



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년05월27일

(11) 등록번호 10-1523404

(24) 등록일자 2015년05월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/48 (2006.01) A61K 49/18 (2006.01)  
A61K 9/127 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7007318

(22) 출원일자(국제) 2008년10월06일

심사청구일자 2013년09월16일

(85) 번역문제출일자 2010년04월02일

(65) 공개번호 10-2010-0080784

(43) 공개일자 2010년07월12일

(86) 국제출원번호 PCT/FR2008/051802

(87) 국제공개번호 WO 2009/053596

국제공개일자 2009년04월30일

(30) 우선권주장

0758103 2007년10월05일 프랑스(FR)

(56) 선행기술조사문헌

US20040253181 A1\*

WO2004058275 A2

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

게르브

프랑스공화국, 빌르뱅뜨 (93420), 르 데 바네스  
15

(72) 발명자

포르 마르꼬

프랑스 에프-95170 되일 라 바레 르 드 베동 86

루조 올리비에

프랑스 에프-60300 쟁리 아브뉘 뒤 발 동네뜨 18

(74) 대리인

특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 친수성 생체분포 리간드에 결합된 같은자리-비스포스포네이트 안정화충으로 피복된 나노입자  
의 신규 제조방법**(57) 요 약**

본 발명은 금속 코어와, 같은자리-비스포스포네이트 화합물이 함유된 유기 안정화충과, 1개 이상의 친수성 생체분포 리간드를 포함하는, 의료 영상용 나노입자의 신규 제조방법에 관한 것이다.

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

나노입자의 안정성/생체분포도에 영향을 미치는 동일하거나 상이한 친수성 생체분포 리간드에 결합된 유기 안정화층으로 도포된 금속 코어(N)로 이루어진 금속 나노입자의 제조방법으로,

a) 금속 나노입자로 된 금속 코어(N)를 제조하는 단계로서, 상기 금속 코어(N)은, 전부 또는 부분적으로, 수산화철; 수화된 산화철; 페라이트 또는 혼합 철산화물로 구성되는 단계와;

b) 화학식 S-C를 가진 표적화 성분을 제조하는 단계로서,

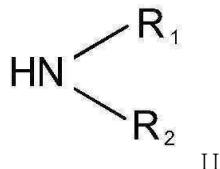
식 중에서:

- S는 화학식 X-L-CH(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>를 가진 같은자리(gem)-비스포스포네이트 접합기이고,

- C는 하기 1) 또는 2)에서 선택된 친수성 생체분포 리간드:

1) 하기로부터 선택된 아미노알콜 리간드:

- 화학식(II)의 화합물:



식 중에서:

R<sub>1</sub>과 R<sub>2</sub>는 동일하거나 상이하고, 2 내지 6개의 탄소원자를 포함하는 지방족 탄화수소계 사슬을 나타내거나,

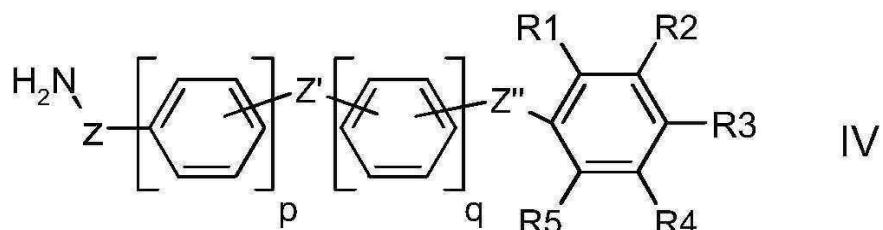
또는

R<sub>1</sub>과 R<sub>2</sub>는 동일하거나 상이하고, 6 내지 10의 하이드록실기로 치환된 2 내지 6개의 탄소원자를 포함하는 지방족 탄화수소계 사슬을 나타내거나,

또는

R<sub>1</sub>과 R<sub>2</sub>는 동일하거나 상이하고, 4 내지 8의 하이드록실기로 치환된 2 내지 6개의 탄소원자를 포함하는 지방족 탄화수소계 사슬을 나타내며, 이 경우, 상기 R<sub>1</sub>에 1개의 산소원자가 삽입되고, R<sub>2</sub>에 1개의 산소원자가 삽입되고, 또는 R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>에 1개의 산소원자가 삽입됨;

- 화학식(IV)의 화합물:



식 중에서:

Z는 결합(bond), CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CONH 또는 (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHCO 이고;

Z'는 결합, O, S, NQ, CH<sub>2</sub>, CO, CONQ, NQCO, NQ-CONQ 또는 CONQCH<sub>2</sub>CONQ 이고;

Z''는 결합, CONQ, NQCO 또는 CONQCH<sub>2</sub>CONQ 이고;

p와 q는 정수로서, 이들의 합이 0 내지 3이고;

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> 또는 R<sub>5</sub>는 각각 독립적으로 H, Br, Cl, I, CONQ<sub>1</sub>Q<sub>2</sub> 또는 NQ<sub>1</sub>COQ<sub>2</sub>이되,

Q<sub>1</sub>과 Q<sub>2</sub>는 동일하거나 상이하며, 하기로부터 선택됨:

H,

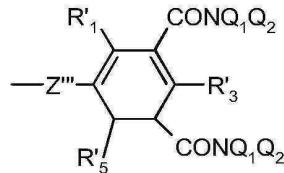
모노수산화 또는 폴리수산화된 (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)알킬기,

모노수산화 또는 폴리수산화되고 1개의 산소원자가 삽입된 (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)알킬기, 또는

1개의 산소원자가 삽입된 (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)알킬기 중에서 선택되어, Q<sub>1</sub>과 Q<sub>2</sub>를 합쳐서 총 4 내지 10개의 OH기가 포함됨;

R<sub>1</sub> 내지 R<sub>5</sub>기들 중 1개 이상, 2개 이하가 CONQ<sub>1</sub>Q<sub>2</sub> 또는 NQ<sub>1</sub>COQ<sub>2</sub>를 나타냄;

또는 R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>는 각각 독립적으로 H, Br, Cl 또는 I를 나타내고, R<sub>2</sub>와 R<sub>4</sub>는



를 나타내며,

식 중에서:

R'<sub>1</sub>, R'<sub>3</sub> 및 R'<sub>5</sub>는 동일하거나 상이하며, H, Br, Cl 또는 I를 나타내고;

Q<sub>1</sub>과 Q<sub>2</sub>는 상기와 동일한 의미를 가지고;

Z'''는 CONQ, CONQCH<sub>2</sub>CONQ, CONQCH<sub>2</sub>, NQCONQ, 또는 CONQ(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NQCO 중에서 선택되는 기이고;

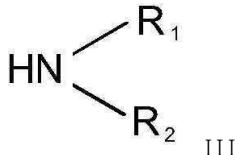
Q는 하기로부터 선택됨:

H,

(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알킬, 또는

선행 또는 분지형인 수산화된 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알킬;

2) 하기의 화학식 (III)을 가진 아미노 폴리에틸렌 글리콜인 폴리에틸렌 글리콜 리간드:



식 중에서:

$R_1$ 과  $R_2$ 는 동일하거나 상이하며, H, 알킬기 또는 화학식  $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_k-\text{CH}_2\text{OR}_3$ 의 폴리에틸렌 글리콜 사슬을 나타내되,  $R_1$ 과  $R_2$  중 하나 이상이 폴리에틸렌 글리콜 사슬을 나타내며;

$k$ 는 2 내지 100으로 다양하고;

$R_3$ 는 H,  $C_1-C_6$  알킬 또는  $-(\text{CO})\text{Alk}$  중에서 선택되며, "알크(Alk)"는  $C_1-C_6$  알킬기를 가리키는 것임;

c) 표적화 성분 S-C의 S 기를 코어(N)에 그래프트시키는 단계

를 포함하고,

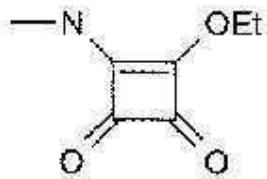
식 중에서:

• L은 X 작용기를 같은자리(gem)-비스포스포네이트  $-\text{CH}(\text{PO}_3\text{H}_2)_2$  작용기에 연결하는 유기 작용기를 나타내고, L은 하기로부터 선택된 2가의 기:

- 지방족기; 지환식기; 지환식-지방족기; 방향족기; 또는 방향족-지방족기,
- 지방족기; 지환식기; 지환식-지방족기; 방향족기; 또는 방향족-지방족기를 나타내고, 상기 지방족기, 지환식기 또는 방향족기는 메틸기, 하이드록시기, 메톡시기, 아세톡시기, 아미도기, 염소 원자, 요오드 원자 또는 브롬 원자로 치환됨;
- $-\text{L}_1-\text{NHCO-L}_2$  기로, 식 중에서  $\text{L}_1$ 과  $\text{L}_2$ 는 동일하거나 상이하고, 이들은 지방족기; 지환식기; 방향족기; 지환식-지방족기; 또는 방향족-지방족기를 나타내며, 상기 기들은 메틸기, 하이드록시기, 메톡시기, 아세톡시기, 아미도기, 염소 원자, 요오드 원자 또는 브롬 원자로 치환됨; 그리고

• X는 친수성 생체분포 리간드(C)에 결합될 수 있는 화학 작용기를 나타내고, X는 하기로부터 선택됨:

- $-\text{COOH}$ ,
- $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NCS}$ ,  $-\text{NH}-\text{NH}_2$ ,  $-\text{CHO}$ , 알킬페로카보닐( $-\text{CO}-\text{O}-\text{CO}-\text{alk}$ ), 아실아지딜( $-\text{CO}-\text{N}_3$ ), 이미노카보네이트( $-\text{O}-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}_2$ ), 비닐설퍼릴( $-\text{S}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 피리딜디설퍼릴( $-\text{S}-\text{S}-\text{Py}$ ), 할로아세틸, 말레이이미딜, 디클로로트리아지닐, 할로젠,
- 하기 화학식을 가진 작용기:



인 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 친수성 생체분포 리간드(C)의 일부는 아미노알콜 리간드이고, 다른 일부는 폴리에틸렌 글리콜 리간드인 것인 방법.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 한편으로는 표적화 성분인 S-C가 코어에 그래프트되고, 다른 한편으로는 생체분포 리간드를 포함하지 않는 안정화기(S)가 코어에 그래프트되는 것인 방법.

**청구항 4**

제1항 또는 제2항에 있어서, 표적화 성분이 코어에 그래프팅되는 정도는 1 내지 10%인 것인 방법.

**청구항 5**

제1항 또는 제2항에 있어서, S-C-T 성분(식 중에서, C는 폴리에틸렌 글리콜 리간드이고, T는 가시광선 스펙트럼의 한 범위 내에서 광자의 에너지를 흡수할 수 있는 착색기(colored group)인, 발색기를 나타냄)을 그래프트시키는 단계를 더 포함하는 방법.

**청구항 6**

삭제

**청구항 7**

삭제

**청구항 8**

삭제

**청구항 9**

삭제

**청구항 10**

삭제

**청구항 11**

삭제

**청구항 12**

삭제

**청구항 13**

삭제

**발명의 설명****기술 분야**

[0001] 본 발명은 금속 코어와, 유기 안정화층과, 병리학적 조직을 표적화하기 위한 1개 이상의 리간드를 포함하는, 의료 영상용 나노입자의 신규 제조방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 영상 진단법, 특히 자기공명 영상법(MRI)에 이용되고, 해당되는 경우 생체 표적화 리간드에 결합된 안정화 유기 층으로 피복된 금속 코어로 이루어지는 금속 나노입자가 알려져 있다.

[0003] 이들 나노입자 중에서, USPIO에 의해 일반적으로 표시되는 금속 나노입자가 특히 알려져 있으며, 이들은 특히 마그네타이트( $Fe_3O_4$ ), 마게마이트( $\gamma-Fe_2O_3$ ) 및 기타 전이원소의 자성 광물질을 포함하는 산화철로 된 초미립자로서 약 100-150nm 미만의 크기를 가진다.

[0004] 생리학적 매질 내에서 안정적인 자성입자의 콜로이드 용액을 얻기 위해서는, 자성입자의 표면을 조정할 필요가 있다. 이를 수행하기 위해, 당류(예를 들어, 텍스트란)와 같은 거대분자나, 카복실산과 같은 작은 유기분자로 구성된 유기 안정화층으로 입자를 피복한다.

[0005] 의료 영상진단을 위한 관련정보를 얻기 위해서는, 후자인 유기 안정화층을 적절한 표적화 리간드에 결합시켜 입자가 표적조직 또는 표적세포에 결합되고/되거나 그에 의해 인식되도록 하는 것이 매우 유리하다. 이러한 인식은, 예를 들어, 대식세포와 같은 면역체계의 세포에 의한 입자의 식작용-유형 메카니즘을 통해, 생체분포도에 영향을 미치는 리간드를 이용하여 유리하게 제공될 수 있다. 이들 리간드로는 예를 들어 아미노알콜기와 같은 친수성기나, 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)형 화합물이 있다.

[0006] 특허문헌 WO 2004/058275는 같은자리-비스포스포네이트형의 층을 안정화/접합층(attachment layer)으로서 이용하고, 여러 가능한 리간드 중에서 생체분포도에 영향을 미치는 친수성기(생체분포 리간드)를 리간드로서 이용하는 화합물의 합성법에 대해 기재하고 있다. 특히는, 화학식 S-C를 가진 표적화 성분으로 도포된 금속 코어(N)의 형태로 존재하는 화합물을 기술하며, 여기서:

- S는 코어에 하기의 화학식(I)을 가지는 그래프트된 같은자리-비스포스포네이트기이고,



- C는 아미노알콜형 및/또는 PEG형의 친수성 리간드(X 작용기에 결합됨)이되,

식 중에서:

\* L은 X 작용기를 같은자리-비스포스포네이트  $-CH(PO_3H_2)_2$  작용기에 연결하는 유기 작용기를 나타내고;

\* X는 친수성 리간드 C에 결합될 수 있는 화학 작용기를 나타낸다.

이들 화합물의 제조를 위해, (대체로 USPI0s를 위해 사용된)종래 방법은

- 금속 나노입자의 금속 코어(N)를 제조하는 단계;

- 코어(N)를 하기 화학식



을 가진 같은자리-비스포스포네이트 안정화층으로 도포하는 단계; 및

- 수득된 입자를 친수성기(들)와 결합시키는 단계

를 계약적으로 포함한다.

[0020] 그래프트된 리간드의 함량이 완벽하게 지배된 화합물을 얻기 위해, 전술한 방법을 개선시켜, 재현성과 함께, 코어에 그래프팅 정도를 최적화하고 조절하며, 세균성 또는 발열체 감염의 위험을 최소화시킴으로써, 정제단계를 피하고 약학적 조절을 단순화시키고, 이로써 산업적 규모에서 제품의 효율적 생산을 이를 수 있도록 한다.

[0021] 또한, 구체적으로 하기에 상세히 설명되는 아미노알콜 또는 폴리에틸렌 글리콜형의 생체분포 리간드의 경우에는, WO 2004/058275에 기재된 방법에 사용되는 리간드의 요구함량에 추가적인 문제가 존재한다. 사실, 마지막에, 표적화 성분인 S-C의 유리하게 높은 부착정도(degree of coverage), 특히는 코어에 가능한 접합 부위가 80%를 초과하는 부착정도를 획득하기 위해, 이러한 종래 방법은 많은 양의 리간드(C)를 과잉으로 사용하고(화합물 N-S [코어 + 같은자리-비스포스포네이트의 접합]의 1 당량에, 친수성 리간드 C의 약 5 당량을 첨가해야 했음), 결과적으로 높은 산업비용이 필요하였다. 구체적으로 이는 화학식(IV)의 화합물과 같은 고비용의 복합 아미노알콜류, 특히는 본 출원의 하기에 기재되는 아미노알콜 AAG1과 그의 유도체에 대한 이러한 문제를 해결하는데에 유용하였다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0022] (특허문헌 0001) WO 2004/058275

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0023] 본 출원인은 (역경로로 지칭되는) 제조방법을 통해 이들 기술문제를 해결하는데 성공하였으며, 이 방법에 따르면 유기성 같은자리-비스포스포네이트 연결그룹(linkage groups)과 화학적으로 결합된 1개 이상의 친수성 리간드로 구성되는 성분들을 제조한 후, 이들 성분[연결그룹-리간드]을 금속 나노입자에 결합시킨다. 그러면 유기성 연결그룹이 안정화(또는 접합)층에 속하거나 이를 형성하게 된다.

### 과제의 해결 수단

[0024] 이 목적을 위해, 본 발명은, 특히 의료 영상용으로, 나노입자의 안정성/생체분포도에 영향을 미치는 1개 이상의 친수성 리간드에 결합된 유기 안정화층으로 도포된 금속 코어(N)로 이루어진 나노입자의 제조방법에 관한 것으로, 상기 방법은

[0025] a) 금속 나노입자로 된 금속 코어(N)를 제조하는 단계;

[0026] b) 화학식 S-C(식 중에서, S는 화학식  $X-L-CH(Po_3H_2)_2$ 의 같은자리-비스포스포네이트 접합기이고, C는 아미노알콜 및 PEG 중에서 유리하게 선택된 친수성 생체분포 리간드임)를 가진 표적화/안정화 성분을 제조하는 단계; 및

[0027] c) 1개 이상의 표적화 성분을 코어(N)에 그래프트시키는 단계

[0028] 를 포함한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 간편하게 하기 위해, 본 출원에서 "표적화 성분" 이란 표현은 표적화/안정화 성분을 나타내는데 사용된다.

[0030] "1개 이상의 표적화 성분을 코어(N)에 그래프트시키는 단계"란 표현은 동일한 구조의 표적화 회합체(targeting assemblies)이거나, S기 및/또는 C기의 화학식이 동일하지 않은 수개의 표적화 회합체를 그래프트시키는 단계를 의미하는 것으로 이해하면 된다.

[0031] 상이한 S기를 가지는 것의 장점이라면, 구체적으로는, (L기의 크기를 변화시킴으로써) 조영제의 유체역학적 크기를 증가시키거나 감소시킬 수 있다는 것이며, 이는 생성물의 생체분포도를 진단학적 적응증(diagnostic indication)에 따라 최적화시킬 수 있게 한다.

[0032] 일부 구현예에 따르면, 표적화 성분은 아미노알콜이다.

[0033] 일부 구현예에 따르면, 표적화 성분은 PEG이다.

[0034] 일부 구현예에 따르면, 표적화 성분의 일부는 아미노알콜이고, 표적화 성분의 다른 일부는 PEG이다. 리간드는 그래프트된 표적화 성분 간에 동일하거나 상이할 수 있다.

[0035] 일부 구현예에 따르면, 그래프팅 이후에 수득된 금속 나노입자는, 예를 들어, 입자(아미노알콜, PEG 분지, 여러 가지 상이한 아미노알콜)의 생체분포도 및/또는 안정성에 유리한 효과를 미치는 친수성 리간드를 가진 표적화 성분 10 내지 90%와, 상이한 리간드를 가진 표적화 성분을 그 나머지로(90 내지 10%) 가지게 될 것이다.

[0036] 일부 구현예에 따라, 한편으로는 표적화 성분인 S-C(친수성기를 포함함)가 코어에 그래프트되고, 다른 한편으로는 생체분포 리간드를 포함하지 않는 안정화기(S)가 코어에 그래프트된다. 예를 들어, 5 내지 95%의 S-C기와 그 나머지로(95 내지 5%) S기가 있게 된다.

[0037] 여러 다양한 가능성을 상세 설명의 끝 부분에 있는 표에 나타내었다.

[0038] 이들 함량은 (가능성 있는 접합 부위들, 통상 나노입자의 표면에 위치하는 양성자화된 부위들에서) S 또는 S-C 성분에 의한 코어의 부착정도에 해당된다. 따라서 퍼센트 값을 코어 상에 존재하는 접합 부위의 개수 당 S-C 또는 S 분자들의 수로서 표현한다. 따라서, 부착정도가 100%라면, 코어의 표면이 실질상 완전히 S-C 및/또는 S 성분으로 피복되게 된다(예를 들어, 80%의 S-C기와 20%의 S기). 이 부착정도는 따라서 전술된 그래프팅 정도와 다르다.

[0039] 금속 나노입자의 유체역학적 직경은 약 10 내지 100nm, 특히는 10 내지 50nm이다.

[0040] 표적화 회합체의 각 S기는 1개 이상의 코어 연결부, 및 리간드(C)와 결합되는, 더 구체적으로는 리간드의 반응성 작용기에 공유결합되는 1개 이상의 화학 작용기(X)를 포함한다.

[0041] a) 단계와 b) 단계는 임의의 순서로 수행될 수 있되, c) 단계 이전에 수행된다.

[0042] 접합(안정화)층은 코어(N)에 그래프트된 S기의 회합체로 구성된다. 코어(N)에 대한 표적화 성분 S-C 및/또는 S의 그래프팅 정도(철 1몰 당 S-C 및/또는 S 화합물의 몰 퍼센트; 그래프팅 정도는 인의 분석으로부터 결정됨)는, 약 7-8nm의 결정크기를 지닌 코어의 경우 통상적으로 0.5 내지 10%이며, 특히는 1 내지 5%로, 예를 들어 1, 2, 3, 5 또는 10%이다.

[0043] 일부 구현예에 따르면, 표적화 성분인 S-C 이외에도, 나노입자의 안정성에 영향을 미치는 작용기들, 예를 들면, 글루콘산, 옥살산, 만델린산, 4-하이드록시-3-메톡시만델린산, 락토바이오산, 알파-하이드록시히푸르산, 메틸-2-하이드록시부틸산, 글리콜산, N-아세틸뉴라민산 및 포스포에놀피루브산 중에서 선택되는 하이드록시모노카복실산이 또한 그래프트된다.

[0044] 따라서, 매우 유리하게도, 리간드를 포함한 화합물을 이용하여 나노입자의 그래프팅 정도를 완벽하게 조절할 수 있으며, 이는 비용, 분석, 그리고 생성물의 생리학적 효과의 특징화 및 조절 측면에서 매우 유용하다. 더 나아가, 표적화 성분인 S-C의 제조, 구체적으로는, 그래프트 되기 전 이들 성분의 순도(이는 공업 제조에 중요함)를 완벽히 조절한다.

[0045] 이제 코어(N)에 대해 좀 더 명확하게 설명하기로 한다. 제조된 나노입자의 금속 코어는 통상, 전부 또는 부분적으로, 수산화철; 수화된 산화철; 혼합 철산화물(예컨대, 코발트, 니켈, 망간, 베릴륨, 마그네슘, 칼슘, 바륨, 스트론튬, 구리, 아연 또는 백금과 철의 혼합 산화물); 또는 후자의 혼합물로 구성된다. “페라이트”란 용어는 일반 화학식  $[x\text{Fe}_2\text{O}_3.y\text{M}_0_2]$ 의 철산화물을 가리키며, 여기서 M은 Fe, Co, Ru, Mg 또는 Mn과 같이 자기장의 영향 하에 자성화될 수 있는 금속을 가리키며, 선택적으로는 방사성인 자성금속일 수도 있다. 바람직하게, 본 발명에 의한 조성물의 자성입자는 페라이트, 특히 마계마이트( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ )와 마그네타이트( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), 또는 코발트와 혼합된 페라이트( $\text{Fe}_2\text{CoO}_4$ )나 망간과 혼합된 페라이트( $\text{Fe}_2\text{MnO}_4$ )를 포함한다. 나노입자의 코어는 산성상태가 되어 S-C 성분의 결합을 용이하게 한다. 산성 코어의 제조방법(질산을 이용하는 단계)은 특허문현 WO 2004/058275(US 2004/253181, 특히 19쪽 331 내지 339 단락)에 상세히 기재되어 있다. S 및/또는 S-C기의 접합 이전에 산성화 단계(매우 산성인 pH - 통상 1 내지 3)를 포함하는 이러한 방법은, 완벽히 조절되는 다분산도를 지니고 안정적인 콜로이드 용액의 상태로 존재하는 특히 유리한 입자들을 얻을 수 있도록 한다.

[0046] 이제 L기에 대해 설명하기로 한다. 바람직하게, L 연결그룹은 2가의 작용기로, 바람직하게는

[0047] - 지방족기; 지환식기; 지환식-지방족기; 방향족기; 또는 방향-지방족기(상기 지방족기, 지환식기 및 방향족기는 메틸기, 하이드록시기, 메톡시기, 아세톡시나 아미도기, 또는 염소 원자, 요오드 원자나 브롬 원자로 임의 치환될 수 있음); 및

[0048] -  $-\text{L}_1\text{-NHCO-L}_2$  기(식 중에서  $\text{L}_1$ 과  $\text{L}_2$ 는 동일하거나 상이하고, 이들은 지방족기; 지환식기; 지환식-지방족기; 방향족기; 또는 방향족-지방족기(상기 작용기들은 메틸기, 하이드록시기, 메톡시기, 아세톡시나 아미도기, 또는 염소 원자, 요오드 원자나 브롬 원자로 임의 치환될 수 있음)를 나타냄)

[0049] 중에서 선택된다.

[0050] 여기서 지방족기는 바람직하게 1 내지 16개, 보다 바람직하게는 1 내지 6개의 탄소원자를 포함하는 선형 또는 분지형 탄화수소계 사슬이다. 바람직하게, 지방족기는 알킬기를 가리킨다. 그 예로서 특히 메틸 라디칼, 에틸 라디칼, 프로필 라디칼, 이소프로필 라디칼, 부틸 라디칼, 터트-부틸 라디칼, 이소부틸 라디칼, 펜틸 라디칼 및 헥실 라디칼이 있다.

[0051] “지환식” 이란 용어는 3 내지 8개의 탄소원자를 포함하는 환형 탄화수소계 사슬로서, 바람직하게는 사이클로알킬기이다. 그 예로서, 사이클로프로필과 사이클로헥실이 특히 언급될 수 있다.

[0052] “지방족” 이란 용어는 바람직하게 5 내지 20개, 보다 바람직하게는 6 내지 18개의 탄소원자를 포함하는 일환 또는 다환 방향족 탄화수소계 그룹이다. 그 예로서 특히 페닐 라디칼 및 1-나프틸 또는 2-나프틸 라디칼이 있다. 특정의 일 변형예에 따르면, 본 발명의 정의 내에서 “방향족”기는 1종 이상의 헤테로원자, 예컨대 황, 산소 또는 질소를 통합할 수 있다. 이러한 특정의 경우에, “방향족”기는 일환 또는 다환 헤테로방향족기를 가리킨다.

[0053] “지방족-지환식” 기와 “지방족-방향족”기는 앞서 언급된 정의에 해당되는 지방족 사슬을 나타내며, 전술된

바와 같이 치환식기 또는 지방족기로 각각 치환된다. 지방족-방향족기의 예로서 벤질이 특히 언급될 수 있다.

[0054] 바람직한 변형예에 따르면, L은 임의 치환된 페닐렌기를 나타내고, X기와 같은자리-비스포스포네이트기는 오르토, 메타 또는 파라 위치에 있을 수 있다.

[0055] 특히 바람직한 일 구현예에 따르면, L은 치환 또는 비치환된 지방족기이며, 보다 바람직하게는  $-(CH_2)_p-$ 기(식 중에서 p는 0 내지 5의 정수임)를 나타낸다.

[0056] 다른 바람직한 구현예에 따르면, L은  $L_1-CO-NH-L_2$ 기이고, 보다 바람직하게는  $-(CH_2)_n-NHCO-(CH_2)_m-$ 기(식 중에서 n과 m은 1 내지 5의 정수를 나타냄)이다.

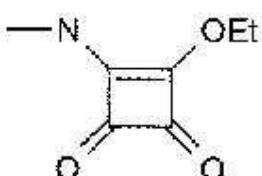
[0057] 화학식(I)의 같은자리-비스포스포네이트 화합물의 X 말단은 바이오벡터 상에 존재하는 작용기와 반응하고 공유 결합을 형성할 수 있도록 선택된다. 이를 결합에 관한 더 많은 정보를 위해서는, *Bioconjugate techniques*, Greg T. Hermanson, 1995, Publisher: Academic, San Diego, Calif.의 연구를 특히 참조할 수 있다.

[0058] 바람직한 X기로서,

-  $-COOH$ ,

[0060] -  $-NH_2$ ,  $-NCS$ ,  $-NH-NH_2$ ,  $-CHO$ , 알킬파로카보닐( $-CO-O-CO-alk$ ), 아실아지딜( $-CO-N_3$ ), 아미노카보네이트( $-O-C(NH)-NH_2$ ), 비닐설퍼릴( $-S-CH=CH_2$ ), 피리딜디설퍼릴( $-S-S-Py$ ), 할로아세틸, 말레이미딜, 디클로로트리아지닐, 할로겐,

[0061] - 하기 화학식을 가진 작용기:

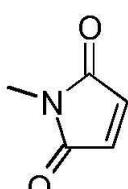


[0062]

[0063] 가 특히 언급될 수 있으며, 특히 바람직한 것은  $-COOH$ 기와  $-NH_2$ 기이다.

[0064] “알크(alk)”란 용어는, 본 설명의 정의 내에서,  $C_1-C_6$  알킬 라디칼을 가리키고, 한편 “Py”란 용어는 피리딜 라디칼을 가리킨다.

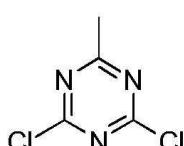
[0065] 말레이디밀 라디칼은 하기 화학식:



[0066]

[0067] 을 가진 환형 라디칼을 가리킨다.

[0068] 디클로로트리아지닐 라디칼은 하기 화학식:



[0069]

[0070] 을 가진 라디칼을 가리킨다.

[0071] 할로겐기 중에서는, 염소, 브롬, 불소 및 요오드가 특히 언급될 수 있으며, 특히 바람직한 것은 염소와 브롬이다.

[0072] 본 설명의 정의 내에서 "할로아세틸"이란 용어는 아세틸 라디칼  $\text{CH}_3\text{-CO-}$ 을 의미하는 것으로 이해하면 되며, 이의 수소 원자들 중 하나는 전술된 바와 같은 할로겐 원자로 치환된다.

[0073] 바람직하게, X는  $-\text{COOH}$ 기 또는  $-\text{NH}_2$ 기를 나타내고, L은 치환 또는 비치환된 지방족기, 보다 바람직하게는  $-(\text{CH}_2)_p$ -기(식 중에서 p는 1 내지 5의 정수임)를 나타낸다.

[0074] 하기 화학식(Ia):

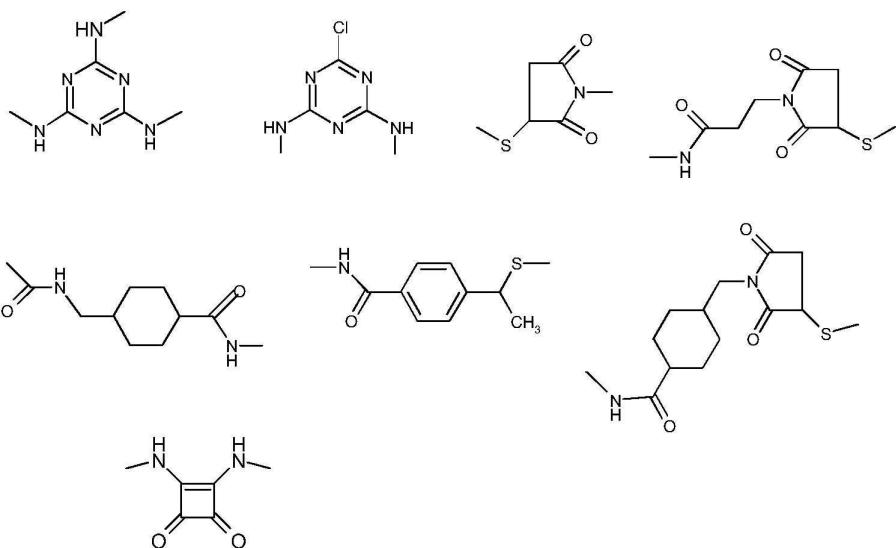
[0075]  $\text{HOOC-(CH}_2)_2\text{-CH(PO}_3\text{H}_2\text{)}_2$  (Ia)

[0076] 을 가진 화합물이 가장 특히 바람직하다.

[0077] 또 다른 바람직한 구현예에 따르면, L은  $\text{L}_1\text{-CONH-L}_2$ 기, 보다 바람직하게는  $-(\text{CH}_2)_n\text{-NHCO-(CH}_2)_m\text{-}$ 기(식 중에서 n과 m은 0 내지 5의 정수를 나타냄)를 나타내고, X는  $-\text{COOH}$ 기 또는  $-\text{NH}_2$ 기를 나타낸다.

[0078] 물론, 본 발명의 범위 내에 속하는 또 다른 사항으로는 X 작용기와 바이오벡터를 간접적인 방식으로, 다시 말하면 동형의 양작용성(homobifunctional) 또는 이형의 양작용성(heterobifunctional) 시약을 통해, 결합시키는 것이다. 동형의 양작용성 시약의 예로서, 글루타르알데하이드가 예컨대 X =  $-\text{NH}_2$  작용기와 바이오벡터의  $-\text{NH}_2$  작용기와의 결합을 수행하는데 적합할 수 있다.

[0079] 본 발명의 바람직한 변형예에 따르면, X 작용기는  $-\text{CONH-}$ ,  $-\text{COO-}$ ,  $-\text{NHCO-}$ ,  $-\text{OCO-}$ ,  $-\text{NH-CS-NH-}$ ,  $-\text{C-S-}$ ,  $-\text{N-NH-}$ ,  $-\text{CO-NH-N-}$ ,  $-\text{CH}_2\text{-NH-}$ ,  $-\text{N-CH}_2\text{-}$ ,  $-\text{N-CS-N-}$ ,  $-\text{CO-CH}_2\text{-S-}$ ,  $-\text{N-CO-CH}_2\text{-S-}$ ,  $-\text{N-CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-}$ ,  $-\text{CH=NH-NH-}$ ,  $-\text{NH-NH=CH-}$ ,  $-\text{CH=N-O-}$ ,  $-\text{O-N=CH-}$  또는 하기의 화학식:



[0080]

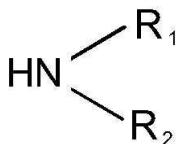
[0081] 예 해당되는 유형의 바이오벡터와 공유결합( $\text{L}_3$ )을 형성한다.

[0082] 같은자리-비스포스포네이트의 X 작용기의 전부 또는 일부, 통상적으로 약 50 내지 100%, 특히 50, 60, 70, 80, 90 또는 95%가 생체분포 리간드에 결합된다.

[0083] 바람직하게, 친수성 생체분포 리간드는 아미노알콜 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG로도 알려짐) 리간드이다.

[0084] 본 발명에 따른 "아미노알콜"이란 용어는 2 내지 10개의 탄소원자를 포함하는 1개 이상의 지방족 탄화수소계 사슬을 지닌 아민 작용기로 이루어진 리간드를 의미하는 것으로 이해하면 되며, 상기 탄화수소계 사슬은 수 개의, 특히는 4 내지 10개의 하이드록실기로 치환된다.

[0085] 바람직한 구현예에 따르면, 아미노알콜 리간드는 하기의 일반 화학식(II)을 가진 화합물로,



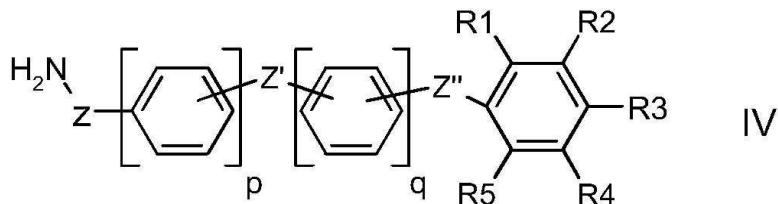
II

[0086] 식 중에서:

[0088] R<sub>1</sub>과 R<sub>2</sub>는 동일하거나 상이하고 2 내지 6개의 탄소원자를 포함하는 지방족 탄화수소계 사슬을 나타내며, 탄화수소계 사슬은 바람직하게 6 내지 10개의 하이드록실기로 치환되거나, 또는 R<sub>1</sub> 및/또는 R<sub>2</sub>에 1개 이상의 산소원자가 삽입(interrupt)된 경우에는 4 내지 8개의 하이드록실기로 치환된다.

[0089] 화학식(II)의 아미노알콜 리간드의 예로서, R<sub>1</sub>과 R<sub>2</sub>가 각각 독립적으로 -(CH<sub>2</sub>)-(CHOH)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>OH 또는 -(CH<sub>2</sub>)-CHOH-CH<sub>2</sub>OH기를 나타내는 리간드, 구체적으로 -(CH<sub>2</sub>)-(CHOH)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>OH 또는 -(CH<sub>2</sub>)-CHOH-CH<sub>2</sub>OH기를 나타내고 R<sub>2</sub>가 -(CH<sub>2</sub>)-(CHOH)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>OH기를 나타내는 리간드가 특히 언급될 수 있다.

[0090] 또 다른 바람직한 구현예에 따르면, 아미노알콜 리간드는 하기의 화학식(IV)을 가진 화합물로,



[0091]

[0092] 식 중에서:

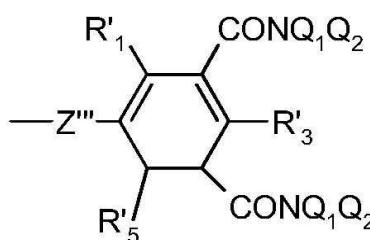
[0093] Z는 결합(bond), CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CONH 또는 (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHCO 이고;

[0094] Z'는 결합, O, S, NQ, CH<sub>2</sub>, CO, CONQ, NQCO, NQ-CONQ 또는 CONQCH<sub>2</sub>CONQ 이고;

[0095] Z'' 는 결합, CONQ, NQCO 또는 CONQCH<sub>2</sub>CONQ 이고;

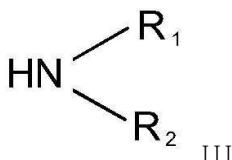
[0096] p와 q는 정수로서, 이들의 합이 0 내지 3(단, 유리한 변형예에 따르면, p=q=0)이고;

[0097] R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> 또는 R<sub>5</sub>는 각각 독립적으로 H, Br, Cl, I, CONQ<sub>1</sub>Q<sub>2</sub> 또는 NQ<sub>1</sub>COQ<sub>2</sub>이되, Q<sub>1</sub>과 Q<sub>2</sub>는 동일하거나 상이 하며 H 및 모노수산화 또는 폴리수산화되고/되거나 1개 이상의 산소원자가 임의로 삽입된 (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)알킬기 중에서 선택됨으로써 Q<sub>1</sub>과 Q<sub>2</sub> 사이에 4 내지 10개의 OH기가 포함되고, R<sub>1</sub> 내지 R<sub>5</sub>기들 중 1개 이상, 2개 이하가 CONQ<sub>1</sub>Q<sub>2</sub> 또는 NQ<sub>1</sub>COQ<sub>2</sub>를 나타내거나, 그렇지 않으면 R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>는 각각 독립적으로 H, Br, Cl 또는 I를 나타내고, R<sub>2</sub>와 R<sub>4</sub>는



[0098]

- [0099] 를 나타내며, 식 중에서:
- [0100]  $R'_1$ ,  $R'_3$  및  $R'_5$  는 동일하거나 상이하며, H, Br, Cl 또는 I를 나타내고;
- [0101]  $Q_1$ 과  $Q_2$ 는 상기와 동일한 의미를 가지고 있고;
- [0102]  $Z''$ 는 CONQ, CONQCH<sub>2</sub>CONQ, CONQCH<sub>2</sub>, NQCONQ, CONQ(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NQCO 중에서 선택되는 기이고;
- [0103] Q는 H 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)알킬로서, 상기 알킬기는 가능하다면 선형 또는 분지형이고 임의 수산화된다.
- [0104] 바람직하게, Z는 CH<sub>2</sub>이다.
- [0105] 바람직하게, p=q=0이다.
- [0106] 바람직하게,  $Z''$ 는 CONH이다.
- [0107] 바람직하게,  $R_2$ 와  $R_4$ 는 CONQ<sub>1</sub>Q<sub>2</sub>를 나타낸다.
- [0108] 바람직하게,  $R_1$ ,  $R_3$  및  $R_5$ 는 Br을 나타낸다.
- [0109] 바람직하게,  $Q_1$ 과  $Q_2$ 는 각각 독립적으로 -(CH<sub>2</sub>)-(CHOH)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>OH 또는 -(CH<sub>2</sub>)-CHOH-CH<sub>2</sub>OH기를 나타내며, 구체적으로 -(CH<sub>2</sub>)-(CHOH)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>OH기를 나타낸다.
- [0110] 특히 바람직한 구현예에 따르면, 아미노알콜 리간드는 하기의 화학식(IV):
- IV
- [0111] 을 가진 화합물이다.
- [0112] 바람직하게는, 본 발명에 따른 아미노알콜 리간드가 그들의 -NH- 또는 -NH<sub>2</sub> 아민 작용기를 통해, 화학식 X-L-CH<sub>2</sub>(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>를 가지는 접합기 S의 X 작용기에 결합함에 따라, 하이드록실 작용기가 유리상태에 있게 되어 그들의 친수성 성질을 유지하게 된다.
- [0113] "폴리에틸렌 글리콜" 이란 표현은, 본 출원의 정의 내에서, -CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-CH<sub>2</sub>OR<sub>3</sub> 사슬을 포함하는 화합물을 일반적으로 가리키며, 식 중에서 k는 2 내지 100(예를 들어: 2, 4, 6, 10 또는 50)이고, R<sub>3</sub>는 H, 알킬 및 -(CO)Alk 중에서 선택되고, "알킬" 또는 "알크(alk)"는 약 1 내지 6개의 탄소원자를 사슬내에 가지는 선형 또는 분지형 탄화수소계 지방족기를 가리킨다.
- [0114] 본원에 사용되었듯이 "폴리에틸렌 글리콜" 이란 표현은, 구체적으로, 하기의 화학식(III)을 가진 아미노 폴리에틸렌 글리콜 화합물로,



- [0115] 식 중에서:
- [0116]  $R_1$ 과  $R_2$ 는 동일하거나 상이하며, H, 알킬기 또는 화학식 -CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-CH<sub>2</sub>OR<sub>3</sub>을 가진 폴리에틸렌 글리콜 사슬

을 나타내되,  $R_1$ 과  $R_2$  중 하나 이상이 폴리에틸렌 글리콜 사슬을 나타내는 것으로 이해되며;

[0119]  $k$ 는 2 내지 100(예를 들면: 2, 4, 6, 10 또는 50)으로 다양하고;

[0120]  $R_3$ 은 H, 알킬 및  $-(CO)Alk$  중에서 선택되며, “알킬” 또는 “알크(Alk)”란 용어는 약 1 내지 6개의 탄소원자를 사슬내에 가지는 선형 또는 분지형 탄화수소계 지방족기를 가리킨다.

[0121] 아미노 폴리에틸렌 글리콜의 예로는, 특히, 0-(2-아미노에틸)-0'-메틸 폴리에틸렌 글리콜 1100, 0-(2-아미노에틸)-0'-메틸 폴리에틸렌 글리콜 2000, 0-(2-아미노에틸)-0'-메틸 폴리에틸렌 글리콜 750 화합물들과, 예를 들면 PEG 340, PEG 750, PEG 1500, PEG 2000 화합물들이 있다.

[0122] 본 출원의 S-C 화합물을 N 코어에 그래프트시키는 일은 S 화합물의  $CH(PO_3H_2)_2$  부분에 의해 수행되는 것으로 명시되어 있다.

[0123] 본 출원인은 특히 아미노알콜 및/또는 PEG 리간드에 대해, 합성과정이 용이하고 수율이 개선되는 것 뿐만이 아니라, 수득되는 최종 생성물이 규제 사항 및 진단분야의 용도에 매우 만족스럽게 부합한다는 점을 주목하였다. 이들 작용기를 거의 모든 코어에 부착하여, 구체적으로는 스틸스(stealth)를 향상시키고(그 결과 유리하게 생성물이 간에 의해 덜 흡수됨) 대식세포 섭취를 향상시켜(대식세포의 표적화가 개선되며, 이는 특히 죽상판, 신경 절(ganglia) 및 기타 감염부위들의 감시용으로 장점을 가짐), 이들 친수성 리간드를 위해 특히 유리한 안정성과 생체분포도가 생성물에 부여된다. 더 나아가, 생산 단위의 재생성, 품질 및 약학적 안전성의 요구조건을 충족시키기 위해, 리간드의 함량을 조절하는 일은 혼합 부착, 예를 들어, 아미노알콜 리간드와 PEG 리간드를 가진 생성물에 유리한 것으로 여겨지고 있다.

[0124] 예상과 달리, 본 출원인의 신규 역방향 경로과정은, 특히 이러한 아미노알콜의 생체분포 리간드 함량을 3 내지 10배로 분할시키는 일을 가능하게 한다. 하기의 표는, 이러한 결과를, 실시예 4로부터 얻은 화합물이 아미노알콜로서 이용된 실시예 14의 화합물을 예로 들어서 나타내었다.

표 1

	직접적인 경로 (종래기술)	역방향 경로
S-C 성분의 부착이 90%를 상회하도록 첨가되는 아미노알콜 리간드의 양	5 내지 10 당량	1.2 내지 2.2 당량
실시예 4로부터 얻은 아미노알콜과의 그래프팅 정도(Fe 1몰당 아미노알콜 리간드%로 표현함)	1.2%	2%
상기 그래프팅 정도를 얻기 위해 사용된 아미노알콜의 양(아미노알콜의 몰로 표현함)	0.2몰	0.025몰

[0126] 따라서, 본 출원인은 리간드들의 그래프팅 정도를 조절하는 문제와, 사용되는 리간드의 양을 감소시키는 문제라는 이중 문제를 해결하는데 성공하였다.

[0127] 특정 구현예에 따르면, 본 발명에 따른 방법은 또한 S-C-T 성분을 그래프트시키는 단계를 포함하며, 여기서 C는 폴리에틸렌 글리콜 리간드이고 T는 발색기를 나타낸다.

[0128] “발색기”란 용어는 착색기(colored group), 다시 말해서 가시광선 스펙트럼의 한 범위 내에서 광자의 에너지를 흡수할 수 있는 반면에 나머지 광장을 투과되거나 산란되는 착색기를 의미하는 것으로 이해하면 된다.

[0129] 본 발명에 따라 사용가능한 발색기의 예로는, 4-(아미노)플루오레신 하이드로클로라이드를 특히 언급할 수 있다.

[0130] 또한 본 발명은 진단용 또는 치료용 조성물의 제조를 위해 본 출원인의 방법을 통해 수득된 나노입자의 용도에 관한 것이다. 나노입자는, 특히, 특허문헌 WO 2004/058275에 상술된 바와 같이 나노입자 조성물 형태의 조형제로서, MRI 영상법 또는 X선 스캐너용으로 사용된다.

[0131] 일부 구현예에 따르면, 이들 입자는, 고형 지질 나노입자의 캡슐화 시스템 또는 진단용 제제로서 사용되는 나노입자는 물론 치료용 유효성분을 함유하기도 하는 리포솜 유형의 캡슐화 시스템과 같은, 유효성분의 방출을 위한

시스템으로 운반된다.

[0132] 본 발명의 또 다른 주제는 앞서 정의된 바와 같은 S-C 표적화 성분으로, 이는 본 발명의 방법에 따라 사용될 수 있다.

[0133] 하기에 상술되는 실시예들을 이용하여 본 발명을 설명하기로 한다.

[0134] 하기에서, 약어들 M, M/L, 이론적 M, N, M/z, ES<sup>+</sup>, ES, kD 및 TLC는 특허문현 WO 2004/058275 (US 2004/253181)에 기재된 바와 같은 의미를 지닌다:

[0135] M 또는 M/L: 몰농도(몰/리터).

[0136] 이론적 M: 이론적 몰 질량.

[0137] N: 노말 농도.

[0138] M/z: 질량 분석기에 의해 결정되는 질량대 전하 비율.

[0139] ES<sup>+</sup>: 양성모드 전기분무.

[0140] ES<sup>-</sup>: 음성모드 전기분무.

[0141] TFA: 트리플루오로아세트 산.

[0142] kD: 몰 질량 단위(킬로달톤).

[0143] TLC: 박막 크로마토그래피.

[0144] Z ave: PCS로 측정한 유체역학적 직경.

[0145] Poly σ: PCS로 측정한 다분산도.

[0146] 하기의 화학 명명은 IUPAC 규칙에 따라 ACD/NAME 소프트웨어(Advanced Chemistry Development Inc., 토론토, 캐나다)에서 유도되었다.

[0147] 전체 철 분석:

[0148] 진한 염산으로 광화(mineralization)시키고 철(III)이온의 표준범위를 기준으로 희석(0, 5, 10, 15 및 20ppm) 시킨 후, 원자흡광광도계(VARIAN AA10 분광도계)를 통해 철을 분석하였다.

[0149] 입경:

[0150] - 그래프트된 입자의 유체역학적 직경(Z ave) = PCS 크기:

[0151] 주입을 위해 물로 약 1 밀리몰까지 희석하고 0.22μm를 통해 여과된 시료 상에서 PCS를 통해 결정하였다(Malvern 4700 machine, 90°에서의 488nm 레이저).

[0152] PCS = Photon Correlation Spectroscopy Reference: R. Pecora in *J. of Nano. Res.* (2000), 2, p. 123-131.

[0153] - 자성 입자(p)의 직경(그래프팅 이전):

[0154] 다양한 온도에서 자화곡선의 복원법(deconvolution of the magnetization curves)(SQUID 자기력계 상에서 측정됨)에 의해 결정하였다(참조: R.W. Chantrell in *IEEE Transactions on Magnetics* (1978), 14(5), p. 975-977).

[0155] 구조적 분석:

[0156] 전기분무 공급기가 구비된 질량 분석기(MICROMASS VG Quattro II machine)로 수행하였다.

[0157] 실시예 1:

[0158] FeCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O 36g(0.181몰)과 150ml의 H<sub>2</sub>O에 용해된 37% HCl 20ml로 만든 용액을, 물 3리터와 27% FeCl<sub>3</sub> 143ml(0.302몰)로 이루어진 혼합물에 투입하였다. 빠른 교반과 함께, 25% NH<sub>4</sub>OH 250ml를 신속하게 투입하였다.

이렇게 얻은 혼합물을 30분간 교반하였다. 그런 후 자성분리법으로 용액을 제거하였다. 자성유체(ferrofluid)를 2리터의 물로 3번 연속적으로 세척하였다. 질소함유-자성유체를 15분간  $\text{HNO}_3$  [2M] 200ml와 함께 교반하고, 자성분리법으로 상청액을 분리하였다. 질소함유-자성유체를 물 600ml와  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  [1M] 200ml과 함께 30분간 환류시켰다. 그런 후 자성분리법으로 상청액을 제거하였다. 질소함유-자성유체를 15분간  $\text{HNO}_3$  [2M] 200ml와 함께 교반하고, 자성분리법으로 상청액을 제거하였다. 질소함유-자성유체를 3리터의 아세톤으로 3번 세척한 후에, 400ml의 물에 녹였다(taken up). 최종부피가 250ml로 될 때까지 용액을 진공하에 증발시켰다.

표 2

[0159]	농도 M/L	Z ave nm	Poly σ	SQUID 직경	Ms emu/cm <sup>3</sup>
	4.85	40 nm	0.22	8.5 nm	275

실시예 2:

450ml의  $\text{H}_2\text{O}$ 에 용해된  $\text{FeCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  108g(0.543몰)을, 물 4리터와 27%  $\text{FeCl}_3$  429ml(0.906몰)의 용액에 투입하였다. 빠른 교반(1200 rpm)과 함께, 25%  $\text{NH}_4\text{OH}$  750ml를 신속하게 투입하였다. 이렇게 얻은 혼합물을 30분간 교반하였다. 그런 후 자성분리법으로 용액을 제거하였다. 자성유체를 3리터의 물로 2번 연속적으로 세척하였다. 질소함유-자성유체를 1/4시간 동안 3리터의  $\text{HNO}_3$  [2M]과 함께 교반하고, 자성분리법으로 상청액을 분리하였다. 질소함유-자성유체를 물 1300ml와  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  [1M] 700ml과 함께 30분간 환류(600 rpm)시켰다. 그런 후 자성분리법으로 상청액을 제거하였다. 질소함유-자성유체를 15분간 3리터의  $\text{HNO}_3$  [2M]과 함께 교반하고, 자성분리법으로 상청액을 제거하였다.

질소함유-자성유체를 3리터의 아세톤으로 3번 세척한 후에, 600ml의 물에 녹였다. 이렇게 얻은 용액을 최종부피가 250ml로 될 때까지 진공하에 증발시켰다.

표 3

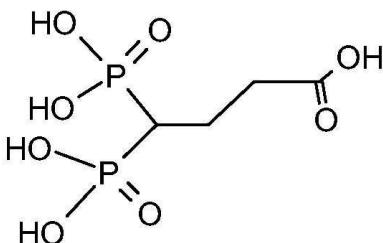
[0163]	수율%	농도 M/L	Z ave (nm)	Poly σ
	81.8	4.45	31.3	0.21

상기 용액의 200ml를 2.4 리터의  $\text{HNO}_3$  중에 4시간 동안 교반하였다. 그런 후 자성분리법으로 상청액을 제거하였다. 질소함유-자성유체를 3리터의 아세톤으로 2번 세척한 후에, 400ml의 물에 녹였다. 이렇게 얻은 용액을 최종부피가 250ml로 될 때까지 진공하에 증발시켰다.

표 4

[0165]	수율%	농도 M/L	Z ave (nm)	Poly σ
	77	2.742	23.3	0.20

[0166] 실시예 3:



[0167]

[0168] 단계 a: 디에틸-1-[디에톡시포스포릴]비닐 포스포네이트

파라포름알데하이드 13g(0.433몰)과 디에틸아민 10ml(0.097몰)를 고온의 조건하에서 250ml의 메탄올에 용해하였다. 그런 후에는 디에틸[디에톡시포스포릴]메틸 포스포네이트 24g( $8.67 \times 10^{-2}$ 몰)을 첨가하였다. 이렇게 얻은 혼합물을 24시간 동안 환류시켰다. 반응매질을 진공하에서 농축하였다. 농출물을 250ml의 톨루엔에 2번 녹인 후에 진공하에서 농축하였다. 수득된 오일을 125ml의 톨루엔에 용해하였다. 파라-톨루엔설휠산 0.14g을 첨가하였다. 이렇게 얻은 혼합물을 Dean-Stark 트랩을 이용하여 24시간 동안 환류한 후, 진공하에서 농축시켜 건조상태로 만들었다. 500ml의  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 로 생성물을 추출한 후, 250ml의 물로 2번 세척하였다. 유기상을  $\text{MgSO}_4$ 로 건조시키고, 진공하에서 농축하였다. 조 생성물을 625g의 Merck Geduran®실리카 젤(40-63  $\mu\text{m}$ ) 상에서 정제하였다. 용출:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /아세톤 - 50/50 (TLC  $\text{SiO}_2$ :  $R_f = 0.45$ ). 18.4g을 분리하였으며 수율은 71%였다.

[0170]

MS:  $M/z = 301.4$  ( $\text{ES}^+$ ).

[0171] 단계 b: 디에틸 2-[2,2-비스(디에톡시포스포릴)에틸] 말로네이트

디에틸 말로네이트 1.6g(0.01몰)과, 에톡시화 나트륨 0.07g(0.001몰)과, 디에틸[디에톡시포스포릴]비닐 포스포네이트 3g(0.01몰)을 15ml의 에탄올 중에서 15분간 교반하였다.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  포화용액 5ml를 에탄올 용액에 첨가하였다. 이렇게 얻은 혼합물을 진공하에서 농축하였다. 잔류물은 30ml의 에틸아세테이트로 추출하고 5ml의 물로 2번 세척하였다. 유기상을  $\text{MgSO}_4$ 로 건조시킨 후, 증발시켜서 건조상태로 만들었다. 수득된 오일을 200g의 Merck Geduran®실리카 상에서 정제하였다. 3.8g을 분리하였으며 수율은 82%였다.

[0173]

MS:  $M/z = 460.9$  ( $\text{ES}^+$ ).

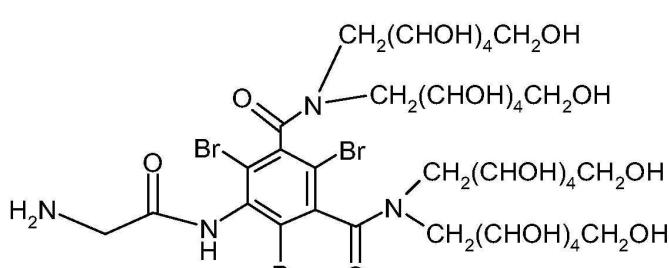
[0174] 단계 c: 4,4-디포스포노부탄산

디에틸 2-[2,2-비스(디에틸포스포릴)에틸]말로네이트 7g( $15.7 \times 10^{-2}$ 몰)을 350ml의  $\text{HCl}$ [5N]에서 8시간 동안 환류시켰다. 수득된 갈색 오일을 물 용출법으로 60g의 실란처리된 실리카겔 상에서 정제하였다. 3.6g을 분리하였으며 수율은 92%였다.

[0176]

MS:  $M/z = 249$  ( $\text{ES}^+$ ).

[0177] 실시예 4:



[0178]

[0179] 특히 EP 0 922 700 A1에 기재된 과정에 따라 화합물(아미노알콜 친수성 리간드)을 제조할 수 있다.

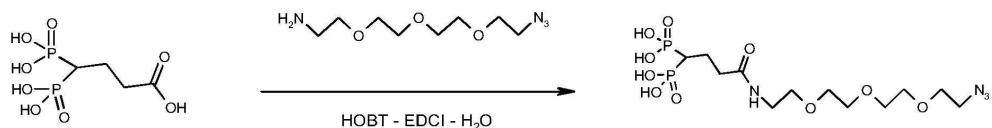
[0180] 실시예 5:

[0181] 실시예 3, 단계 c에서 제조된 화합물의 600mg( $2.42 \times 10^{-3}$  M)과 실시예 4에서 제조된 화합물 3.2g( $4.85 \times 10^{-3}$  M)을 20ml의  $H_2O$ 에 용해하였다. 0.1N NaOH를 이용하여 pH를 6.2로 조절하였다. 이 혼합물에 EDC1( $3.13 \times 10^{-3}$  M) 600mg과 HOBT( $4.8 \times 10^{-4}$  M) 65mg을 첨가하여 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 반응매질을 400ml의 IPA에 부은 후 24시간 동안 교반하였다. 침전물을 정제시킨 후, 에틸에테르로 세척하고, 진공하에서 건조하였다.

[0182] 조 생성물의 pH를 9로 조절하여, 최소량의 물에 용해한 후, 150ml의 앰버라이트(Na 수지( $H^+$  형태) 상에 밤새 중착시켰다. 이렇게 얻은 생성물을 물로 용출하였다. 상당 부분을 진공하에서 농축하였다. MS, ES<sup>+</sup>: 1385.6.

[0183] 실시예 6:

[0184] 단계 a



[0185]

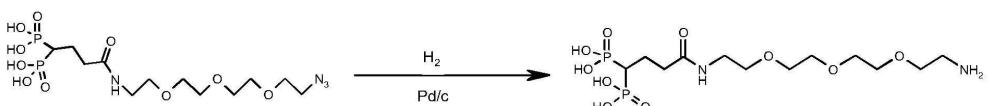
[0186] 전극과 자력 교반기가 구비된 500ml 3목(three-necked) 플라스크에서, 같은자리-비스포스포네이트(실시예 3, 단계 c, 30g)를  $H_2O$ (250ml)에 용해하였다. NaOH를 통해 pH를 5.7로 조절하고, 아민(11-아지도-3,6,9-트리옥사운데칸-1-아민, Fluka®, 21.8 g)을 한 번에 첨가하고, HOBT(1.72g)와 EDC1(21.16g)을 순서대로 첨가하였다. 반응매질을 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 약 150ml의 최종부피를 얻을 때까지 매질을 증발시켰다. NaOH를 통해 pH를 8로 조절하였다. 초과량의 아미노 PEG를 제거하기 위해, 이 용액을 앰버라이트 252 Na 수지 ( $H^-$  1.8 meq/ml) 70ml(이론적 양의 30배)로 환류시켰다(passed over).  $H_2O$ 를 이용하여 용출하였다( $V_{recovered} = 300$  ml).

[0187] 약 150ml의 최종부피를 얻을 때까지 용액을 증발시켰다.

[0188] 초과량의  $Cl^-$  이온을 제거하기 위해, 이 용액을 IRA 67 수지( $OH^-$  1.6 meq/ml) 140ml(이론적 양의 2배)로 환류시켰다.  $H_2O$ 를 이용하여 용출하였다( $V_{recovered} = 260$  ml). 약 100ml의 최종부피를 얻을 때까지 용액을 증발시켰다. 이 용액을 실란처리된 실리카 900g로 환류시켰다. 2 리터의  $H_2O$ 과 2 리터의  $H_2O/CH_3OH$  혼합물(50/50)을 이용하여 용출하였다.

[0189]  $m = 28.46g$ , 수율 = 75%, LC/MS: in ES<sup>+</sup> at  $m/z = 449.12$ .

[0190] 단계 b

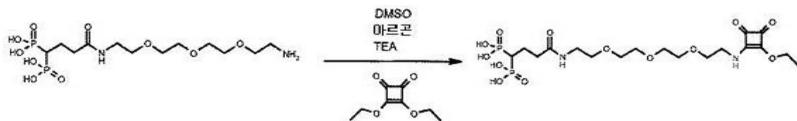


[0191]

[0192] 미리 EtOH(350ml)에 용해시킨, 단계 a에서 수득된 아지드(28.26g)를 1 리터 오토클레이브(고압살균기) 반응기 내로 투입하였다. 이 매질을 HCl 용액으로 산성화시키고, 4 스파츌라(spatula)의 Pd/C를 이 용액에 투입하였다. 이렇게 얻은 반응매질을 4바의 수소압력하에 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 반응매질을 클라셀(clace1)로 여과시키고, 벽질색을 띠는 황색 오일(31.21g)을 수득할 때까지 용액을 건조상태로 증발시켰다. 초과량의  $Cl^-$  이온을 제거하기 위해, 이 용액을 IRA 67 수지( $OH^-$  1.6 meq/ml) 200ml로 환류시킴으로써 생성물을 정제하였다.  $H_2O$ 를 이용하여 용출하였다.

[0193]  $m = 12.25g$ , 수율 = 46%(오일), LC/MS: in  $ES^+$  at  $m/z = 423.12$ .

[0194] 단계 c

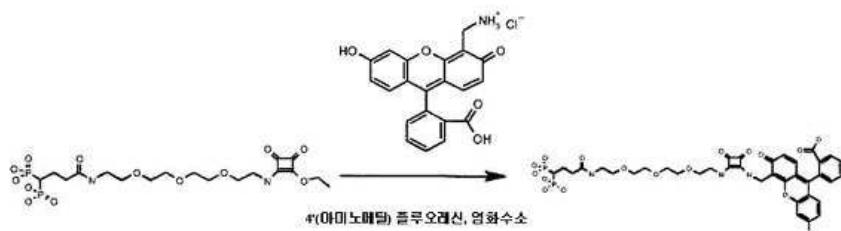


[0195]

[0196] 자력 교반기가 구비된 250ml 3목 플라스크에서, 미리 제조한 중간체(12g)를 DMSO(200ml)에 용해하였다. 트리에틸아민(6696 $\mu$ l)과 디에틸 스쿠아레이트(squarate) (4205  $\mu$ l)를 순서대로 첨가하였다. 이렇게 얻은 매질을 실온에서 72시간 동안 교반하였다. 황색 오일이 수득될 때까지, 베인펌프를 이용하여 용액을 농축시켜 건조상태로 만들었다. 이렇게 얻은 황색 오일을, 실란처리된 실리카(2000ml의  $H_2O$ 에 이어서 2000ml의  $H_2O/CH_3OH$  (80/20)를 이용하여 용출함), 2000ml의  $H_2O/CH_3OH$  혼합물(50/50) 및 1000ml의  $CH_3OH$ 로 순서대로 정제하였다.

[0197]  $m = 7.2g$ , 수율 = 46.4% (oil), LC/MS: in  $ES^+$  at  $m/z = 547.25$ .

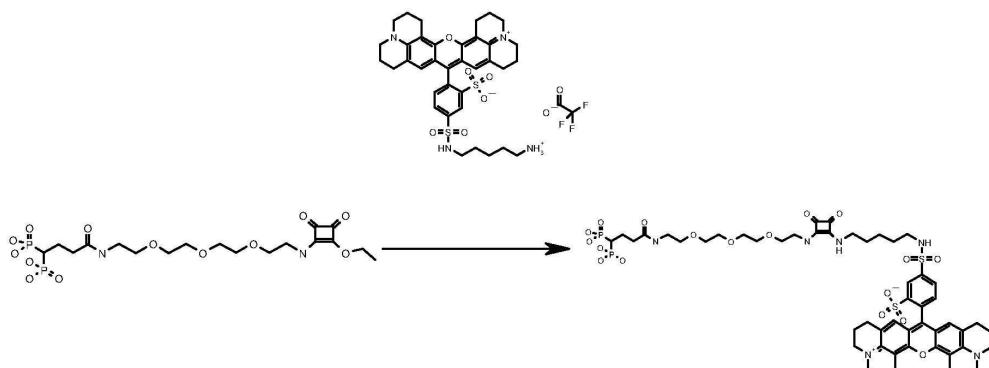
[0198] 실시예 7:



[0199]

[0200] 전극과 자력 교반기가 구비된 환제기(pill-making machine), 앞서 제조된 중간체(실시예 6, 단계 c)(0.137g;  $2.5 \times 10^{-4}$  몰)를  $H_2O$ (2ml)에 용해하였다. 이렇게 얻은 용액의 pH는 6.5였다. 이 용액의 pH를,  $Na_2CO_3$  포화용액을 이용하여 7.5로 조절하였다. 미리 DMSO(1ml)에 용해시킨 염료(0.05g;  $1.26 \times 10^{-4}$  몰)를 반응매질에 첨가하였다. 이렇게 얻은 용액의 pH를,  $Na_2CO_3$  포화용액을 이용하여 8로 조절하였다. 이 용액을 실온에서 48시간 동안 교반하였다. 용액의 pH를, 1N 염산용액을 이용하여 7로 조절하였다. 베인펌프를 이용하여 용액을 증발시켜 건조상태로 만들었다. 수득된 오일을  $H_2O$ (10ml)에 용해하고, 90g의 RP18 실리카(25-40 $\mu$ m)의 카트리지 상에서 크로마토그래피에 의해 정제시켰다. 95mg의 생성물을 분리하였으며 수율은 95%였다. LC/MS: in  $ES^-$ ,  $m/z = 860.19$ .

[0201] 실시예 8:



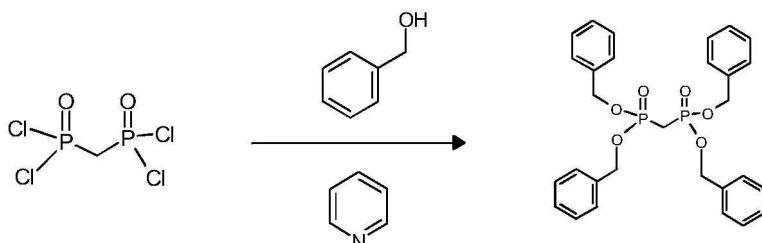
[0202]

[0203] 전극과 자력 교반기가 구비된 환제기에서, 실시예 6, 단계 c에서 제조된 화합물(0.137g;  $2.5 \times 10^{-4}$  몰)을

$\text{H}_2\text{O}$ (2ml)에 용해하였다. 이렇게 얻은 용액의 pH를,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  포화용액을 이용하여 7.5로 조절하였다. 미리 DMSO(1ml)에 용해시킨 염료( $0.102\text{g}$ ;  $1.26 \times 10^{-4}$  몰)를 반응매질에 첨가하였다. 이때 용액의 pH는 5.5였다. 이 용액의 pH를,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  포화용액을 이용하여 8로 조절하였다. 이 용액을 실온에서 48시간 동안 교반하였다. 용액의 pH를, 1N 염산용액을 이용하여 7로 조절하였다. 베인펌프를 이용하여 용액을 증발시켜 건조상태로 만들었다. 수득된 오일을  $\text{H}_2\text{O}$ (10ml)에 용해하고, 90g의 RP18 실리카( $25-40\mu\text{m}$ )의 카트리지 상에서 크로마토그래피에 의해 정제시켰다. 100mg의 생성물을 분리하였으며 수율은 66%였다.

[0204] 실시예 9:

[0205] 단계 a



[0206]

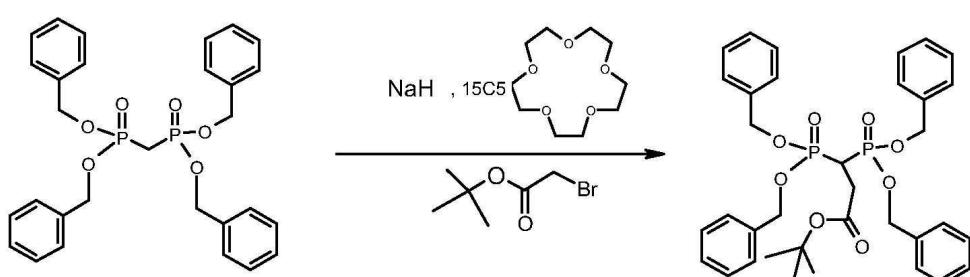
[0207]

메틸렌비스(포스폰 디염화물)을 미리 분자체로 건조시킨 180ml의 툴루엔 중에 교반하였다. 이때 온도는  $0^\circ\text{C}$ 에 유지하였다. 벤질알콜 60ml와 피리딘 37.5ml의 용액을 4시간에 걸쳐 시린지 드라이버를 사용하여 적가하였으며, 이때의 온도가  $0^\circ\text{C}$ 를 넘지 않도록 할 필요가 있다. 이렇게 얻은 매질을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 불용성 부분을 여과법에 의해 제거하고, 툴루엔으로 수차례 세정하였다. 유기상을 150ml의 2N 수산화나트륨과 250ml의 물로 3번 세척하고,  $\text{MgSO}_4$ 로 건조한 후 농축하였다. 이렇게 얻은 혼합물을 실리카(용리액: 헵탄/에틸아세테이트: 30/70) 상에서 정제하였다.

[0208]

TLC [SiO<sub>2</sub>-Hept/AcOEt: 3/7 -  $R_f = 0.3$ ] - 수율: 60%[0209] ▷ LC/MS in ES<sup>+</sup> 537.21

[0210] 단계 b



[0211]

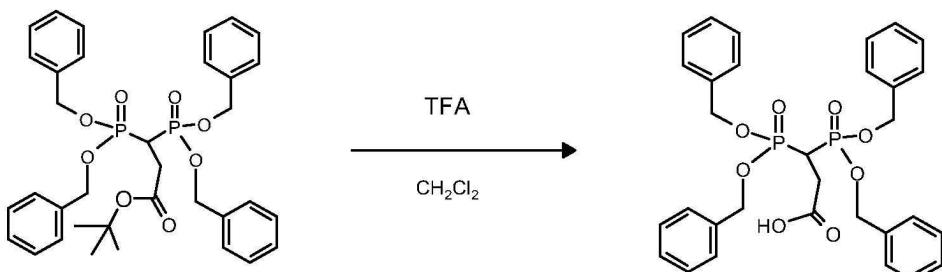
[0212]

단계 a에서 제조된 화합물과 15C5를 240ml의 새로 증류한 THF 중에 교반하였다. 1.15g의 60% NaH를 소량씩 매질에 첨가하였다. 1/2시간 동안 교반을 계속하였다. 25ml의 THF에 용해된 *t*-부틸 브로모아세테이트를 열음증탕에 적가하였다. 이렇게 얻은 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응매질을 진공하에서 농축하고  $\text{NH}_4\text{Cl}$  포화용액에 녹이고, 2 x 200ml의  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 로 추출하였다. 유기상을  $\text{MgSO}_4$ 로 건조한 후 정제하였다(Si60 카트리지: 201nm; 유량 = 20ml/분; 구배(gradient):  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{아세톤}$ ) - 수율: 65%.

[0213]

▷ LC/MS in ES<sup>+</sup> = 650.65, BP-*t*Bu: ( $M+1$ ) = 595.26

[0214] 단계 c



[0215]

[0216]

단계 b에서 제조된 화합물의 3.4g을 35ml의  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 의 용액으로 투입하였다. 이 용액을 얼음증탕에 유지하고, 3.4ml의 TFA를 적가하였다. 이렇게 얻은 혼합물을  $0^\circ\text{C}$ 에서 4시간 동안 교반한 후, 실온에서 20시간 동안 더 교반하였다. 반응매질을  $20^\circ\text{C}$ 에서 진공하에 증발시켰다. 이렇게 얻은 생성물을 20ml의  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 에 녹이고, 물로 세척한 후 정제하였다.

[0217]

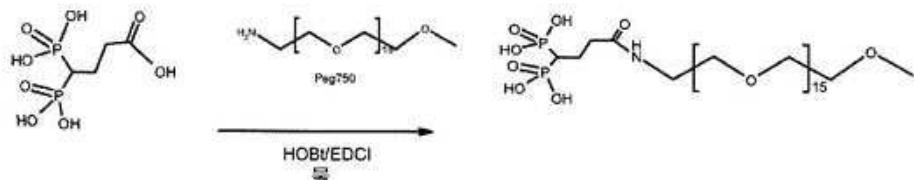
(RP 18 카트리지; 201nm에서 검출됨; 유량 = 20ml/분; 구배: 물-TFA pH = 2.77/ $\text{CH}_3\text{CN}$ ) - 수율: 51%

[0218]

▷ LC/MS in  $\text{ES}^+$  595.28

[0219]

실시예 10:



[0220]

[0221]

실시예 3의 단계 c에서 수득된 화합물의 1g( $4.03 \times 10^{-3}$  몰)과 PEG750 3.26g( $4.43 \times 10^{-3}$  몰)을 55ml의 물에 용해하였다. pH를 6.2로 조절하였다. 272mg의 HOBT( $2.01 \times 10^{-3}$  몰)를 첨가하고, 이렇게 얻은 반응매질을 5분간 교반하였다. 그런 후에는 1.148g의 EDCI( $6 \times 10^{-3}$  몰)를 첨가하고 24시간 동안 교반을 계속하였다. 생성물의 pH를 9에 고정시키고 앰버라이트 252 Na 수지로 정제한 결과 2.3g, 즉 59%의 수율을 얻었다.

[0222]

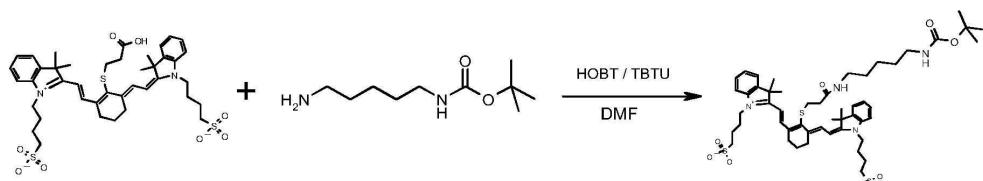
LC/MS:  $\text{ES}^-$  모드, 일련의 피크들이 964.35에서 BP에 집중됨.

[0223]

실시예 11:

[0224]

단계 a



[0225]

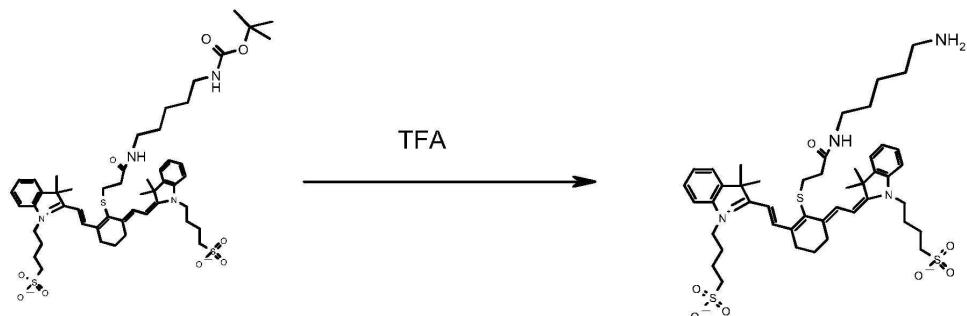
[0226]

염료 150mg( $1.88 \times 10^{-4}$  몰)을 15ml의 DMF에 용해하였다. 60mg의 HOBT( $4.44 \times 10^{-4}$  몰)와, 51mg의 TBTU( $1.58 \times 10^{-4}$  몰)와, 84mg의 터트-부틸기가 보호된 디아민 ( $4.15 \times 10^{-4}$  몰)과 0.165ml의 DIPEA ( $9.4 \times 10^{-4}$  몰)를 순차적으로 첨가하였다. 이렇게 얻은 반응매질을 실온에서 밤새 교반하였다. 역상 속성 크로마토그래피법에 의해 정제

하였다. 103.4mg의 생성물을 분리하였으며 수율은 55%였다.

[0227] LC/MS: ES<sup>+</sup> 모드 BP at 980.89

[0228] 단계 b

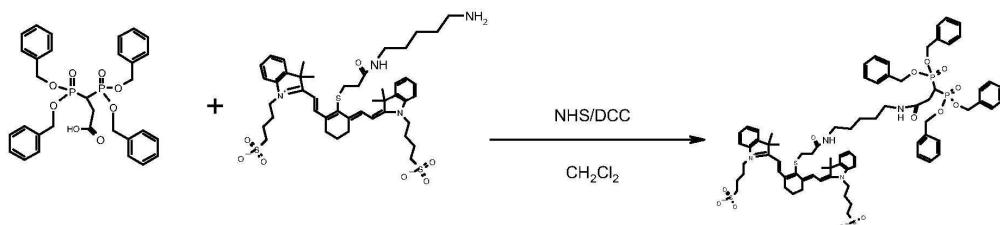


[0229]

[0230] 단계 a에서 제조된 화합물의 103mg( $1.05 \times 10^{-4}$  몰)을 3ml의 TFA/TIS/물 (비율: 90/2.5/2.5)에 30분간 교반하였다. 역상 속성 크로마토그래피법에 의해 정제하였다. 40mg의 생성물, 즉 43%의 수율을 얻었다.

[0231] LC/MS: ES<sup>+</sup> 모드 BP at 879.39 (z = 1)

[0232] 단계 c

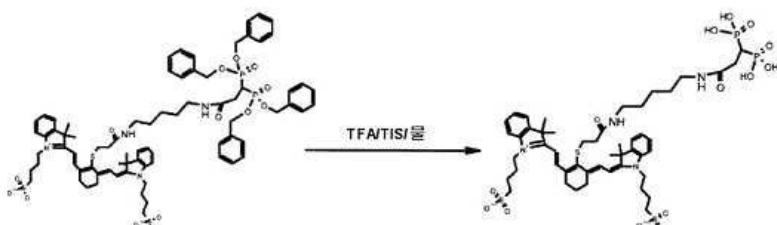


[0233]

[0234] 실시예 9의 단계 c에서 수득한 화합물의 26mg( $4.37 \times 10^{-5}$  몰)과, DCC 18mg( $8.72 \times 10^{-5}$  몰)과, NHS 8mg( $6.95 \times 10^{-5}$  몰)을 5ml의 디클로로메탄 중에 실온에서 3시간 동안 교반하였다. DCC를 여과시켰다. 그런 후에는 단계 b에서 수득한 염료의 40mg( $4.54 \times 10^{-5}$  몰)과, 몇 방울의 TEA를 첨가하였다. 3시간 동안 교반을 계속하였다. 역상 속성 크로마토그래피법에 의해 정제하였다. 12mg을 분리하였으며 수율은 20%였다.

[0235] LC/MS: ES<sup>+</sup> 모드 BP at 1457.33

[0236] 단계 d



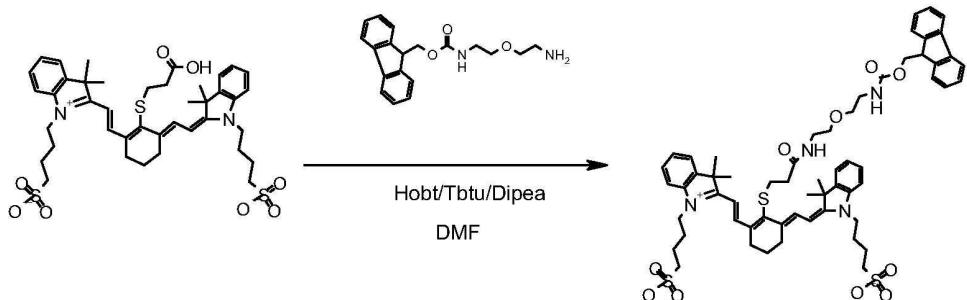
[0237]

[0238] 이전 단계에서 제조된 화합물의 150mg( $1.029 \times 10^{-4}$  몰)을 4ml의 TFA/TIS/물 (비율: 90/2.5/2.5)에서 교반하였고, 실온에서 3시간 동안 교반을 계속하였다. 역상 속성 크로마토그래피법에 의해 정제하였다. 50mg, 즉 45%의 수율을 얻었다.

[0239] LC/MS: ES<sup>-</sup> 모드 BP at 1094.53 (z = 1)

[0240] 실시예 12:

[0241] 단계 a

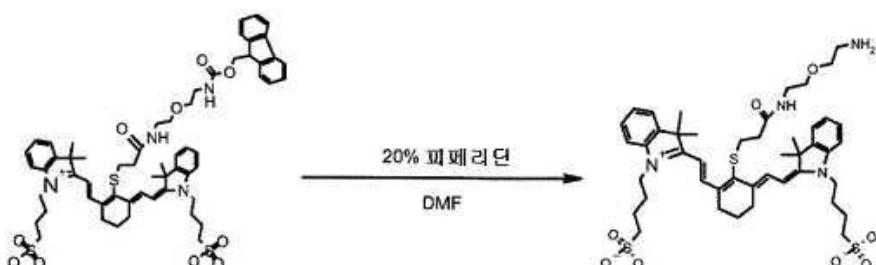


[0242]

[0243] 염료 200mg( $2.51 \times 10^{-4}$  몰)을 20ml의 DMF에 용해하였다. HOBT 80mg( $5.92 \times 10^{-4}$  몰)과, TBTU 68mg( $2.11 \times 10^{-4}$  몰)과, DIPEA 0.220ml( $1.255 \times 10^{-3}$  몰)와, Fmoc-아미노에톡시에틸아민 108mg( $3.30 \times 10^{-4}$  몰)을 순차적으로 첨가하였다. 이렇게 얻은 반응매질을 실온에서 밤새 교반하였다. 역상 속성 크로마토그래피법에 의해 정제하였다. 물/CH<sub>3</sub>CN. 178mg의 생성물을 분리하였으며 수율은 65%였다.

[0244] LC/MS: ES<sup>+</sup> 모드, BP at 1103.43 (z = 1)

[0245] 단계 b

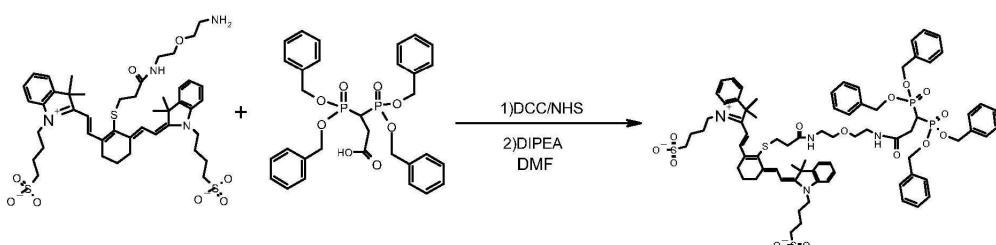


[0246]

[0247] 이전 단계에서 제조된 화합물의 80mg( $9.0 \times 10^{-5}$  몰)을 20% 피페리딘을 함유하는 DMF 용액 6ml에 투입하였다. 실온에서 1시간 동안 교반을 계속하였다. 역상 속성 크로마토그래피법에 의해 정제하였다. 50mg의 생성물, 즉 40%의 수율을 얻었다.

[0248] LC/MS: ES<sup>-</sup> 모드, BP at 880.09 (z = 1)

[0249] 단계 c



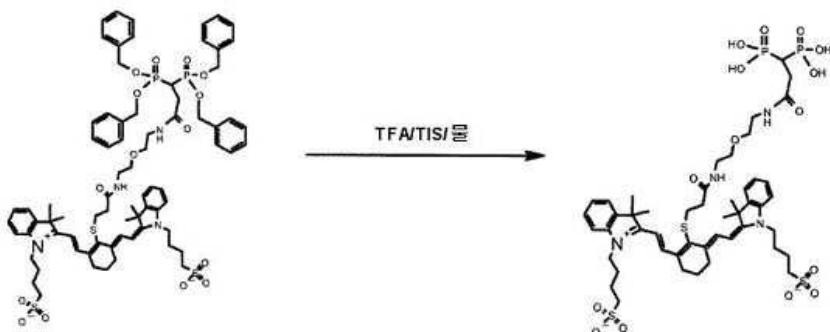
[0250]

[0251] 실시예 9의 단계 c에서 수득한 벤질-함유 트위저(tweezer)의 20mg( $3.36 \times 10^{-5}$  몰)과, DCC 14mg( $6.78 \times 10^{-5}$

몰)과, NHS 6mg( $5.21 \times 10^{-5}$  몰)을 DMF에 용해하고 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 그런 후에는 DCU를 제거하였다. 단계 b에서 수득한 염료의 30mg( $3.4 \times 10^{-5}$  몰)과, DIPEA 17 $\mu$ l( $1.02 \times 10^{-4}$  몰)를 1ml의 DMF에 용해한 후에, 활성 에스테르를 적가하였다. 실온에서 3시간 동안 교반을 계속하였다. 역상 속성 크로마토그래피법에 의해 정제하였다. 30mg, 즉 36%의 수율을 얻었다.

[0252] LC/MS: ES<sup>+</sup> 모드, BP at 1458.90 (z = 1)

[0253] 단계 d



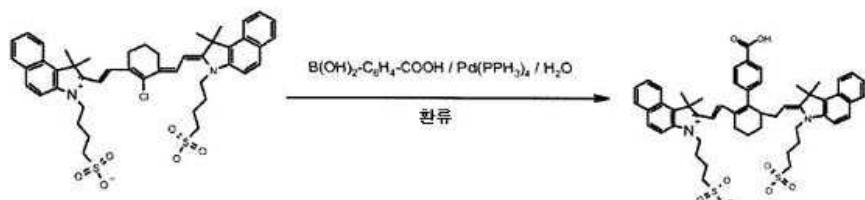
[0254]

[0255] 단계 c에서 제조된 화합물의 30mg( $2.03 \times 10^{-5}$  몰)을 3ml의 TFA/TIS/I2(비율: 90/2.5/2.5)에 실온에서 3시간 50분 동안 용해하였다. 속성 크로마토그래피법에 의해 정제하였다. 6mg, 즉 35%의 수율을 얻었다.

[0256] LC/MS: ES<sup>+</sup> 모드, BP at 1098.21 (z = 1) 및 550.3 (z = 2)

[0257] 실시예 13:

[0258] 단계 a



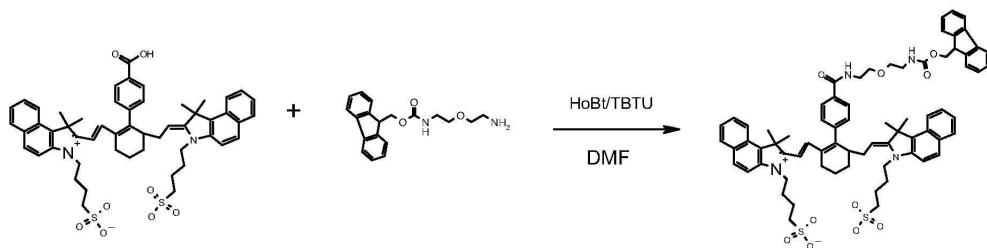
[0259]

[0260] 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐 10.7mg( $9.24 \times 10^{-6}$  몰)과 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 40.7mg( $2.9 \times 10^{-4}$  몰)의 존재하에 110°C에서 24시간 동안, IR820(Aldrich<sup>®</sup>,  $5.88 \times 10^{-5}$  몰) 50mg과 페닐보론산 14.65mg( $8.82 \times 10^{-5}$  몰)을 가열하여 환류하였다. 실험이 끝난 후, 팔라듐을 여과시켰다. 역상 속성 크로마토그래피법에 의해 정제하였다. 33mg, 즉 62%의 수율을 얻었다.

[0261] LC/MS: ES<sup>+</sup> 모드, BP at 913.27 (z = 1)

[0262]

단계 b



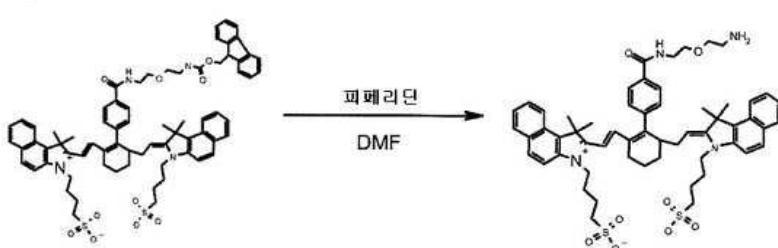
[0263]

[0264]

단계 a에서 제조된 화합물의  $18\text{mg}(1.96 \times 10^{-5}\text{몰})$ 과, HOBT  $7\text{mg}(4.31 \times 10^{-5}\text{몰})$ 과, TBTU  $7\text{mg}(4.70 \times 10^{-5}\text{몰})$ 과, Fmoc-아미노에톡시에틸아민  $10\text{mg}(2.15 \times 10^{-6}\text{몰})$ 과, DIPEA  $11\mu\text{l}(9.8 \times 10^{-5}\text{몰})$ 을 실온에서 밤새 교반하였다. 이렇게 얻은 반응매질을 디에틸에테르( $20\text{mg}$ ) 내에서 분쇄(triturate)하고 여과시켰다.  $13\text{mg}$ 의 생성물을 분리하였으며 수율은 55%였다.

[0265]

단계 c



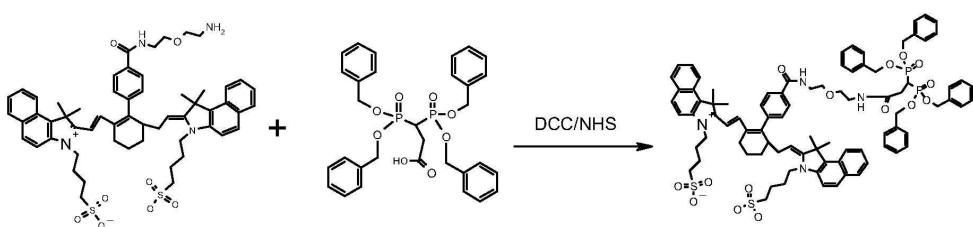
[0266]

[0267]

단계 b에서 수득한 화합물의  $13\text{mg}(1.06 \times 10^{-5}\text{몰})$ 을 DMF와 20% 피페리딘 중에 교반하였다. 실온에서 30분간 교반을 계속하였다. 20ml의 에틸에테르에 침전시키고, 실온에서 1시간 동안 교반하였다.  $4.3\text{mg}$ , 즉 40%의 수율을 얻었다.

[0268]

단계 d

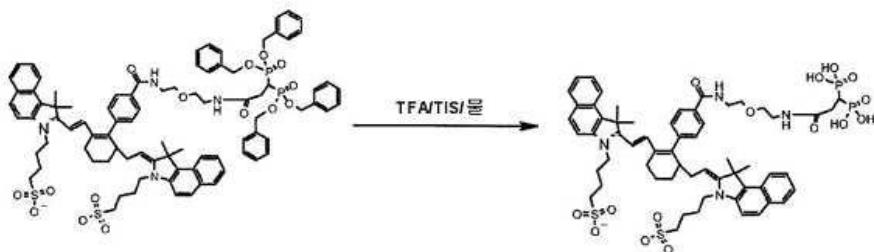


[0269]

[0270]

실시예 9의 단계 c에서 수득한 화합물의  $20\text{mg}(3.36 \times 10^{-5}\text{몰})$ 과, DCC  $14\text{mg}(6.78 \times 10^{-5}\text{몰})$ 과, NHS  $6\text{mg}(5.21 \times 10^{-5}\text{몰})$ 을 실온에서 3시간 동안 용해하였다. 그런 후에는 DCU를 제거하였다. 단계 c에서 수득한 염료의  $35\text{mg}(3.4 \times 10^{-5}\text{몰})$ 과, DIPEA  $17\mu\text{l}(1.02 \times 10^{-4}\text{몰})$ 를 1ml의 DMF에 용해한 후에, 활성 에스테르를 적가하였다. 실온에서 3시간 동안 교반을 계속하였다. 50ml의 에틸에테르에 침전시켰다.  $20\text{mg}$ , 즉 37%의 수율을 얻었다.

[0271] 단계 e



[0272]

[0273] 단계 d에서 제조된 화합물의  $20\text{mg}(1.25 \times 10^{-5}\text{몰})$ 을 3ml의 TFA/TIS/물 (비율: 90/2.5/2.5)에 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 역상 속성 크로마토그래피법에 의해 정제하였다. 4mg, 즉 26%의 수율을 얻었다

[0274] 실시예 14:

[0275] 실시예 5에서 수득한 화합물을 10ml의 물에 용해시켜 얻은 용액의 60 마이크로몰 ( $\mu\text{mol}$ )을, 100ml의 물에 희석되어 2.75M/L의 농도를 지닌 실시예 2의 용액(산성 자성유체) 1ml에 적가하였다. 이렇게 얻은 혼합물을 실온에서 20분간 교반하고, pH를 7.2로 조절하였다. 수득된 용액을, 분리한계가 30kD인 한와 여과막을 통해 여과시켰다. 300ml의 여과액을 제거하여 최종 용액 10ml를 수득하였다.

[0276]  $[\text{Fe}] = 0.260 \text{ M/L}$  PCS 크기 = 28nm

[0277] 그래프팅 정도[아미노알콜 화합물/Fe] = 2% 몰/몰

[0278] 실시예 15:

[0279] 실시예 2에 기재된 화합물의 3ml ( $[\text{Fe}] = 1.336 \text{ 몰/1}$ )를 100ml의 물에 희석하였다. 이 용액에, 각 첨가시 15분의 지연 간격을 두고, 실시예 5에 기재된 화합물을 2ml의 물에 용해시켜 얻은 용액의 46mg, 실시예 7에 기재된 화합물을 2ml의 물에 용해시켜 얻은 용액의 3.85mg, 그리고 마지막으로 실시예 5에 기재된 화합물을 2ml의 물에 용해시켜 얻은 용액의 46mg을 순차적으로 첨가하였다. 이렇게 얻은 용액을 실온에서 15분간 교반하고, NaOH 용액을 이용하여 pH를 7.4로 조절하였다. 30kD인 한와 여과막을 통해 매질을 여과시키고, 철의 농도가 0.191 몰/1인 부피 20ml의 용액을 얻었다. PCS: 26.8.

[0280] 실시예 16:

실시예 16으로부터의 과정에 따라, 하기의 표에 정리된 바와 같이, 다양한 비율의 비스포스포네이트 화합물의 다양한 2차 또는 3차 조합물을 실시예 1 또는 실시예 2에 기재된 산화철의 입자에 고착시켰다:

표 5

번호	입자	비스포스포네이트 1 (몰%)	비스포스포네이트 2 (몰%)	비스포스포네이트 3 (몰%)	PCS 크기 nm
1	실시예 1	실시예 5 (40)	실시예 3 (60)	-	42
2	실시예 2	실시예 5 (60)	실시예 3 (30)	실시예 7 (10)	28
3	실시예 2	실시예 5 (95)	실시예 7 (5)	-	27
4	실시예 2	실시예 5 (90)	실시예 8 (10)	-	26
5	실시예 2	실시예 5 (95)	실시예 11 (5)	-	28
6	실시예 2	실시예 10 (20)	실시예 3 (80)	-	29
7	실시예 2	실시예 10 (95)	실시예 12 (5)	-	28
8	실시예 2	실시예 10 (80)	실시예 3 (15)	실시예 12 (5)	27
9	실시예 2	실시예 10 (98)	실시예 13 (2)	-	28
10	실시예 2	실시예 10 (100)	-	-	27
11	실시예 2	실시예 5 (100)	-	-	26
12	실시예 2	실시예 5 (96)	실시예 12 (2)	실시예 7 (2)	27
13	실시예 2	실시예 5 (50)	실시예 10 (50)	-	28

[0282]

괄호 안의 숫자들은 부착정도를 가리키며, 예를 들어, No. 1의 부착(정도)은 실시예 5로부터의 화합물(아미노알콜 리간드) 40%와, 실시예 3으로부터의 화합물(리간드에 연결되지 않은 비스포스포네이트 화합물) 60%로 구성된다.