



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0012541
(43) 공개일자 2017년02월02일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08G 65/334 (2006.01) A61K 47/30 (2017.01)
C08G 65/34 (2006.01) C08G 65/48 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C08G 65/3342 (2013.01)
A61K 47/30 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-0011902(분할)</p> <p>(22) 출원일자 2017년01월25일
심사청구일자 2017년01월25일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2014-0194237
원출원일자 2014년12월30일
심사청구일자 2014년12월30일</p> | <p>(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50</p> <p>(72) 발명자
김병수
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
손수현
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50</p> <p>(74) 대리인
제일특허법인</p> |
|--|---|

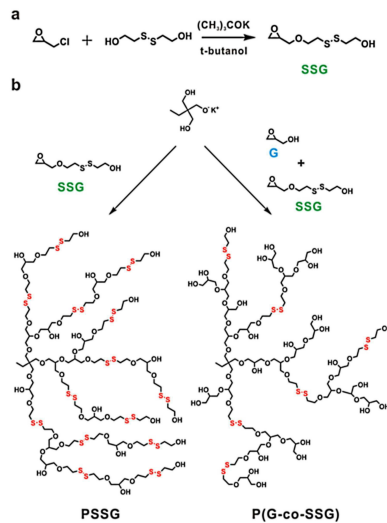
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 다이설파이드 결합을 갖는 고분지형 폴리글리세롤

(57) 요약

본 발명은 다이설파이드 결합을 갖는 고분지형 폴리글리세롤, 보다 상세하게는 단량체로서 다이설파이드 결합을 갖는 글리시돌계 화합물을 포함하거나, 공단량체로서 다이설파이드 결합을 갖는 글리시돌계 화합물 및 글리시돌을 포함하는 고분지형 폴리글리세롤 및 이의 용도에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 고분지형 폴리글리세롤은 생체적합성이며, 주쇄 또는 분지쇄 내에 다이설파이드 결합이 존재하여 환원 조건하에서 분해될 수 있으므로, 약물 운반체로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C08G 65/34 (2013.01)

C08G 65/48 (2013.01)

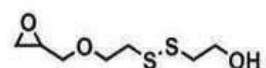
명세서

청구범위

청구항 1

반복단위로서 하기 화학식 1의 화합물을 포함하는 단일중합체로서,
주쇄 또는 분지쇄에 다이설파이드 결합을 갖는,
고분지형 폴리글리세롤(hyperbranched polyglycerol).

<화학식 1>



청구항 2

제1항에 있어서,
상기 고분지형 폴리글리세롤이 상기 화학식 1의 화합물의 음이온성 개환 다중분지 중합반응(anionic ring-opening multibranching polymerization)에 의해 생성되는 것을 특징으로 하는, 고분지형 폴리글리세롤.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 고분지형 폴리글리세롤이 반복단위로서 상기 화학식 1의 화합물을 10 내지 50개 포함하는 것을 특징으로 하는, 고분지형 폴리글리세롤.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 고분지형 폴리글리세롤이 2000 내지 11000 g/mol의 수평균분자량을 갖는 것을 특징으로 하는, 고분지형 폴리글리세롤.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 고분지형 폴리글리세롤이 1.10 내지 1.15의 M_w/M_n 을 갖는 것을 특징으로 하는, 고분지형 폴리글리세롤.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 고분지형 폴리글리세롤을 포함하는 약물 운반체(drug carrier).

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 다이설파이드 결합을 갖는 고분지형 폴리글리세롤에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 주쇄 또는 분지쇄에 다이설파이드 결합을 갖는 고분지형 폴리글리세롤 및 이의 약물 운반체로서의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 고분지형 폴리글리세롤(hyperbranched polyglycerol; PG)은 많은 하이드록실기를 갖는 폴리에테르 골격으로 이루어진 구상형의 고분지형 중합체이다. PG는 단량체로서 상대적으로 좁은 다중분산도를 갖는 광범위한 분자량의 글리시돌을 개환 다중분지 중합반응시켜 합성된다. 폴리에테르 유사체인 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 유사하게, PG는 탁월한 생체적합성, 면역원성, 및 낮은 독성을 나타낸다. 또한, PG는 합성 용이성, 다양한 구조에의 접근 용이성 및 다양한 작용기의 부착 용이성으로 인해, 약물 운반 시스템, 중합체 치료제, 프로테오믹스(proteomics), 및 인간 혈청 알부민 대체물과 같은 생물의학 분야에서 유망 물질로서 큰 관심을 끌고 있다.

[0003] PG는 길고 제어가능한 생체내 순환 반감기를 가지고 있어, 치료 효능이 우수하다. 예를 들어, 분자량이 100 kg/mol 및 500 kg/mol인 PG는 각각 32시간 및 57시간의 순환 반감기를 갖는다. 그러나, 최근 연구에 따르면, 500 kg/mol의 PG의 경우 주사된 투여량의 대략 10% 정도가 간과 같은 기관에 축적되며, 이 축적량은 중합체의 분자량이 높을수록 더 큰 것으로 나타났다. 따라서, 생리학적 조건 하에서 생체적합성이며 분해성인 중합체를 개발하는 것이 필요하다.

[0004] 이를 위해, 산-분해성 모이어티를 갖는 PG가 최근에 소개되었다. 한 그룹은 단량체 또는 개시제 내에 각각 아세탈 결합을 도입함으로써 두 가지 유형의 pH-반응성 고분지형 PG를 개발하였다(Dingels, C. et al., *Biomacromolecules* 2013, 14, 448-459; Tonhauser, C. et al., *ACS Macro Letters* 2012, 1, 1094-1097). 또한, 다른 그룹은 구조적으로 상이한 케탈 연결기를 중합체 골격에 도입함으로써 고분지형 PG의 분해 동역학을 제어하였다(Shenoi, R. A. et al., *Biomaterials* 2013, 34, 6068-6081; Shenoi, R. A. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 14945-14957). 그럼에도 불구하고, 이들 pH-반응성 분해 접근법은 중합체가 중성 pH 조건의 수용액에서 분해될 수 있기 때문에 여전히 불완전하다.

[0005] 생물학적 시스템에서, 다이설파이드 결합은 세포의 유체에서의 글루타치온 농도(<10 μ M) 대비 세포질에서의 글루타치온의 고농도(2-10 mM)에 의해 주로 생성되는 환원 포텐셜에 반응하여 티올로 분해된다. 대조적으로, 다이설파이드는 세포 외부의 산화적 환경에서 안정한데, 시스템 및 환원된 글루타치온보다 시스템의 농도가 더 높기 때문이다. 세포내 환경과 세포의 환경 사이에 커다란 농도 구배는 세포 흡수 후에 특이적으로 분해되는 중합체의 개발을 위한 새로운 수단을 제공한다. PEG- 및 PG-함유 물질의 분해에 다이설파이드 결합을 이용하는 기술이 보고된 바 있으나(Ko, N. R. et al., *Biomacromolecules* 2014, 15, 3180-3189; Chen, W. et al., *Macromolecules* 2013, 46, 699-707; 및 Lee, Y. et al., *Biomacromolecules* 2005, 6, 24-26), 이들은 중합체와 약물간의 접합 링커(conjugation linker) 또는 나노겔에 대한 가교제로 한정되어 있어, PG 골격 내에 다이설파이드 결합을 사용한 것은 보고된 바 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) Dingels, C. et al., *Biomacromolecules* 2013, 14, 448-459;
 (비특허문헌 0002) Tonhauser, C. et al., *ACS Macro Letters* 2012, 1, 1094-1097
 (비특허문헌 0003) Shenoi, R. A. et al., *Biomaterials* 2013, 34, 6068-6081
 (비특허문헌 0004) Shenoi, R. A. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 14945-14957
 (비특허문헌 0005) Ko, N. R. et al., *Biomacromolecules* 2014, 15, 3180-3189
 (비특허문헌 0006) Chen, W. et al., *Macromolecules* 2013, 46, 699-707; 및 Lee, Y. et al., *Biomacromolecules* 2005, 6, 24-26

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 생체적합성 및 산화환원-분해성 고분지형 폴리글리세롤을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 고분지형 폴리글리세롤의 약물 운반체로서의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 주쇄 또는 분지쇄에 다이설파이드 결합을 갖는 고분지형 폴리글리세롤을 제공한다.

[0010] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 고분지형 폴리글리세롤을 포함하는 약물 운반체를 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 고분지형 폴리글리세롤은 생체적합성이며, 주쇄 또는 분지쇄 내에 다이설파이드 결합이 존재하여 환원 조건하에서 분해될 수 있으므로, 약물 운반체로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1a는 단량체(반복단위)로서 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올(SSG)을 제조하기 위한 반응식을 나타낸 것이고, 도 1b는 상기 단량체의 단일중합체인 고분지형 폴리글리세롤(PSSG), 및 상기 단량체 및 글리시돌의 공중합체인 고분지형 폴리글리세롤(P(G-co-SSG))을 제조하기 위한 반응식을 나타낸 것이다.

도 2a는 단량체(반복단위)로서 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올(SSG)의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이고, 도 2b는 단일중합체(중합체 2)의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이며, 도 2c는 공중합체(중합체 7)의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 3a는 단량체(반복단위)로서 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올(SSG)의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이고, 도 3b는 단량체(반복단위)로서 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올(SSG)의 ^{13}C NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 4a는 단일중합체(중합체 1)의 MALDI-ToF 스펙트럼을 나타낸 것이고, 도 4b는 공중합체(중합체 7)의 MALDI-ToF 스펙트럼을 나타낸 것이다. 또한, 도 4b에서의 삽도는 2600 내지 2700 g/mol 범위의 공중합체의 상세한 몰 질량과 배치를 보여준다.

도 5는 G와 SSG(단량체 비율 1:1)의 원위치 공중합반응 동역학에 대한 ^{13}C NMR 스펙트럼을 나타낸 것으로서, 좌측은 지정된 시점으로 수집된 스펙트럼의 오버레이(overlay)를 나타낸 것이고, 우측은 각각 G와 SSG 단량체에 상응하는, 53 및 55 ppm에서 에폭사이드 내의 메틴 카본을 보여주는 줌-인 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 6은 50°C에서 벌크로 정량적인 ^{13}C NMR 동역학으로부터 측정된 G(청색 사각형)와 SSG(적색 원형)의 공중합에 대한 단량체 전환 퍼센트 대 전체 전환율을 나타낸 것이다.

도 7a는 DTT 처리한 PSSG 사슬의 분해 도해를 나타낸 것이고, 도 7b는 DTT 처리 후(10분) PSSG 단일중합체(중합체 2)의 ^1H - 및 ^{13}C NMR 스펙트럼에서의 변화를 나타낸 것이다.

도 8a는 DTT 처리 전(흑색 곡선) 및 후(적색 곡선)의 P(G₁₆₅-co-SSG₅₅)(중합체 4)의 GPC 흔적을 나타낸 것이고, 도 8b는 분해 생성물의 도해를 나타낸 것이며, 도 8c는 DTT 처리 후 GPC 흔적에서 3개의 피크의 기원에 대해 가

능한 메커니즘을 나타낸 것이다.

도 9a는 MTT 분석에 의해 측정된, 정상세포 WI-38에서의 PG₁₅₀(흑색), P(G₆₀-co-SSG₃₀)(회색) 및 PSSG₂₀ 중합체(백색)의 시험관내 세포 생존 분석을 나타낸 것이고, 도 9b는 MTT 분석에 의해 측정된, 암세포 HeLa에서의 시험관내 세포 생존 분석을 나타낸 것이며, 도 9c는 CCK 분석에 의해 측정된, 정상세포 WI-38에서의 시험관내 세포 생존 분석을 나타낸 것이고, 도 9d는 CCK 분석에 의해 측정된, 암세포 HeLa에서의 시험관내 세포 생존 분석을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

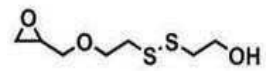
[0013] 본 발명은 주쇄 또는 분지쇄에 다이설파이드 결합을 갖는 고분지형 폴리글리세롤(hyperbranched polyglycerol)을 제공한다.

[0014] 종래 '고분지형 폴리글리세롤'는 폴리에테르 주쇄, 폴리에테르 분지쇄 및 다수의 하이드록실기로 구성된 중합체인 반면, 본 발명에 따른 고분지형 폴리글리세롤은 주쇄 또는 분지쇄에 다이설파이드 결합을 추가로 갖는 것을 특징으로 한다.

[0015] 하나의 실시양태에서, 본 발명에 따른 주쇄 또는 분지쇄에 다이설파이드 결합을 갖는 고분지형 폴리글리세롤은 반복단위(단량체)로서 '다이설파이드 결합을 갖는 글리시돌계 화합물'를 포함하는 중합체일 수 있으며, 바람직하게는 반복단위(단량체)로서 다이설파이드 결합을 갖는 글리시돌계 화합물로부터 중합된 단일중합체(homopolymer)일 수 있다.

[0016] 상기 '다이설파이드 결합을 갖는 글리시돌계 화합물'는 하기 화학식 1로 표시되는 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올('SSG'라 함)일 수 있다.

[0017] <화학식 1>



[0019] 상기 화학식 1의 화합물을 반복단위로 중합하여 제조된 고분지형 폴리글리세롤은 '폴리(2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올)'('PSSG'라 함)일 수 있다. 상기 PSSG의 예시적인 구조는 도 1b를 참조한다.

[0020] 본 발명에 따른 고분지형 폴리글리세롤은 상기 다이설파이드 결합을 갖는 글리시돌계 화합물의 음이온성 개환 다중분지 중합반응(anionic ring-opening multibranching polymerization)에 의해 생성될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 하나의 실시양태에 따른 고분지형 폴리글리세롤은 도 1b에 나타난 도식에 의해 생성될 수 있다.

[0021] 바람직하게는, 본 발명의 하나의 실시양태에 따른 고분지형 폴리글리세롤은 아르곤 분위기 하에 다이설파이드 결합을 갖는 글리시돌계 화합물인 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올(SSG)을 개시제에 첨가하여 중합시킴으로써 생성될 수 있다.

[0022] 상기 중합반응의 개시제의 예로는 알코올을 포함하는 화합물, 예를 들면 트리메틸올프로판(TMP) 또는 메톡시에탄올을 들 수 있다.

[0023] 상기 중합반응은 촉매로서 칼륨 알콕사이드(예를 들면, 칼륨 메톡사이드) 또는 세슘 하이드록사이드 모노하이드레이트(CeOH · H₂O)을 사용하여 수행될 수 있다.

[0024] 상기 중합반응은 아르곤 분위기 하에서, 0.5 내지 3시간, 바람직하게는 1시간 동안 상온에서 반응시키는 개시 단계, 및 아르곤 분위기 하에서, 5 내지 24시간, 바람직하게는 12시간 동안 단량체를 적가한 후 2시간 내지 8시간, 바람직하게는 5시간 동안 70 내지 120℃, 바람직하게는 90℃에서 추가 반응시키는 중합 단계로 이루어질 수 있다.

[0025] 본 발명의 하나의 양태에 따른 고분지형 폴리글리세롤은 상기 다이설파이드 결합을 갖는 글리시돌계 화합물을

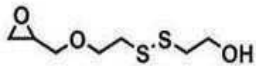
10 내지 50개 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 고분지형 폴리글리세롤은 PSSG₁₀, PSSG₂₀, PSSG₃₀, PSSG₄₀ 또는 PSSG₅₀일 수 있다.

[0026] 본 발명의 하나의 양태에 따른 고분지형 폴리글리세롤은 2000 내지 11000 g/mol의 분자량을 가질 수 있으며, 1.10 내지 1.15의 M_w/M_n 을 가질 수 있다. 상기 고분지형 폴리글리세롤의 분자량은 단량체 대 개시제 비율을 변경함으로써 조절될 수 있다. 예시적인 고분지형 폴리글리세롤의 특징은 표 1에서 확인될 수 있다.

[0027] 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 주쇄 또는 분지쇄에 다이설파이드 결합을 갖는 고분지형 폴리글리세롤은 반복단위로서 글리시돌을 추가로 포함하는 중합체일 수 있으며, 바람직하게는 공단량체로서 다이설파이드 결합을 갖는 글리시돌계 화합물 및 글리시돌로부터 공중합된 공중합체(copolymer)일 수 있다.

[0028] 상기 '다이설파이드 결합을 갖는 글리시돌계 화합물'은 하기 화학식 1로 표시되는 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올('SSG'라 함)일 수 있다.

[0029] <화학식 1>



[0030]

[0031] 상기 화학식 1의 화합물 및 글리시돌의 공중합 반응에 의해 생성된 고분지형 폴리글리세롤은 '폴리(글리세롤-co-2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올)'('P(G-co-SSG)'라 함)일 수 있다. 상기 P(G-co-SSG)의 예로는 P(G₁₆₅-co-SSG₅₅), P(G₆₀-co-SSG₃₀), P(G₂₀-co-SSG₂₀) 및 P(G₁₀-co-SSG₂₀)을 포함하는, 다양한 공중합체를 들 수 있다. 상기 P(G-co-SSG)의 예시적인 구조는 도 1b를 참조한다.

[0032] 상기 본 발명의 다른 양태에 따른 고분지형 폴리글리세롤(공중합체)은 도 1b에 나타난 도식에 의해 생성될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 다른 양태에 따른 고분지형 폴리글리세롤(공중합체)은 아르곤 분위기 하에 다이설파이드 결합을 갖는 글리시돌계 화합물인 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올(SSG)과 글리시돌(G)을 개시제에 첨가하여 공중합시킴으로써 생성될 수 있다.

[0033] 상기 중합반응의 개시제의 예로는 알코올을 포함하는 화합물, 예를 들면 1,1,1-트리스(하이드록시메틸)프로판(TMP) 또는 메톡시에탄올을 들 수 있다.

[0034] 상기 중합반응은 촉매로서 칼륨 알콕사이드(예를 들면, 칼륨 메톡사이드) 또는 세슘 하이드록사이드 모노하이드레이트(CeOH · H₂O)를 사용하여 수행될 수 있다.

[0035] 상기 중합반응은 아르곤 분위기 하에서, 0.5 내지 3시간, 바람직하게는 1시간 동안 상온에서 반응시키는 개시단계, 및 아르곤 분위기 하에서, 5 내지 24시간, 바람직하게는 12시간 동안 단량체를 적가한 후 2시간 내지 8시간, 바람직하게는 5시간 동안 70 내지 120℃, 바람직하게는 90℃에서 추가 반응시키는 중합 단계로 이루어질 수 있다.

[0036] 본 발명의 다른 양태에 따른 고분지형 폴리글리세롤은 5000 내지 24000 g/mol의 분자량을 가질 수 있으며, 1.23 내지 1.38의 M_w/M_n 을 가질 수 있다. 상기 고분지형 폴리글리세롤의 분자량은 단량체 대 개시제 비율을 변경함으로써 조절될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 다른 양태에 따른 고분지형 폴리글리세롤의 분자량은 25 내지 75 몰%의 SSG를 첨가함으로써 달성될 수 있다. 예시적인 고분지형 폴리글리세롤의 특징은 표 1에서 확인될 수 있다.

[0037] 본 발명에 따른 고분지형 폴리글리세롤은 주쇄 또는 분지쇄 내에 존재하는 다이설파이드기로 인해 환원 조건 하에 분해될 수 있으며, 생체적합성이므로, 주쇄 또는 분지쇄 내에 다이설파이드 결합이 없는 종래 고분지형 폴리글리세롤에 비해 안전하다.

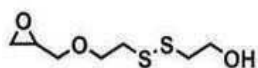
[0038] 한편, 본 발명은 전술한 고분지형 폴리글리세롤을 포함하는 약물 운반체를 제공한다. 본 발명에 따른 고분지형 폴리글리세롤은 약물 운반체 외에도 중합체 치료제, 프로테오믹스(proteomics), 및 인간 혈청 알부민 대체물로써 유용하게 사용될 수 있다.

[0039] 이하, 본 발명을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하나, 상기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 이로 인해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0040] 제조예 1: 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올(SSG, 단량체)의 합성

[0041] 산화환원 분해성이고 다작용성인 고분지형 타입의 폴리글리세롤을 제조하기 위하여, 도 1a에 나타낸 바와 같이, 산화환원 불안정한 AB₂-타입 단량체인, 하기 화학식 1의 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올(SSG)을 합성하였다(도 1a).

[0042] <화학식 1>



[0044] 구체적으로, t-부탄올(150 mL) 중 2-하이드록시에틸 다이설파이드(13.88 g, 0.09 mol) 용액을 t-부탄올(225 mL) 중 칼륨-t-부톡사이드(7.41 g, 0.09 mol)에 아르곤 하에서 실온에서 15분간 교반하면서 천천히 가한 다음, 15분간 계속 교반하였다. 이어서 과량의 에피클로로하이드린(54.6 g, 0.6 mol)을 주사기를 사용하여 30분간 적 가한 후, 실온에서 15시간 동안 교반하였다. 형성된 염을 걸러내고, 여액을 회전 증발기로 증발시켜 생성물, 부산물(다이에폭사이드) 및 미반응 다이올의 혼합물을 수득하였다. 상기 조 생성물을 150 mL의 메틸렌 클로라이드에 용해시키고 물로 3회(매회 30 mL) 세정하였다. 유기층을 회전 증발기를 사용하여 증발시키고 진공 오븐에서 건조시켰다. 상기 혼합물을, 에틸 아세테이트/헥산(2:1 v/v)을 이용한 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 추가 정제하여 담황색 점성 액체로서 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올(SSG)(6.2 g, 33%)을 수득하였다.

[0045] ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ ppm 3.90 (dd, 2H, J = 12.1, 6.0 Hz), 3.85 - 3.73 (m, 3H), 3.39 (dd, 1H, J = 11.7, 6.1 Hz), 3.19 - 3.15 (m, 1H), 2.90 (dt, 4H, J = 22.5, 6.1 Hz), 2.82 - 2.90 (m, 1H), 2.63 (dd, 1H, J = 5.0, 2.7 Hz) 2.20 (t, 1H, J = 6.3 Hz). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ ppm 70.91, 68.84, 59.66, 50.19, 43.50, 40.56, and 37.8.

[0046] 실시예 1: 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올의 단일중합체(PSSG₁₀; 중합체 1)의 합성

[0047] 도 1b에 나타낸 바와 같이, 트리메틸올프로판(TMP)과 칼륨 메톡사이드 용액의 반응에 의해 만들어진 칼륨 알콕사이드 개시제를 이용한 음이온성 개환 다중분지 중합반응에 의해, 하기와 같이 단일중합체인 폴리(2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올)을 제조하였다. 본 실시예에서는 제어식 방식으로 중합체를 합성하기 위한 느린 단량체 부가반응을 이용하였다. 중합체의 분자량은 단량체 대 개시제 비율로 제어하였다.

[0048] 구체적으로, 트리메틸올프로판(TMP)(45 mg, 0.3352 mmol)을 2-목 둥근바닥 플라스크에 넣었다. 메탄올 중 칼륨 메톡사이드(25 중량%, 37.5 μL, 0.127 mmol)를 0.70 mL의 메탄올로 희석시키고, 상기 용액을 플라스크에 가하여 30분간 아르곤 분위기하에 실온에서 교반시켰다. 과량의 메탄올을 회전 증발기를 사용하여 제거하고 진공 오븐(90℃, 3시간)에서 건조시켜 백색 염 개시제를 수득하였다. 이후 상기 플라스크를 아르곤으로 퍼징시키고 90

℃로 가열하였다. 그리고 나서, 제조예 1에서 수득한 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올 단량체(0.70 g, 3.32 mmol)를 12시간 동안 주사기 펌프를 사용하여 적가하였다. 단량체의 첨가 완료 후, 반응을 추가로 5시간 동안 계속하였다. 생성된 고분자를 1.0 mL의 메탄올에 용해시킨 후, 과량의 다이에틸 에테르를 이용하여 침전시키고, 다이에틸 에테르로 2회 세척하였다. 상기 생성물을 진공하에 90℃에서 1일간 건조시켜, 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올의 단일중합체(중합체 1)를 수득하였다.

[0049] 실시예 2: 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올의 단일중합체(PSSG₂₀; 중합체 2)의 합성

[0050] 트리메틸올프로판(TMP)(24 mg, 0.1788 mmol)을 2-목 둥근바닥 플라스크에 넣었다. 메탄올 중 칼륨 메톡사이드(25 중량%, 20 μL, 0.0678 mmol)를 0.70 mL의 메탄올로 희석시키고, 상기 용액을 플라스크에 가하여 30분간 아르곤 분위기하에 실온에서 교반시켰다. 과량의 메탄올을 회전 증발기를 사용하여 제거하고 진공 오븐(90℃, 3시간)에서 건조시켜 백색 염 개시제를 수득하였다. 이후 상기 플라스크를 아르곤으로 퍼징시키고 90℃로 가열하였다. 그리고 나서, 제조예 1에서 수득한 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올 단량체(0.70 g, 3.32 mmol)를 12시간 동안 주사기 펌프를 사용하여 적가하였다. 단량체의 첨가 완료 후, 반응을 추가로 5시간 동안 계속하였다. 생성된 고분자를 1.0 mL의 메탄올에 용해시킨 후, 과량의 다이에틸 에테르를 이용하여 침전시키고, 다이에틸 에테르로 2회 세척하였다. 상기 생성물을 진공하에 90℃에서 1일간 건조시켜, 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올의 단일중합체(중합체 2)를 수득하였다.

[0051] 실시예 3: 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올의 단일중합체(PSSG₅₀; 중합체 3)의 합성

[0052] 트리메틸올프로판(TMP)(9 mg, 0.06705 mmol)을 2-목 둥근바닥 플라스크에 넣었다. 메탄올 중 칼륨 메톡사이드(25 중량%, 7.5 μL, 0.0254 mmol)를 0.70 mL의 메탄올로 희석시키고, 상기 용액을 플라스크에 가하여 30분간 아르곤 분위기하에 실온에서 교반시켰다. 과량의 메탄올을 회전 증발기를 사용하여 제거하고 진공 오븐(90℃, 3시간)에서 건조시켜 백색 염 개시제를 수득하였다. 이후 상기 플라스크를 아르곤으로 퍼징시키고 90℃로 가열하였다. 그리고 나서, 제조예 1에서 수득한 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올 단량체(0.70 g, 3.32 mmol)를 12시간 동안 주사기 펌프를 사용하여 적가하였다. 단량체의 첨가 완료 후, 반응을 추가로 5시간 동안 계속하였다. 생성된 고분자를 1.0 mL의 메탄올에 용해시킨 후, 과량의 다이에틸 에테르를 이용하여 침전시키고, 다이에틸 에테르로 2회 세척하였다. 상기 생성물을 진공하에 90℃에서 1일간 건조시켜, 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올의 단일중합체(중합체 3)를 수득하였다.

[0053] 실시예 4: 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올 및 글리시돌의 공중합체(P(G₁₆₅-co-SSG₅₅); 중합체 4)의 합성

[0054] 도 1b에 나타난 바와 같이, 제조예 1에서 제조된 SSG와 비-분해성 글리시돌(G)의 공중합 반응에 의해, 공중합체인 폴리(글리세롤-co-2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올)(P(G-co-SSG))를 제조하였다.

[0055] 구체적으로, 트리메틸올프로판(TMP)(24 mg, 0.1788 mmol)을 2-목 둥근바닥 플라스크에 넣었다. 메탄올 중 칼륨 메톡사이드(25 중량%, 20 μL, 0.0678 mmol)를 0.70 mL의 메탄올로 희석시키고, 상기 용액을 플라스크에 가하여 30분간 아르곤 분위기하에 실온에서 교반시켰다. 과량의 메탄올을 회전 증발기를 사용하여 제거하고 진공 오븐(90℃, 3시간)에서 건조시켜 백색 염 개시제를 수득하였다. 상기 플라스크를 아르곤으로 퍼징시키고 플라스크를 90℃로 가열하였다. SSG(2.1 g, 10 mmol)와 글리시돌(G)(2.22 g, 30 mmol)의 혼합물을 12시간 동안 주사기 펌프를 사용하여 적가하였다. 단량체의 첨가 완료 후, 반응을 추가로 5시간 동안 계속하였다. 생성된 고분자를 1.0 mL의 메탄올에 용해시킨 후, 과량의 다이에틸 에테르를 이용하여 침전시키고, 다이에틸 에테르로 2회 세척하였다. 상기 생성물을 진공하에 90℃에서 1일간 건조시켜, 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올 및 글리시돌의 공중합체(중합체 4)를 수득하였다.

[0056] 실시예 5: 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올 및 글리시돌의 공중합체(P(G₆₀-co-SSG₃₀); 중합체 5)의 합성

[0057] 트리메틸올프로판(TMP)(12 mg, 0.0894 mmol)을 2-목 둥근바닥 플라스크에 넣었다. 메탄올 중 칼륨 메톡사이드(25 중량%, 10 μ L, 0.0339 mmol)를 0.70 mL의 메탄올로 희석시키고, 상기 용액을 플라스크에 가하여 30분간 아르곤 분위기하에 실온에서 교반시켰다. 과량의 메탄올을 회전 증발기를 사용하여 제거하고 진공 오븐(90℃, 3시간)에서 건조시켜 백색 염 개시제를 수득하였다. 상기 플라스크를 아르곤으로 퍼징시키고 플라스크를 90℃로 가열하였다. SSG(0.568 g, 2.7 mmol)와 글리시돌(G)(0.4 g, 5.4 mmol)의 혼합물을 12시간 동안 주사기 펌프를 사용하여 적가하였다. 단량체의 첨가 완료 후, 반응을 추가로 5시간 동안 계속하였다. 생성된 고분자를 1.0 mL의 메탄올에 용해시킨 후, 과량의 다이에틸 에테르를 이용하여 침전시키고, 다이에틸 에테르로 2회 세척하였다. 상기 생성물을 진공하에 90℃에서 1일간 건조시켜, 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올 및 글리시돌의 공중합체(중합체 5)를 수득하였다.

[0058] 실시예 6: 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올 및 글리시돌의 공중합체(P(G₂₀-co-SSG₂₀); 중합체 6)의 합성

[0059] 트리메틸올프로판(TMP)(24 mg, 0.1788 mmol)을 2-목 둥근바닥 플라스크에 넣었다. 메탄올 중 칼륨 메톡사이드(25 중량%, 20 μ L, 0.0678 mmol)를 0.70 mL의 메탄올로 희석시키고, 상기 용액을 플라스크에 가하여 30분간 아르곤 분위기하에 실온에서 교반시켰다. 과량의 메탄올을 회전 증발기를 사용하여 제거하고 진공 오븐(90℃, 3시간)에서 건조시켜 백색 염 개시제를 수득하였다. 상기 플라스크를 아르곤으로 퍼징시키고 플라스크를 90℃로 가열하였다. SSG(0.757 g, 3.6 mmol)와 글리시돌(G)(0.266 g, 3.6 mmol)의 혼합물을 12시간 동안 주사기 펌프를 사용하여 적가하였다. 단량체의 첨가 완료 후, 반응을 추가로 5시간 동안 계속하였다. 생성된 고분자를 1.0 mL의 메탄올에 용해시킨 후, 과량의 다이에틸 에테르를 이용하여 침전시키고, 다이에틸 에테르로 2회 세척하였다. 상기 생성물을 진공하에 90℃에서 1일간 건조시켜, 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올 및 글리시돌의 공중합체(중합체 6)를 수득하였다.

[0060] 실시예 7: 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올 및 글리시돌의 공중합체(P(G₁₀-co-SSG₂₀); 중합체 7)의 합성

[0061] 트리메틸올프로판(TMP)(24 mg, 0.1788 mmol)을 2-목 둥근바닥 플라스크에 넣었다. 메탄올 중 칼륨 메톡사이드(25 중량%, 20 μ L, 0.0678 mmol)를 0.70 mL의 메탄올로 희석시키고, 상기 용액을 플라스크에 가하여 30분간 아르곤 분위기하에 실온에서 교반시켰다. 과량의 메탄올을 회전 증발기를 사용하여 제거하고 진공 오븐(90℃, 3시간)에서 건조시켜 백색 염 개시제를 수득하였다. 상기 플라스크를 아르곤으로 퍼징시키고 플라스크를 90℃로 가열하였다. SSG(0.757 g, 3.6 mmol)와 글리시돌(G)(0.133 g, 1.8 mmol)의 혼합물을 12시간 동안 주사기 펌프를 사용하여 적가하였다. 단량체의 첨가 완료 후, 반응을 추가로 5시간 동안 계속하였다. 생성된 고분자를 1.0 mL의 메탄올에 용해시킨 후, 과량의 다이에틸 에테르를 이용하여 침전시키고, 다이에틸 에테르로 2회 세척하였다. 상기 생성물을 진공하에 90℃에서 1일간 건조시켜, 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올 및 글리시돌의 공중합체(중합체 7)를 수득하였다.

[0062] 시험예 1: 단량체 및 중합체에 대한 특성 규명

[0063] 제조예 1에서 합성된 단량체(SSG)의 성공적인 합성을 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 분광학에 의해 규명하였다(도 2a, 도 3a

및 3b). 도 2a, 3a 및 3b에 나타난 바와 같이, 2-((2-(옥시란-2-일메톡시)에틸)다이설파닐)에탄-1-올(SSG, 단량체)의 경우 다이설파이드 결합이 에폭사이드와 하이드록실기 사이에 도입되었다.

- [0064] 한편, 상기 단량체로부터 제조된 중합체의 경우, 분자량을 단량체 대 개시제 비율로 제어하였고, 이를 GPC와 ^1H NMR 분광학에 의해 규명하였다. 중합체 2 및 중합체 7의 ^1H NMR 스펙트럼을 도 2b 및 도 2c에 각각 나타내었다.
- [0065] 중합체 2의 분자량의 경우, 하기 식을 이용하여 도 2b의 NMR 데이터로부터 수득한 결과, 3709 g/mol인 것으로 계산되었다:
- [0066] 반복 단위의 수 (n) = $22 \text{ <적분 값> } \times 3 \text{ <TMP(메틸, 3H)의 양성자 수> } / 4 \text{ <SSG(4H)의 다이설파이드 이웃하는 양성자의 양성자 수> } = 17$;
- [0067] $M_n = 210.31 \text{ <SSG 단량체의 분자량> } \times 17 + 134.17 \text{ <TMP 개시제의 분자량> } = 3709.44 \text{ g/mol}$.
- [0068] 또한, 중합체 7의 분자량의 경우, 하기 식을 이용하여 도 2c의 NMR 데이터로부터 수득한 결과, 4424 g/mol인 것으로 계산되었다:
- [0069] 반복 단위(SSG)의 수 = $17.47 \text{ <적분 값> } \times 3 \text{ <TMP(메틸, 3H)의 양성자 수> } / 4 \text{ <SSG(4H)의 양성자에 이웃하는 다이설파이드 양성자의 수> } = 13$;
- [0070] 반복 단위(G)의 수 = $[75.52 \text{ <적분 값> } \times 3 \text{ <TMP(메틸, 3H)의 양성자의 수> } \times \{ (13 \text{ <SSG 반복 단위의 수> } \times 9 \text{ <다이설파이드 이웃하는 양성자를 제외한 SSG의 양성자의 수(9H)> } - 6 \text{ <TMP(에테르, 6H)의 양성자의 수> }) \} / 5 \text{ <G 단량체의 양성자의 수(5H)> } = 21$;
- [0071] $M_n = 74.08 \text{ (G 단량체의 분자량)} \times 21 + 210.31 \text{ (SSG 단량체의 분자량)} \times 13 + 134.17 \text{ (TMP의 분자량)} = 4423.88 \text{ g/mol}$.
- [0072] 실시예 1 내지 7에서 제조된 단일중합체 및 공중합체의 경우, 생성물의 분지된 구조와 사용된 PS(폴리스티렌) 기준물질들을 고려할 때, 제어된 분자량(단일중합체: 2200 - 10650 g/mol; 공중합체: 5000 - 24000 g/mol)과 좁은 분자량 분포 (단일중합체 $M_w/M_n < 1.15$; 공중합체 $M_w/M_n < 1.38$)를 가지고 있었다. 흥미롭게도, 단일중합체의 경우 SSG 단량체가 완전 전환(90-100%)되었으나, 공단량체로서 글리시돌의 부가는 SSG 전환을 약간 감소(60-85%)시킨 것으로 나타났다. 예를 들어, 공중합체의 중합반응에서 SSG의 공급량을 변화(25-75 mol%)시킴으로써, SSG가 28 내지 55 mol%의 비율로 포함된 다양한 조성의 공중합체를 얻을 수 있었다. 이 결과는 두 단량체가 상이한 반응성을 갖는다는 것을 보여준다.
- [0073] 모든 단일중합체(PSSG)와 공중합체(P(G-co-SSG))는 물 외에도, 메탄올, DMSO, 및 DMF와 같은 유기 극성 용매에 가용성이었다. 도 2b에서, 단일중합체(중합체 2)의 ^1H NMR 스펙트럼은, 폴리에테르 골격(3.4-4.2 ppm에서 PSSG의 폴리에테르 골격 및 c)과 함께, 각각 다이설파이드 이웃하는 탄소(2.8-3.1 ppm에서 d, e), 개시제의 메틸기 및 메틸렌기(0.8 ppm에서 a 및 1.3 ppm에서 b)의 특징적인 양성자 피크를 명확히 보여주었다. 2.8-3.1 ppm에서 다이설파이드 이웃하는 탄소의 신호에 대해 0.8 ppm에서 개시제 신호의 적분을 측정함으로써, 평균 분자량 M_n 을 계산하였다. 중합하면, 표적화된 분자량과 NMR 분광학으로 수득한 데이터는 일치하였다.
- [0074] 또한, 도 2c에 나타난 공중합체(중합체 7)의 ^1H NMR 스펙트럼은 단일중합체와 유사한 화학적 이동을 보인다. 그러나, 공중합체의 경우, 단일중합체와 비교하여 PG에 존재하는 부가적인 폴리에테르 골격으로 인해 폴리에테르 골격 신호에서 훨씬 더 강한 신호(3.4-4.2 ppm)가 관찰되었다. SSG의 포함 비율과 분자량은 0.8 ppm에서 개시제의 신호에 대해 2.8-3.1 ppm(SSG)에서 다이설파이드 이웃하는 탄소와 3.4-4.2 ppm에서 폴리에테르 골격으로부터의 양성자의 피크를 적분하여 계산하였다. 또한, ^1H 및 인버스-게이트된 ^{13}C NMR의 상세한 분석으로 PSSG 중합체의 분지된 구조를 확인하였다.
- [0075] GPC 결과는 단봉형 분포와 제어된 분자량 값을 보여준다(표 1). 그러나, NMR 및 GPC에 의해 측정된 분자량의 불일치가 발견되었으며 이러한 결과는 분지된 구조와 다수의 하이드록실 작용기의 존재에 의해 설명될 수 있다.

이들 구상형 고분자 구조는 중합체의 전체적인 수력학적 반경에 기여하지 않으며, GPC가 PS로 보정되었다는 사실은 또 다른 편차의 근원일 수 있다.

[0076] 상기 본 발명에서 합성된 모든 중합체에 대한 특성 분석 데이터를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0077]

	중합체 조성 (표적)	중합체 조성(NMR) ^a	Mn (표적)	%SSG (표적)	Mn (NMR) ^a	%SSG (NMR) ^a	Mn (GPC) ^b	Mw/Mn ^b (GPC) ^b
참조	PG ₁₅₀	PG ₁₃₉	11200	0	10400	0	14300	1.50
중합체 1	PSSG ₁₀	PSSG ₉	2240	100	2030	100	3780	1.10
중합체 2	PSSG ₂₀	PSSG ₁₉	4340	100	4130	100	3600	1.12
중합체 3	PSSG ₅₀	PSSG ₅₃	10650	100	11280	100	8500	1.15
중합체 4	P(G ₁₆₅ -co-SSG ₅₅)	P(G ₁₁₄ -co-SSG ₄₈)	23920	25.00	18670	29.63	15800	1.28
중합체 5	P(G ₆₀ -co-SSG ₃₀)	P(G ₄₆ -co-SSG ₁₈)	10890	33.33	7460	28.12	5370	1.38
중합체 6	P(G ₂₀ -co-SSG ₂₀)	P(G ₂₁ -co-SSG ₁₃)	5820	50.00	4420	38.23	5000	1.25
중합체 7	P(G ₁₀ -co-SSG ₂₀)	P(G ₁₀ -co-SSG ₁₂)	5080	66.67	3530	54.54	4620	1.23

[0078] ^a ¹H NMR 분광학을 통하여 측정됨.

[0079] ^b 폴리스티렌 기준물질을 갖는 DMF중에서의 GPC-RI를 사용하여 측정됨.

[0080] PG₁₅₀은 PSSG와 비교하기 위해 합성한 고분자임.

[0081] 본 발명에 따른 단일중합체(중합체 1) 및 공중합체(중합체 7)의 MALDI-ToF 스펙트럼을 각각 도 4a 및 4b에 나타내었다. 도 4b에서의 삽도는 2600 내지 2700 g/mol 범위의 공중합체의 상세한 몰 질량과 배치를 보여준다. 신호 간격은 단일중합체와 공중합체 중 각 단량체의 선형 조합의 질량에 대응한다(G: 74.08 g/mol, SSG: 210.31 g/mol).

[0082] TMP 개시제 및, 단일중합체 및 공중합체 내의 작용성 단량체의 각 절편의 존재가 MALDI-ToF 측정법에 의해 명확하게 확인되었다. 도 4a에 나타난 바와 같이, 단편화된 화학종과 함께 H⁺ 및 K⁺와 같은 상이한 이온으로 인하여 2개의 분포 모드가 관찰되었다. 예를 들어, 1224.82에서의 주요 분자량 분포는 반대이온으로서 칼륨을 갖는 PSSG의 분자량(TMP(134.17) + SSG(210.31) x 5 + K⁺(39.1))에 해당하며 1186.72에서의 서브-분포는 반대이온으로서 H⁺를 갖는 PSSG의 분자량(TMP(134.17) + SSG(210.31) x 5 + H⁺(1))에 해당한다. 또한, 신호들간의 간격(210.31 g/mol)은 PSSG에 포함된 작용성 SSG 단위와 잘 매치되는데, 이는 SSG 단량체의 존재를 증명한다. PSSG 단일중합체의 결과와는 달리, P(G-co-SSG) 공중합체의 MALDI-ToF 결과는 2개의 분포 모드의 존재를 보여준다. 도 4b에 나타난 바와 같이, G와 SSG의 TMP-개시된 공중합체의 존재가 명확하게 증명된다. 특히, G와 SSG가 다양하게 조합된 공중합체에 해당하는 피크가 상기 질량 스펙트럼으로부터 분리된다(도 4b에 있는 삽도). 예를 들어, 2670.63에서의 질량 피크는 개시제로서 TMP, 11개 단위의 G, 8개 단위의 SSG, 및 반대이온으로서 K⁺를 갖는 공중합체에 대응한다(TMP(134.17) + G(74.08) x 11 + SSG(210.31) x 8 + K⁺(39.1)). 신호의 간격이 공중합체 내의 다양한 각 단량체의 선형 조합의 질량(G: 74.08 g/mol, SSG: 210.31 g/mol)에 대응한다는 점이 강조되어야 하는데, 이는 P(G-co-SSG)의 성공적인 공중합반응을 분명하게 증명한다.

[0083] 시험예 2: 원위치(in situ) 공중합반응 동역학

- [0084] 공중합 반응 동안 공단량체의 분포를 분석하기 위해, 본 발명의 SSG 단량체와 다른 단량체와의 공중합반응 거동을 연구하였다. 온라인 ^1H NMR 분광학은 2개의 스펙트럼 사이에 몇초 정도로 짧은 최소의 간격으로 용이하게 접근할 수 있고 공단량체의 소모량의 관찰하는 정량적 방법이기 때문에, 에폭사이드 단량체의 동역학을 관찰하는데 이용되어 왔다. 그러나, 본 발명에서 ^1H NMR을 사용할 경우 두 단량체와 중합체의 ^1H NMR 신호가 중첩되기 때문에, 이는 단량체 소모량을 모니터링하는 것으로 한정된다. 그러므로, 본 발명자들은 ^{13}C NMR 분광학에 기반한 벌크 공중합반응에 대한 두 단량체의 정량적인 원위치 모니터링법을 이용하였다. 상세하게는, 통상의 NMR 튜브에서 50°C 에서 어떠한 용매도 사용하지 않고 G와 SSG의 공중합반응을 수행하였다. 벌크 중합반응에서, ^{13}C 동위원소의 자연적인 풍부성으로 인해 정량적인 ^{13}C NMR 스펙트럼이 수분 내에 관찰될 수 있다. 이 방법으로, 반응에 걸쳐서 임의의 시간에 성장하는 중합체의 미세구조를 관찰할 수 있다.
- [0085] 구체적으로, 개시제를 제조하기 위하여, 메톡시에탄올(0.5 g, 6.57 mmol) 및 수산화세슘 일수화물(0.378 g, 2.25 mmol)을 아르곤 대기하에 60°C 의 둥근바닥 플라스크에서 반응시켰다. 개시제 용액과 공단량체(G와 SSG)를 4.0 mL 바이알에 넣고 병목 상에서 완전히 교반하였다. 혼합물을 아르곤 대기 하에서 통상의 NMR 튜브로 옮기고 이어서 병목 상에서 격막으로 밀봉시켰다. ^{13}C NMR을 사용하는 동역학 측정치를 5 mm PFG AutoX DB 프로브가 있는 600 MHz VNMRs 시스템 상에 기록하고 용매없이 측정하였다. 기준 동역학 ^{13}C NMR 실험에는 $13.7\ \mu\text{s}\ 90^\circ$ 펄스로 달성되는 1회의 실험을 위하여 64개의 과도신호, 1894 Hz의 스펙트럼 폭, 및 10 s의 재순환 지연시간이 필요하였으며 1개의 동역학 수행을 위해서는 70회의 실험이 13시간의 기간에 걸쳐 45° 의 플립 각도와 전도-게이트된 탈커플링(inverse gated decoupling) 실험과 함께 이용되었다.
- [0086] 도 5에 G와 SSG(단량체 비율 1:1)의 원위치 공중합반응 동역학에 대한 ^{13}C NMR 스펙트럼을 나타내었다. 좌측은 지정된 시점으로 수집된 스펙트럼의 오버레이(overlay)를 나타낸 것이고, 우측은 각각 G와 SSG 단량체에 상응하는, 53 및 55 ppm에서 에폭사이드 내의 메틴 카본을 보여주는, 중-인 스펙트럼을 나타낸 것이다(용매 없음, 150 MHz, 323 K).
- [0087] 도 5는 G와 SSG의 공중합반응에 대해 수집된 전형적인 일련의 ^{13}C NMR 스펙트럼을 나타내며, 이는 70-78 ppm에서 중합체의 폴리에테르 골격의 동시 출현과 함께 두 단량체(청색으로 강조된 G와 적색으로 표시되는 SSG)의 소모를 증명한다. 단량체 소모량을 측정하기 위하여, 두 에폭사이드 단량체에 대해 메틴기 중 대표적인 탄소에 대한 공명(G의 경우 55 ppm 및 SSG의 경우 53 ppm)을 반응 진행 중에 비교하였다. 도 5에 나타난 바와 같이, 공중합반응에서 G의 완전한 단량체 소모에 필요한 시간은 SSG보다 더 짧았다. 예를 들어, 각 단량체에 대한 신호는 각각 165 및 440분 후에 검출될 수 없었는데, 이는 각 단량체의 상이한 반응성을 나타낸다. 이런 차이점은 SSG 내의 다이설파이드 스페이서의 구조가 다른 SSG 단량체로부터의 접근을 방해하여 중합반응 중 반응성을 감소시켰기 때문이다.
- [0088] 한편, 본 발명자들은 글리시돌 단량체의 낮은 인화점(66°C)으로 인한 NMR 튜브에서의 폭발 가능성을 막기 위해 동역학 연구에서 중합반응 온도로 50°C 를 선택하였다.
- [0089] 도 6에 50°C 에서 벌크로 정량적인 ^{13}C NMR 동역학으로부터 측정된 G(청색 사각형)와 SSG(적색 원형)의 공중합에 대한 단량체 전환 퍼센트 대 전체 전환율을 나타내었다.
- [0090] 첫번째 ^{13}C NMR 스펙트럼에서 단량체 전환율은 0%로 설정한다는 점에 유의하여야 하며, 전환 비율은 다이설파이드 이웃하는 2개의 탄소의 신호에 대해 측정된 적분값을 사용하여 계산하였는데, 이는 중합반응 기간에 걸쳐 일정하게 유지되었다. 도 6에 나타난 바와 같이, 중합체 사슬 내의 SSG 단위의 물비는 초기 단계에서의 단량체 공급량보다 더 낮았으며 반응의 최종 단계 근처에서 G 단량체의 소모시 급속하게 증가되었는데, 예를 들어, 51%의 전체 전환율에서, G와 SSG의 전환율은 각각 80% 및 22%이다(G는 SSG보다 반응성이 3.6배 더 크다). 따라서, P(G-co-SSG)의 공중합 동안 단량체 포함의 구배가 존재한다. 그럼에도 불구하고, NMR 측정 중 벌크로 수행되는 원-포트(one-pot) 반응과 달리, 본 발명자들은 용매 중에서 공중합체를 합성하는 느린 단량체 부가 방법을 사용

하였다. 따라서, 두 단량체의 더욱 균질한 분포를 수득하기 위해서 두 단량체간 반응성에서의 차이가 억제되어야 하는 것으로 추정되었다.

[0091] 시험예 3: 중합체 분해

[0092] 다이설파이드 환원을 통한 단일중합체(PSSG)의 분해를 NMR 및 GPC를 이용하여 연구하였다.

[0093] a) NMR 분석: D₂O 용액 중에서 2 당량의 다이설파이드 다이티오프레이톨-d₁₀ (DTT-d₁₀) 용액으로 처리 전 및 후의 화학적 이동값을 비교하여 중합체의 산화환원 의존성 분해를 연구하였다. NMR 연구를 위해, 약 15 mg의 PSSG 중합체를 0.60 mL의 DTT 용액에 용해시키고 ¹H 및 ¹³C NMR 분광학에 의해 다이설파이드 환원 및 중합체의 분해를 각각 관찰하였다.

[0094] b) GPC 분석: DTT(다이설파이드의 2 당량)를 DMF 중 P(G-co-SSG)의 용액에 가하고 10 mM 브롬화리튬을 함유하는 DMF 중에서 GPC-MALLS를 사용하여 시료를 분석하였다. 분자량(M_n 및 M_w)과 PDI를 측정하고 DTT 처리 전과 후의 결과를 비교하였다.

[0095] DTT 처리한 PSSG 사슬의 분해 도해를 도 7a에 나타내었고, DTT 처리 후(10분) PSSG 단일중합체(중합체 2)의 ¹H- 및 ¹³C NMR 스펙트럼에서의 변화를 도 7b에 나타내었다.

[0096] 단량체 및 중합체 사슬 내에 존재하는 다이설파이드기는 환원성 조건하에서 상기 사슬을 분해시킨다. 다이티오프레이톨(DTT)은 (1) 내부 다이설파이드 결합을 갖는 안정한 6원환의 형성하기 위한 구조적 경향으로 인하여 높은 다이설파이드 환원 효율을 갖고 있으며 (2) PG계 중합체를 용해시킬 수 있는 다양한 유기 용매에서 우수한 용해성을 갖고 있기 때문에, 환원제로서 다이티오프레이톨을 사용하였다. PSSG의 DTT-유도된 분해를 연구하기 위하여(도 7a), 2 당량의 DTT-d₁₀ 함유 D₂O 용액에 PSSG를 용해시켜 PSSG의 환원을 관찰하고 DTT 처리 전 및 후의 ¹H 및 ¹³C NMR 스펙트럼을 비교하였다. ¹H 및 ¹³C NMR 결과에 나타난 바와 같이, DTT 처리시 모니터링될 수 있었던 티올 이웃하는 양성자와 탄소 시그널의 동시 출현과 함께 다이설파이드 이웃하는 양성자 및 탄소 신호가 사라졌다(도 7b). 또한, 수용액 중에서 중합체 사슬의 다이설파이드 결합이 10분 내에 신속하게 분해되는 것으로 확인되었는데, 이는 수용액에서 PSSG와 DTT의 용해도가 높아 DTT가 중합체 사슬에 접근하는 것을 용이하기 때문일 것이다.

[0097] 한편, GPC 분석에 의해 공중합체의 분해 생성물을 추가로 조사하였다. DTT 처리 전(흑색 곡선) 및 후(적색 곡선)의 P(G₁₆₅-co-SSG₅₅)(중합체 4)의 GPC 흔적을 도 8a에 나타내었고, 분해 생성물의 도해를 도 8b에 나타내었으며, DTT 처리 후 GPC 흔적에서 3개의 피크의 기원에 대해 가능한 메커니즘을 도 8c에 나타내었다.

[0098] 상기 도 8은 DMF 중에서 1시간 동안 DTT-유도된 분해 후 P(G₁₆₅-co-SSG₅₅) 쇄의 분자량이 어떻게 변화되는가를 보여준다. 예상대로, 18000 g/mol에 위치하는 분자량 피크가 좌측으로 이동하였는데, 이는 P(G₁₆₅-co-SSG₅₅)가 각각 2600, 4600 및 12900 g/mol에서의 3개의 상이한 피크에 해당하는 작은 중합체 단편으로 성공적으로 분해되었음을 나타낸다. 각 피크들이 상이한 강도를 나타낸다는 점은 흥미롭다. 산화환원-분해성 SSG 단량체보다 비-분해성 G 단량체가 반응성이 더 높다는 점을 고려할 때, 공중합체의 내부의 코어 블록은 비-분해성인 G 분획을 더 많이 포함하는 반면, 외부 주변은 분해성 SSG로 더 많이 이루어져 있을 것이다. P(G₁₆₅-co-SSG₅₅)의 고분지형 공중합체 내의 단량체의 분포에서의 이러한 구매는 고분자량보다 저분자량 분획의 강도를 더 높게 한다(도 8b). 본 발명자는 중합 동안 차이점으로부터 중합체의 분해의 가능한 기계적 통찰을 제안하였다(도 8c). 구체적으로, 유입되는 단량체는 2-하이드록실기(청색, -OH 기) 또는 1° 하이드록실기(녹색, -OH 기) 중 하나와 반응할 수 있다. 하나가 2° 하이드록실기를 통해 반응하는 경우, 새로운 중합체 사슬은 DTT 처리 후에도 남아있

게 된다. 그와 반대로, 후속 단량체가 1° 하이드록실기와 반응하는 경우, 새로운 중합체 사슬은 모 중합체 사슬로부터 분해될 수 있다. 이러한 이유로, 분해 생성물의 구조가 작은 절편과 큰 절편으로 나누어지게 되며 여기서 이들의 분자량 차이는 거의 2배이다. 한편, 큰 코어 절편의 존재는 3개의 하이드록실기를 포함하는 TMP 개시제에 기인한다. 이론적으로, TMP 개시제는 3개의 큰 절편을 가질 수 있으므로 큰 코어 절편은 큰 절편의 분자량보다 3배인 분자량을 가질 수 있다. 요약하면, 분해 생성물의 구조는 개시제와 단량체의 2개의 상이한 반응 부위에 의해 3개의 상이한 구조로 나누어질 수 있다.

[0099] 시험예 4: 생체적합성 분석(세포독성 분석)

[0100] PG₁₅₀, P(G₆₀-co-SSG₃₀) 및 PSSG₂₀의 약물 운반체로서의 잠재성을 조사하기 위하여 이들의 세포독성을 평가하였다.

[0101] 구체적으로, 인간 상피 암종 세포(HeLa)와 인간 2배체 세포(WI-38)를 한국 세포주은행(Korean Cell Line Bank; Seoul, Korea)으로부터 구입하였다. 세포독성 분석은 통상의 MTT 분석을 이용하여 수행하였다. 세포를 96개-웰 플레이트에 웰 당 7×10^3 개의 세포 밀도로 시딩하고 37°C에서 5% CO₂에서 24시간 동안 배양하였다. HeLa 세포를 10% 우태아혈청(FBS)과 1% 페니실린-스트렙토마이신이 첨가된 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium: DMEM, Life Technologies)에서 배양하였다. WI-38 세포는 10% FBS, 25 mM 중탄산나트륨, 및 1% 페니실린-스트렙토마이신이 첨가된 로즈웰 파크 메모리얼 연구소(Roswell Park Memorial Institute: RPMI) 1640 배지(Life Technologies)에서 배양하였다. 배양 배지를 제거한 후, 웰을 PBS로 세척하였다. 이어서 각 웰에 90 μ L의 신선한 배지, 10 μ L의 다양한 농도의 PG₁₅₀, P(G₆₀-co-SSG₃₀), PSSG₂₀ 용액을 다시 채우고 추가 24시간 동안 배양하였다. MTT 분석을 위해, 각 웰을 PBS로 세척하였다. 그 후, 10 μ L의 티아졸릴 블루 테트라졸륨 브로마이드(MTT, Sigma-Aldrich) 스톱 용액(5 mg/mL)과 90 μ L의 신선한 배지를 첨가하였다. 4시간 동안 배양한 후, 100 μ L의 DMSO 용액을 중합체 용액으로 교체하여 MTT-포르마잔 생성물을 용해시키고, 플레이트를 실온에서 15분간 부드럽게 교반시켰다. 상기 용액의 흡광도를 620 nm를 참고로 사용하여 540 nm에서 판독하였다. CCK-8 분석을 위해, 각 웰을 PBS로 세척하였다. 그 후, 10 μ L의 수용성 테트라졸륨 염(CCK-8, Dojindo Molecular Technologies)과 90 μ L의 신선한 배지를 첨가하였다. 4시간 동안 배양한 후, 플레이트를 실온에서 15분간 부드럽게 교반시키고, 상기 용액의 흡광도를 450 nm에서 판독하였다.

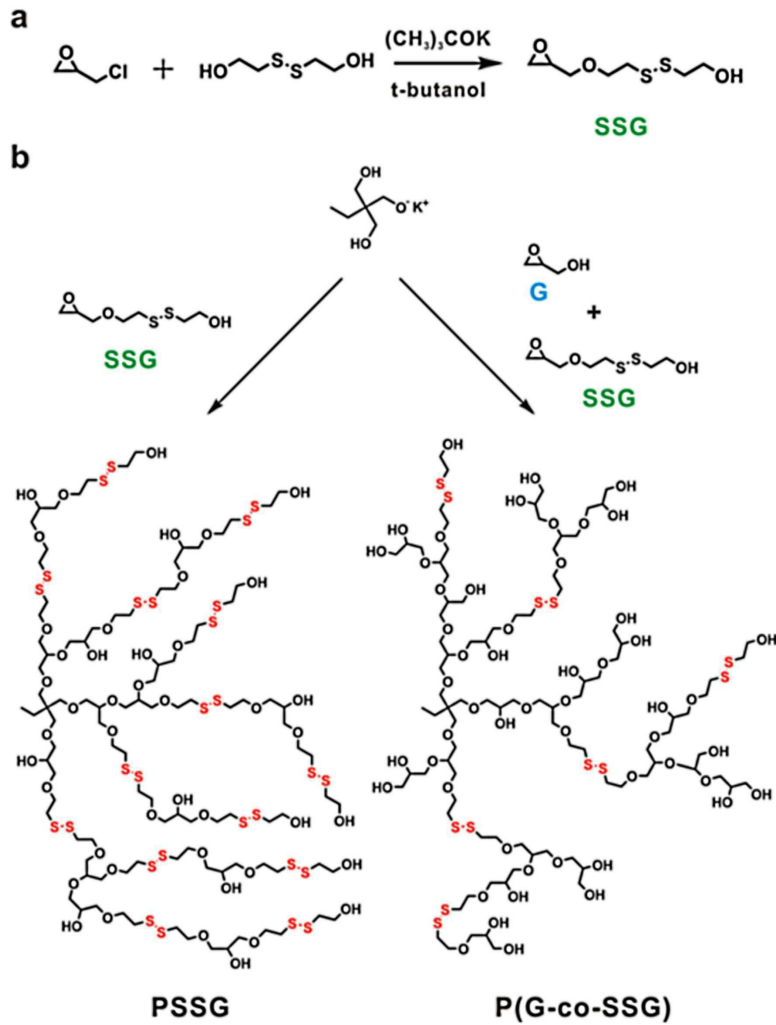
[0102] 상기 결과를 도 9에 나타내었다. 도 9a는 MTT 분석에 의해 측정된, 정상세포 WI-38에서의 PG₁₅₀(흑색), P(G₆₀-co-SSG₃₀)(회색) 및 PSSG₂₀ 중합체(백색)의 시험관내 세포 생존 분석을 나타낸 것이고, 도 9b는 MTT 분석에 의해 측정된, 암세포 HeLa에서의 시험관내 세포 생존 분석을 나타낸 것이며, 도 9c는 CCK 분석에 의해 측정된, 정상세포 WI-38에서의 시험관내 세포 생존 분석을 나타낸 것이고, 도 9d는 CCK 분석에 의해 측정된, 암세포 HeLa에서의 시험관내 세포 생존 분석을 나타낸 것이다.

[0103] MTT 분석은 미토콘드리아 탈수소효소 활성을 기본으로 하는 반면, CCK-8 분석은 세포내 탈수소효소인 NAD(H) 및 NADP(H)의 활성을 검출하기 위하여, 전자 매개체인 1-메톡시 페나지늄 메틸술페이트(1-메톡시 PMS)를 사용한다. 따라서, CCK-8은 MTT 검정법보다 감응성이 더 크며, 이는 전체적인 세포 생존율을 반영할 수 있는 반면 MTT 검정법은 미토콘드리아 활성을 나타낸다. 도 9에 나타난 바와 같이, 다양한 농도의 중합체 용액으로 처리된 각 세포주의 세포 생존율은 두 분석 모두에서 100 μ g/mL의 농도까지 90%가 넘었다. PG1의 경우 시험된 모든 농도 범위에서 우수한 세포 생존율을 나타냈지만, PSSG₂₀는 1000 μ g/mL의 높은 농도에서 다른 2개의 시료보다 상대적으로 더 낮은 세포 생존성을 나타내는 것으로 관찰되었다. 이는 세포내 산화환원 조건하에서 다이설파이드 결합의 분해가 세포내 산화환원 메커니즘에 영향을 미쳐 세포독성을 약화시키기 때문이다. 일반적으로, 30 몰%의 다이설파이드 결합을 갖는 P(G₆₀-co-SSG₃₀)의 공중합체는 1000 μ g/mL에서 단일중합체 PSSG₂₀보다 더 높은 세포 생존율을 나타낸다. 종합하면, 상기 결과는 분해성 연결의 양이 전체 세포 생존율에 영향을 미친다는 것을 입증한다. 또한, P(G₆₀-co-SSG₃₀) 중 분해성 연결기의 함량이 종래 알려진 분해성 중합체(일반적으로 6 내지 15 mol%의 분해성 연결기를 함유함)보다 훨씬 높다는 점에 주목해야 한다. 중합체의 생물학적 적용을 위한 바람직

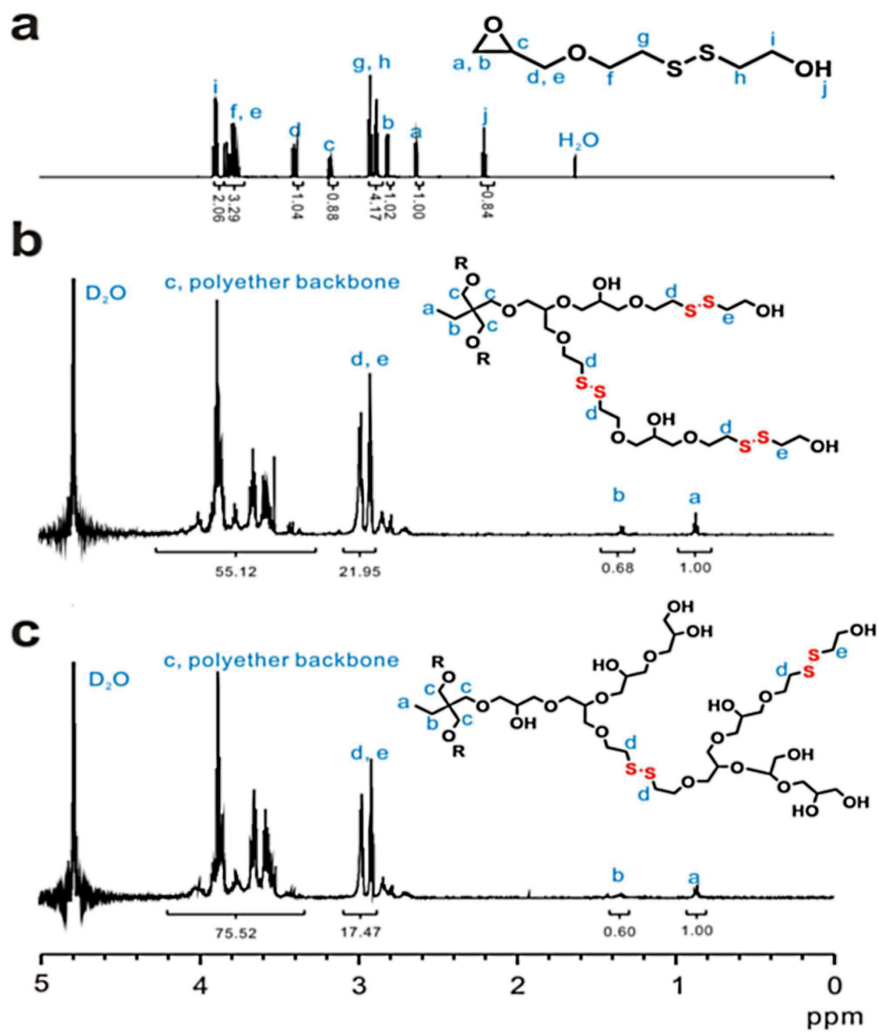
한 농도가 일반적으로 1000 $\mu\text{g/mL}$ 미만이라는 점을 고려할 때, SSG의 신규한 산화환원-분해성 잔기를 갖는 단 일중합체 및 공중합체는 미토콘드리아 활성 및 세포 생존율에 부작용이 없다.

도면

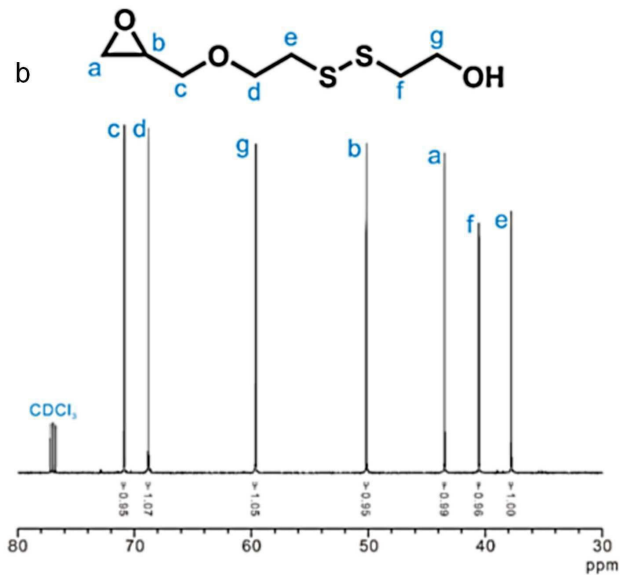
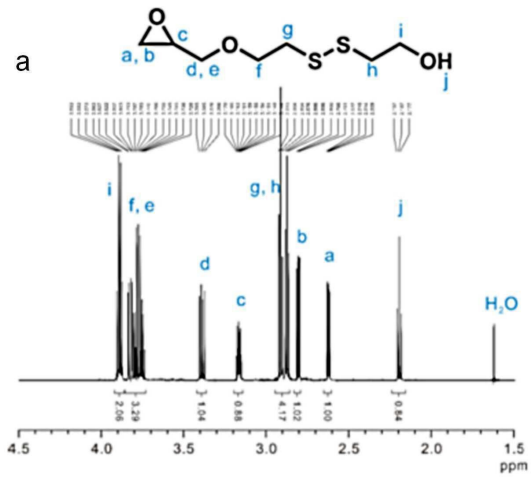
도면1



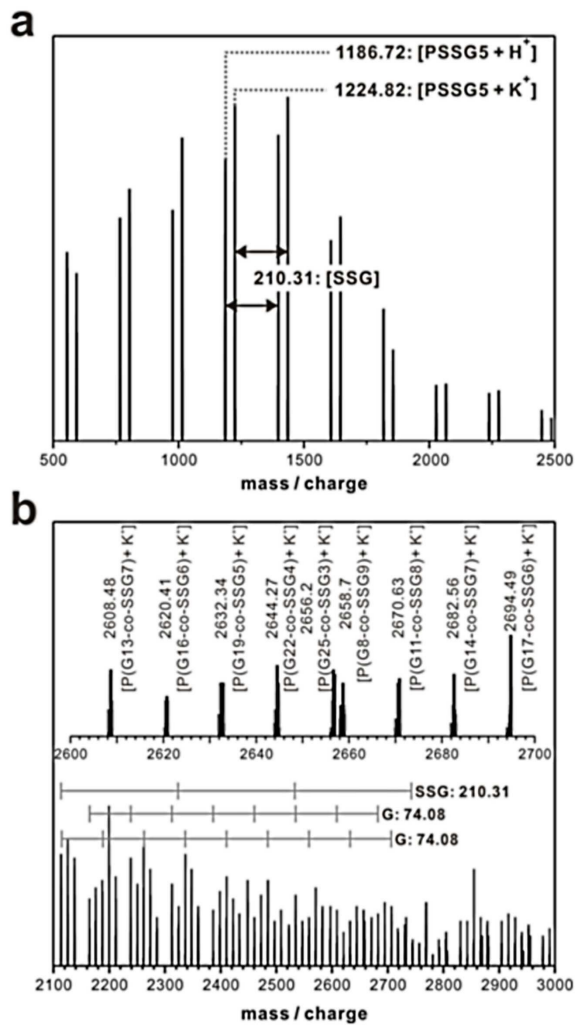
도면2



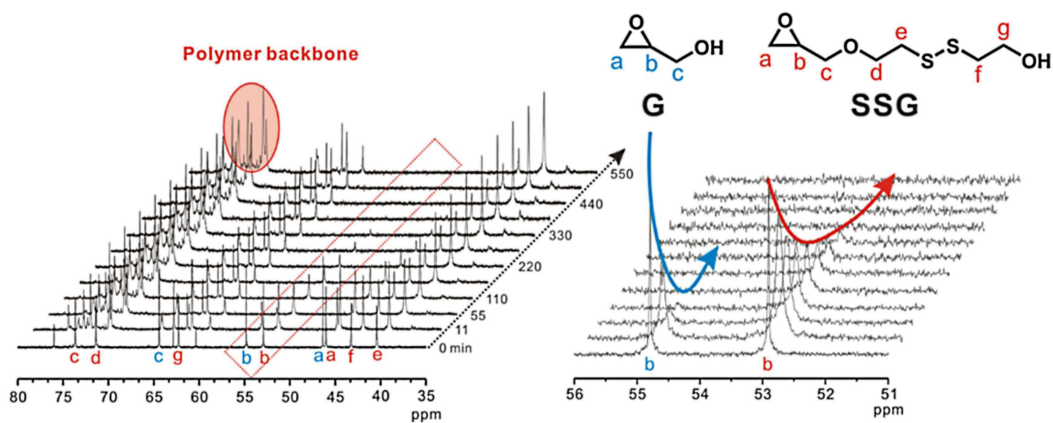
도면3



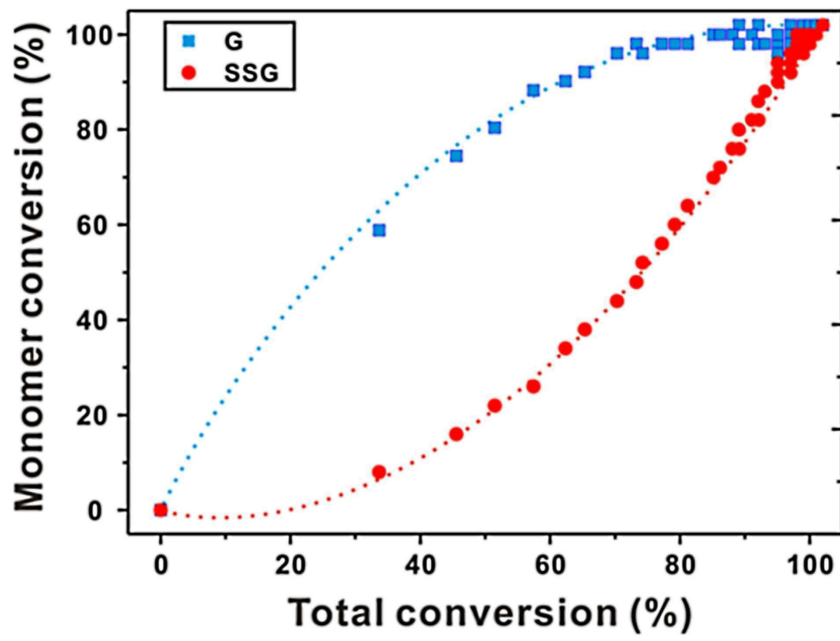
도면4



도면5

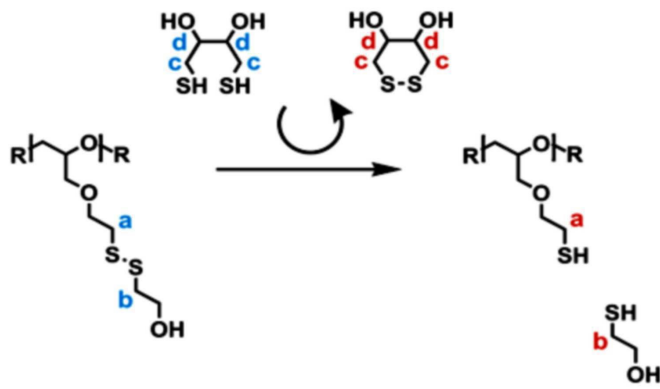


도면6

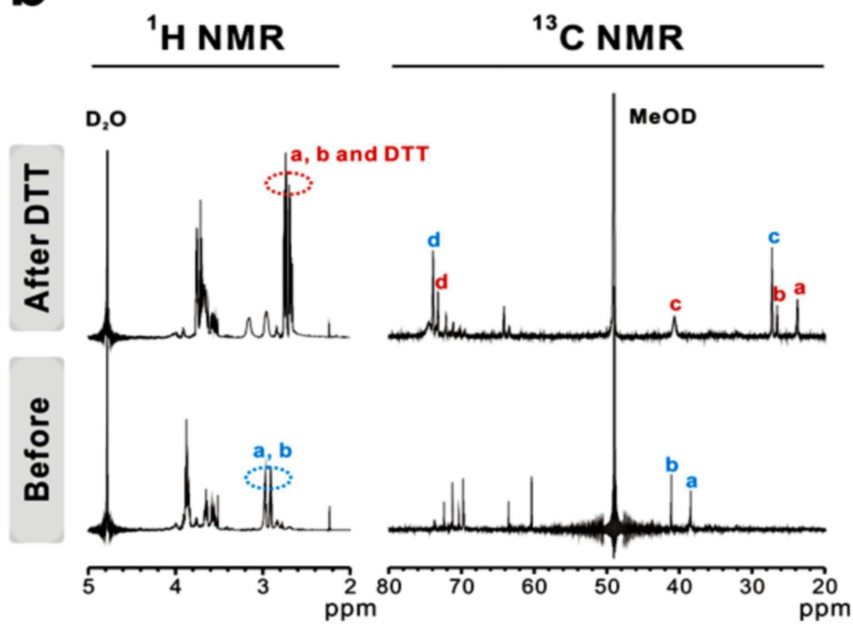


도면7

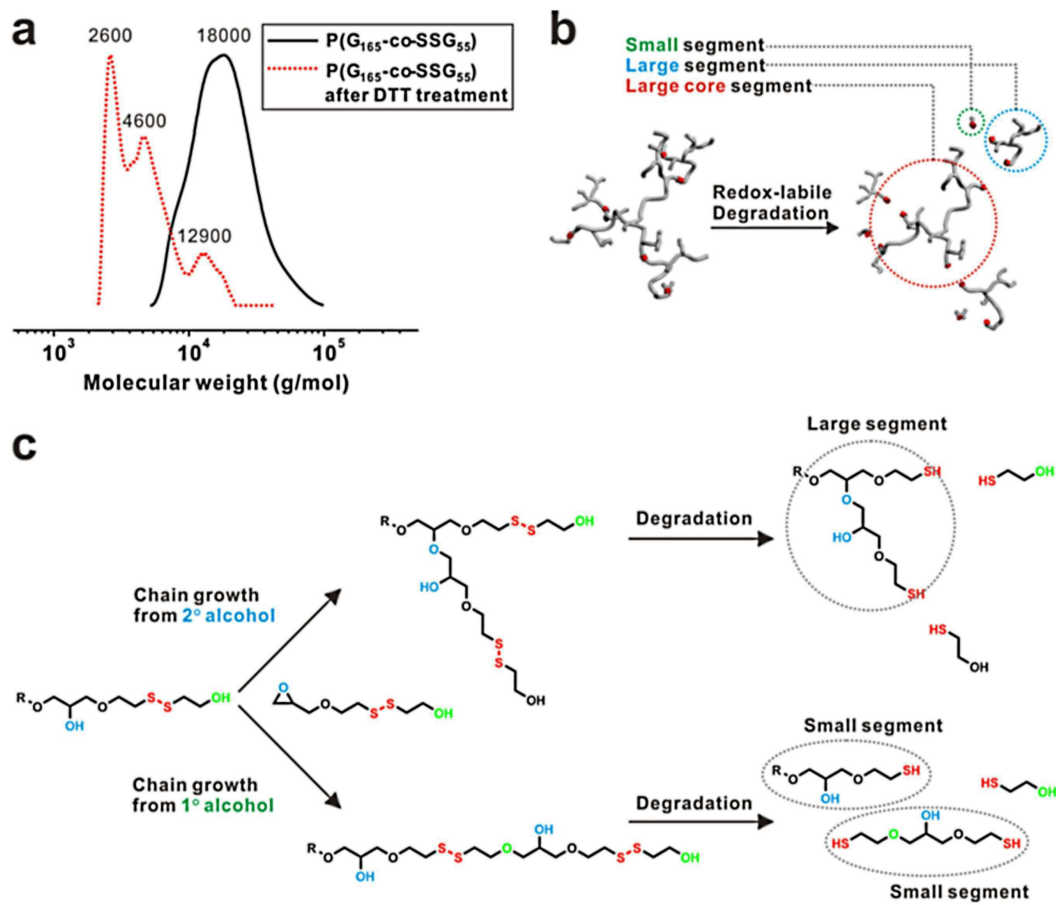
a



b



도면8



도면9

