(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2007년11월05일
(11) 등록번호 10-0773029
(24) 등록일자 2007년10월29일

(51) Int. Cl.
A61K 31/661(2006.01) *A61K 31/665*(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-0054548
(22) 출원일자 2006년06월16일
심사청구일자 2006년06월16일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020040092812 A

(73) 특허권자
이화여자대학교 산학협력단
서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내
(72) 발명자
손연수
서울 강남구 압구정동 481번지 현대아파트 93동 1003호
지다은
서울 용산구 효창동 171-1
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
박장원

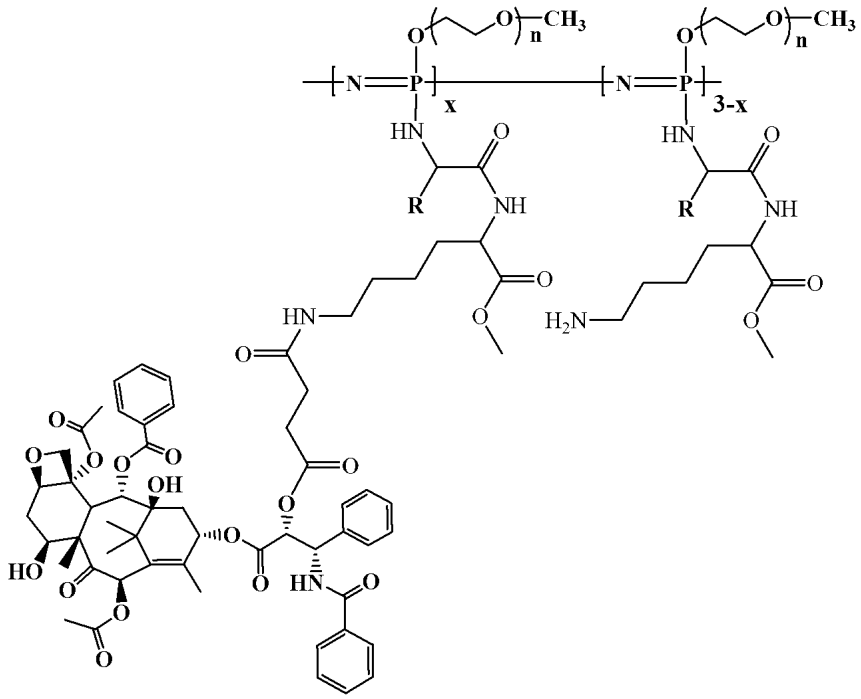
전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 김문경

(54) 수용성 미셀을 형성하는 생분해성 고리형 삼합체 포스파젠-탁솔 컨쥬게이트 항암제 및 이의 제조방법

(57) 요 약

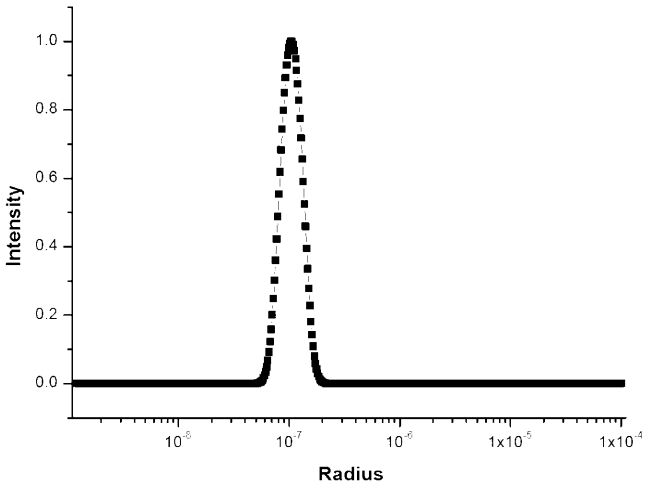
본 발명은 수용성 미셀을 형성하며, 생체 내에서 분해되면서 탁솔을 서서히 방출하는 특징을 갖는, 하기 화학식 1로 표시되는 고리형 삼합체 포스파젠-탁솔 컨쥬게이트 항암제 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

[화학식 1]



식 중에서, R은 H, CH_3, $(CH_3)_2CH$ 및 $(CH_3)_2CHCH_2$ 중에서 선택되며, n은 7 내지 16 중에서 선택되는 폴리에틸렌글리콜의 반복 단위의 수이고, x는 1 또는 2이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

전용주

서울 강북구 번3동 한양아파트 101동 1007호

이화정

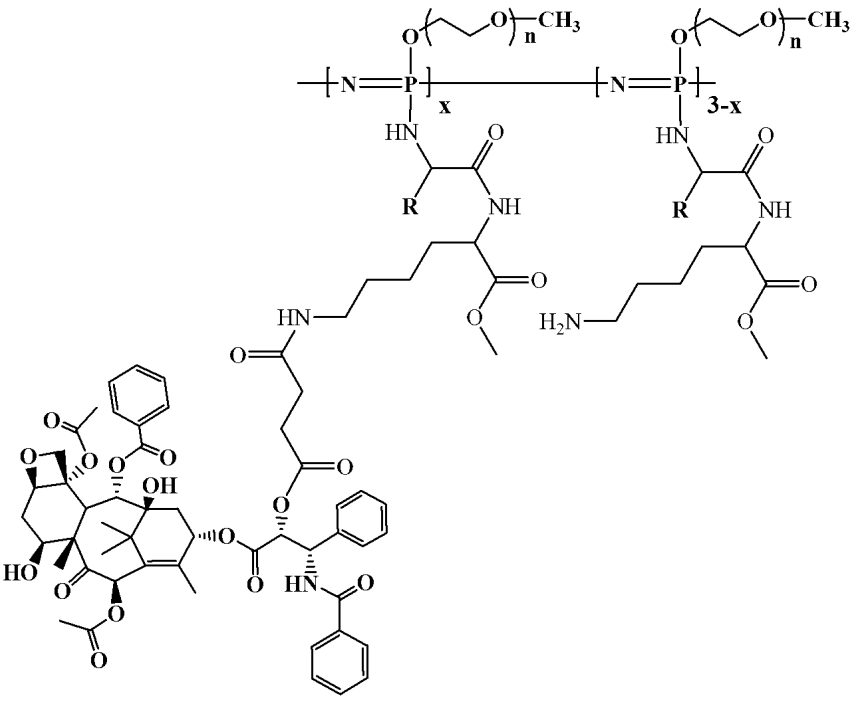
서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교 약학대학 약학관 B동102호

특허청구의 범위

청구항 1

다음 화학식 1로 표시되는 고리형 삼합체 포스파젠-탁솔 컨쥬게이트 항암제:

[화학식 1]



식 중에서, R은 H, CH_3, $(CH_3)_2CH$ 및 $(CH_3)_2CHCH_2$ 중에서 선택되는 것이고, n은 7 내지 16 중에서 선택되는 폴리에틸렌글리콜의 반복 단위의 수이며, x는 1 또는 2이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 수용액 중에서 10-150 nm 크기의 미셀을 형성하는 것인 고리형 삼합체 포스파젠-탁솔 컨쥬게이트 항암제.

청구항 3

제1항에 있어서, 메톡시 폴리에틸렌글라이콜의 분자량은 350, 550 또는 750인 것인 고리형 삼합체 포스파젠-탁솔 컨쥬게이트 항암제.

청구항 4

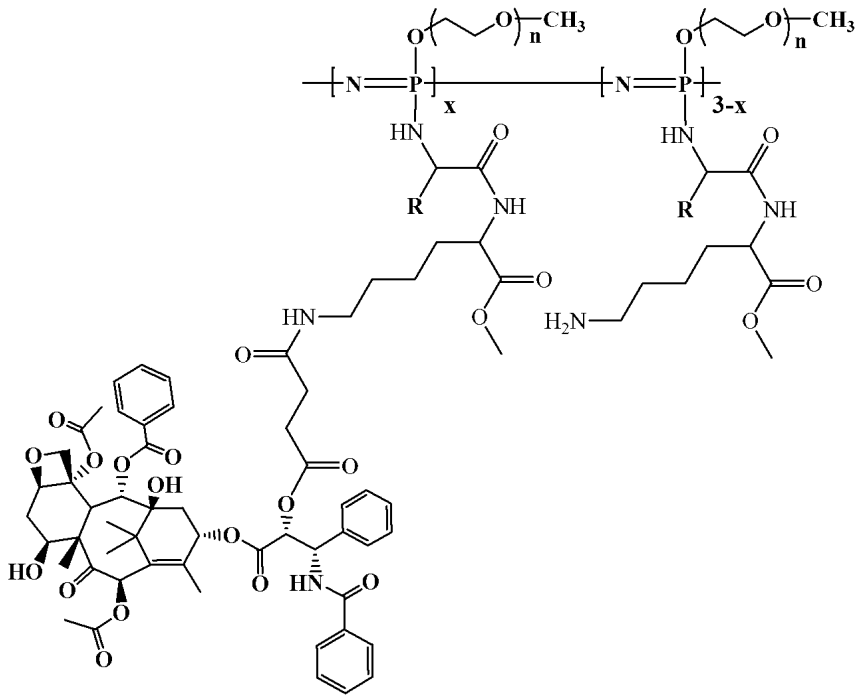
(1) 하기 화학식 3으로 표시되는 폴리에틸렌글라이콜의 나트륨 염을 하기 화학식 4로 표시되는 고리형 6염화포스파젠 삼합체와 반응시켜, 하기 화학식 5로 표시되는 고리형 포스파젠 중간체를 제조하는 단계와,

(2) 화학식 5로 표시되는 고리형 삼합체 포스파젠 중간체를, 하기 화학식 6으로 표시되는 글라이실라이신의 메틸에스터와 반응시켜, 하기 화학식 7로 표시되는 화합물을 제조하고 탈보호하여 하기 화학식 8로 표시되는 화합물을 제조하는 단계와,

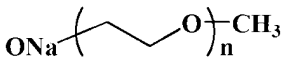
(3) 화학식 8 화합물을 석시닐 탁솔과 반응시켜 화학식 1로 표시되는 고리형 포스파젠 삼량체-탁솔 컨쥬게이트를 제조하는 단계를 포함하는,

하기 화학식 1의 고리형 삼합체 포스파젠-탁솔 컨쥬게이트 항암제의 제조 방법.

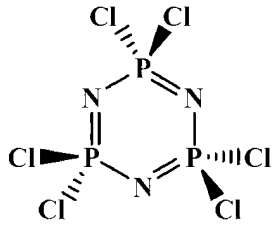
[화학식 1]



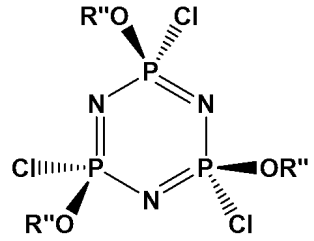
[화학식 3]



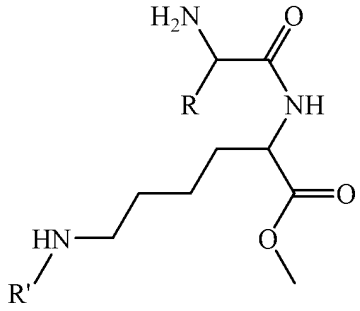
[화학식 4]



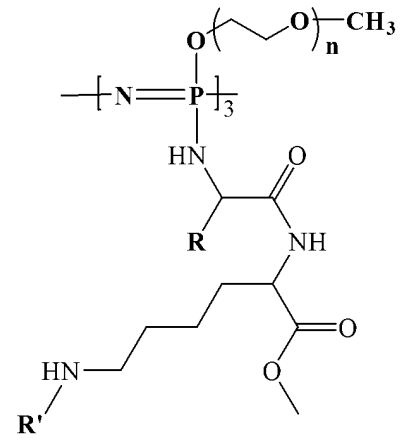
[화학식 5]



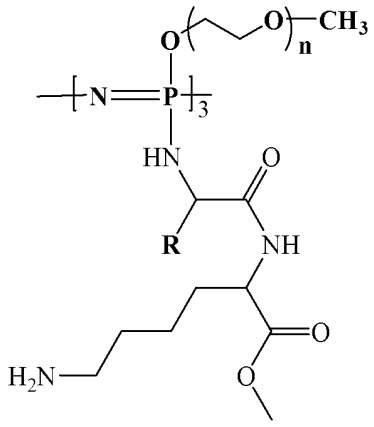
[화학식 6]



[화학식 7]



[화학식 8]



상기 식 중에서,

R은 H, CH_3, $(CH_3)_2CH$ 및 $(CH_3)_2CHCH_2$ 중에서 선택되는 것이고,

R'은 벤질옥시카보닐기 또는 t-부톡시카보닐기이고,

R"은 $CH_3(OCH_2CH_2)_n$이며,

n은 7 내지 16 중에서 선택되는 폴리에틸렌글리콜의 반복 단위의 수이고,

x는 1 또는 2 이다.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 단계 (1)에서는 화학식 4의 헥사클로로사이클로트라이포스파젠 1몰에 대하여 화학식 3의 나트륨 염을 3 내지 4 당량의 양으로 사용하여, 트리에틸아민 존재 하에서 반응시키는 것인 제조 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 단계 (2)에서는 화학식 5의 고리형 삼합체 포스파젠 중간체에 치환되지 않은 3개의 염소에 대하여 염소 원자 1개당 1.1 - 1.5 당량의 화학식 6의 화합물을 반응시키는 것인 제조 방법.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 단계 (3)에서는 화학식 8 화합물에 대하여 1 또는 2 당량의 2'-석시닐 탁솔을 반응시키는 것인 제조 방법.

청구항 8

제4항에 있어서, 상기 단계 (3)에서는 화학식 8 화합물과 2'-석시닐 탁솔의 커플링 시약으로서 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드와 1-하이드록시벤조니트로아졸 하이드레이트를 함께 사용하는 것인 제조 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<3> 본 발명은 수용성 미셀을 형성하며, 생체 내에서 서서히 분해 및 방출되는 고리형 삼합체 포스파젠-탁솔 컨쥬게이트 항암제 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

<4> 포스파젠계 고분자는 미국의 알콕 그룹(H. R. Allcock, R. L. Kugel, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 4216(**1965**))에 의하여 처음 합성된 무기/유기 하이브리드 고분자로 인(P)과 질소(N) 원자가 교대로 고분자 사슬을 이루고, 인 원자에 유기치환체가 곁가지로 결합하여 이루어진 선형 고분자로서, 곁가지 그룹의 분자구조에 따라 다양한 물성을 나타낸다. 이들 포스파젠계 고분자는 유기 고분자가 갖지 못하는 우수한 물성을 갖고 있으나, 아직은 극한 재료로 일부 실용화되어 있을 뿐 범용 고분자 재료로는 사용되지 못하고 있다. 특히 의약 전달물질로의 개발은 매우 더디게 진행되고 있는데, 그 주요 원인은 일반 소재용 폴리포스파젠의 경우 강한 기계적 강도를 필요로 하는 것이므로 최대 분자량 ($Mw>10^6$)이 필수조건이지만, 의약 전달물질의 경우 생분해성 등 생체적합성($Mw=10^{4-5}$)이 필요하기 때문이다.

<5> 본 발명자들은 고리형 염화포스파젠 삼합체($N_3P_3Cl_6$)**를** 열중합 반응시켜 염화폴리포스파젠 고분자를 합성할 때, 촉매로서 염화알루미늄을 사용하면 촉매량에 따라 분자량 조절이 가능하다는 사실을 처음으로 발견 [Youn Soo Sohn, et al. *Macromolecules*, **28**, 7566 (1995)]하여, 다양한 형태의 의약 전달물질로 개발하고 있다. 특히 최근에는 염화포스파젠 삼합체($N_3P_3Cl_6$)로부터 고분자를 합성하지 않고, 바로 친수성 폴리에틸렌글라이콜과 소수성 아미노산을 저온(-60℃)에서 친핵 치환반응시켜 온도감응성 삼합체를 최초로 합성하였다(Youn Soo Sohn, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 8315). 그러나 이들 아미노산의 삼합체들은 소수성이 낮아서 미셀을 형성하지 못하고, 수용액에서 다소 불안정하여 실용성이 떨어진다.

<6> 이에 따라, 본 발명자들은 아미노산 대신 소수성이 훨씬 강한 트라이- 또는 테트라-올리고펩타이드를 삼합체에 도입하는 경우에 수용액에서 안정한 10 - 100 nm 크기의 미셀을 형성한다는 것을 발견하여, 이를 한국특허 제0567397호로서 등록 받은 바 있다. 나아가, 현재 이들 온도 감응성 미셀을 단백질 의약, 탁솔 등과 같은 난용성 약물의 제제에 응용하기 위한 연구를 진행하고 있다.

<7> 탁솔은 현재 임상에서 유방암, 난소암, 소세포 폐암 등 여러 종류의 암에 우수한 치료 효과[E.K. Rowinsky, R.C. Donehower, *New Engl. J. Med.* 332 (1995) 1004-1014]를 나타내므로, 가장 널리 사용되는 항암제이다. 그러나 탁솔 분자는 소수성이 강하여 물에 대한 용해도(< 1 μg/ml)가 아주 낮기 때문에 그대로 주사제로 사용되지는 못하고, 용해제로 제제되어 사용된다. 그러나 용해제로 사용되는 계면활성제 크레머포어(Cremophore EL)와 알콜에 기인하는 신경 독성 등의 부작용 [R.T. Dorr, *Ann. Pharmacother.* 28 (1994) S11-S14]이 심하여 사용이 제한되고 있다.

<8> 이에 따라 이러한 문제를 해결하기 위한 많은 연구가 다방면으로 진행되고 있는데, 그 중에서도 특히 최근에는

고분자 미셀을 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다[K.M. Huh, et al. *J. Control. Release* 101 (2005) 59-68; O. Soga, et al. *J. Control. Release* 103 (2005) 341-353]. 친수성 블록과 소수성 블록으로 구성된 고분자 미셀은 소수성 그룹이 미셀 내부의 핵을 이루기 때문에 탁솔과 같은 소수성 약물을 미셀 내부에 효율적으로 포집하여 가용화할 수 있기 때문이다. 또한 탁솔 분자에 폴리에틸렌글라이콜과 같은 친수성기를 화학적으로 결합시켜 가용화한 컨쥬게이트형 항암제[R.B. Greenwald, et al. *Advanced Drug Delivery* 55 (2003) 217-250 및 M.Ceruti, et al. *J. Control. Release* 63 (2000) 141-153]와, 수용성 폴리글루타민산에 탁솔을 결합시킨 고분자형 탁솔 항암제 [C. Li, et al. Cancer Chemother. Pharmacl. 46 (2000) 416-422] 등 많은 연구 결과가 보고되었다. 특히 이러한 고분자형 항암제는 현재 임상 시험 중에 있다. 그러나 아직 포스파젠계 고분자를 이용하여 탁솔을 가용화한 경우는 없으며, 더욱이 탁솔과 친수성 고분자를 화학적으로 결합시켜 수용액에서 미셀을 형성하도록 만든 컨쥬게이트형 항암제의 예는 아직 보고된 바가 없다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

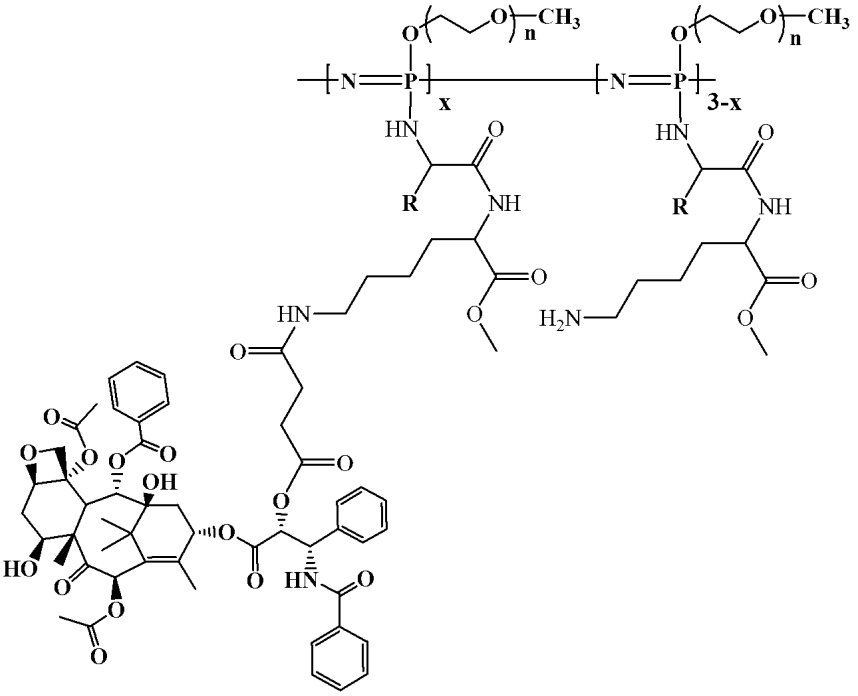
<9> 본 발명의 목적은 현재 임상에서 사용되는 난용성 항암제인 탁솔의 제제 시에 용해제로 사용되는 크레머포어/알콜에 기인하는 심한 부작용과 그로 인하여 환자 치료 시에 병원에 입원하여 장시간 투여하여야 하는 치료 절차를 근본적으로 개선할 수 있는, 새로운 수용성 삼합체 포스파젠-탁솔 컨쥬게이트 항암제 및 그 제조 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<10> 본 발명자들은 고리형 포스파젠 삼합체에 친수성 치환기로서 인체에 무해하고 분자량이 350 이상인 폴리에틸렌글라이콜(PEG)을 도입하고, 스페이서기(spacer group)로서 소수성이 비교적 낮은 올리고펩타이드, 특히 라이신을 포함하는 다이펩타이드, 예를 들면, 글라이실라이신 메틸에스터를 도입한 다음, 난용성 항암제인 탁솔을 라이신 아민기에 화학적으로 결합시킨 수용성 컨쥬게이트형 항암제는 스스로 물에 잘 용해되고, 10 - 150 nm 크기의 수용성 미셀을 형성할 수 있어서, 생체 내에 투여하는 경우에 체내 체류 시간이 길고, 미셀이 생체 내에서 서서히 생분해되면서 미셀 코어 내부의 탁솔이 방출되므로, 약효가 지속적이고 서방성이어서 약물에 의한 부작용을 획기적으로 감소시킬 수 있고, 탁솔의 생체이용률을 극대화 할 수 있다는 것을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

<11> 따라서 본 발명은 수용성 미셀을 형성하며, 생체 내에서 분해되면서 탁솔을 서서히 방출하는 특징을 갖는, 하기 화학식 1로 표시되는 고리형 삼합체 포스파젠-탁솔 컨쥬게이트 항암제 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

화학식 1



<12>

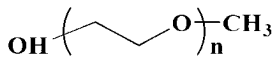
<13> 식 중에서, R은 H, CH_3, $(CH_3)_2CH$ 및 $(CH_3)_2CHCH_2$ 중에서 선택되며, n은 7 내지 16 중에서 선택되는 폴리에틸렌글리콜의 반복 단위의 수이고, x는 1 또는 2이다.

<14> 상기 화학식 1로 표시되는 고리형 포스파젠 삼량체-탁솔 컨쥬게이트 항암제는 이하에 설명하는 방법으로 제조될 수 있다. 이때 모든 제조 과정은 수분이 들어가지 않도록 진공 및 질소 라인을 이용하여 수행하고, 반응에 사용하는 각종 용매와 시약은 수분을 충분히 제거한 후에 사용하는 것이 좋다.

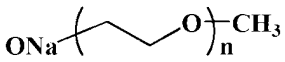
<15> 본 발명에 따른 화학식 1 화합물의 제조 방법은,

<16> (1) 하기 화학식 2로 표시되는 폴리에틸렌글라이콜 모노메틸에스터(MPEG)를 나트륨 또는 수소화나트륨과 반응시켜 하기 화학식 3으로 표시되는 폴리에틸렌글라이콜의 나트륨 염으로 만든 다음, 이 염을 화학식 4로 표시되는 고리형 6염화포스파젠 삼합체($N_3P_3Cl_6$)와 반응시켜 하기 화학식 5로 표시되는 고리형 포스파젠 중간체를 얻는 단계와,

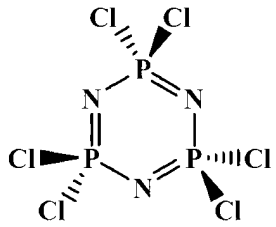
화학식 2

<17> 

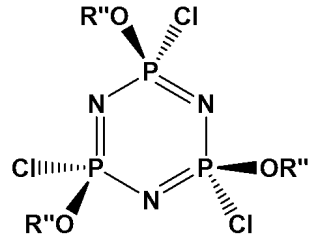
화학식 3

<18> 

화학식 4

<19> 

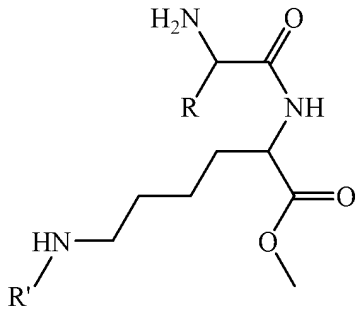
화학식 5

<20> 

<21> (2) 화학식 5의 고리형 삼합체 포스파젠 중간체를, 하기 화학식 6으로 표시되는 글라이실라이신의 메틸에스터와 반응시켜, 하기 화학식 7로 표시되는 화합물을 제조한 다음 탈보호하여 하기 화학식 8로 표시되는 화합물을 얻는 단계와,

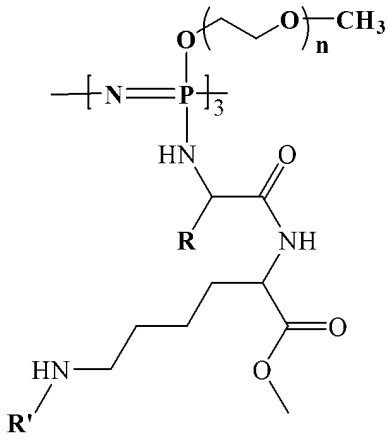
화학식 6

<22>



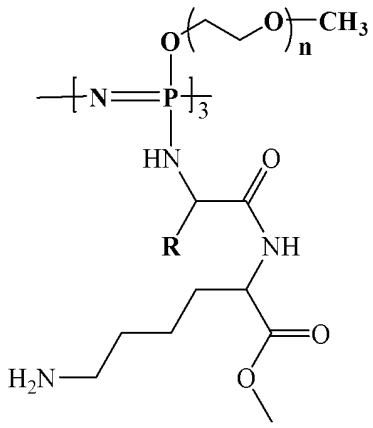
화학식 7

<23>



화학식 8

<24>



<25> (3) 화학식 8 화합물을 석시닐 탁솔(succinyl taxol)과 반응시켜 화학식 1의 고리형 포스파젠 삼량체-탁솔 컨쥬게이트를 제조하는 단계를 포함한다.

<26> 상기 화학식 5에서 R"는 $CH_3(OCH_2CH_2)_n$이고, 화학식 6에서 R'은 벤질옥시카보닐기 또는 t-부톡시카보닐기이며, 화학식 2 내지 8에서 n은 화학식 1에 대하여 정의한 것과 동일하다.

<27> 상기 단계 (1)에 있어서, 화학식 2의 폴리에틸렌글라이콜 모노메틸에스터(MPEG)는 사용 전에 70-80℃의 기름 중탕에서 진공 조건에서 1 내지 2일 동안 수분을 제거하는 것이 좋다. 화학식 2 화합물의 나트륨 염을 제조함에 있어서는 나트륨 또는 수소화나트륨을 화학식 2로 표시되는 알콜에 대하여 1.1 내지 1.3 당량 사용하는 것이 적당하다. 반응 용매로는 테트라하이드로퓨란(THF), 벤젠 또는 톨루엔을 사용할 수 있다. 그 다음, 화학식 4의 헥사클로로사이클로트라이포스파젠1몰 (6 당량)에 대하여 화학식 3의 나트륨 염을 3 내지 4 당량의 양으로 하여, 트리에틸아민 존재 하에서, 화학식 4 화합물과 화학식 3의 나트륨 염을, 드라이아이스-아세톤 중탕을 이용하여 -60℃에서 반응을 시작하여 상온까지 올리면서 반응시킨다. 단계 (1)에서는 3개의 폴리에틸렌글라이콜기가 포스

파젠 고리 평면에 대하여 한쪽 면으로 배열(cis-nongeminal)된 이성질체 형태의 화학식 5의 고리형 포스파젠 중간체를 얻는다.

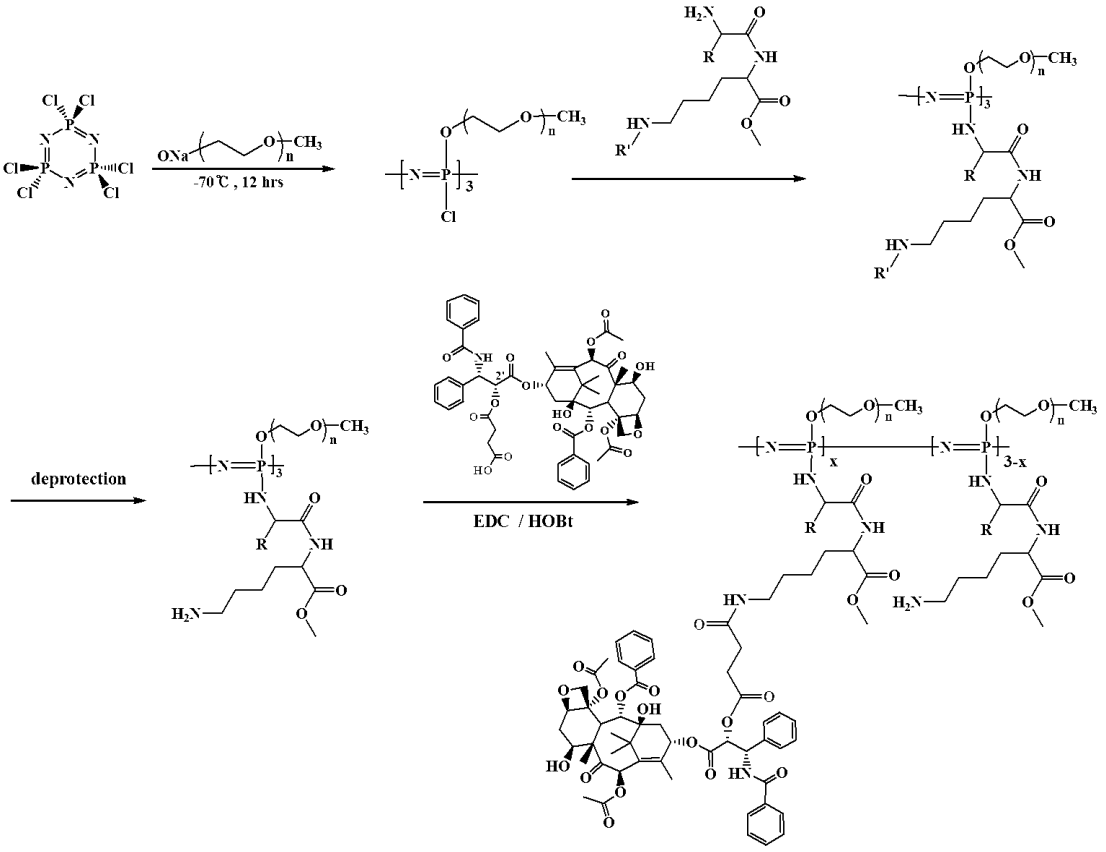
<28> 상기 단계 (2)에서는 단계 (1)에서 얻은 화학식 5의 고리형 삼합체 포스파젠 중간체에 치환되지 않은 3개의 염소에 대하여 염소 원자 1개당 1.1 - 1.5 당량의 화학식 6의 화합물을, 화학식 6 화합물에 대하여 4 당량의 트라이에틸아민을 클로로포름 또는 메틸렌글로라이드에 녹인 용액을 가하여 반응시킨다. 상온에서 1일 동안 반응시키고, 이어서 40 - 60℃에서 1 내지 2일 정도 환류 반응시킨다. 반응 용액을 다음과 같은 방법으로 정제하여 순수한 화학식 7 화합물을 분리한다. 먼저, 반응 용액을 원심분리 또는 여과하여 생성된 과량의 침전물($Et_3N \cdot HCl$ 또는 NaCl)을 제거하고, 여액을 감압 농축한 다음, 테트라하이드로퓨란을 가하여 다시 녹이고, 과량의 에틸에테르 또는 헥산을 가하여 침전을 유도한다. 이 과정을 2 내지 3회 반복하고, 침전물을 소량의 증류수에 녹여 투석막(통과 분자량: 1000)을 이용하여 투석하여 정제한 다음, 동결 건조한다. 그 다음, 생성물을 증류수에 용해시킨 후, 온도를 서서히 올리면 맑게 용해되어있던 화합물이 이 화합물의 저임계 용액 온도에서 침전으로 가라앉는다. 이를 4000 rpm에서 30분 동안 원심분리하고, 분배된 상층의 증류수를 제거하여 바닥에 가라앉은 침전물을 취한다. 이 과정을 2 - 3회 반복한 다음 동결 건조하면, 소량의 다른 이성질체가 제거된 순수한 화학식 7의 고리형 포스파젠 삼량체가 얻어진다. 그 다음, 예를 들면, 화학식 7 화합물에 존재하는 다이펩타이드의 당량수에 대하여 5 - 10당량의 사이클로헥사다이엔과 메탄올을 이용하여 수소 기체 분위기에서 반응시켜 화학식 7 화합물로부터 벤질옥시카보닐기 또는 t-부톡시카보닐기가 제거된 화학식 8의 화합물을 얻는다.

<29> 상기 단계 (3)에서는 화학식 8 화합물을 메틸렌클로라이드 또는 테트라하이드로퓨란에 용해시키고, 3당량의 트리에틸아민을 가한 다음, 드라이아이스-아세톤 중탕을 이용하여 -78℃로 온도를 내리고, 일정 시간 동안 교반한다. 그 다음, 별도의 반응 용기에 화학식 8 화합물에 대하여 1 또는 2 당량의 2'-석시닐 탁솔을 메틸렌클로라이드 또는 테트라하이드로퓨란에 용해시키고, 2'-석시닐 탁솔과 동일한 당량의 아마이드 커플링 시약, 예컨대, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드(EDC)와 1-하이드록시벤조니트로아졸 하이드레이트(HOBt)를 메틸렌클로라이드에 용해시킨 용액을 2'-석시닐 탁솔 반응 용액에 천천히 적가하고, 환류 반응시킨다. 위에 예시한 시약 이외에도 본 발명 분야에 통상적으로 알려져 있는 사용 가능한 아마이드 커플링 시약은 매우 다양하다. 따라서, 위에 예시한 아마이드 커플링 시약은 예시에 불과한 것이며, 본 발명 분야에 알려져 있는 어떠한 시약을 사용하더라도 동일한 목적을 달성할 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

<30> 이렇게 만들어진 2'-석시닐 탁솔 반응 용액을 앞에서 제조한 화학식 8의 포스파젠 삼합체 용액에 가하고, 반응이 완결될 때까지 환류 반응시킨다. 최종 반응 용액을 여과하여 침전물을 제거하고, 감압 증류 및 동결 건조하여 화학식 1의 고리형 포스파젠 삼량체-탁솔 컨쥬게이트를 얻는다.

<31> 하기 반응식 1은 본 발명에 따른 화학식 1 화합물의 제조 방법의 전체 합성 공정을 예시한 것이다.

반응식 1



<32>

<33> 상기 반응식 1에 기재되어 있는 구체적인 반응 시약, 반응 용매, 반응 시간, 반응 온도 등의 조건은 본 발명에 따른 화학식 1 화합물을 제조하는 한 가지 예에 불과하다. 따라서 앞에서 설명한 단계 (1) 내지 (3)에 따라 화학식 1 화합물을 제조함에 있어서 그 반응 조건은 반응식 1에 예시된 것과는 다르게 변형될 수 있으며, 그러한 변형 역시 본 발명의 범위에 포함되는 것이다.

<34> **실시예**

<35> 이하에서는 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 실시예는 본 발명의 예시에 불과하며, 본 발명의 범위는 특허청구의 범위를 벗어나지 않는 한 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<36> 본 발명의 화합물에 대한 탄소, 수소 및 질소 원소 분석은 Perkin-Elmer C, H, N 분석기를 이용하여 수행되었다. 수소 핵자기 공명 스펙트럼은 Bruker DPX-250 NMR Spectromter를, 인 핵자기 공명 스펙트럼은 Varian Gemini-400 NMR Spectrometer를 사용하여 각각 측정하였다.

<37> **실시예 1**: (트리메톡시폴리에틸렌글라이콜350)(트리글라이실라이신메틸에스터-모노-2'-석시닐탁솔)사이클로트라이포스파젠 {[NP(MPEG350)(GlyLys-Me-2'-석시닐탁솔)][NP(MPEG350)(GlyLysMe)]$_2$}의 제조

<38> 분자량 350의 메톡시폴리에틸렌글라이콜(MPEG350)(3.32 g, 9.50 mmol)과 수소화나트륨 (0.24 g, 9.98 mmol)을 건조된 테트라하이드로퓨란에 넣고 아르곤 기류 하에서 4시간 교반하여 메톡시폴리에틸렌글라이콜의 나트륨염을 제조한다. 고리형 6염화 포스파젠 삼합체 ($N_3P_3Cl_6$, 1.00 g, 2.88 mmol)를 건조된 테트라하이드로퓨란에 녹인 다음, 여기에 앞서 제조한 메톡시폴리에틸렌글라이콜의 나트륨염 용액을 드라이아이스-아세톤 중탕(-78℃) 하에서 30분 동안 적가 한다. 30분 후에 드라이아이스-아세톤 중탕을 제거하고, 상온에서 8시간 동안 반응시킨다.

<39> 별도의 반응 용기에서 건조된 클로로포름(100 mL) 내에서 트라이에틸아민 (3.58ml, 25.80 mmol)으로 중화한 글라이실 벤질옥시카보닐라이신 메틸에스터(Gly(cbz)LysEt) (3.57 g, 11.52 mmol)를 앞에서 제조한 포스파젠을 함유하는 반응 용액에 서서히 가한 후, 상온에서 24시간 동안 반응시킨다. 그 다음, 반응 용액을 여과하여 생성된 과량의 침전물(NEt_3 HCl 또는 NaCl)을 제거하고, 여액을 감압 농축한 후 소량의 물에 녹이고, 투석막(통과 분자량: 1000)을 이용하여 24시간 동안 투석시킨 후 동결 건조한다. 이 생성물을 테트라하이드로퓨란에 녹인 후, 과

량의 에테르 또는 헥산을 가하여 재결정한 다음, 메탄올(100ml)에 다시 녹인다. 여기에 팔라듐 차콜 (3g)과 사이클로헥사다이엔 (1.46ml, 14.1mmol)을 넣고, 수소 기체 하에서 48시간 동안 반응시키면 라이신 아민기의 보호기인 벤질옥시카보닐기가 완전히 제거된 포스파젠 삼량체 생성물 [NP(MPEG350)GlyLysMe]을 얻는다. 소량의 다른 이성질체를 제거하기 위하여 생성물을 증류수 20ml에 용해시킨 후, 온도를 서서히 올리면 생성물이 38℃에서 침전으로 떨어진다. 이러한 재결정 과정을 2 - 3회 반복한 다음 동결 건조하여 순수한 고리형 포스파젠삼량체 생성물 $[NP(MPEG350)GlyLysMe]_3$을 얻었다 (수율 65%).

<40> 이렇게 얻은 고리형 포스파젠 삼량체 (500mg, 0.29mmol)를 메틸렌클로라이드에 녹인 후, 여기에 트라이에틸아민 (NEt_3) (0.09ml, 0.67mmol)과 2'-석시닐 탁솔 (270mg, 0.29mmol)을 같이 녹인다. 별도의 반응 용기 내에서 카복시 그룹과 아민기의 커플링 시약인 EDAC와 HOBt를 각각 메틸렌클로라이드에 녹인 후 드라이아이스-아세톤 중탕 (-78℃)하에 있는 2'-석시닐 탁솔 반응 용액에 천천히 적가하고, 1시간 동안 교반하였다. 다음 드라이아이스-아세톤 중탕을 제거하고, 다시 상온에서 48시간 교반하였다. 감압 건조 후, 소량의 메탄올에 녹여 물에서 통과분자량 1000의 투석막을 이용하여 24시간 투석시킨 후 감압 동결 건조하여 {$[NP(MPEG350)(GlyLysMe\text{-}2'\text{-석시닐탁솔}]_1[NP(MPEG350)(GlyLys\text{-}Me)]_2$}를 얻었다 (수율, 62%).

<41> 조성식: $C_{123}H_{198}N_{13}O_{50}P_3$

<42> 분자량: 2,784

<43> 원소 분석치(%): C, 54.63; H, 7.17; N, 6.04.

<44> 이론치(%): C, 54.35; H, 7.17; N, 6.54.

<45> 수소 핵자기 공명 스펙트럼($CDCl_3$)(δ, ppm): 1.12 (s, 3H, C17-H), 1.26 (t, 3H, C16-H), 1.36 (br, 12H, LysMe γ-$\underline{CH_2}$, δ-$\underline{CH_2}$), 1.67 (s, 3H, C19-H), 1.79 (br, 6H, LysMe β-$\underline{CH_2}$), 1.88 (br, 3H, C18-H), 2.25 (s, 3H, C10-OAc), 2.41 (s, 3H, C4-OAc), 2.49 (br, 2H, 석시닐 $\underline{CH_2}$), 2.74 (br, 2H, 석시닐 $\underline{CH_2}$), 3.05 (br, 6H, LysMe ε-$\underline{CH_2}$), 3.39 (s, 9H, MPEG350 O$\underline{CH_3}$), 3.66 (br, 72H, MPEG350 O$\underline{CH_2CH_2}$), 4.02 (d, 2H, Gly $\underline{CH_2}$), 3.79, (d, 1H, C3-H), 3.95 (br, 12H, MPEG350 O$\underline{CH_2CH_2}$), 4.13 (m, 2H, C20-H), 4.27 (d, 1H, C7-H), 4.47 (br, 3H, LysMe α-$\underline{CH}$), 4.98 (d, 1H, C5-H), 5.43 (s, 1H, C2'-H), 5.66 (d, 1H, C2-H), 5.90 (m, 1H, C3'-H), 6.17 (m, 1H C13-H), 6.29 (s, 1H, C10-H), 7.39 (m, 3'Ph), 7.46 (br, 3'-NBz), 7.50 (m, 2-OBz), 7.80 (d, 3'-OBZ), 8.12 (d, 2-OBz).

<46> 인 핵자기 공명 스펙트럼(CDCl, ppm): δ 22.5

<47> **실시예 2**: (트리메톡시폴리에틸렌글라이콜550)(트리글라이실라이신메틸에스터-모노-2'-석시닐탁솔)사이클로트라이포스파젠, {$[NP(MPEG550)(GlyLys\text{-}Me\text{-}2'\text{-석시닐탁솔}]_1[NP(MPEG350)(GlyLysMe)]_2$}의 제조

<48> 분자량 550의 메톡시폴리에틸렌글라이콜(MPEG550)(5.24g, 9.50 mmol)을 사용하여 위의 실시예 1에서와 동일한 방법으로 합성하였다 (수율: 58%).

<49> 조성식: $C_{153}H_{258}N_{13}O_{65}P_3$

<50> 분자량: 3,318

<51> 원소 분석치(%): C, 54.22; H, 8.06; N, 5.84.

<52> 이론치(%): C, 54.31; H, 7.69; N, 5.47.

<53> 수소핵자기 공명 스펙트럼($CDCl_3$)(δ, ppm): 1.13 (s, 3H, C17-H), 1.20 (t, 3H, C16-H), 1.43 (br, 12H, LysMe γ-$\underline{CH_2}$, δ-$\underline{CH_2}$), 1.67 (s, 3H, C19-H), 1.79 (br, 6H, LysMe β-$\underline{CH_2}$), 1.89 (br, 3H, C18-H), 2.18 (s, 3H, C10-OAc), 2.42 (s, 3H, C4-OAc), 2.49 (br, 2H, 석시닐 $\underline{CH_2}$), 2.74 (br, 2H, 석시닐 $\underline{CH_2}$), 3.10 (br, 6H, LysMe ε-$\underline{CH_2}$), 3.38 (s, 9H, MPEG550 O$\underline{CH_3}$), 3.65 (br, 132H, MPEG550 O$\underline{CH_2CH_2}$), 4.04 (d, 2H, Gly $\underline{CH_2}$), 3.18, (d, 1H, C3-H), 4.44 (br, 3H, LysMe α-$\underline{CH}$) 4.28(m, 2H, C20-H), 4.35 (d, 1H, C7-H), 4.99 (d, 1H, C5-H), 5.41 (s, 1H, C2'-H), 5.67 (d, 1H, C2-H), 5.91 (m, 1H, C3'-H), 6.19 (m, 1H C13-H), 6.29 (s, 1H, C10-H), 7.40 (m, 3'Ph), 7.46 (br, 3'-NBz), 7.50 (m, 2-OBz), 7.80 (d, 3'-OBZ), 8.12 (d, 2-OBz).

<54> 인 핵자기 공명 스펙트럼(CDCl, ppm): δ 22.54

<55> **실시예 3**: (트리메톡시폴리에틸렌글라이콜550)(트리글라이실라이신메틸에스터-디-2'-석시닐탁솔)사이클로트라이포스파젠, {[NP(MPEG550)(GlyLysMe- 2'-석시닐탁솔]$_2$[NP(MPEG550)(GlyLysMe)]$_1$}의 제조

<56> 분자량 550의 메톡시폴리에틸렌글라이콜(MPEG550)(5.24 g, 9.50 mmol)과 2배의 2'-석시닐 탁솔 (540 mg, 0.58 mmol)을 사용하여 위의 실시예 1에서와 동일한 방법으로 합성하였다 (수율: 58%).

<57> 조성식: $C_{204}H_{312}N_{14}O_{82}P_3$

<58> 분자량: 4,318

<59> 원소 분석치(%): C, 54.22; H, 8.06; N, 5.84.

<60> 이론치(%): C, 56.74; H, 7.28; N, 4.54.

<61> 수소핵자기 공명 스펙트럼($CDCl_3$)(δ, ppm): 1.13 (s, 3H, C17-H), 1.20 (t, 3H, C16-H), 1.43 (br, 12H, LysMe γ-CH_2, δ-CH_2), 1.67 (s, 3H, C19-H), 1.79 (br, 6H, LysMe β-CH_2), 1.89 (br, 3H, C18-H), 2.18 (s, 3H, C10-OAc), 2.42 (s, 3H, C4-OAc), 2.49 (br, 2H, 석시닐 CH_2), 2.74 (br, 2H, 석시닐 CH_2), 3.10 (br, 6H, LysMe ε-CH_2), 3.38 (s, 9H, MPEG550 OCH_3), 3.65 (br, 132H, MPEG550 OCH_2CH_2), 4.04 (d, 2H, Gly CH_2), 3.18, (d, 1H, C3-H), 4.44 (br, 3H, LysMe α-CH) 4.28(m, 2H, C20-H), 4.35 (d, 1H, C7-H), 4.99 (d, 1H, C5-H), 5.41 (s, 1H, C2'-H), 5.67 (d, 1H, C2-H), 5.91 (m, 1H, C3'-H), 6.19 (m, 1H C13-H), 6.29 (s, 1H, C10-H), 7.40 (m, 3'Ph), 7.46 (br, 3'-NBz), 7.50 (m, 2-OBz), 7.80 (d, 3'-OBZ), 8.12 (d, 2-OBz).

<62> 인 핵자기 공명 스펙트럼($CDCl_3$, ppm): δ 22.54

<63> **실시예 4**: 포스파젠-탁솔 컨쥬게이트의 미셀 형성 및 크기 측정

<64> 본 발명에 따라 합성된 고리형 삼합체 포스파젠-탁솔 컨쥬게이트가 수용액 중에서 친지성기들의 상호 작용에 의하여 응집되어 미셀을 형성하는지 여부를 이하에 설명된 절차에 따라 DLS(Dynamic light scattering)법으로 결정하였다. 실시예 1의 포스파젠-탁솔 컨쥬게이트를 증류수에 0.1 - 0.5 %로 용해시킨 수용액의 입도를 DLS법으로 측정하였다. 도 1 에서 볼 수 있는 바와 같이, 반지름 105 nm의 미셀이 형성된다는 것이 확인되었다.

<65> **실시예 5**: 포스파젠-탁솔 컨쥬게이트의 PBS 용액에서의 분해 실험

<66> 본 발명의 포스파젠-탁솔 컨쥬게이트가 생체 내에서 항암효과를 내려면 탁솔 분자가 화학적으로 결합되어 있는 약물 전달 물질인 삼합체 포스파젠으로부터 효소 분해 또는 가수분해에 의하여 떨어져 나와야 한다. 따라서 본 발명에서는 다음과 같은 절차에 따라 PBS 용액에서 가수분해 실험을 실시하였다.

<67> {NP(MPEG350)GlyLysMe-2'-석시닐탁솔}$_1${NP(MPEG350)GlyLysMe}$_2$ 3.4 mg을 DMSO 0.1 ml에 녹이고, PBS 용액(pH 5.4/7.4/9.4) 0.9 ml에 희석시킨 후, 37℃의 물중탕에서 흔들어 주면서 시간별로 시료를 취하여 동결건조하고, 0.1% TFA을 함유한 물과 아세토나이트릴(6:4) 혼합 용액을 사용하여 유속을 1ml/분으로 하여 HPLC로 분석하였다. 실험 결과는 도 2에 도시되어 있다.

<68> **실시예 6**: 포스파젠-탁솔 컨쥬게이트의 *in vitro* 항암 효과 시험

<69> 본 발명의 포스파젠-탁솔 컨쥬게이트의 항암 효과를 알아보기 위하여. 표준 시험 절차[Y. J. Jun, et al. *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 1593-1601]에 따라 실시예 1의 화합물에 대한 *in vitro* 항암 효과 시험을 수행하여 그 결과를 아래 표 1에 제시하였다.

<70> 표 1에서 보면, 같은 실시예 1의 화합물이 순수한 물에서는 거의 분해되지 않아 항암 효과가 매우 낮지만, 체액과 비슷한 PBS 용액에서는 탁솔 분자가 상당량 분해되어 비교적 높은 항암 효과를 나타내고 있다. 생체 내에서는 컨쥬게이트에 스페이서로 연결시킨 다이펩타이드가 라이소좀에 존재하는 펩타이드 분해효소에 의하여 쉽게 분해되기 때문에, 생체 내에서 항암 효과가 더 높게 나타날 것으로 기대된다.

<71> [표 1]포스파젠-탁솔 컨쥬게이트의 *in vitro* 항암 효과 시험 결과

<72>

화합물	IC_{50} 값 (nM) (평균 ± SD, n=3 - 4)			
	MCF-7	SK-OV3	A-431	MDA-MB-231
탁솔(유리)	39.0 ± 4.9	65.8 ± 30.5	25.1 ± 8.9	47.1 ± 12.2
실시예 1(식염수)	128.6 ± 37.5	137.5 ± 14.3	53.8 ± 13,9	107.5 ± 10.9
실시예 1(순수한 물)	447.4 ± 138.2	503.4 ± 114.3	379.9 ± 89.2	327.2 ± 54.5

<73> MCF-7 및 MDA-MB-231: 유방암 세포주

<74> SK-OV3: 난소암 세포주

<75> A-431: 자궁암 세포주

<76> **실시예 7:** 포스파젠-탁솔 컨쥬게이트의 혈 대사 시험

<77> 수컷 SD 래트 (270~300g) 4마리를 1군으로 하여, 약물 농도가 6.67mg/ml가 되도록 약물을 PBS 용액에 녹인 다음, 각 개체에 대하여 약물 투여량을 5mg/kg로 하여, 정맥 주입(i.v. infusion)으로 3분 동안 투여하였다. 약물 투여 후 48시간 동안 시간별(0, 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48시간)로 혈액(100㎕)을 채취하여 HPLC로 분석한 결과를 다음 표 2에 제시하였다.

<78> 표 2에서 보면, 본 발명의 실시예 2의 화합물의 체내 반감기가 제제하지 않은 탁솔에 비하여 거의 2배 길게 나타나는 것을 알 수 있었다.

<79> [표 2]삼량체 포스파젠-탁솔 컨쥬게이트의 대사 시험 결과

<80>

변수	파클리탁셀 (제어군)		실시예 2	
	평균	S.D.	평균	S.D.
C_0 (ug/ml)	2.70	0.65	1.53	0.15
Lambda z (hr^{-1})	0.275	0.165	0.133	0.077
$t_{1/2}$_Lambda z (hr)	3.54	2.46	6.29	2.51
Vz_obs (ml)	2778.1	1735.0	4468.9	2059.6
Cl_obs (ml/hr)	556.2	63.0	513.3	145.1
AUClast (ug*hr/ml)	1.97	0.31	1.97	0.59
AUCINF (측정값)	2.29	0.28	2.55	0.66
AUClast/AUCINF(%)	85.9	9.4	77.1	10.5

발명의 효과

<81> 본 발명에 따라 수용성 미셀을 형성하며, 생체 내에서 서서히 분해 및 방출되는 고리형 삼합체 포스파젠-탁솔 컨쥬게이트 항암제 및 그의 제조 방법이 제공되었다. 본 발명의 고리형 삼합체 포스파젠-탁솔 컨쥬게이트 항암제는 물에 잘 녹기 때문에 바로 단시간 주사 투여가 가능하여 치료 방법이 간편하고, 생체 투여 시 혈중에서 미셀을 형성하고 장시간 순환하면서 탁솔 분자가 미셀의 내부로부터 분해되어 서서히 혈중에 공급되므로 항암제의 일시 투여에 의한 독성을 근본적으로 감소시키고, 지속적인 약효를 낼 수 있어서, 우수한 항암 치료 효과를 기대할 수 있다. 따라서 부작용이 적고 치료효과가 뛰어난 새로운 항암제로 널리 이용 될 수 있을 것으로 기대된다.

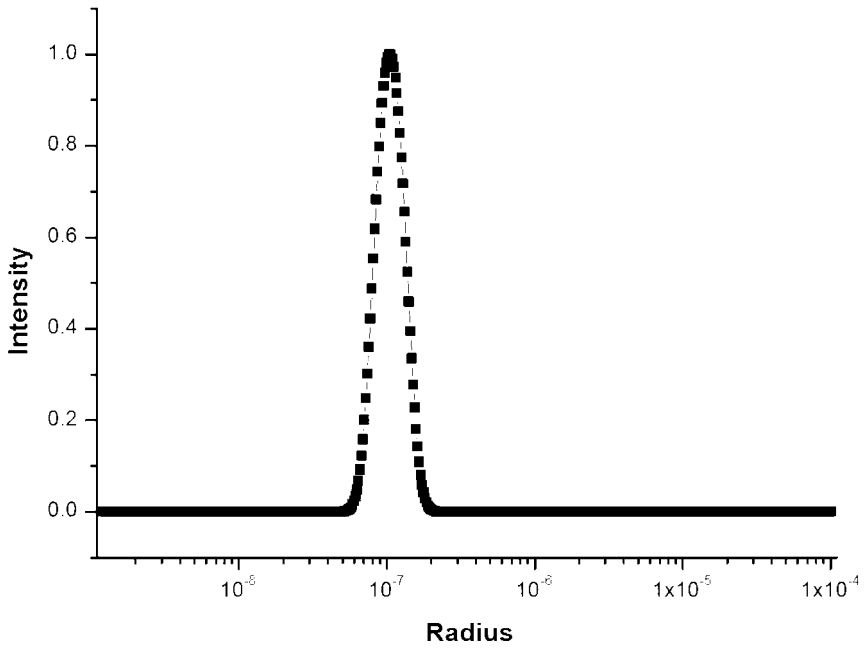
도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 본 발명의 실시예 1에서 제조한 포스파젠-탁솔 컨쥬게이트를 증류수에 0.1 - 0.5 %로 용해시킨 수용액의 입도를 DLS법으로 측정할 결과를 보여주는 것이다.

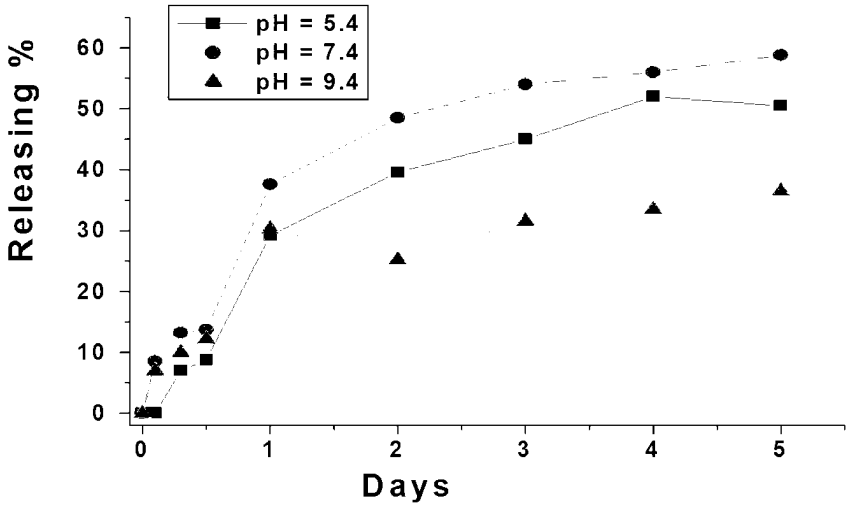
<2> 도 2는 실시예 1에서 제조한 포스파젠-탁솔 컨쥬게이트의 가수 분해 실험 결과를 도시한 것이다.

도면

도면1


Intensity
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
10^{-8}
10^{-7}
10^{-6}
$1x10^{-5}$
$1x10^{-4}$
Radius

도면2


pH = 5.4
pH = 7.4
pH = 9.4
Releasing %
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
5
Days