) 중 tert-부톡시화칼륨의 1.0M 용액 및 브로모아세트산tert-부틸(12.9g, 0.066몰)을 첨가하고, 이 혼합물을 아르곤 대기 하에 45°C에서 밤새도록 교반하였다. 용체를 감압 하에서 증류하고, 잔류물을 증류수(1,000ml) 중에 용해하였다. 이 용액에 1M의 수산화나트륨을 첨가하여 용액의 pH를 12로 맞추고, 1M의 수산화나트륨을 주기적으로 첨가하여 pH를 12.0으로 유지시키면서 상기 용액을 밤새도록 교반하였다. 이후, 1M의 인산을 첨가하여 pH를 2로 맞추었다. 결과로 생성된 생성물인 4-ARM-PEG_{20K}-아세트산("4-ARM-PEG_{20K}-CM"이라고도 함)을 디클로로메탄으로 추출하였다. 추출물을 무수 황산나트륨에서 건조, 여과 및 농축하였다. 이후 농축된 추출물을 에틸 에테르에 첨가하였다.

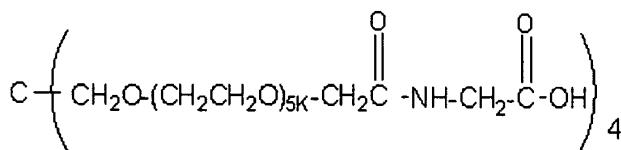
[0338] 감압 하에서, 침전된 생성물을 여과하여 수집하고, 이를 건조하였다. 수득량 95.5g. ^1H NMR ($\text{d}_6\text{-DMSO}$): δ 3.51 ppm (s, PEG 주쇄), 4.01 ppm (s, $-\text{CH}_2-\text{COO}-$). 치환율 100%. 치환율 = ~100% (이는 곧, NMR 방법의 정확도 내에서, 4-ARM-PEG 출발 물질의 각 분자 말단에 존재하는 각 OH^- 기가, 상응하는 아세트산으로 전환되었음을 의미함).

[0339] B. 4-ARM-PEG_{20K}-아세트산, N-하이드록시숙신이미드 에스테르(NHS)의 합성

[0340] 4-ARM-PEG_{20K}-아세트산(90.0g, 0.018당량)을 디클로로메탄(270ml) 중에 용해하고, 여기에 N-하이드록시숙신이미드(2.20g, 0.019몰)를 첨가하였다. 그 다음, 디시클로헥실카보디이미드(4.13g, 0.020몰)를 첨가한 후, 이 용액을 실온에서 밤새도록 교반하였다. 반응 혼합물을 여과 및 농축하고, 이소프로필 알코올을 첨가하여 침전시켰다.

[0341] 최종 생성물의 수득량: 82g. ^1H NMR ($\text{d}_6\text{-DMSO}$): δ 2.81 ppm (s, 숙신이미드), 3.51 ppm (s, PEG 주쇄), 4.60 ppm (s, $-\text{CH}_2-\text{COO}-$). 치환율 100%.

[0342] C. 4-ARM-PEG_{20K}-CM-글리신("4-ARM-PEG_{20K}-CM-GLY")의 합성



[0343]

[0344] 4-ARM-PEG_{20K}-CM-글리신

[0345] 4-ARM-PEG_{20K}-아세트산, N-하이드록시숙신이미드 에스테르(80.0g, 0.016 당량)를 디클로로메탄(240ml) 중에 용해하고, 여기에 글리신, tert-부틸 에스테르 염산염(3.22g, 0.019몰)을 첨가하였다. 그 다음, 트리에틸아민(6.90g)을 첨가하고, 용액을 실온에서 밤새도록 교반하였다. 감압 하에서 디클로로메탄 160ml를 중류한 다음, 트리플루오로아세트산 80ml를 첨가하여, 이 반응 혼합물을 농축하였다. 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반한 다음, 감압 하에서 중류하여, 디클로로메탄과 트리플루오로아세트산을 제거하였다. 미정제 생성물을 120ml 디클로로메탄에 용해하고, 여기에 이소프로필 알코올을 첨가하여 침전시켰다.

[0346] 침전물, (4-ARM-PEG_{20K}-CM-GLY)를 수집하여 건조한 결과, 백색 고체 생성물 74g을 얻었다. ^1H NMR (CDCl_3): δ 3.64 ppm (s, PEG 주쇄), 4.05 ppm (s, $-\text{CH}_2-\text{COO}-$), 4.09 ppm (d, $-\text{CH}_2-$, 글리신). 치환율 ~100%.

실시예 4

[0348] 4-ARM-PEG_{20K}-CM-글리신 결합 도세탁셀 컨쥬게이트

[0349] ("4-ARM-PE-PEG_{20K}-CM-GLY-DOC")의 합성

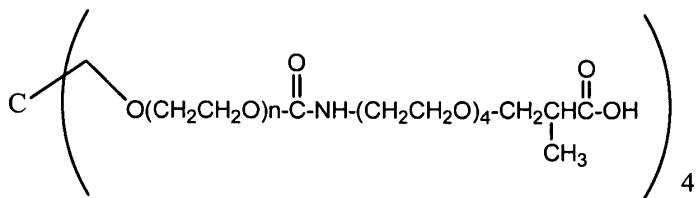
[0350] 무수 디클로로메탄 60ml 중 4-ARM-PEG_{20K}-아세테이트 결합 글리신(4-ARM-PEG_{20K}-CM-GLY, 5.0g, 0.0010당량), 도세탁셀(1.0g, 0.0012몰), 및 p-톨루엔설폰산 4-디메틸아미노노프리딘 염(1.5g, 0.0051몰) 용액에, N,N'-디이소프로필카보디이미드(0.63g, 0.005몰)를 첨가하고, 이 혼합물을 아르곤 대기 하에 실온에서 밤새도록 교반하였다. 감압 하에서 용제를 중류하였다. 잔류물을 디클로로메탄(7.5ml) 중에 용해하고, 이를 이소프로필 알코올과 디에틸 에테르의 1:1 혼합물(100ml)에 첨가하였다. 감압 하에서, 침전된 생성물을 여과 및 건조하였다. 반복하여 침전시킨 결과, 백색 고체 생성물 3.7g이 얻어졌다.

[0351] 생성물(4-ARM-PEG_{20K}-CM-GLY-DOC)의 CDCl_3 (용제) 중 NMR 분석 결과를 통하여, 치환율이 약 75%임을 알 수 있었다. 이는 곧, 4-ARM-PEG_{20K}-CM-GLY의 각 문자가, 원하는 바와 같이 4개가 아닌 약 3개의 도세탁셀 문자와 연결되었음을 의미하는 것이다.

[0352] 실시예 5

[0353] 추가의 4-ARM-PEG_{10K}-CM-글리신 결합 도세탁셀 컨쥬케이트("4-ARM-PE-PEG_{10K}-CM-GLY-DOC")의 합성:[0354] 4-ARM-PEG_{10K}-CM-글리신 결합 도세탁셀 컨쥬케이트를, 이 컨쥬케이트의 분자량 즉, 출발 펜타에리트리톨계 4-ARM-PEG-OH의 평균 분자 질량이 10kDa 이라는 것을 제외하고는 전술한 바와 유사한 방식으로 제조하였다.[0355] 4ARM-PEG_(10k)-글리신 결합 도세탁셀의 ¹H NMR 분석 결과, 치환율은 약 84%이었음을 알 수 있었다.

[0356] 실시예 6

[0357] 4-ARM-PEG_{20K}-TEG-α-메틸프로피온산[0358] ("4-ARM-PEG_{20K}-TEG-α-MPA")의 합성

[0359]

[0360] I. 테트라(에틸렌 글리콜)-(α-아민, 황산염)-ω-(α-메틸프로피온산, 메틸 에스테르)의 합성

[0361] A. 테트라(에틸렌 글리콜) 모노-α-메틸프로피오니트릴

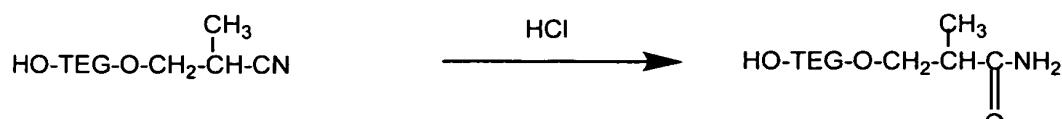


[0363] 감압 하에서 테트라(에틸렌 글리콜), "TEG"(194.2g, 1.0몰), 브롬화테트라부틸암모늄(9.6g) 및 톨루엔(350ml)의 혼합물을 톨루엔을 증류하여 공비 건조하였다. 고체 수산화칼륨(분말, 2.2g)을 첨가한 다음 이 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 그 다음, 2시간 동안 메타크릴로니트릴(50ml)을 적가하고, 이 반응 혼합물을 아르곤 대기 하에 실온에서 92시간 동안 교반하였다. 미정제 생성물을 1500ml의 탈이온수 중에 용해하고, 결과로 생성된 용액을 활성 탄소(50g)와, 앰버라이트 IR(Amberlite IR) 120(500ml) + 앰버라이트 IR 67로 구성된 탈염 컬럼에 통과시켜 여과하였다. 염화나트륨(300g)을 첨가한 다음, 디클로로메탄(500, 300 및 200ml)으로 생성물을 추출하였다. 감압 하에서, 추출물을 건조($MgSO_4$)한 다음, 용제를 증류하였다.

[0364] 수득량: 54.0g. ¹H NMR (D2O): δ 1.21 ppm (d, $\text{CH}_3-\text{C}-$), 3.00 ppm (m, -CH-CN), 3.62 ppm (bm, -OCH₂CH₂O-).

순도: ~100%.

[0365] B. 테트라(에틸렌 글리콜)모노-α-메틸프로피온아미드

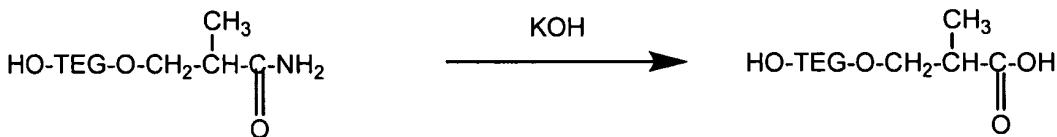


[0366]

[0367] 테트라(에틸렌 글리콜) 모노-α-메틸프로피온니트릴(54g)을 진한 염산(180ml) 중에 용해하고, 결과로 생성된 용액을 실온에서 20시간 동안 교반하였다. 여기에 탈이온수(250ml)를 첨가하고, 7 ~ 8°C에서 수산화나트륨 10% 용액을 사용하여 pH를 7.6으로 맞추었다. 감압 하에서 물을 증류하고, 무수 에틸알코올(200ml)을 사용하여 고체 잔류물로부터 생성물을 추출하였다. 이 추출물로부터 에틸알코올을 증류하고, 미정제 생성물을 디클로로메탄(150ml) 중에 용해하였다. 감압 하에서, 이 용액을 무수 $MgSO_4$ 로 건조하고 용제를 증류하였다.

[0368] 수득량: 53.3g. ^1H NMR (D_2O): δ 0.89 ppm (d, $\text{CH}_3-\text{C}-$), 2.55 ppm (m, $-\text{CH}-(\text{C=O})\text{NH}_2$), 3.47 ppm (bm, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$). 순도: ~100%.

[0369] C. 테트라(에틸렌 글리콜) 모노- α -메틸프로피온산

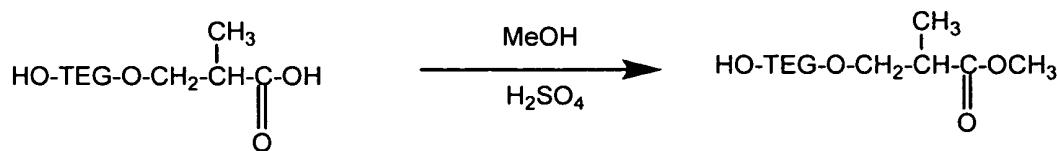


[0370]

[0371] 테트라(에틸렌 글리콜) 모노- α -메틸프로피온아미드(45g)를 수산화칼륨 용액(농도 6.67%, 450ml) 중에 용해한 다음, 결과로 생성된 용액을 실온에서 70시간 동안 교반하였다. 그 다음, 여기에 7 ~ 8°C의 온도에서 10% 인산을 첨가하여 반응 혼합물의 pH를 7.5로 맞추었다. 감압 하에서 물을 증류하고, 무수 에틸알코올(300ml)을 사용하여 고체 잔류물로부터 생성물을 추출하였다. 이후, 에틸알코올을 추출물로부터 증류하였다. 미정제 생성물을 탈이온수(50ml) 중에 용해한 다음, 불순물을 디클로로메탄(4 x 100ml)으로 추출하였다. 여기에 NaCl(10g)을 첨가하고, 10% 염산을 사용하여 이 용액의 pH를 3.0으로 맞추었다. 디클로로메탄(100, 100 및 80ml)으로 생성물을 추출하였다. 감압 하에서, 무수 MgSO_4 를 사용하여 추출물을 건조하고, 용제를 증류하였다.

[0372] 수득량: 25.3g. ^1H NMR (D_2O): δ 1.06 ppm (d, $\text{CH}_3-\text{C}-$), 2.73 ppm (m, $-\text{CH}-\text{COO}-$), 3.60 ppm (bm, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$). 순도: ~100%.

[0373] D. 테트라(에틸렌 글리콜)모노- α -메틸프로피온산, 메틸 에스테르

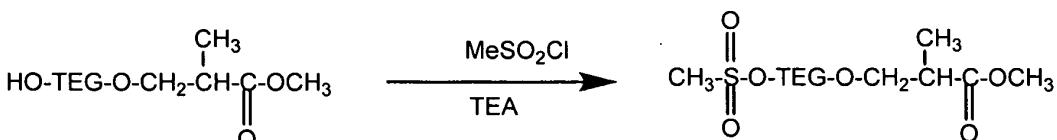


[0374]

[0375] 테트라(에틸렌 글리콜)모노- α -메틸프로피온산(25g)을 무수 메틸 알코올(350ml) 중에 용해하고, 여기에 진한 황산(6.5ml)을 첨가한 다음, 이 용액을 실온에서 3 시간 동안 교반하였다. 감압 하에서 8% NaHCO_3 수용액을 사용하여 반응 혼합물의 pH를 6.0으로 맞추고, 메틸 알코올을 증류하였다. 디클로로메탄(100, 80 및 50ml)을 사용하여 생성물을 추출하였다. 감압 하에서, 무수 MgSO_4 로 추출물을 건조하고, 용제를 증류하였다.

[0376] 수득량: 24.0g. ^1H NMR ($\text{d}_6\text{-DMSO}$): δ 1.06 ppm (d, $\text{CH}_3-\text{C}-$), 2.69 ppm (m, $-\text{CH}-\text{COO}$), 3.47 ppm (bm, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 360 ppm (s, $\text{CH}_3\text{O}-$). 순도: ~100%.

[0377] E. 테트라(에틸렌 글리콜)- α -메실레이트- ω -(α -메틸프로피온산, 메틸 에스테르)



[0378]

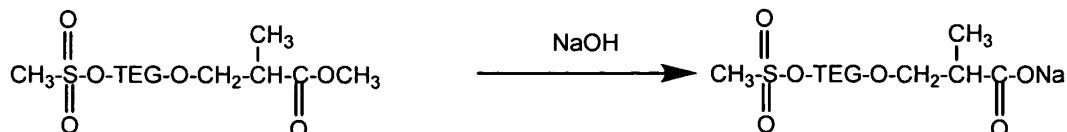
[0379] 감압 하에서 테트라(에틸렌 글리콜)모노- α -메틸프로피온산, 메틸 에스테르(24g, 0.0815몰) 및 톨루엔(240ml)의 혼합물을 톨루엔을 증류하여 공비 건조하였다. 건조된 무수 테트라(에틸렌 글리콜)모노- α -메틸프로피온산, 메틸 에스테르를 무수 톨루엔(200ml) 중에 용해하였다. 이 용액에 무수 디클로로메탄 40 ml와 트리에틸아민(0.0897몰) 12.5ml를 첨가하였다. 이후, 0 ~ 5°C에서, 디클로로메탄(50ml) 중에 용해된 염화메탄설포닐(0.0873몰) 10.0g을 적가하였다. 아르곤 대기 하에 실온에서 이 용액을 밤새도록 교반하였다. 그 다음, 탄산나트륨(10g)을 첨가한 후, 이 혼합물을 1시간 동안 교반하였다. 이후, 감압 하에서, 이 용액을 여과하고, 용제를 증류하였다.

[0380] 수득량: 28.3g. ^1H NMR ($\text{d}_6\text{-DMSO}$): 1.06 ppm (d, $\text{CH}_3-\text{C}-$), 2.70 ppm (m, $-\text{CH}-\text{COO}-$), 3.18 ppm (s, CH_3- , 메탄

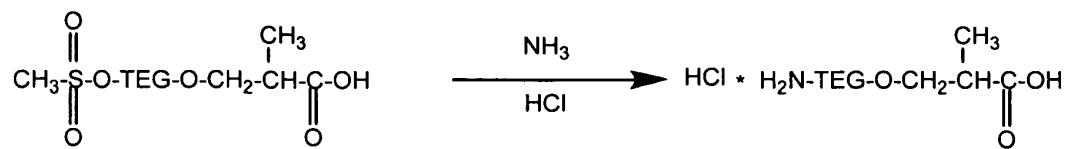
설포네이트), 3.49 ppm (bm, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3.60 ppm (s, $\text{CH}_3\text{O}-$), 3.67 ppm (m, $-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-$ 메탄설포네이트), 4.31 ppm (m, $-\text{CH}_2-$ 메탄설포네이트). 순도: ~100%.

[0381]

F. 테트라(에틸렌 글리콜)-(α-아미노, 염산염)-ω-(α-메틸프로파온산)



[0382]



[0383]

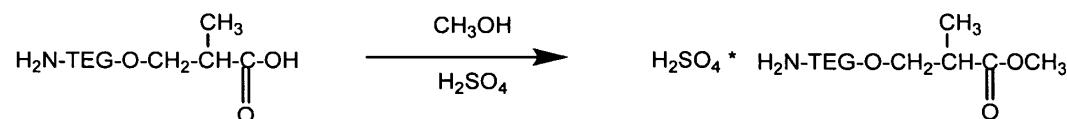
pH를 12.0 ~ 12.3으로 유지하면서, 6시간 동안, 테트라(에틸렌 글리콜)-α-메칠레이트-ω-(α-메틸프로파온산, 메틸 에스테르)(23.8g) 및 탈이온수(50ml)의 혼합물에, 5% NaOH 용액 70ml를 서서히 첨가하였다. 그 다음, 진한 수산화암모늄(1500ml)을 첨가한 후, 이 혼합물을 실온에서 64시간 동안 교반하였다. 이후, 감압 하에서 이 혼합물을 농축하여 건조하였다. 잔류물을 탈이온수(150ml) 중에 용해하고, 1M HCl을 사용하여 이 용액의 pH를 3.0으로 맞추었다. 감압 하에서 물을 증류하고, 미정제 생성물을 디클로로메탄(150ml) 중에 용해하였다. 감압 하에서, 이 용액을 여과하고, 무수 MgSO_4 로 건조한 다음, 용제를 증류하였다.

[0385]

수득량: 19.4g. ^1H NMR (D_2O): 1.06 ppm (d, $\text{CH}_3-\text{C}-$) 2.72 ppm (m, $-\text{CH}-\text{COO}-$), 3.13 ppm (t, $-\underline{\text{CH}_2}-\text{NH}_2 * \text{HCl}$), 3.64 ppm (bm, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$). 순도: ~100%.

[0386]

G. 테트라(에틸렌 글리콜)-(α-아민, 황산염)-ω-(α-메틸프로파온산, 메틸 에스테르)



[0387]

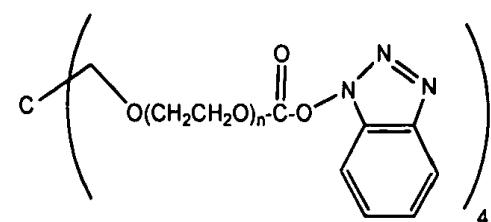
테트라(에틸렌 글리콜)-(α-아민, 염산염)-ω-(α-메틸프로파온산)(19.4g)을 무수 메틸 알코올(280ml) 중에 용해하고, 진한 황산(5.2ml)을 첨가한 다음, 이 용액을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 감압 하에, 8% NaHCO_3 수용액으로 반응 혼합물의 pH를 6.0으로 맞추고, 용제를 증류하였다. 미정제 생성물을 디클로로메탄(250ml) 중에 용해하였다. 감압 하에서, 이 용액을 무수 MgSO_4 로 건조한 다음, 용제를 증류하였다.

[0389]

수득량: 15.7g. ^1H NMR (D_2O): 1.04 ppm (d, $\text{CH}_3-\text{C}-$) 2.77 ppm (m, $-\text{CH}-\text{COO}-$), 3.11 ppm (t, $-\underline{\text{CH}_2}-\text{NH}_2 * \text{H}_2\text{SO}_4$), 3.62 ppm (bm, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$). 순도: ~100%.

[0390]

II. 4-ARM-PEG_{20K}-벤조트리아졸릴 카보네이트("4-ARM-PEG_{20K}-BTC")의 합성



[0391]

용제를 아세토니트릴(100ml) 중 펜타에리트리톨계 4-ARM-PEG_{20K}-OH (10.0g, 0.0020 당량)(NOF 코포레이션) 용액을 증류하여 공비 건조하였다. 그 다음, 생성물을 50ml의 무수 아세토니트릴 중에 다시 용해하고, 피리딘 (0.49ml) 및 디(1-벤조트리아졸릴) 카보네이트(트리클로로에탄 중 59% 분산액, 1.31g)를 첨가한 다음, 이 혼합물을 질소 대기 하에 실온에서 밤새도록 교반하였다. 감압 하에서 용제를 증류한 다음, 이소프로필알코올로 생

성물을 침전시켰다. 감압 하에서, 침전된 생성물을 디클로로메탄(10ml) 중에 용해하고, 이소프로필 알코올로 다시 침전시킨 다음, 여과 및 건조하였다.

[0393] 수득량 9.8g. ^1H NMR ($\text{d}_6\text{-DMSO}$): 3.51 ppm (s, 중합체 주쇄), 4.62 ppm (m, PEG-OCH₂-CH₂-OCO₂- 2H), 7.41-8.21 ppm (착물 다량체, 벤조트리아졸 양자, 4H). 치환율 = ~100% (이는 곧, NMR 방법의 정확도 내에서, 4-ARM-PEG 출발 물질의 각 분자 말단에 존재하는 각 OH- 기가, 상응하는 벤조트리아졸릴 카보네이트 기로 전환되었음을 의미함).

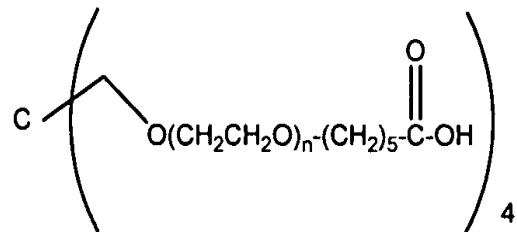
[0394] III. 4-ARM-PEG_{20k}-TEG- α-메틸프로피온산("4-ARM-PEG_{20k}-TEG- α-MPA")의 합성

[0395] 무수 디클로로메탄(80ml) 중 테트라(에틸렌 글리콜)-(α-아민, 황산염)-ω-(α-메틸프로피온산, 메틸에스테르)(0.75g) 용액에, 트리에틸아민(0.56ml)을 첨가한 다음, 고체 4-ARM-PEG_{20k}-벤조트리아졸릴 카보네이트 ("4-ARM-PEG_{20k}-BTC")(8.0g)를 일부씩 첨가하고, 결과로 생성된 용액을 아르곤 대기 하에 실온에서 밤새도록 교반하였다. 그 다음, 감압 하에서 이 용액을 농축하고, 생성물을 이소프로필 알코올로 침전시켜 진공 하에서 건조하였다. 그 다음, 이를 중류수(200ml)에 용해하였다. 1M 수산화나트륨으로 이 용액의 pH를 12.1로 맞추고, 여기에 1M의 수산화나트륨을 주기적으로 첨가하여 pH를 12.1로 유지하면서 용액을 5시간 동안 교반하였다. 이후, NaCl(10g)을 첨가하고, 10% 인산을 첨가하여 pH를 3으로 맞춘 다음, 생성물을 디클로로메탄으로 추출하였다. 추출물을 무수 황산나트륨에서 건조하고, 여과 및 농축하였다. 이후, 농축된 추출물을 이소프로필 알코올에 첨가하였다.

[0396] 감압 하에서 침전된 생성물을 여과하여 수집하고 건조하였다. 수득량 7.4g. ^1H NMR ($\text{d}_6\text{-DMSO}$): δ 1.00 ppm (d, CH₃-C-), 2.55 ppm (m, -CH-COO-), 3.08 ppm (q, -CH₂N-NH-), 3.51 ppm (s, PEG 주쇄), 4.00 ppm (s, -CH₂-COO-), 7.16 ppm (t, -(C=O)-NH-). 치환율 ~100% (이는 곧, 4-ARM-PEG 출발 물질의 각 분자 말단에 존재하는 각 OH- 기가, 상응하는 메틸프로피온산으로 전환되었음을 의미함).

[0397] 실시예 7

[0398] 4-ARM-PEG_{20k}-헥산산("4-ARM-PEG_{20k}-HA")의 합성



[0399]

[0400] 무수 툴루엔(500ml) 중 펜타에리트리톨계 4-ARM-PEG_{20k}-OH(50.0g, 0.010당량)(NOF 코포레이션) 용액을 툴루엔을 중류하여 공비 건조하였다. 건조된 생성물을 무수 툴루엔(500ml) 중에 용해하고, *tert*-부탄올(30ml, 0.030몰) 중 *tert*-부톡시화칼륨 1.0M 용액과 1-(5-브로모펜닐)-4-메틸-2,6,7-트리옥사비시클로[2.2.2]옥坦(7.8g, 0.028몰)을 첨가한 다음, 이 혼합물을 아르곤 대기 하에 72°C에서 밤새도록 교반하였다. 감압 하에서 용체를 중류하고, 잔류물을 중류수(400ml) 중에 용해하였다. 10% 인산을 사용하여 이 용액의 pH를 2로 맞춘 다음, 용액을 실온에서 15분 동안 교반하였다. 그 다음, 1M의 수산화나트륨을 첨가하여 pH를 다시 12.5로 맞추고 나서, 여기에 1M의 수산화나트륨을 주기적으로 첨가하여 pH를 12.1 ~ 12.5로 유지하면서, 이 용액을 2시간 동안 교반하였다. 그 다음, 10% 인산을 첨가하여 pH를 3으로 맞추었으며, 생성물을 디클로로메탄으로 추출하였다.

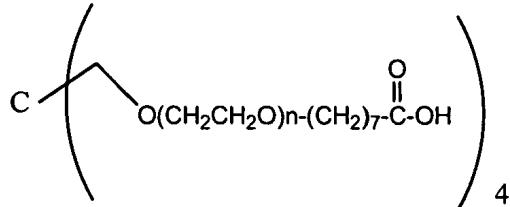
[0401] 감압 하에 무수 황산마그네슘에서 추출물을 건조하고, 여과 및 농축한 다음, 이를 에틸 에테르에 첨가하였다. 감압 하에서, 침전된 생성물을 여과로 분리하고 건조하였다.

[0402] 수득량: 48.5g. ^1H NMR ($\text{d}_6\text{-DMSO}$): δ 1.28 ppm (m, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COO-), 1.48 ppm (m, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COO-), 2.18 ppm (t, -CH₂-COO-), 3.51 ppm (s, PEG 주쇄). 치환율 = ~100% (이는 곧, 4-ARM-PEG

출발 물질의 각 분자 말단에 존재하는 각 OH- 기가, 상응하는 옥탄산으로 전환되었음을 의미함).

[0403] 실시예 8

[0404] 4-ARM-PEG_{20K}-옥탄산 ("4-ARM-PEG_{20K}-OA")의 합성



[0405] I. 3-메틸-3-옥세탄메탄올의 8-브로모옥타노에이트 에스테르의 합성

0 ~ 5°C로 냉각된 무수 디클로로메탄(500ml) 중 8-브로모옥타노(22.5g, 0.101몰), 3-메틸-3-옥세탄메탄올(11.0g, 0.108몰), 및 1-하이드록시벤조트리아졸(1.6g) 용액에, 무수 디클로로메탄(110ml) 중 N,N'-디시클록세 헬디카보디이미드(22.3g, 0.108몰) 용액을 45분에 걸쳐 적가하였다. 그 다음, 여기에 4-(디메틸아미노)피리딘(1.8g)을 첨가한 다음, 이 혼합물을 아르곤 대기 하에 실온에서 밤새도록 교반하였다. 이 용액을 여과하고, 5% 인산으로 2회 세정하였다(2 x 250ml). 그 다음, 무수 MgSO₄로 건조하고, 용제를 증류하였다. 미정제 생성물의 수득량은 28.0g이다.

II. 1-(7-브로모헵틸)-4-메틸-2,6,7-트리옥사비시클로[2.2.2]옥탄의 합성

3-메틸-3-옥세탄메탄올의 8-브로모옥타노에이트 에스테르(14.0g)를 무수 디클로로메탄(70ml) 중에 용해하고, 이 용액을 0 ~ 5°C로 냉각하였다. 여기에 붕소 삼플루오르화물 디에틸 에테르염(1.49ml)을 첨가하고, 이 혼합물을 0 ~ 5°C에서 4시간 동안 교반하였다. 여기에 또 트리에틸아민(7.2ml)을 첨가하고, 그 혼합물을 0 ~ 5°C에서 15분 동안 교반하였다. 감압 하에서 용제를 증류하였다. 잔류물을 에틸 에테르(200ml)중에 용해하고, 이 용액을 여과하였다. 그 다음, 상기 용제를 감압 하에서 증류하였다. 수득량 13.5g.

III. 4-ARM-PEG_{20K}-옥탄산의 합성

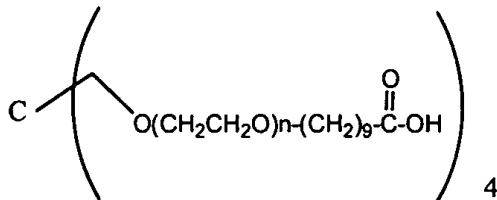
무수 툴루엔(200 ml) 중 펜타에리트리톨계 4-ARM-PEG_{20K}-OH(20.0g, 0.004당량)(NOF 코포레이션) 용액을 툴루엔을 증류하여 공비 건조하였다. 건조된 생성물을 무수 툴루엔(400ml) 중에 용해하고, 여기에 *tert*-부탄올(12ml, 0.012몰) 중 *tert*-부톡시화칼륨 1.0M 용액과 1-(7-브로모헵틸)-4-메틸-2,6,7-트리옥사비시클로[2.2.2]옥탄(3.7g, 0.012몰)을 첨가한 후, 이 혼합물을 아르곤 대기 하에 72°C에서 밤새도록 교반하였다. 감압 하에서 용제를 증류하고, 잔류물을 증류수(300ml)에 용해하였다. 10% 인산을 사용하여 이 용액의 pH를 2로 맞추고, 그 용액을 실온에서 45분 동안 교반하였다. 그 다음, 1M의 수산화나트륨을 첨가하여 pH를 12.5로 다시 맞춘 다음, 여기에 1M의 수산화나트륨을 주기적으로 첨가하여 pH를 12.1 ~ 12.5로 유지시키면서 이 용액을 3시간 동안 교반하였다. 그 다음, 10% 인산을 첨가하여 pH를 3으로 맞추고, 생성물을 디클로로메탄으로 추출하였다.

추출물을 감압 하 무수 횡산마그네슘에서 건조하고, 여과 및 농축한 다음, 이소프로필 알코올로 침전시켰다. 감압 하에서, 침전된 생성물을 여과하여 분리하고 이를 건조한 다음, 디클로로메탄(15ml) 중에 용해하고, 다시 이 소프로필 알코올로 재침전시켰다. 수득량 15.5g.

수득량 48.5g. ¹H NMR (*d*₆-DMSO): δ 1.25 ppm (m, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COO-), 1.47 ppm (m, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COO-), 2.15 ppm (t, -CH₂-COO-), 3.51 ppm (s, PEG 주체). 치환율 = ~100% (이는 곧, 4-ARM-PEG 출발 물질의 각 분자 말단에 존재하는 각 OH- 기가, 상응하는 옥탄산으로 전환되었음을 의미함).

[0414] 실시예 9

[0415]

4-ARM-PEG_{20K}-데칸산("4-ARM-PEG_{20K}-DA")의 합성

[0416]

I. 3-메틸-3-옥세탄메탄올의 10-브로모데카노에이트 에스테르의 합성

[0418]

0 ~ 5°C로 냉각시킨 무수 디클로로메탄(500ml) 중 10-브로모옥탄산(25.0g, 0.100몰), 3-메틸-3-옥세탄메탄올(10.9g, 0.107몰) 및 1-하이드록시벤조트리아졸(1.6g) 용액에, 무수 디클로로메탄(100ml) 중 N,N'-디시클록세힐디카보디이미드(22.1g, 0.107몰) 용액(110ml)을 45분에 걸쳐 적가하였다. 그 다음, 4-(디메틸아미노)피리딘(1.8g)을 첨가한 다음, 이 혼합물을 아르곤 대기 하에 실온에서 밤새도록 교반하였다. 이 용액을 여과하고, 5% 인산으로 2회 세정하였다(2 x 250ml). 그 다음, 이것을 무수 MgSO₄로 건조하고, 용제를 증류하였다. 수득량 29.0g.

[0419]

II. 1-(9-브로모노닐)-4-메틸-2,6,7-트리옥사비시클로[2.2.2]옥탄의 합성

[0420]

3-메틸-3-옥세탄메탄올(29.0g)의 10-브로모데카노에이트 에스테르를 무수 디클로로메탄(300ml) 중에 용해하고, 이 용액을 0 ~ 5°C로 냉각하였다. 여기에 봉소 삼플루오르화물 디에틸 에테르염(2.83ml)을 첨가하고, 이 혼합물을 0 ~ 5°C에서 4시간 동안 교반하였다. 여기에 트리에틸아민(13.7ml)을 첨가하고, 이 혼합물을 0 ~ 5°C에서 15분 동안 교반하였다. 감압 하에서 용제를 증류하였다. 잔류물을 에틸 에테르(400ml) 중에 용해하고, 이 용액을 여과하였다. 그 다음, 감압 하에서 용제를 증류하였다. 수득량 28.0g.

[0421]

III. 4-ARM-PEG_{20K}-데칸산의 합성

[0422]

무수 툴루엔(200 ml) 중 웬타에리트리톨계 4-ARM-PEG_{20K}-OH(20.0g, 0.004당량)(NOF 코포레이션) 용액을 툴루엔을 증류하여 공비 건조하였다. 건조된 생성물을 무수 툴루엔(400ml) 중에 용해하고, 여기에 *tert*-부탄올(12ml, 0.012몰) 중 *tert*-부톡시화칼륨 1.0M 용액과, 1-(9-브로모노닐)-4-메틸-2,6,7-트리옥사비시클로[2.2.2]옥탄(4.0g, 0.012몰)을 첨가한 다음, 이 혼합물을 아르곤 대기 하에 72°C에서 밤새도록 교반하였다. 이후, 용제를 감압 하에서 증류하고, 잔류물을 증류수(300ml) 중에 용해하였다. 이 용액에 10% 인산을 첨가하여 pH를 2로 맞춘 다음, 실온에서 45분 동안 상기 용액을 교반하였다. 그 다음, 1M 수산화나트륨을 첨가하여 pH를 12.5로 다시 맞추고, 여기에 1M 수산화나트륨을 주기적으로 첨가하여 pH를 12.1 ~ 12.5로 유지하면서 이 용액을 3시간 동안 교반하였다. 그 다음, 여기에 10% 인산을 첨가하여 pH를 3으로 맞추고, 생성물을 디클로로메탄으로 추출하였다.

[0423]

감압 하에, 추출물을 무수 황산마그네슘에서 건조하고, 여과 및 농축한 다음, 이소프로필 알코올로 침전시켰다. 침전된 생성물을 여과에 의해 분리하고 건조한 후, 이를 디클로로메탄(15ml) 중에 용해하고 나서, 다시 이소프로필 알코올로 재침전시켰다. 수득량 15.5g.

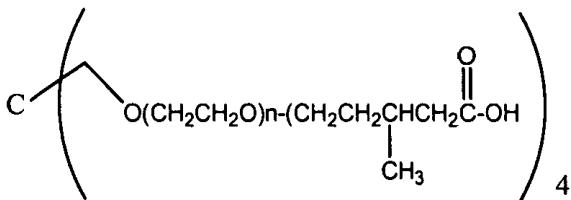
[0424]

¹H NMR (d₆-DMSO): δ 1.24 ppm (m, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COO-), 1.46 ppm (m, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COO-), 2.14 ppm (t, -CH₂-COO-), 3.51 ppm (s, PEG 주체). 치환율 = ~100% (이는 곧, 4-ARM-PEG 출발 물질의 각 분자 밀단에 존재하는 각 OH-기가, 상응하는 데칸산으로 전환되었음을 의미함).

[0425]

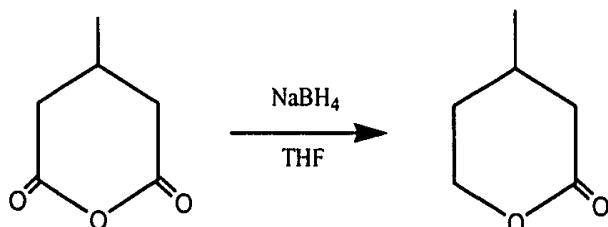
실시예 10

[0426] 4-ARM-PEG_{20K}-β-메틸 펜탄산("4-ARM-PEG_{20K}-β-MPA")의 합성



[0427]

I. β-메틸-δ-발레로락톤의 합성



[0429]

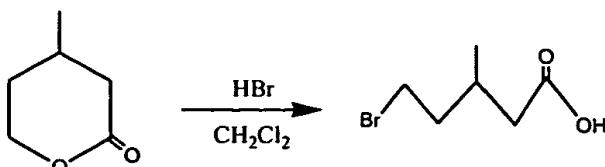
[0430] 0 ~ 5°C로 냉각시킨, 무수 테트라하이드로푸란(160ml) 중 수소화붕소나트륨(8.0g)의 혼탁액에, 무수 테트라하이드로푸란(80ml) 중 3-메틸 글루타르산 무수물(25.6g) 용액을 첨가한 다음, 이 혼합물을 실온에서 밤새도록 교반하였다. 그 다음, 이 혼합물을 0 ~ 5°C로 냉각하고, 여기에 염산(20% 용액, 80ml)을 40분에 걸쳐 첨가하였다. 이 혼합물을 0 ~ 5°C에서 15분 동안 교반한 다음, 다시 실온에서 4시간 동안 교반하고, 이후 감압 하에서 농축하고, 여과한 후, 미정제 생성물을 클로로포름으로 추출하였다. 감압 하에서, 추출물을 무수 MgSO₄로 건조하고, 용제를 증류하였다.

[0431]

78°C 및 2.6mm Hg에서 끓고 있는 분획을 진공 증류 수집하여 미정제 생성물을 정제하였다. 수득량 13.1g. NMR ~ 100% 순도의 생성물.

[0432]

II. 5-브로모-3-메틸펜탄산의 합성

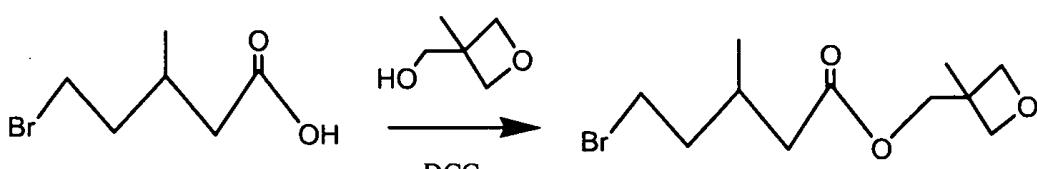


[0433]

[0434] 0 ~ 5°C로 냉각시킨 무수 디클로로메탄(30ml) 중 β-메틸-δ-발레로락톤(3.0g) 용액을 브롬화수소 가스로 포화하고, 이 혼합물을 실온에서 3일 동안 교반하였다. 혼합물을 디클로로메탄(100ml)으로 희석하고, 결과로 생성된 용액을 10% NaCl로 세정하였다(3 x 30ml). 그 다음, 감압 하에서, 이 용액을 무수 MgSO₄로 건조하고, 용제를 증류하였다. 수득량 4.6g. NMR ~ 100% 순도의 생성물.

[0435]

III. 3-메틸-3-옥세탄메탄올의 5-브로모-3-메틸펜타노에이트 에스테르의 합성

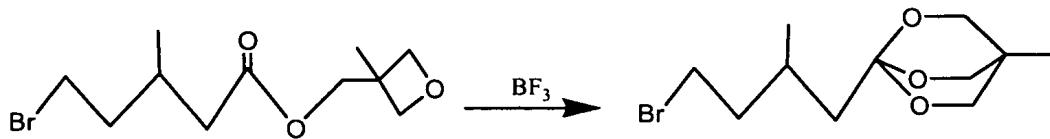


[0436]

[0437] 0 ~ 5°C로 냉각시킨 무수 디클로로메탄(100ml) 중 5-브로모-3-메틸펜탄산(4.6g, 0.024몰), 3-메틸-3-옥세탄메탄올(2.65g, 0.026몰), 및 1-하이드록시벤조트리아졸(0.40g) 용액에, 무수 디클로로메탄(20ml) 중 N,N'-디시클록세힐디카보디이미드(5.35g, 0.026몰) 용액을 5분에 걸쳐 적가하였다. 그 다음, 여기에 4-(디메틸아미노)페리딘(0.045g)을 첨가하고, 아르곤 대기 하에 실온에서 이 혼합물을 밤새도록 교반하였다. 용액을 여과하고 5% 인산으로 2회 세정하였다(2 x 50ml). 그 다음, 무수 MgSO₄로 건조하고, 용제를 증류하였다. 수득량 5.4g. NMR 순

도 ~ 95%.

[0438] IV. 1-(4-브로모-2-메틸부틸)-4-메틸-2,6,7 트리옥사비시클로[2.2.2]옥탄의 합성



[0439]

[0440] 3-메틸-3-옥세탄메탄올(5.4g)의 5-브로모-3-메틸펜타노에이트 에스테르를 무수 디클로로메탄(400ml) 중에 용해하고, 이 용액을 0 ~ 5°C로 냉각하였다. 붕소 삼플루오르화물 디에틸 에테르염(0.7ml)을 첨가한 다음, 이 혼합물을 0 ~ 5°C에서 4시간 동안 교반하였다. 트리에틸아민(3.4ml)을 첨가하고, 이 혼합물을 0 ~ 5°C에서 15분 동안 교반하였다. 감압 하에서 용제를 증류하였다. 잔류물을 에틸 에테르(50ml) 중에 용해하고, 용액을 여과하였다. 그 다음, 용제를 감압 하에서 증류하였다. 수득량 4.6g.

[0441] V. 4-ARM-PEG_{20k}-α-메틸펜탄산의 합성

[0442] 무수 툴루엔(37.5ml) 중 펜타에리티톨계 4-ARM-PEG_{20k}-OH(7.5g, 0.0015 당량)(NOF 코포레이션)의 용액을 툴루엔을 증류하여 공비 건조하였다. 건조된 생성물을 무수 툴루엔(37.5ml) 중에 용해하고, 여기에 *tert*-부탄올(9ml, 0.0090몰) 중 *tert*-부톡시화칼륨의 1.0M 용액과 1-(4-브로모-2-부틸)-4-메틸-2,6,7-트리옥사비시클로[2.2.2]옥탄(2.3g, 0.0083몰)을 첨가한 다음, 이 혼합물을 아르곤 대기 하에 70°C에서 밤새도록 교반하였다. 감압 하에서 용제를 증류한 다음, 잔류물을 증류수(100ml) 중에 용해하였다. 여기에 10% 인산을 첨가하여 이 용액의 pH를 2로 맞추고, 그 용액을 실온에서 15분 동안 교반하였다. 그 다음, 1M 수산화나트륨을 첨가하여 pH를 12.5로 다시 맞추고, 1M 수산화나트륨을 주기적으로 첨가하여 pH를 12.1 ~ 12.5로 유지하면서 용액을 3시간 동안 교반하였다. 이후, 여기에 10% 인산을 첨가하여 pH를 3으로 맞추고, 생성물을 디클로로메탄으로 추출하였다. 감압 하에, 추출물을 무수 황산마그네슘에서 건조하고, 여과 및 농축한 다음, 이소프로필 알코올을 사용하여 침전시켰다. 감압 하에서, 침전된 생성물을 여과로 분리하고 건조하였다. 수득량 3.2g.

[0443] ¹H NMR (D₂O): δ 0.88 ppm (d, -CH₃), 1.44 ppm 및 1.56 ppm (m, .-CH₂-CH₂-CH(CH₃)-CH₂- COO-), 1.93 ppm (m, CH-CH₃), 2.11 ppm 및 2.31 ppm (m, -CH₂- COO-), 3.24 ppm (s, -OCH₃), 3.51 ppm (s, PEG 주체). 치환율 = ~75.5%.

[0444] 실시예 11

[0445] 컨쥬케이트의 특성 규명

[0446] 도세탁셀의 다양한 다분지형 컨쥬케이트에 대한 약물 치환 정도를 이하에 요약하였다(¹H NMR로 측정).

[0447] 약물 치환: 약물 치환 정도의 계산(¹H NMR에 의함)

[0448] 중수소화된 클로로포름(CDCl₃) 중 상이한 4-ARM-PEG-도세탁셀 컨쥬케이트 샘플을 대상으로 ¹H NMR 분석을 수행하고, 8.10 ppm에서, 중합체 주체의 적분 결과를 도세탁셀 방향성 양자의 적분 결과와 비교하였다. 얻어진 모든 스펙트럼에 대한 평균 양자 피크 적분 결과를 바탕으로 하여, 약물 치환 정도를 측정하였다.

표 1

컨쥬케이트	NMR %((치환율))
4-ARM-PEG _{20k} -GLY-DOC	(다분지형 중합체 당 평균 3개의 약물 분자에 대해 74%)
4-ARM-PEG _{10k} -GLY-DOC	(다분지형 중합체 당 평균 3.2개의 약물 분자에 대해 81%)

4-ARM-PEG _{20K} -BA-DOC	(다분지형 중합체 당 평균 3.8개의 약물 분자에 대해 95%*)
----------------------------------	---

[0450] * BA-결합 컨쥬게이트 즉, 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC에 대한 약물 치환율 수치 = 평균 약 98%(95 ~ 100%)

[0451] 실시예 12

[0452] 추가의 다분지형 중합체 알카노에이트 결합 도세탁셀 컨쥬게이트의 합성

[0453] 이하 4-ARM-PEG_{20K}-알칸산을 실시예 1에 기술된 바와 같이 제조하였다: 4-ARM-PEG_{20K}-α-메틸프로피온산(4-ARM-PEG_{20K}-MPA), 4-ARM-PEG_{20K}-헥산산(4-ARM-PEG_{20K}-HA), 4-ARM-PEG_{20K}-옥탄산(4-ARM-PEG_{20K}-OA), 및 4-ARM-PEG_{20K}-데칸산(4-ARM-PEG_{20K}-DA). 이하 다분지형 부탄산도 제조하였다: 4-ARM-PEG_{10K}-부탄산(4-ARM-PEG_{10K}-BA), 4-ARM-PEG_{30K}-부탄산(4-ARM-PEG_{30K}-BA), 및 4-ARM-PEG_{40K}-부탄산(4-ARM-PEG_{40K}-BA). 합성에 관한 상세한 설명은 각각 실시예 12A ~ C에 기술한 바와 같다.

[0454] 도세탁셀(1.03g, 1.20mmol), 상응하는 4-ARM-PEG_{20K}-산[α-메틸프로피온산(4-ARM-PEG_{20K}-MPA), 4-ARM-PEG_{20K}-헥산산(4-ARM-PEG_{20K}-HA), 4-ARM-PEG_{20K}-옥탄산(4-ARM-PEG_{20K}-OA), 4-ARM-PEG_{20K}-데칸산(4-ARM-PEG_{20K}-DA), 4-ARM-PEG_{10K}-부탄산(4-ARM-PEG_{10K}-BA), 4-ARM-PEG_{30K}-부탄산(4-ARM-PEG_{30K}-BA), 또는 4-ARM-PEG_{40K}-부탄산(4-ARM-PEG_{40K}-BA), 0.25mmol], 및 DPTS(0.15g, 0.50mmol)를 50ml DCM에 용해하였다. 결과로 생성된 용액을 얼음-소금(NaCl) 수조(-15 ~ -5°C) 내에서 20분 동안 냉각시킨 다음, DIC(0.38g, 3.00mmol, DCM 5ml 중)를 첨가하여 교반하였다. 반응 혼합물을 -15 ~ -5°C에서 12시간 더 교반하였다. 용액을 여과하여 어떠한 고체 물질도 남아있지 않게 한 다음, 이를 감압 하에서 농축하여 부피를 절반이 되도록 만들었다. 결과로 생성된 용액을 에테르/IPA (1:1) 400ml에 천천히 첨가하면서 교반하였다. 전술한 방법을 사용하여 백색 고체 물질을 수집하고, 침전시켰다. 생성물을 진공 하에서 건조하였다(수율: 모든 합성에 대하여 약 90%).

[0455] 4-ARM-PEG_{20K}-MPA-도세탁셀: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.02–1.20 (m, 24H), 1.21 (s, 12H), 1.32 (s, 36H), 1.65 (d, 4H), 1.74 (s, 12H), 1.85 (m, 4H), 1.93 (s, 12H), 2.10–2.38 (m, 8H), 2.41 (s, 12H), 2.60 (m, 4H), 2.80 (m, 4H), 3.30–3.92 (m, ~2180 H), 4.10–4.30 (m, 23H), 4.95 (d, 4H), 5.21 (s, 4H), 5.47 (m, 4H), 5.52 (br., 10H), 6.21 (t, 4H), 7.26 (m, 8H), 7.40 (m, 8H), 7.50 (m, 8H), 7.60 (m, 4H), 8.12 (d, 8H).

[0456] 4-ARM-PEG_{20K}-HA-도세탁셀: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.12 (s, 12H), 1.22 (s, 12H), 1.32 (s, 36H), 1.34–1.70 (m, 15H), 1.74 (s, 12H), 1.80–1.95 (m, 16H), 2.10–2.38 (m, 16H), 2.43 (s, 12H), 2.60 (m, 4H), 3.30–3.90 (m, ~1950H), 3.91 (d, 4H), 4.12–4.26 (m, 8H), 4.30 (d, 4H), 4.97 (d, 4H), 5.28 (s, 4H), 5.25–5.55 (m, 10H), 5.68 (d, 4H), 6.21 (t, 4H), 7.26 (m, 8H), 7.40 (m, 8H), 7.50 (m, 8H), 7.60 (m, 4H), 8.11 (d, 8H).

[0457] 4-ARM-PEG_{20K}-OA-도세탁셀: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.11 (s, 12H), 1.13–1.24 (m, 40H), 1.33 (s, 36H), 1.40–1.60 (m, 18H), 1.74 (m, 12H), 1.83–2.00 (m, 16H), 2.00–2.20 (m, 4H), 2.220–2.40 (m, 13H), 2.43 (s, 12H), 2.60 (br., 4H), 3.32–3.89 (m, ~2180H), 3.90 (d, 4H), 4.12–4.20 (m, 12H), 4.26 (d, 4H), 4.96 (d, 4H), 5.21 (s, 4H), 5.38 (m, 8H), 5.50 (br. 4H), 5.68 (d, 4H), 6.23 (t, 4H), 7.24 (m, 8H), 7.38 (m, 8H), 7.50 (m, 8H), 7.61 (m, 4H), 8.12 (d, 8H).

[0458] 4-ARM-PEG_{20K}-DA-도세탁셀: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.11 (s, 12H), 1.22 (s, 12H), 1.23–1.30 (m, 44H), 1.33 (s, 36H), 1.40–1.60 (m, 18H), 1.74 (m, 12H), 1.84–2.00 (m, 16H), 2.00–2.20 (m, 4H), 2.20–2.40 (m, 13H), 2.43 (s, 12H), 2.60 (br., 4H), 3.30–3.88 (m, ~2100H), 3.90 (d, 4H), 4.12–4.20 (m, 12H), 4.26 (d, 4H), 4.96 (d, 4H), 5.21 (s, 4H), 5.38 (m, 8H), 5.50 (br. 4H), 5.68 (d, 4H), 6.23 (t, 4H), 7.24 (m, 8H), 7.38 (m, 8H), 7.50 (m, 8H), 7.61 (m, 4H), 8.12 (d, 8H).

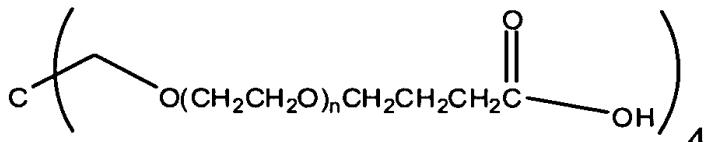
[0459] 4-ARM-PEG_{10K}-BA-도세탁센: ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.10 (s, 12H), 1.21 (s, 12H), 1.33 (s, 36H), 1.74 (s, 12H), 1.85 (m, 12H), 1.94 (m, 12H), 2.15 (m, 4H), 2.30 (m, 4H), 2.41(m, 15H), 2.55 (m, 8H), 3.30-3.80 (m, ~960H), 3.90 (d, 4H), 4.18 (m, 8H), 4.25 (m, 4H), 4.30 (d, 4H), 4.97 (d, 4H), 5.19 (s, 4H), 5.30 (s, 4H), 5.45 (m, 8H), 5.64 (d, 4H), 6.30 (t, 4H), 7.24 (m, 8H), 7.35 (m, 8H), 7.49 (m, 8H), 7.60 (m, 4H), 8.01 (d, 8H).

[0460] 4-ARM-PEG_{30K}-BA-도세탁센: ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.11 (s, 12H), 1.21 (s, 12H), 1.33 (s, 36H), 1.74 (s, 12H), 1.85 (m, 12H), 1.94 (m, 12H), 2.15 (m, 4H), 2.30 (m, 4H), 2.41(m, 15H), 2.55 (m, 8H), 3.30-3.80 (m, ~2840H), 3.90 (d, 4H), 4.18 (m, 8H), 4.25 (m, 4H), 4.30 (d, 4H), 4.97 (d, 4H), 5.19 (s, 4H), 5.30 (s, 4H), 5.45 (m, 8H), 5.64 (d, 4H), 6.30 (t, 4H), 7.24 (m, 8H), 7.35 (m, 8H), 7.49 (m, 8H), 7.60 (m, 4H), 8.01 (d, 8H).

[0461] 4-ARM-PEG_{40K}-BA-도세탁센: ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.11 (s, 12H), 1.21 (s, 12H), 1.33 (s, 36H), 1.74 (s, 12H), 1.85 (m, 12H), 1.94 (m, 12H), 2.15 (m, 4H), 2.30 (m, 4H), 2.41(m, 15H), 2.55 (m, 8H), 3.30-3.80 (m, ~4050H), 3.90 (d, 4H), 4.18 (m, 8H), 4.25 (m, 4H), 4.30 (d, 4H), 4.97 (d, 4H), 5.19 (s, 4H), 5.30 (s, 4H), 5.45 (m, 8H), 5.64 (d, 4H), 6.30 (t, 4H), 7.24 (m, 8H), 7.35 (m, 8H), 7.49 (m, 8H), 7.60 (m, 4H), 8.09 (d, 8H).

[0462] 실시예 12A

[0463] 4-ARM-PEG_{10K}-부탄산 ("4-ARM-PEG_{10K}-BA")의 합성



[0464]

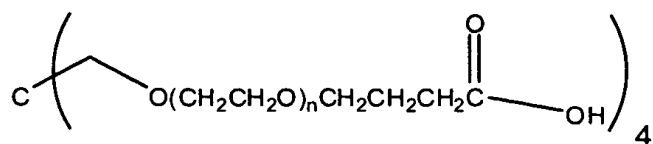
[0465] 툴루엔(450ml) 중 펜타에리트리톨계 4-ARM-PEG_{10K}-OH(50.0g, 0.020 당량)(NOF 코포레이션) 용액을 툴루엔 100ml 를 증류하여 공비 건조하였다. *tert*-부탄올(50ml, 0.050몰) 중 *tert*-부톡시화칼륨의 1.0M 용액과 1-(3-브로모프로필)-4-메틸-2,6,7-트리옥사비시클로[2.2.2]옥탄(14.0g, 0.056몰)을 첨가하고, 이 혼합물을 아르곤 대기 하에 70°C에서 밤새도록 교반하였다. 감압 하에서 용제를 증류하고, 잔류물을 증류수(600ml) 중에 용해하였다. 여기에 5% 인산을 첨가하여 이 용액의 pH를 2로 맞추고, 이 용액을 실온에서 15분 동안 교반하였다. 그 다음, 1M 수산화나트륨을 첨가하여 pH를 12로 다시 맞추고 나서, 여기에 1M 수산화나트륨을 주기적으로 첨가하여 pH를 12로 유지시키면서 상기 용액을 2시간 동안 교반하였다. 이후, 5% 인산을 첨가하여 pH를 3으로 맞추고 생성물을 디클로로메탄으로 추출하였다.

[0466] 무수 황산마그네슘에서 추출물을 건조하고, 여과한 다음, 이것을 이소프로필 알코올에 첨가하였다. 감압 하에서, 침전된 생성물을 여과로 분리한 다음 건조하였다.

[0467] 수득량 45.0g. ¹H NMR (d₆-DMSO): δ 1.72 ppm (q, CH₂-CH₂- COO-), 2.24 ppm (t, -CH₂ -COO-), ,3.51 ppm (s, PEG 주체). 치환율 = ~100% (이는 곧, 4-ARM-PEG 출발 물질의 각 분자 말단에 존재하는 각 OH- 기가, 상응하는 부탄산으로 전환되었음을 의미함).

[0468] 실시예 12B

[0469]

4-ARM-PEG_{30k}-부탄산("4-ARM-PEG_{30k}-BA")의 합성

[0470]

[0471] 툴루엔(450ml) 중 펜타에리트리톨계 4-ARM-PEG_{30k}-OH(50.0g, 0.0067 당량)(텍사스주 휴스톤 소재, 켐올가닉스(ChemOrganics)) 용액을 툴루엔 100ml를 증류하여 공비 건조하였다. *tert*-부탄올(20ml, 0.020몰) 중 *tert*-부톡시화칼륨의 1.0M 용액과 1-(3-브로모프로필)-4-메틸-2,6,7-트리옥사비시클로[2.2.2]옥탄(5.9g, 0.023몰)을 첨가하고, 이 혼합물을 아르곤 대기 하에 70°C에서 밤새도록 교반하였다. 감압 하에서 용제를 증류하고, 잔류물을 증류수(600ml) 중에 용해하였다. 5% 인산을 첨가하여 용액의 pH를 2로 맞추고, 이 용액을 실온에서 15분 동안 교반하였다. 그 다음, 여기에 1M 수산화나트륨을 첨가하여, pH를 12로 다시 맞추고, 여기에 1M 수산화나트륨을 주기적으로 첨가하여. pH를 12로 유지시키면서 이 용액을 2시간 동안 교반하였다. 그 다음, 여기에 5% 인산을 첨가하여 pH를 3으로 맞추고, 생성물을 디클로로메탄으로 추출하였다.

[0472]

추출물을 무수 황산마그네슘에서 건조하고, 여과한 다음, 여기에 이소프로필 알코올을 첨가하였다. 감압 하에서, 침전된 생성물을 여과하여 분리하고, 건조하였다.

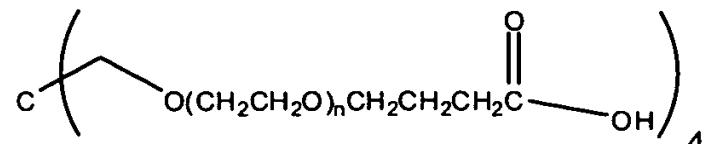
[0473]

수득량 46g. ¹H NMR (d₆-DMSO): δ 1.72 ppm (q, CH₂-CH₂- COO-), 2.24 ppm (t, -CH₂ -COO-), 3.51 ppm (s, PEG 주체). 치환율 = ~100% (이는 곧, 4-ARM-PEG 출발 물질의 각 분자 말단에 존재하는 각 OH- 기가, 상응하는 부탄산으로 전환되었음을 의미함).

[0474]

실시예 12C

[0475]

4-ARM-PEG_{40k}-부탄산("4-ARM-PEG_{40k}-BA")의 합성

[0476]

[0477] 툴루엔(450ml) 중 펜타에리트리톨계 4-ARM-PEG_{40k}-OH(50.0g, 0.005 당량)(NOF 코포레이션) 용액을 툴루엔 100ml를 증류하여 공비 건조하였다. 여기에 *tert*-부탄올(15ml, 0.015몰) 중 *tert*-부톡시화칼륨의 1.0M 용액과 1-(3-브로모프로필)-4-메틸-2,6,7-트리옥사비시클로[2.2.2]옥탄(4.4g, 0.018몰)을 첨가하고, 이 혼합물을 아르곤 대기 하에 70°C에서 밤새도록 교반하였다. 감압 하에서 용제를 증류하고, 잔류물을 증류수(600ml) 중에 용해하였다. 여기에 5% 인산을 첨가하여 이 용액의 pH를 2로 맞추고, 이 용액을 실온에서 15분 동안 교반하였다. 그 다음, 여기에 1M 수산화나트륨을 첨가하여 pH를 12로 다시 맞춘 다음, 여기에 1M 수산화나트륨을 주기적으로 첨가하여 pH를 12로 유지하면서 용액을 2시간 동안 교반하였다. 그 다음, 여기에 5% 인산을 첨가하여 pH를 3으로 맞추고, 생성물을 디클로로메탄으로 추출하였다.

[0478]

추출물을 무수 황산마그네슘에서 건조하고, 여과한 다음, 이소프로필 알코올에 첨가하였다. 감압 하에서, 침전된 생성물을 여과에 의해 분리하고, 이를 건조하였다.

[0479]

수득량 48.0g. ¹H NMR (d₆-DMSO): δ 1.72 ppm (q, CH₂-CH₂- COO-), 2.24 ppm (t, -CH₂ -COO-), 3.51 ppm (s, PEG 주체). 치환율 = ~100% (이는 곧, 4-ARM-PEG 출발 물질의 각 분자 말단에 존재하는 각 OH- 기가, 상응하는 부탄산으로 전환되었음을 의미함).

[0480]

실시예 13

[0481]

인간 폐암 및 결장암의 마우스 이종 이식편 모델에 있어서

[0482] 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀의 항종양 활성

[0483] 이하에 기술된 연구의 목적은, 도세탁셀 감수성이 제한적인 비소세포 폐 마우스 종양 이종 이식편 모델(H460)과 대장결장 마우스 종양 이종 이식편 모델(LS174T, LoVo) 내 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC의 항종양 활성을 평가하는 것이다.

[0484] H460, LS174T 및 LoVo 종양을 암컷 무흉선 누드 마우스 내에 확립하였다. 10마리의 마우스로 이루어진 군에 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC 또는 도세탁셀을 단일 투여로서 총 3회 투여하였는데, 즉, 최대 내성 용량(MTD) 이하의 양만큼 수 회로 나누어 7일에 1회꼴로 투여하였다(q7d x 3). 대조군에는 종양을 이식한 후 어떠한 처리도 하지 않았다. 처음 5일 동안은 매일 동물들의 체중을 측정하였으며, 이후에는 1주일에 2회씩 측정하였다. 처음 약물을 주입한 후에는 1주일에 2회씩 종양 부피를 측정하였다.

[0485] 종양 종점 부피(Tumor endpoint volume)는 LS174T의 경우 1500mm³, LoVo의 경우 1000mm³, 그리고 H460의 경우 2000mm³ 이었다.

[0486] 종양 부피의 변화, 종결 시점에 도달하는 시간, 그리고 종양의 완전 퇴행 현상 또는 부분 퇴행 현상을 통하여 항종양 활성을 측정하였다.

[0487] 처리 결과를, 종점까지 이르는 기간의 중앙 시점을 치료군과 대조군을 비교하여 그 연장 여부로서 판단하는 종양 성장 지연율(TGD)로 평가하였다. 본원에서는 이것을 %TGD 즉, 대조군의 종점까지 이르는 기간의 중앙 시점을 백분율로 나타낸 것으로서 표시한다.

[0488] 제1일 때의 종양 부피에 비하여 3일 연속으로 측정하였을 때 종양 부피가 50% 이하로 줄어든 종양은 부분적으로 퇴행한 것(partial regression)으로 간주하였다. 완전히 퇴행한 경우(complete regression)는, 3일 연속으로 측정하였을 때 종양 부피가 13.5mm³ 이상인 경우를 의미한다.

[0489] 허용 가능한 독성이란, 연구 기간 중 군 평균 체중(BW) 감소율이 20% 미만이며, 10마리의 처리 동물들 중 1마리 이하가 이 처리로 인하여 사멸한 경우로 정의된다. 독성을 더욱 증가시킨 임의의 투여 요법을 최대 내성 용량(MTD)을 초과하는 요법으로 간주하였다.

[0490] 결과는 다음과 같았다.

[0491] 비소세포 폐암 모델(H460): 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC 처리 결과, 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC 및 도세탁셀 처리 군 각각의 경우, % TGD 값이 122% 및 48%인 H460 종양 보유 마우스 내에서는 MTD에서(즉, 33mg/kg 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC, 25mg/kg 도세탁셀) 종양 성장 효과가 투여량과 관련하여 통계학적 유의 수준($p<0.05$)만큼 증가하였다(도 3a(모든 투여량) 및 3b(대조군 및 MTD 군만 나타냄) 그리고 이하 표 2a를 참조). 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC와 도세탁셀을 MTD만큼 투여하였을 때 체중 감소율은 비슷하였다(각각 14.2% 및 15.5%).

[0492] 항종양 활성이 개선된 것이 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC 투여 후 더욱 많은 양의 도세탁셀에 혈장과 종양이 노출되었음으로 인한 것인지 여부를 평가하기 위하여, H460 종양을 보유하는 마우스에 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC 또는 도세탁셀을 1회 IV 투여한 후, 혈장 및 종양의 세포 분쇄액을 분석하였다. 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC 및 도세탁셀을 각각의 최대 내성 용량(MTD)만큼(33 및 25mg/kg) 투여한 각각의 경우를 관찰하였을 때, 다음과 같은 결과가 관찰되었다. 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC를 투여한 후, 168시간 동안 혈장 중 도세탁셀 농도는 5ng/mL 초과로 유지되었던 반면에, 도세탁셀을 투여한 후 72시간까지는 도세탁셀 농도가 1ng/mL로 감소하였다. 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC를 투여하였을 때의 최대 혈장 중 도세탁셀 농도는 도세탁셀을 투여하였을 경우에 비해 13배나 낮았다. 상기 두 가지 경우의 처리에 있어서 농도-시간 곡선 아래 부분이 나타내는 혈장 중 도세탁셀 표면적(AUC)은 유사하였던 반면에, 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC를 처리한 경우의 종양 도세탁셀 농도는 도세탁셀을 처리한 경우보다 0.4 ~ 4배 높아서, 결과적으로 종양 도세탁셀 AUC는 2배 이상이 되었다. 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC 투여 후 종양을 도세탁셀에 노출시키는 양과 시간을 늘이면, 도세탁셀을 투여한 경우에 비하여 종양 성장 지연율이 상당 수준 증가하였다(122% 대 48%). 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC를 19mg/kg(MTD의 58%)만큼 투여한 경우에는 항종양 활성이 상당 수준으로 유지되었던 반면에, 도세탁셀을 25mg/kg 미만만큼 투여하였을 경우에는 그렇지 않았다.

표 2

[표 2a] H460 이종 이식편에 있어서 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC 및 도세탁셀로 처리한 이후의 반응 요약

처리군	투여량 (mg/kg)	투여량 (mg/m ²)	TGD ¹ (%)	BW 감소율 (%) / BW 가 장 적게 나가는 날	생존한 마우스 수/ 처리된 마우스 수
				0 / 0 ²	10 / 10
미처리	0	0	---	0 / 0 ²	10 / 10
도세탁셀	10	30	-2	0 / 0	10 / 10
	14	42	4	4.1 / 19	10 / 10
	18.7	56.1	23	9.7 / 22	10 / 10
	25	75	48*	15.5 / 26	10 / 10
4-ARM-PEG _{20K} -BA- DOC	14	42	-1	0 / 0	10 / 10
	18.7	56.1	56*	6.2 / 22	10 / 10
	25	75	72**	10.4 / 29	10 / 10
	33.3	99.9	122**	14.2 / 22	10 / 10

[0493]

*p<0.05 : 미처리 군과 비교.

[0495]

**p<0.01 : 미처리 군과 비교.

[0496]

1 종양 성장 지연 결과는, 종양이 2000mm³ 되는 날 또는 57일 경과 시 연구 종결 시점에서의 결과를 바탕으로 함.

[0497]

2 0/0은, 체중이 감소하지 않았음을 나타냄.

[0498]

3 처리양은 MTD를 초과하였으므로, 통계학적 유의값은 산정하지 않았음.

[표 2b]

처리	투여량 (mg/kg) ³		종양 성장 지연율 (%)	AUC (hr*ng/mL)		4-ARM-PEG _{20K} -BA-DOC 대 도세탁셀의 비율	
				혈장	종양	혈장	종양
도세탁셀	25	MTD	48	6146	138,715	---	---
4-ARM- PEG _{20K} -BA- DOC	33	MTD	122	6013	313,558	1.0	2.3
	19	58% MTD	56	3488 [#]	181,864 [#]	0.6	1.3

[0499]

[#] q7dx3로 투여함.

[0501] [#] 33mg/kg 투여한 경우를 외삽함.

[0502] 결장 암 모델(LS174T): LS174T 종양을 보유하는 마우스에 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC를 처리하였을 경우의 TGD는 투여량과 관계가 있었으며, MTD만큼 투여하였을 때는 종양이 3회 부분적으로 퇴행하였고(PR); 도세탁셀을 투여하였을 경우에는 부분적으로도 퇴행하지 않았다. LS174T 종양 보유 마우스에서, TGD는 도세탁셀을 투여하였을 때보다 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC를 투여하였을 때 유의적 이었음을 알 수 있었다($p<0.0001$): [40mg/kg 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC, 30mg/kg 도세탁셀, 266 % 대 166%]. MTD에서 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC를 30mg/kg 투여하였을 때 TGD는 250%였고 부분 퇴행 현상이 1회 발생하였던 반면에, 도세탁셀을 30mg/kg 투여하였을 때 TGD는 166%였으며 퇴행 현상은 발생하지 않았다. 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC와 도세탁셀을 mtd만큼 투여하였을 때 체중 감소율은 유사하였다(각각 18.8% 및 16.6%).

[0503] 이하, 도 2A 및 2B, 그리고 표 3을 참조한다.

표 3

LS174T 결장 암 이종 이식편에 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC와 도세탁셀을 처리한 후의 반응 요약

처리군	투여량 (mg/kg)	투여량 (mg/m ²)	TGD ¹ (%)	BW 감소율 (%) / BW가 가장 적게 나가는 날	PR	생존한 마우스 수/ 처리된 마우스 수
미처리	0	0	---	0 / 0 ²	0	10 / 10
도세탁셀	12.7	38.1	69*	8.8 / 23	0	10 / 10
	16.9	50.7	96*	11.2 / 23	0	10 / 10
	22.5	67.5	135*	6.7 / 23	0	10 / 10
	30	90	166*	16.6 / 23	0	10 / 10
4-ARM-PEG _{20K} -BA- DOC	16.9	50.7	126*	12.4 / 23	0	9 / 10
	22.5	67.5	169*	11.1 / 23	0	10 / 10
	30	90	250*	17.9 / 23	1	9 / 10
	40	120	266*	18.8 / 23	3	10 / 10

[0505] * $p<0.001$: 미처리 군과 비교.

[0506] 1 TGD는 종양이 1500mm³ 되는 날 또는 79일 경과 시를 연구 종결 시점으로 한 결과를 바탕으로 함.

[0507] 2 0/0은, 체중이 감소하지 않았음을 나타냄.

[0508] 결장 암 모델(LoVo): LoVo 종양을 보유하는 마우스에 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC를 처리한 결과, TGD가 투여량과 관련하여 유사하게 개선되었다. 일반적으로, 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOc를 처리하였을 때의 체중 변화는 동일한 등가 용량(equivalent dose)으로 도세탁셀을 투여하였을 때의 체중 변화와 유사하였거나 그에 미치지 못하였다. 체중 감소율이 22.6%인 것으로 보아 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC를 40mg/kg만큼 투여한 경우는 MTD를 초과하는 양만큼 투여한 경우이며, 또한 이 경우는 TGD가 148%이고 PR은 2회 발생하였다. 거의 비슷하지만, 도세탁셀 등가 용량 30mg/kg 만큼(상기 두 가지 제제의 MTD) 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC를 투여하였을 때, 도세탁셀을 투여하였을 경우에 비하여 종양 성장 지연율이 2배가 되었다(128% 대 64%). 이보다 더 낮은 도세탁셀 등가 용량(22.5 및 16.9mg/kg)만큼 투여하였을 때에는, 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC와 도세탁셀의 활성이 비슷했다. 도 4a 및 4b를 참조.

표 4

[0509]

LoVo 이종 이식편에 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC 및 도세탁셀을 처리한 후의 반응 요약

처리군	투여량 (mg/kg)	투여량 (mg/m ²)	TGD ² (%)	BW 감소율 (%) / BW가 가장 적게 나 가는 날	PR	생존한 마우스 수/ 처리된 마우스 수
미처리	0	0	---	0 / 0 ³	0	10 / 10
도세탁셀	12.7	38.1	7	5.0 / 24	0	10 / 10
	16.9	50.7	70**	12.8 / 21	0	10 / 10
	22.5	67.5	32*	14.6 / 24	0	10 / 10
	30	90	64**	13.3 / 21	0	10 / 10
4-ARM-PEG _{20K} -BA- DOC	16.9	50.7	64**	7.0 / 21	0	10 / 10
	22.5	67.5	50*	11.0 / 24	0	10 / 10
	30	90	128**	16.2 / 24	0	10 / 10
	40	120	148 ¹	22.6 / 24	2	10 / 10

*p<0.01 ***p<0.001: 미처리군과 비교.

[0511] 1 처리량이 MTD를 초과하였으므로, 통계학적 유의성은 평가하지 않음.

[0512] 2 TGD는 종양이 1000mm³되는 날 또는 77일 경과시를 연구의 종결 시점으로 한 결과를 바탕으로 함.

[0513] 3 0/0은 체중이 감소하지 않았음을 나타냄.

[0514] 전술한 사실들은, H460 및 LS174T 마우스 이종 이식편 모델에서 도세탁셀을 투여하였을 경우보다 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC를 투여하였을 경우에 항종양 활성이 훨씬 크다는 것을 보여주고 있다. 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC에 대한 세포 주 모델들 3개 중 2개에서는 부분적 퇴행 현상이 관찰되었던 반면에, 도세탁셀을 투여하였을 경우에는 퇴행 현상이 관찰되지 않았다. H460 및 LS174 이종 이식편 모델에 MTD만큼 투여하였을 때, 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC에 대한 %TGD는 도세탁셀에 대한 %TGD보다 2.5배 및 1.6배 높았다. 뿐만 아니라, MTD만큼 투여하였을 때의 체중 감소율이 도세탁셀을 투여하였을 경우와 비슷하였고, 또한 눈에 띌만한 임상학적 결과가 관찰되지 않은 것으로 보아, 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC에 대한 내약성이 강하였다는 것을 알 수 있었다. 요약하면, 전술한 바는 예시적인 컨쥬케이트 4-ARM-PEG_{20K}-BA-DOC가 도세탁셀의 항종양 활성과 시간-농도 간 프로필을 상당 수준 개선하는데 효과적이라는 것을 말해주는 것이다.

실시예 14

스프라그-돌리 래트 내 도세탁셀과 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀의 약동학

[0517] 본 연구의 목적은 래트에 도세탁셀과 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 정맥 내 주입한 후의 약동학적 분석 결과와 이 약물들의 배출량을 평가하는 것이다.

[0518] 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀과 도세탁셀의 약동학적 분석 결과를 5, 10 및 15mg/kg(30, 60, 90mg/m²)의 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 또는 5mg/kg(30mg/m²)의 도세탁셀을 투여하여 수컷 래트(15 래트/투여량 수준)에서 평가하였다. 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 및 도세탁셀을 대퇴 정맥 카테터를 통하여 투여하였다(30분, 정맥 내 주입, 4mL/kg). 투여 전과 투여 후 144시간 경과 사이에 목의 정맥을 천자하여 혈액 샘플(n=15 시점, n=5 샘플/투여량 수준/시점)을 채취하였다. 약동학적 매개 변수들을 이하 표 5에 요약하였다.

표 5

[0519] 5mg/kg의 도세탁셀, 또는 5, 10, 15mg/kg의 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 1회 IV투여한 후 수컷 래트 내 도세탁셀 및 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀의 약동학적 매개 변수

처리	투여량 (mg/kg)	분석물	T _{1/2} (hr)	T _{max} (hr)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{last} (hr*ng/mL)	AUC _{inf} (hr*ng/mL)	CL (mL/min/kg)	V _{ss} (L/kg)
도세탁셀	5	도세탁셀	ND ¹	0.5	682	1417	ND	ND ²	ND
컨쥬게이트*	5	도세탁셀	ND	0.5	122	1711	ND	NA	NA
		컨쥬게이트	73	0.5	40079	226203	250374	0.33	0.8
컨쥬게이트*	10	도세탁셀	ND	2.0	176	3003	ND	NA	NA
		컨쥬게이트	59	0.5	70795	419132	437912	0.38	0.55
컨쥬게이트*	15	도세탁셀	ND.	1.0	273	3743	ND	NA	NA
		컨쥬게이트	63	0.5	138296	847993	895159	0.28	0.47
평균 컨쥬게이트(±SD)			65±7					0.33±0.05	0.61±0.17

¹ND = 측정되지 않음; 정의가 잘 되어 있지 않은 최종 상태.

²NA = 도세탁셀 대사 물질에 대해서는 적용 불가.

*컨쥬게이트 = 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀

[0520] 혈장 중 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀의 농도는 평균 최종 반감기가 65시간으로 다단계 방식으로 감소하였다. 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀의 소멸율은 0.33mL/min/kg에서 낮았다. V_{ss}는 전체 체수분과 유사하였는데, 이는 곧, 혈관간 외부에 분포하고 있음을 말해주는 것이다. T_{1/2}, CL 및 V_{ss}는 투여량과 독립적이었다. C_{max} 및 AUC 수치는 투여량과 상관되어 증가하였으며, 일반적으로는 투여량에 비례하여 증가하였다.

[0521] 혈장 중 도세탁셀 농도는 다단계 방식으로 감소하였으며, 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 투여한 후에도 유지되었다. 도세탁셀의 농도는 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 투여한 후 0.5 ~ 2시간 경과시 C_{max}에 달하였는데, 이는 곧, 도세탁셀의 일부가 신속하게 방출됨을 말해주는 것이다. 도세탁셀과 이 도세탁셀의 등가 용량(5mg/kg 또는 30mg/mm²)만큼 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 투여하였을 경우, C_{max}는 약 6배 낮았으나, AUC는 유사하였다. 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 투여한 후 도세탁셀 C_{max}와 AUC는 투여량과 상관되어 증가하였는데, 일반적으로는 투여량에 비례하여 증가하였다.

[0522] 부분적으로는 정량의 최소 한계치(1ng/mL)와 가까운 양일때 나타나는 최저 소실 상태일 때에는 농도가 다양하고 도세탁셀이 지속적으로 존재하기 때문에, 표준적인 비구획 분석법(non-compartmental analysis)을 통해서는 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 투여 후 장기간인 도세탁셀 최종 반감기를 정확히 추정할 수 없었다. 지속적인 혈장 중 도세탁셀 최종 반감기를 추가로 평가하기 위하여, 집단 약동학적 연구를 실시하였다. 집단 약동학적 분석 결과, 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 투여한 후 168시간 경과시 도세탁셀의 최종 반감기와, 도세탁셀을 투여한 후 40시간 경과시 도세탁셀의 최종 반감기를 추정하였다.

[0523] 전술한 바를 바탕으로 하였을 때, 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 래트에 투여하였을 때 소멸율과 분포 부피는 낮았으며, 그 결과, 길이가 긴 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀의 최종 반감기는 65시간이었다. 등가 용량만큼의 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 및 도세탁셀을 투여한 후 혈장 중 도세탁셀의 C_{max}는 약 6배 낮았던 반면에, AUC는 유사하였다. 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 투여한 후 혈장 중 도세탁셀의 반감기를 추정한 결과, 도세탁셀을 투여한 후 혈장 중 도세탁셀의 반감기에 비하여 약 4배 길었음을 알 수 있었는데(168시간 대 40시간), 이는 도세탁셀이 전신에 지속적으로 노출된다는 것을 말해주는 것이다.

[0524] 실시예 15

[0525] 비글 개 내에서의 도세탁셀과 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀의 약동학적 분석 결과

[0526] 본 연구의 목적은 개에 도세탁셀과 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 정맥 내 주입한 후의 약동학적 분석 결과와 이 약물들의 배출량을 평가하는 것이다.

[0527] 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 0, 0.75, 2, 또는 4mg/kg(0, 15, 40 및 80mg /m²/투여량), 또는 도세탁셀 0.75mg/kg(15mg/m²)을 투여한 수컷 개(4마리/투여량 수준)를 대상으로 하여 약동학적 분석을 수행하였다. 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀과 도세탁셀을 요측피정맥 카테터 또는 복제 정맥 카테터를 통해 4mL/kg/hr로 60분 동안 정맥 내 주입하여 투여하였다. 투여 직후에서 투여 후 168시간 사이에 목 정맥 천자 즉, 아바코스 IV 카테터 (Abbacoth IV catheter)를 사용하여 17개의 혈액 샘플을 얻었다. 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀과 도세탁셀의 혈장 중 농도를 측정하였다.

[0528] 약동학적 매개 변수를 표 6에 요약하였다.

표 6

[0529] 0.75mg/kg 도세탁셀, 그리고 0.75, 2 및 4mg/kg 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 1회 IV 투여한 후 수컷 개 내에서의 도세탁셀 및 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀의 약동학적 매개 변수

처리	투여량 (mg/kg)	분석물	T _{1/2} (hr)	T _{max} (hr)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{last} (hr*ng/mL)	AUC _{inf} (hr*ng/mL)	CL (mL/min/kg)	V _{ss} (L/kg)
도세탁셀	0.75	도세탁셀	ND ¹	0.88	223	479	ND	ND ²	ND
컨쥬게이트	0.75	도세탁셀	ND	0.88	2.1	64	ND	NA	NA
		컨쥬게이트	28	1.1	7084	93084	104247	0.12	0.23
컨쥬게이트	2	도세탁셀	ND	1.1	6.3	153	ND	NA	NA
		컨쥬게이트	35	1.4	17731	232378	245446	0.14	0.26
컨쥬게이트	4	도세탁셀	ND	12	19	326	ND	NA	NA
		컨쥬게이트	32	6.8	33570	597336	611470	0.12	0.31
평균 컨쥬게이트(±SD)			32±4					0.13±0.01	0.26±0.04

¹ND = 측정되지 않음; 정의가 잘 되어 있지 않은 마지막 상태.

²NA = 도세탁셀 대사 물질에 대해서는 적용 불가.

*컨쥬게이트 = 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀

[0530] 혈장 중 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 농도는 평균 최종 반감기가 31시간으로 다단계 방식으로 감소하였다. 0.13mL/min/kg에서 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀의 소멸율은 낮았다. V_{ss}는 전체 체수분에 못미쳤는데, 이는 곧, 혈관간 외부에 분포하고 있음을 말해주는 것이다. T_{1/2}, CL 및 V_{ss}는 투여량과 독립적이었다. 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 투여 후 C_{max} 및 AUC 수치는 투여량과 상관되어 증가하였으며, 일반적으로는 투여량에 비례하여 증가하였다.

[0531] 혈장 중 도세탁셀 농도는 다단계 방식으로 감소하였으며, 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 투여한 후에는 유지되었다. 도세탁셀의 농도는 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 투여한 후 0.88 ~ 12시간 경과시 C_{max}에 달하였는데, 이는 곧, 도세탁셀의 일부가 신속하게 방출됨을 말해주는 것이다. 도세탁셀 및 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀의 등가 용량 수준(0.75mg/kg)으로 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 처리할 경우, C_{max}는 약 110배 낮았으나, AUC는 7배 작았다. 도세탁셀 C_{max}와 AUC는 투여량과 상관되어 증가하였는데, 일반적으로는 투여량에 비례하여 증가하였다.

[0532] 부분적으로는 정량의 최소 한계치(1ng/mL)와 가까운 양일 때 나타나는 최저 소실 상태일 때에는 농도가 다양하고 도세탁셀이 지속적으로 존재하기 때문에, 표준적인 비구획 분석법을 통해서는 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 투여 후 장기간인 도세탁셀 최종 반감기를 정확히 측정할 수 없었다. 지속적인 혈장 중 도세탁셀 최종 반감기를 추가로 평가하기 위하여, 집단 약동학적 연구를 실시하였다. 집단 약동학적 분석을 통해서, 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 투여한 후 199시간 경과시 개의 체 내 도세탁셀 최종 반감기와, 도세탁셀을 투여한 후 25시간 경과시 도세

탁셀 최종 반감기를 추정하였다.

[0533] 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 투여한 후 AUC가 작아지는 것은, 곁보기 반감기(apparent half-life)가 199시간일 때 샘플 채취 기간이 비교적 짧아서(168시간) AUC가 불완전하게 확보되었기 때문일 것이다. 이와 같은 관찰 결과를 바탕으로 하였을 때, 도세탁셀은 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 투여한 후 상당한 시간 동안 지속적으로 방출되는 것으로 생각된다.

[0534] 전술한 바를 바탕으로 하였을 때, 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 래트에 투여하였을 때 소멸율과 분포 부피는 낮았으며, 그 결과, 길이가 긴 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀의 최종 반감기는 31시간이었다. 등가 용량만큼의 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 및 도세탁셀을 투여한 후 혈장 중 도세탁셀의 C_{max}는 약 110배 낮았던 반면에, AUC는 약 7배 작았다. 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 투여한 후 도세탁셀 AUC는 작았는데, 그 이유는 곁보기 반감기가 199시간일 때 샘플 채취 기간이 비교적 짧아서(168시간) AUC가 불완전하게 확보되었기 때문일 것으로 파악된다. 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 투여한 후 혈장 중 도세탁셀의 반감기를 추정한 결과, 도세탁셀을 투여한 후 혈장 중 도세탁셀의 반감기에 비하여 약 8배 길었음을 알 수 있었는데(199시간 대 25시간), 이는 도세탁셀이 전신에 지속적으로 노출된다는 것을 말해주는 것이다.

[0535] 실시예 16

말단 소실율 상수의 비선형 혼합 효과 모델링

[0536] 도세탁셀 또는 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 투여한 후 도세탁셀의 약동학적 분석 결과를 측정할 때, 농도가 정량의 최저 한계치(1ng/mL)에 가깝거나 최저 한계치임으로 인해 농도-시간 프로필이 불완전해지고/불완전해지거나, 인접 샘플 채취 시점 사이의 혈장 중 도세탁셀의 농도 변화에 간접적으로 영향을 받는 대다수의 동물들에 대해 말단 소실율 상수(terminal disposition rate constant)인 t_z에 대한 신뢰성있는 수치는 얻을 수 없었다. 뿐만 아니라, 실시예 14에서, 래트는 샘플링의 전체 기간을 포함하도록 군들 간 샘플링 방법을 번갈아서, 중첩적으로 그리고 드물게 수행하여, 15마리의 래트로 이루어진 군 내에서 샘플링하였다. 이와 같은 요인들 모두로 인하여 주어진 동물의 최종 농도-시간 프로필과 관련된 데이터를 드물게 얻을 수 있었다.

[0537] 도세탁셀과 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 간 도세탁셀 말단 소실 패턴을 추가로 조사 및 비교하기 위해서, 래트로부터 얻은 데이터(실시예 14)와, 개로부터 얻은 데이터(실시예 15 및 하나의 추가 연구)에 집단 약동학적 방법을 적용하였다. 이를 통해서, 개별 동물에서 얻어진 불완전한 데이터를 바탕으로 하여 각 처리군에 대한 집단 t_z 수치 및 이와 상응하는 반감기 수치를 추정할 수 있었다. 구체적으로, 모놀릭스(Monolix)라는 프로그램을 이용하여, 처리 군에 속하는 모든 동물들과 모든 처리군으로부터 얻어진 데이터는 비선형 혼합 효과 약동학 모델에 적합하였다. 도세탁셀 또는 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 투여 후 혈장 중 도세탁셀 농도, 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 투여 후 혈장 중 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 농도는, 한정된 주입 기간 동안의 투여량 비례 관계 입력 수치와 이 중 지수 소실 수치를 지정하는 모델에 적합하였다(모놀릭스 PK 모델 26; Monolix PK Model 26). 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 투여 후 도세탁셀 농도-시간 데이터는, 제곱 관계 입력 수치에 비례하는 모델에 적합하여, 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀의 대사 작용을 활성 도세탁셀 대사 물질에 반영하고, 또한 이중 지수 소실 수치도 반영하였다(모놀릭스 PK 모델 31). 본 조사에 있어서 관심 있는 매개 변수는 상기 결과들을 보충해 줄 집단 말단 소실율 상수(t_z)였다.

A. 스프라그-돌리 래트 내 도세탁셀에 대한 집단 모델링 결과

[0538] 도세탁셀 또는 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 투여 후 래트에 있어서의 혈장 중 도세탁셀 농도-시간 프로필은 각 모델에 적합하였다. 4개의 처리군 모두에 있어서, t_z에 대한 집단 추정치를 얻을 수 있었다. 그 결과, 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 모든 경우의 투여량으로 투여한 후 말단 소실 상태일 때의 도세탁셀 농도는 도세탁셀을 투여한 후의 도세탁셀 농도보다 더욱 오랫동안 지속됨을 알 수 있다.

[0539] 도세탁셀과 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 래트에 투여한 후 도세탁셀에 대한 집단의 평균(SE) t_z 추정치는 각각

0.0174(0.0018) hr^{-1} 및 0.00412(0.001) hr^{-1} 였으며, 이 경우, $t_{1/2_{1z}}$ 값은 각각 40 시간 및 168시간이었다.

[0542] B. 비글 개 내 도세탁셀에 대한 집단 모델링 결과

도세탁셀 또는 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀의 투여 후 개의 체 내 혈장 도세탁셀 농도-시간 프로필은 각 모델에 적합하였다. 4개의 처리군 모두에 있어서, l_z 에 대한 집단 추정치를 얻을 수 있었다. 이 모델링을 통하여, 모든 경우의 투여량으로 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 투여한 후 말단 소실 상태일 때의 도세탁셀 농도는 도세탁셀을 투여한 후의 도세탁셀 농도보다 더욱 오랫동안 지속됨을 알 수 있었는데, 이는 래트에서 관찰된 결과와 일치하는 것이었다.

[0544] 도세탁셀과 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 개에 투여한 후 도세탁셀에 대한 집단의 평균(SE) l_z 을 추정한 값은 각각 0.0276(0.0022) hr^{-1} 및 0.00349(0.0021) hr^{-1} 였으며, 이 경우, $t_{1/2_{1z}}$ 값은 25 시간 및 199시간이었다.

[0545] 추가의 연구에서는 제1일과 제22일에 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 개에 7mg/kg씩 투여하였으며, 이 경우, 혈장 중 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀과 도세탁셀의 농도를 측정하기 위해 투여시마다 연속적으로 혈액의 샘플을 채취하였다.

[0546] 개에 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 투여한 후 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀과 도세탁셀의 집단 평균(SE) l_z 추산치는 각각 0.0141(0.00041) h^{-1} 및 0.00627(0.00086) h^{-1} 이었으며, 이 경우, 상응하는 $t_{1/2_{1z}}$ 수치는 49 시간 및 110 시간이었다.

[0547] 하나의 연구에서, 그리고 연구간 상호 비교하였을 때, 집단 평균 l_z 추산치를 통하여, 혈장 중 도세탁셀 농도는, 종과 투여량에 상관없이, 도세탁셀을 투여한 후 보다는 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 투여한 후에 더욱 오랫동안 유지됨을 알 수 있다.

표 7

[0548] 종간 그리고 연구간 도세탁셀 집단 평균 l_z 추산치 및 이에 상응하는 $t_{1/2_{1z}}$ 수치의 요약

종	처리	투여량(mg/kg)	평균 (SE) l_z (hr^{-1})	$t_{1/2_{1z}}$ (hr)
래트	도세탁셀	5	0.0174 (0.0018)	40
	컨쥬게이트	5, 10, 15	0.00412 (0.001)	168
개	도세탁셀	0.75	0.0276 (0.0022)	25
	컨쥬게이트	0.72, 2, 4	0.00349 (0.0021)	199
개	컨쥬게이트	7	0.00627 (0.00086)	110

*컨쥬게이트 = 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀

[0550] [0100] 래트 및 개에서의 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 투여 후 도세탁셀 $t_{1/2_{1z}}$ 수치는 도세탁셀 투여 후 도세탁셀 $t_{1/2_{1z}}$ 수치보다 4 ~ 8배 커졌는데, 이는 원하는 바와 같이 도세탁셀 반감기가 증가하였으며, 따라서 노출 시간도 연장되었다는 특징에 대한 증거를 제공한다.

[0551] 실시예 17

[0552] H460 NSCLC 종양 단편이 피하 이식된 암컷 무흉선 누드 마우스에서의 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀에 관한 약동학적 연구

[0553] 본 연구의 목적은 H460 NSCLC 종양을 보유하는 무흉선 암컷 마우스의 혈장 및 종양 조직 내에서 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 투여 후 도세탁셀의 약동학적 분석 결과와, 도세탁셀을 투여하였을 때의 도세탁셀의 약동학적 분석 결과를 비교하고, 전체 혈구수에 미치는 영향을 측정하기 위한 것이었다. 본 실시예에는 약동학적 결과가 요약되

어 있다.

[0554] H460 종양 세포를 시험관 내에서 성장시킨 후, 이를 암컷 HRLN 누드 마우스에 피하 이식하였다. 종양 크기가 172mg 과 288mg 사이에 이르렀을 때, 도세탁셀 25mg/kg 또는 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 33mg/kg을 정맥 내 볼루스 주사하여 동물에 투여 부피 10mL/kg로 투여하였다. 이와 같은 투여 수준은 본 종양 모델 내 q7dx3 스케줄에 따라서 투여된 도세탁셀 및 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀에 대한 최대 내성 용량에 해당한다. IV 주사 후 제0일 및 제7일 경과시 혈액 샘플과 종양 샘플(n=7/시점, n=3/시점)을 수집하였다. 도세탁셀과 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀에 대해 혈장과 종양 샘플을 분석하였다.

[0555] 양 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 조(lot)는 혈장 및 종양 약물 농도 시간 프로필이 유사하였다. 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀은 종양 조직에 분포되어 잔류하였으며, 종양 대 혈장 비율은 투여 후 약 7: 168 시간이었다.

[0556] 도세탁셀 투여 후 72시간 경과시 혈장 중 도세탁셀 농도는 정량의 한계점 이하(1ng/mL)였던 반면에, 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 투여한 후 최대 168시간 경과시 혈장 중 도세탁셀 농도는 5ng/mL 이상으로 유지되었다. 이와 같은 결과를 통하여, 제3의 동물 종에 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 투여한 후 전신이 지속적으로 도세탁셀에 노출된다는 것을 알 수 있다. 양 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 조는 혈장 및 종양 도세탁셀 농도-시간 프로필이 유사하였다.

[0557] 혈장 및 종양 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 및 도세탁셀 노출 데이터를 표 8에 요약하였다.

표 8

[0558] H460-보유 누드 마우스에 25mg/kg의 도세탁셀과 33mg/kg의 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을 투여한 후의 혈장 및 종양 노출

처리	투여량 (mg/kg)	분석물	구획	Tmax (hr)	Cmax (ng/mL)	AUClast (hr*ng/mL)	컨쥬게이트 대 도세탁셀의 비	
							Cmax	AUC
도세탁셀	25	도세탁셀	혈장	0.5	2571	6146		
			종양	4	2336	138715		
컨쥬게이트 제1조	33	컨쥬게이트	혈장	0.5	128354	1097606		
			종양	4	7062	652823		
컨쥬게이트 제2조	33	컨쥬게이트	혈장	12	195	6013	0.08	1.0
			종양	12	2931	313558	1.3	2.3
도세탁셀	33	도세탁셀	혈장	0.5	118209	1852510		
			종양	4	7675	718068		
도세탁셀	33	도세탁셀	혈장	12	162	5570	0.06	0.9
			종양	12	4623	380617	2.0	2.7

*컨쥬게이트 = 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀

[0559] 혈장 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 Cmax는 투여 후 0.5 시간 경과시에 도달하였다(처음 시점 측정). 종양 Cmax는 투여 후 4시간 경과시에 도달하였다. 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 Cmax는 혈장의 경우에 비하여 종양의 경우 17배에 해당하였으며, AUC는 약 2배 작았다.

[0560] 치료 방법에 상관없이 혈장 중 도세탁셀 Cmax는 투여 후 0.5시간 경과시에 도달하였다(처음 시점 측정). 종양 도세탁셀 Cmax는 도세탁셀 투여 후 4시간 경과시에, 그리고 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 투여 후 12시간 경과시에 도달하였다. 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 투여 후 혈장 도세탁셀 Cmax는 약 14배 감소하였으나, 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 투여 후 혈장 중 약물 지속 농도는, 두 가지 처리에 있어서 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 투여 후 평균 도세탁셀 AUC 값과 유사하였다. 종양 도세탁셀 농도의 감소율은 도세탁셀과 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 투여 후 유사

하였으나, 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 투여 후 종양 도세탁셀 농도는 투여 후 24시간부터 샘플링 시점의 말의 기간 동안에 약 5배 높았는데, 이는 곧, 종양 도세탁셀 노출량이 더 많고 지속적으로 노출됨을 입증하는 것이다.

[0561] 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 투여 후 종양 도세탁셀 노출이 지속되고 노출량이 많아질수록, 이와 상관하여, 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀 대 도세탁셀의 H460 종양 성장 지연율은 상당 수준 증가하였다(122% 대 48%).

[0562] 본 연구는 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀의 우수한 항종양 활성이 종양 도세탁셀 노출이 지속되고 노출량이 증가하는 것과 관련이 있다는 증거를 제공한다.

[0563] 실시예 18

[0564] 마우스, 래트, 개 및 인간 혈장 중 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀의 안정성

[0565] 본 연구의 목적은 마우스, 래트, 개 및 인간 혈장 중 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀의 안정성을 평가하는 것이다.

[0566] 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀을, 혜파린 처리되어 풀링된 수컷 마우스, 래트 및 개의 혈장에 찍은 후($50 \mu\text{g/mL}$; $60 \mu\text{M}$) 이를 성별에 따라 풀링한 인간의 혈장 및 인산염 완충된 염수와 혼합하였다. 3개의 샘플을 37°C 에서 0, 15, 30, 60, 120, 및 240 분 동안 항온 처리하였다. 각 시점에서 일정량만큼 분취한 다음, 이것을 대상으로 ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀이 소멸되었는지 여부와, 도세탁셀이 존재하는지 여부를 승인된 개 혈장 분석법 이용하여 분석하였다.

[0567] 표 9에는 240분의 항온 처리 기간의 마지막 시점에 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀이 소멸되었는지 여부와 도세탁셀이 존재하는지 여부에 관하여 요약되어 있다.

표 9

[0568] 완충액, 마우스, 래트, 개 및 인간 혈장과 함께 항온 처리한 후 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀의 혈장 중 안정성

	마우스	래트	개	인간	완충액
4시간 경과시 잔류하는 컨쥬게이트* (%)	72	64	93	88	85
4시간 경과시 방출된 도세탁셀 (%) ¹	20	20	3	4	0.6
물질 균형(%)	92	84	95	92	86

1 평균 ($n=3$), 출발 컨쥬게이트 농도의 백분율로서 표시함.
 2 평균 ($n=3$), 총 도세탁셀 함량의 백분율로서 표시함.
 *컨쥬게이트 = 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀

[0569] 4시간 동안 항온 처리한 후 4종 모두에서 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀로부터 도세탁셀이 혈장 중에 방출됨을 확인 할 수 있었다. 방출된 도세탁셀의 %는 마우스와 래트의 혈장의 경우 20%였으나, 개 혈장(3%)과 인간 혈장(4%)의 경우에는 이에 훨씬 못미쳤고 또한 유사하기도 했다. 이와 같은 결과는 설치류의 에스터라제 활성이 비설치류 종의 에스터라제 활성에 비하여 더 크다는 보고와 일치하는 것이며[Williams F.M., *Clin. Pharmacokinet.* 1985; **10**: 392-403, Kaliste-Korhonen E., et al., *Human & Experimental Toxicology* 1996; **15**: 972-978, Li, B., et al., *Biochem. Pharmacol* 2005; **70**: 1673-1684], 또한 설치류는 통상적으로 에스테르 함유 약물과 전구 약물을 더 빠른 속도로, 그리고 더욱 많이 대사화한다는 보고와도 일치한다[Li, B., et al., *Biochem. Pharmacol* 2005; **70**: 1673-1684; Cook C.S., et al., *Pharm. Res.* 1995; **12**: 1158-1164; Quon C.Y., et al., *Drug Metabolism and Disposition* 1988; **16**: 425-428; Minagawa T., et al., *Biochem. Pharmacol.* 1995; **49**: 1361-1365; Ericsson H., et al., *Eur. J. Pharm. Sci.* 1999; **8**: 29-37]. 본 연구의 결과는 에스테르 함유 약물과 전구 약물의 설치류에 의한 대사가 반드시 인간에 의한 대사를 대신하여 나타내거나 이를 예측할 수 있도록 만들어주는 것은 아니라는 보고와 일치한다.

[0570] 도세탁셀은 마우스, 래트, 개 그리고 인간의 혈장 중 항온 처리 후 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀로부터 방출된다. 도세탁셀의 방출은 비설치류 혈장 중에서보다 설치류의 혈장 중에서 더 신속히 진행되었는데, 이는 곧, 설치류가 4-ARM-PEG_{20K}-BA-도세탁셀의 인간의 체 내 대사 작용에 대한 예측 모델로서 개보다 신뢰성이 떨어짐을 말해주는 것이다.

[0571] 실시예 19

[0572] 예시적인 다분자형 중합체 알카노에이트 결합 도세탁셀 컨쥬케이트의

[0573] 투여량 증가 연구

[0574] 본 연구는 중합체 크기와 링커의 본질이 컨쥬케이트의 독성에 미치는 영향을 관찰하기 위해 수행되었다. 실시예 12에 개시된 바와 같은 도세탁셀 컨쥬케이트를 대상으로, 스프라그-돌리 래트에 투여하였을 때(단일 투여) 이 래트에서의 최대 내성 용량(MTD)을 측정하였다.

[0575] 건강한 래트를 18개 군(군 당 5마리의 수컷과 5마리의 암컷으로 이루어짐)으로 램덤화하였다. 동물의 체중 변화율은 평균 체중의 ± 10%를 넘지 않았다. 투여 전, 테스트 대상 물질 각각을 멀균수 중 5% 텍스트로즈 용액 중에 주사용으로 용해하였다. 이 대상 물질을 의식이 있는 래트에 각각 단일 정맥 내 볼루스 주사의 형태로 투여하였다. 투여 부피는 2mL/kg 체중으로 유지하였다.

[0576] 처음에 5마리의 수컷 래트와 5마리의 암컷 래트로 이루어진 군에 모든 제제를 투여량 12.5mg/kg(도세탁셀 당량)만큼 투여하였다. 만일 투여 후 48시간 경과시 사멸율이 10% 이하이면, 테스트 제제를 투여량 20mg/kg만큼 5마리의 수컷 래트와 5마리의 암컷 래트로 이루어진 다음 군에 투여하였다. 만일 12.5mg/kg만큼 투여한 후의 사멸율이 10% 이상이면, 이후 두 번째 투여량을 수정하였다. 세 번째 투여량은, 처음 2회 투여시 결과들을 바탕으로 하여 결정되며, 이 또한 얻어진 사멸율 결과를 바탕으로 하여 수정하였다.

[0577] 투여 후 15분, 30분, 1, 2, 3 및 4시간 경과시와, 테스트 대상 물질을 투여한 날 오후 중으로 한 번, 임상학적 관찰을 수행하였다. 매일 2회씩 계속해서 관찰하였으며, 나머지 14일 동안에는 오전에 한 번 그리고 오후에 한번 관찰하였다.

[0578] 관찰한 지 14일 경과 후 각 투여 수준에서의 전체 사멸율을 측정하였다. 그 결과를 이하 표 10에 나타내었다. 전술한 바와 같이, 투여 후 처음 48시간 이내의 사멸율은 그 다음 투여시 투여량을 늘리느냐 여부를 결정하는데 사용되었다. 사멸전 임상학적 징후들로서는 운동력 감소, 운동 실조 보행, 폴리요소의 생성, 설사 그리고 수척해지는 현상을 포함하였다.

표 10

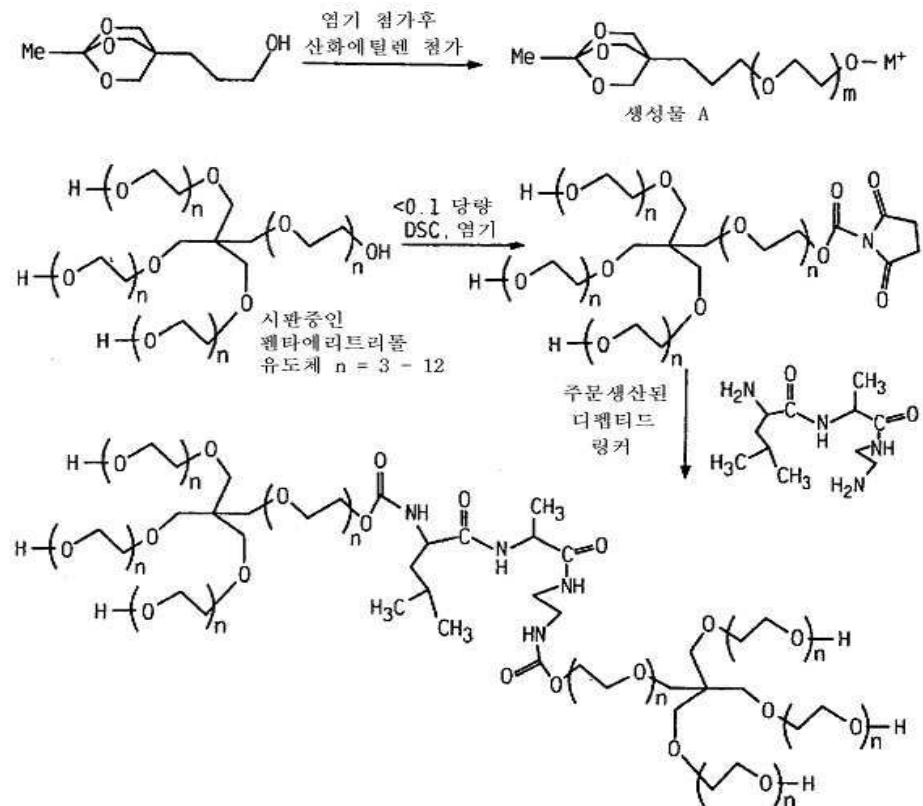
투여량 DE (mg/kg)	10K BA	10K BA	30K BA	30K BA	40K BA	40K BA	20K β MPA	20K β MPA	20K OA	20K OA
-	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
12.5	0/5	0/5	2/5	1/5	4/5	4/5	0/5	0/5	0/5	0/5
20	0/5	0/5	4/5	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5
25	0/5	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5

[0580] 상기 결과들을 살펴보았을 때, 부타노에이트-결합 컨쥬케이트에 대한 예비 독성 데이터는 래트 내 독성의 상대적인 세기 순서를 나타냄을 알 수 있으며, 이는 중합체의 분자량을 기준으로 한다: 10K < 20K < 30K < 40K. 하나의 중합체 분자량(즉, 중합체 크기 상수 = 20K) 대 링커 구조에 대한 데이터를 비교함에 있어서[래트 데이터만을 바탕으로 함], 독성의 상대적 세기 순서 즉, MPA는 OA < BA < HA와 거의 같았음을 알 수 있다.

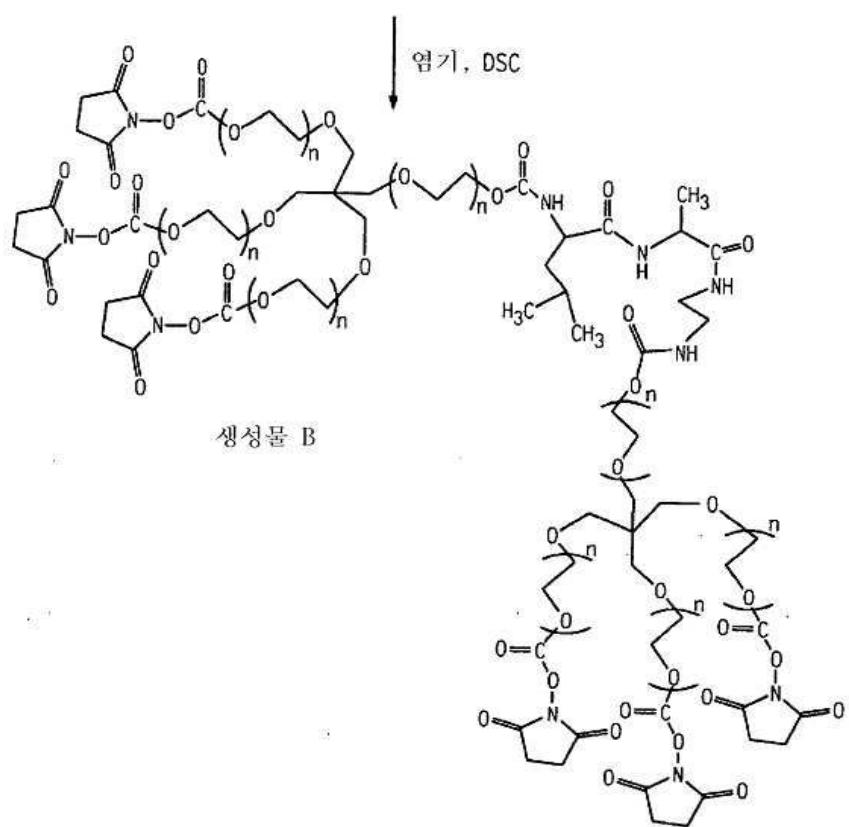
[0581] 본원에 제공된 발명은 구체적으로 예시된 구체예들을 참고로 하여 개시되었다. 그러나, 전술한 바는 본 발명을 예시한 구체예를 제한하고자 하는 것이 아니며, 당업자들은 전술한 상세한 설명에 기술된 바와 같은 본 발명의 범위와 사상을 벗어나지 않고 본 발명에 변형을 가할 수 있음을 알아야 할 것이다.

도면

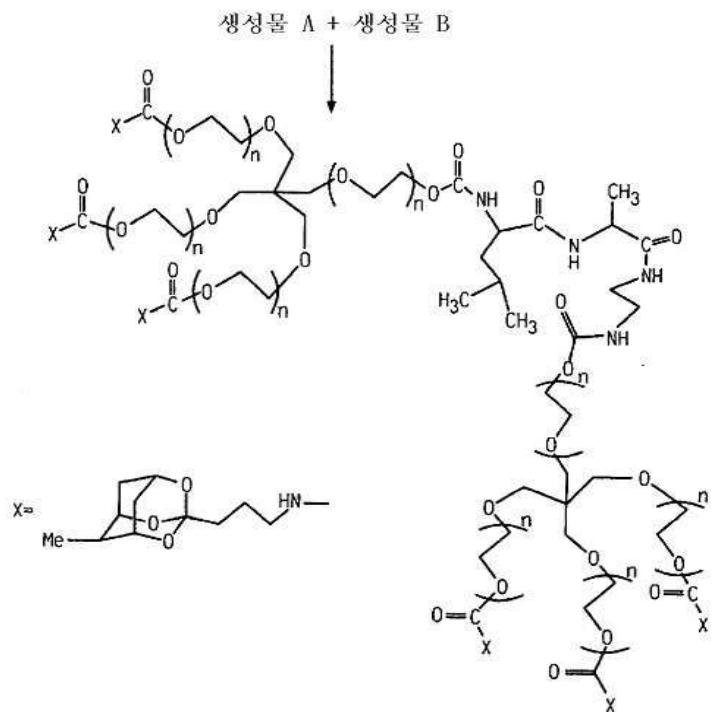
도면 1a



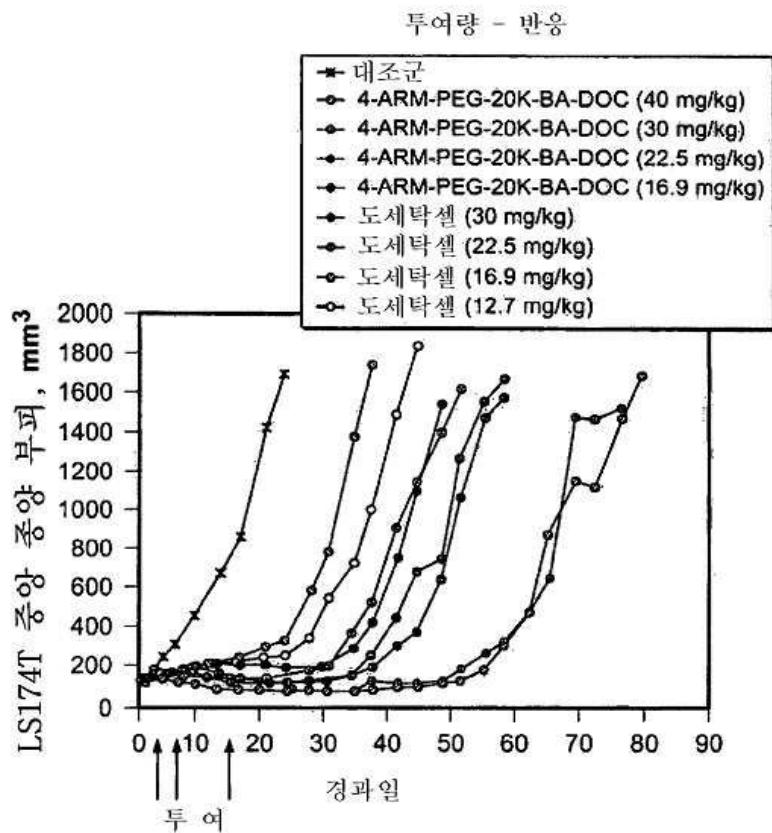
도면1b



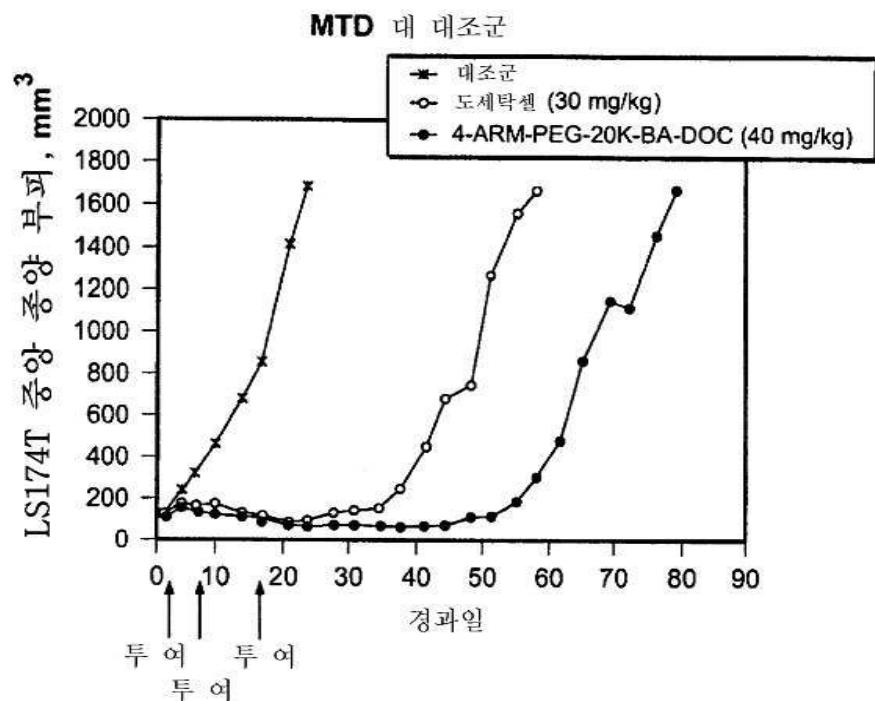
도면1c



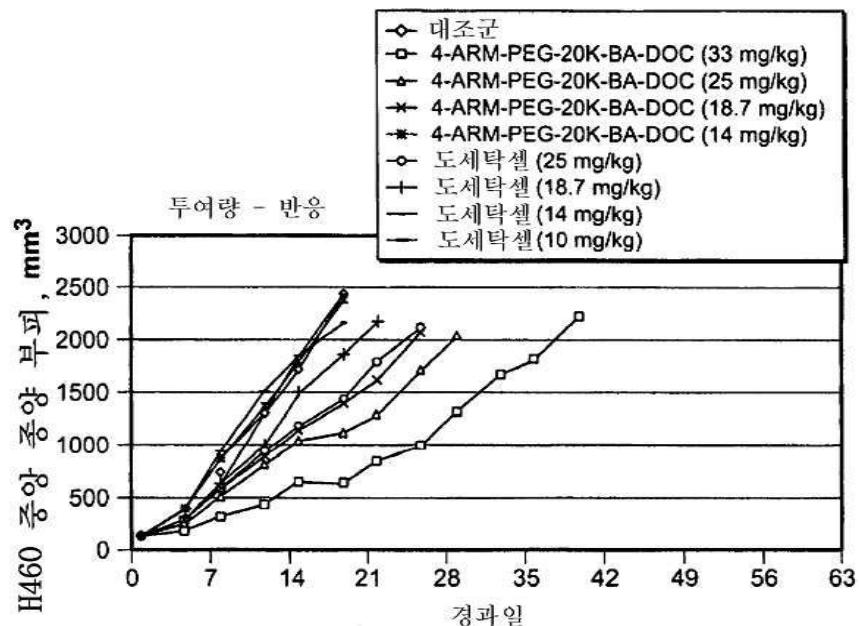
도면2a



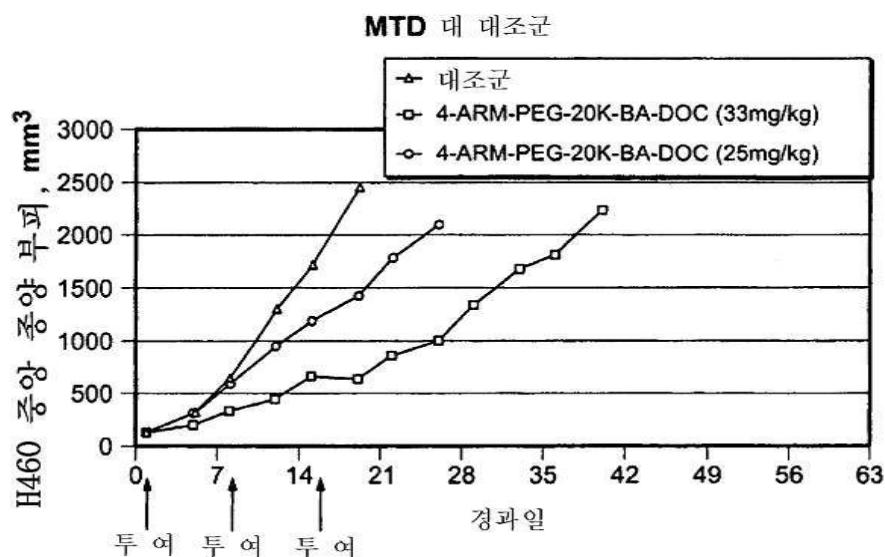
도면2b



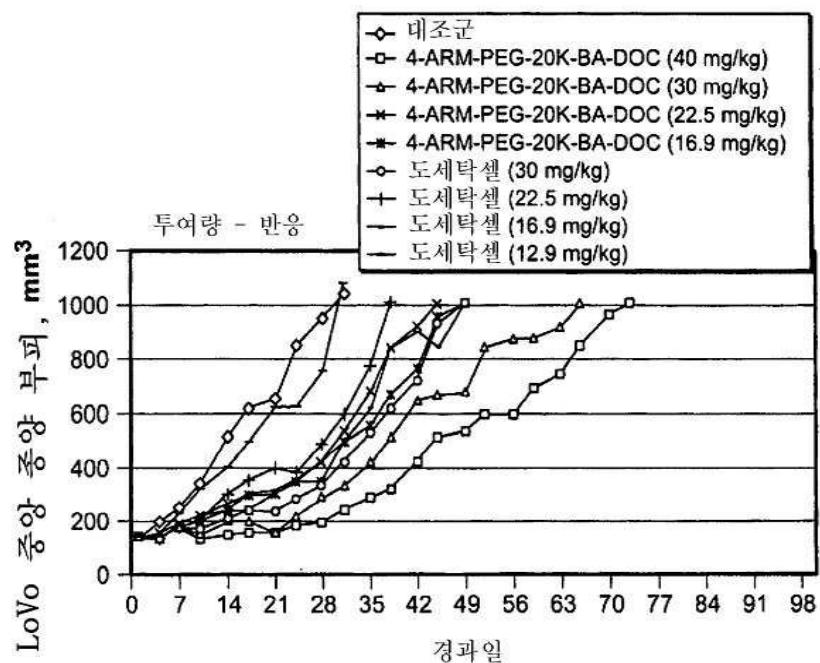
도면3a



도면3b



도면4a



도면4b

