



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0017465
(43) 공개일자 2018년02월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07F 5/02 (2006.01) A61K 31/69 (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01) A61K 47/24 (2017.01)
A61K 9/48 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07F 5/025 (2013.01)
A61K 31/69 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0101314

(22) 출원일자 2016년08월09일
심사청구일자 2016년08월09일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)

(72) 발명자

홍종달

인천광역시 연수구 동곡재로117번길 22, 102동
401호(동춘동, 대우3차아파트)

빈센트 에스. 조세프

인천광역시 연수구 아카데미로 119, 인천대 기숙
사 B303-4

(74) 대리인

차준용

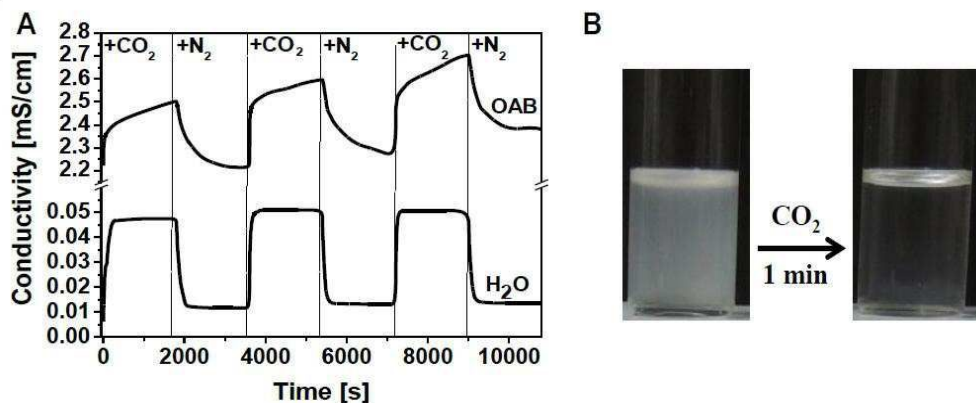
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 이중 자극-감응성 올리고아민 보론산

(57) 요약

본 발명은 이중 자극-감응성 올리고아민 보론산에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 소정 개수의 양이온성 아민 그룹과 페닐보론산 그룹을 함유한 특정 구조를 지닌으로써, 이산화탄소(CO₂) 및 단당류(모노사카리드)와 결합하여 이들 각각에 대해 뛰어난 감응성을 지니고 이러한 결합이 생체 조건과 유사한 중성 pH에서 이루어지며 세포독성 또한 없어, 혈액 내 CO₂ 및 혈당에 대한 자극-감응성 어셈블리, 약물전달용 캡슐화제 등을 비롯한 다양한 생체의 학 분야에서 이상적인 소재로 적용이 가능한 생체분해성 올리고아민 보론산(OAB) 패치, 천연 아미노산 및 3-카르복시페닐보론산을 이용해 이를 제조하는 방법, 및 이의 의약적 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/18 (2013.01)

A61K 47/24 (2013.01)

A61K 9/4858 (2013.01)

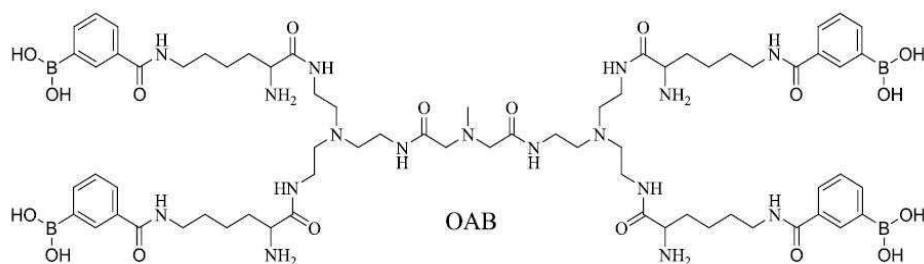
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 3으로 표시되는 이중 자극-감응성(Dual stimuli-responsive) 올리고아민 보론산(Oligoamine boronic acid; OAB):

[화학식 3]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 올리고아민 보론산은 이산화탄소(CO₂) 및 단당류(Monosaccharide)에 대한 감응성을 동시에 지니는 것을 특징으로 하는,

이중 자극-감응성 올리고아민 보론산.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 올리고아민 보론산에 함유된 아민 그룹이 이산화탄소와 가역적으로 결합하여 이산화탄소-감응성을 지니는 것임을 특징으로 하는,

이중 자극-감응성 올리고아민 보론산.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 올리고아민 보론산에 함유된 아민 그룹이 이산화탄소와 결합하여 카바메이트(Carbamate)를 형성하는 것임을 특징으로 하는,

이중 자극-감응성 올리고아민 보론산.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 올리고아민 보론산에 함유된 페닐보론산 그룹이 단당류와 강하게 결합하여 단당류-감응성을 지니는 것임을

특징으로 하는,
이중 자극-감응성 올리고아민 보론산.

청구항 6

제5항에 있어서,
상기 페닐보론산 그룹과 당류의 결합은 색상법(Colorimetry) 또는 경쟁결합측정법(Competitive binding assay)을 통해 정량이 가능한 것임을 특징으로 하는,
이중 자극-감응성 올리고아민 보론산.

청구항 7

제6항에 있어서,
알리자린 레드 에스(Alizarin Red S; ARS)가 비색 리포터(Colorimetric reporter)로 사용되는 것임을 특징으로 하는,
이중 자극-감응성 올리고아민 보론산.

청구항 8

제2항에 있어서,
상기 올리고아민 보론산은 생체 조건인 중성 pH 조건에서 이산화탄소 및 당류에 대한 감응성을 지니는 것을 특징으로 하는,
이중 자극-감응성 올리고아민 보론산.

청구항 9

제8항에 있어서,
상기 올리고아민 보론산은 pH 7.4의 조건에서 이산화탄소 및 당류와 결합하는 것임을 특징으로 하는,
이중 자극-감응성 올리고아민 보론산.

청구항 10

제1항에 있어서,
상기 올리고아민 보론산은 비-세포독성(Non-cytotoxic)인 것을 특징으로 하는,
이중 자극-감응성 올리고아민 보론산.

청구항 11

제1항에 있어서,
상기 올리고아민 보론산은 약물 패치의 소재로 사용되는 것을 특징으로 하는,

이중 자극-감응성 올리고아민 보론산.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 올리고아민 보론산은 혈액 내 이산화탄소 및 혈당에 대한 자극-감응성 어셈블리, 약물전달용 캡슐화제, 약물 코팅제 또는 약물방출 제어제의 소재로 사용되는 것을 특징으로 하는,

이중 자극-감응성 올리고아민 보론산.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 약물은 올리고펩티드 또는 단백질인 것을 특징으로 하는,

이중 자극-감응성 올리고아민 보론산.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 약물은 인슐린인 것을 특징으로 하는,

이중 자극-감응성 올리고아민 보론산.

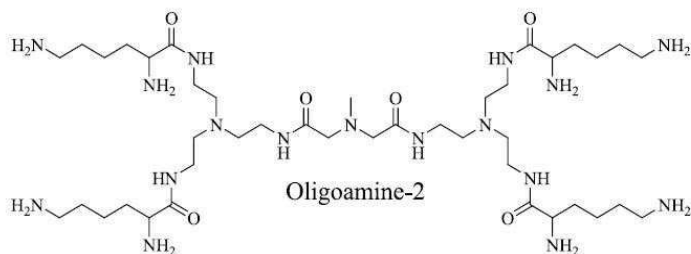
청구항 15

제1항에 따른 이중 자극-감응성 올리고아민 보론산의 제조방법으로서,

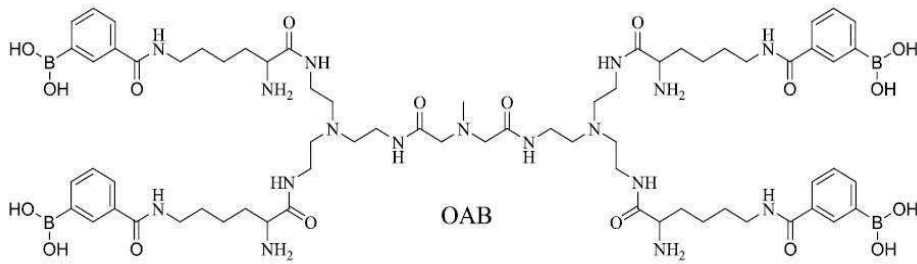
하기 화학식 2로 표시되는 올리고아민-2 화합물과 N,N'-디이소프로필카르보디이미드(DIC)에 의해 활성화된 3-카르복시페닐보론산을 커플링시켜, 하기 화학식 3으로 표시되는 올리고아민 보론산을 합성하는 것을 특징으로 하는,

이중 자극-감응성 올리고아민 보론산의 제조방법:

[화학식 2]



[화학식 3]



청구항 16

제15항에 있어서,

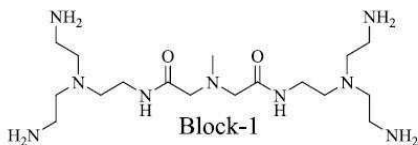
S1) N,N'-디이소프로필카르보디이미드(DIC)가 첨가된 N-메틸이미노디아세트산과 트리스(2-아미노에틸)아민을 반응시켜, 하기 화학식 1로 표시되는 블록-1 화합물을 합성하는 단계;

S2) 상기 블록-1 화합물과 N,N'-디이소프로필카르보디이미드(DIC)가 첨가된 Boc-Lys(Boc)-OH를 반응시켜, 하기 화학식 2로 표시되는 올리고아민-2 화합물을 합성하는 단계; 및

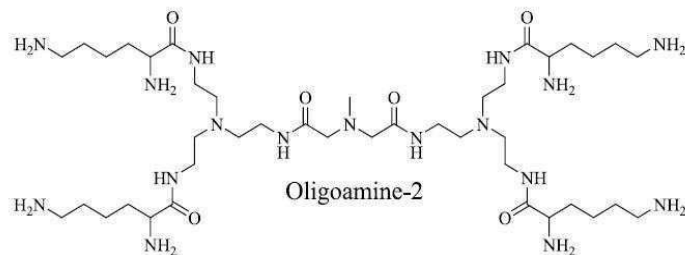
S3) 상기 올리고아민-2 화합물과 N,N'-디이소프로필카르보디이미드(DIC)가 첨가된 3-카르복시페닐보론산을 반응시켜, 하기 화학식 3으로 표시되는 올리고아민 보론산을 합성하는 단계;를 포함하는,

이중 자극-감응성 올리고아민 보론산의 제조방법:

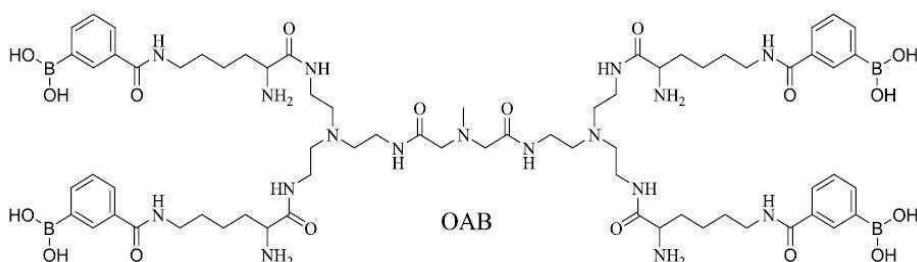
[화학식 1]



[화학식 2]



[화학식 3]



발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 이중 자극-감응성 올리고아민 보론산에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 소정 개수의 양이온성 아민 그룹과 페닐보론산 그룹을 함유한 특정 구조를 지니므로써, 이산화탄소(CO₂) 및 단당류(모노사카리드)와 결합하여 이들 각각에 대해 뛰어난 감응성을 지니고 이러한 결합이 생체 조건과 유사한 중성 pH에서 이루어지며 세포독성 또한 없어, 혈액 내 CO₂ 및 혈당에 대한 자극-감응성 어셈블리, 약물전달용 캡슐화제 등을 비롯한 다양한 생체의학 분야에서 이상적인 소재로 적용이 가능한 생체분해성 올리고아민 보론산(OAB) 패치, 천연 아미노산 및 3-카르복시페닐보론산을 이용해 이를 제조하는 방법, 및 이의 의약적 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 페닐보론산(Phenylboronic acid)은 단당류(Monosaccharide)에 가역적으로 결합하여 페닐보론산 에스테르를 형성할 수 있는바, 폴리이온, 폴리머 및 덴드리머 내로의 도입을 통해 인슐린 전달용 나노- 및 마이크로- 어셈블리, 생물학적으로 중요한 글리코컨쥬게이트(Glycoconjugate)용 수용체 등을 설계하는데 있어 큰 잠재성을 보이는 물질이다.

[0003] 그러나, 이러한 페닐보론산류를 생체에 적용함에는 높은 pH 조건(> pH 9), 독성 유발 등 아직까지 많은 제한사항이 존재한다. 또한 페닐보론산계 폴리머의 경우, 그 적절한 구조가 아직까지 충분히 연구되어 있지 않았고, 다수의 부수 조건(세포 조직에서 모든 네거티브 사이트에 강하고 비가역적으로 결합하는 거동, 불안정화 및 응집 유발 등)에 따른 제약을 받고 있는 상황이다. 또한 이러한 제한적인 부수 조건과 더불어, 페닐보론산을 이용해 폴리전해질 복합체 및 캡슐을 제조하는데에도 몇몇 실제적 요구사항들이 존재한다.

[0004] 따라서, 센싱 및 약물전달 분야에 있어서 페닐보론산류 물질의 생체적용성 및 잠재성에 대한 더욱 심도있는 연구 및 개발이 필요한 현실이다.

[0005] 이와 관련하여, 아미도아민(Amidoamine) 골격과 더불어 비-독성의 생체분해성 구조를 지니도록 페닐보로네이트 부분을 설계하는 것은 좋은 해결책이 될 수 있다. 또한 명확한 구조로 설계되면 네거티브 사이트와의 특정적 상호작용에 관한 제어가 가능해지고, 단순한 외부 자극에 대해 세포막이 가역적으로 제어될 수 있다.

[0006] 이러한 구조는 보다 진보된 스마트 복합체 구조를 가능하게 할 뿐만 아니라, 다양한 생체의학 분야에 있어서 자극-트리거 방식으로 활성 성분의 방출을 제어할 수 있도록 해 줄 것이다.

[0007] 또한, 아미도아민 내의 아민 그룹은 분자간 보론산-아민(B-N) 상호작용을 통해 페닐보론산 그룹의 pKa를 낮출 수 있을 것으로 기대된다. 아울러 아미도아민 골격을 활용하면 세포독성 및 면역원성을 저감시킬 수 있을 것으로 예상되는바, 이는 폴리(아미도아민)이 통상적으로 생체적합성 고분자(거대분자)여서 생체의학용으로 적절하기 때문이다. 더불어 아미도아민은 부분적으로 양쪽친매성을 지니고 수소결합을 형성하는 능력이 있어 세포막과 원활하게 상호작용을 할 수 있는 것으로 알려져 있다.

[0008] 따라서, 폴리(아미도아민)은 세포막 만곡(Membrane curvature)을 개시하여 엔도시토시스(Endocytosis)를 유도하는 것으로 현재 여겨지고 있는 인지질 머리 그룹(Phospholipid head groups)과의 멀티포인트 상호작용을 실현할 수 있는 소재이다.

[0009] 이러한 새로운 소재가 개발된다면, 올리고펩티드 또는 단백질 약물(특히, 인슐린) 전달과 같은 관세포 수송(Transcellular trafficking) 분야에 크게 기여할 수 있을 것이다.

[0010] 구체적으로, 혈액 내에 있는 이산화탄소와 혈당에 감응하는 재료의 개발에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있는바, 이러한 재료들은 약물 코팅제로 사용되었을 경우 혈액 내에 있는 이산화탄소 및 단당류와 결합하는 과정에

해리되거나 구조 변화가 일어나 약물방출을 제어할 수 있기 때문이다.

[0011] 이와 관련하여, 페닐보론산을 포함하는 다양한 형태의 재료들이 보고된 바 있으나, 지금까지 보고된 재료들은 대부분 높은 pH에서 작동하거나 강한 독성 때문에 생체에 사용될 수 없었다.

[0012] 이에, 세포독성이 없는 페닐보론산계 물질로서 생체 조건과 유사한 중성 pH 영역에서 혈당 등에 대해 특이적인 감응성을 나타내어 자극-감응성 센싱, 약물 전달 및 방출 제어 등 다양한 생체의학 분야에 적용될 수 있는 새로운 소재에 대한 개발이 요구되는 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0013] (비특허문헌 0001) De Geest, B. G.; Jonas, A. M.; Demeester, J.; De Smedt, S. C. Langmuir 2006, 22, 5070.

발명의 내용

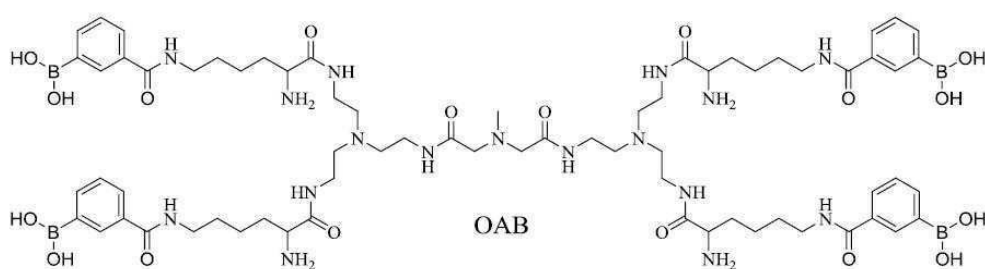
해결하려는 과제

[0014] 본 발명은 상기와 같은 종래의 요구를 충족시키기 위한 것으로, 생체 조건과 유사한 중성 pH에서 이산화탄소 및 당당류와 원활하게 결합할 수 있는 비-세포독성의 이중 자극-감응성 올리고아민 보론산, 이를 효율적으로 합성하는 방법, 및 이의 의약적 용도를 제공함을 기술적 과제로 한다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기한 기술적 과제를 달성하고자, 본 발명은 하기 화학식 3으로 표시되는 이중 자극-감응성(Dual stimuli-responsive) 올리고아민 보론산(Oligoamine boronic acid; OAB)을 최초로 제공한다.

[0016] [화학식 3]



[0017]

[0018] 본 발명은 예의 연구를 거듭한 결과, 천연 아미노산 및 3-카르복시페닐보론산에 기초한 단분산(Homodisperse) 이중 자극-감응성 올리고아민 보론산(OAB)(이른바, 페닐보로네이트로 개질된 올리고아민 패치)을 합성하는데 성공하였다.

[0019] 본 발명에 따른 올리고아민 보론산은 적절한 개수의 양이온성 아민 그룹(정확히는 7개의 아민 그룹)을 지니 음이온성 표면 및 폴리머에 대해 충분히 강하면서도 가역적으로 결합할 수 있고, 비-세포독성(Non-cytotoxic)이라는 장점이 있다. 구체적으로 본 발명의 올리고아민 보론산은 이산화탄소(CO₂)에 대한 감응성을 지닌 것으로, 가역적인 CO₂ 착화(Complexation) 및 카바메이트 형성에 의해 그 전체 전하(Overall charge)가 양이온성 및 음이온성 사이의 통상적인 pH 범위(5.5 ~ 7.5)에서 전환될 수 있다.

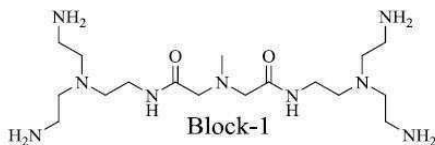
[0020] 또한, 본 발명에 따른 올리고아민 보론산은 적절한 개수의 페닐보론산 그룹(정확히는 4개의 페닐보론산 그룹)을 지녀 0.1 M 인산 완충액(Phosphate buffer) 내의 중성 pH 조건에서 단당류(모노사카리드; Monosaccharide)에 대해 강한 결합을 나타내며, 이는 색상법(또는 측색법, 비색정량법; Colorimetry) 및 Wang의 경쟁결합측정법(Competitive binding assay)을 통해 정량적으로 확인되었다.

[0021] 즉, 본 발명에 따른 특정 구조의 올리고아민 보론산은 중성 pH 조건(예컨대, pH 7.4)에서 CO₂와 같은 그린 트리거(Green trigger)와 가역적으로 결합하고, 단당류에 대한 강한 결합 특성을 나타내는바, 약물(예컨대, 인슐린) 패치, 혈액 내 이산화탄소 및 혈당에 대한 자극-감응성 어셈블리, 약물전달용 캡슐화제, 약물 코팅제 및 약물방출 제어제를 비롯한 다양한 의약적 용도로 적용될 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명은 하기 화학식 2로 표시되는 올리고아민-2 화합물과 N,N'-디이소프로필카르보디이미드(DIC)에 의해 활성화된 3-카르복시페닐보론산을 커플링시켜, 하기 화학식 3으로 표시되는 올리고아민 보론산을 합성하는 것을 특징으로 하는, 이중 자극-감응성 올리고아민 보론산의 제조방법을 제공한다.

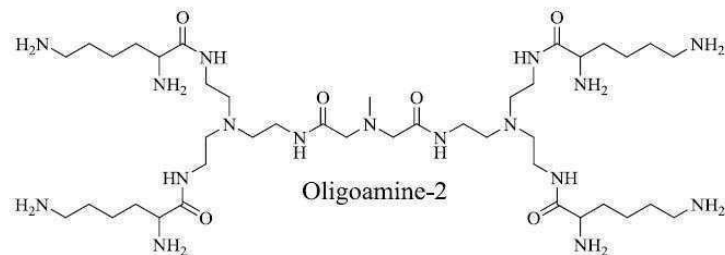
[0023] 구체적으로, 본 발명은 S1) N,N'-디이소프로필카르보디이미드(DIC)가 첨가된 N-메틸이미노디아세트산과 트리스(2-아미노에틸)아민을 반응시켜, 하기 화학식 1로 표시되는 블록-1 화합물을 합성하는 단계; S2) 상기 블록-1 화합물과 N,N'-디이소프로필카르보디이미드(DIC)가 첨가된 Boc-Lys(Boc)-OH를 반응시켜, 하기 화학식 2로 표시되는 올리고아민-2 화합물을 합성하는 단계; 및 S3) 상기 올리고아민-2 화합물과 N,N'-디이소프로필카르보디이미드(DIC)가 첨가된 3-카르복시페닐보론산을 반응시켜, 하기 화학식 3으로 표시되는 올리고아민 보론산을 합성하는 단계;를 포함하는, 이중 자극-감응성 올리고아민 보론산의 제조방법을 제공한다.

[0024] [화학식 1]



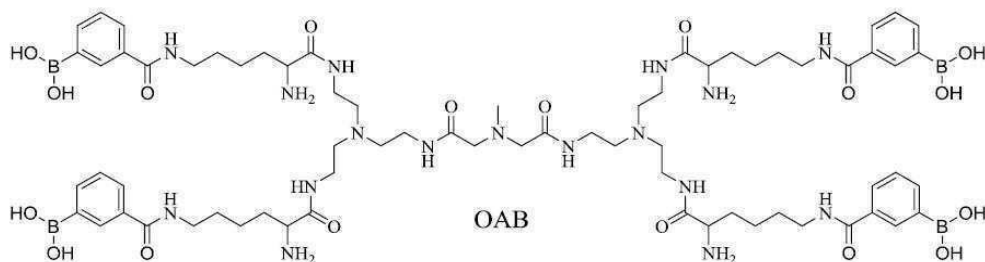
[0025]

[0026] [화학식 2]



[0027]

[0028] [화학식 3]



[0029]

발명의 효과

[0030] 본 발명에 따른 올리고아민 보론산은 생체 내와 유사한 중성 pH 조건에서 이산화탄소 및 단당류 각각에 대한 이

중 자극-감응성을 나타낸다.

[0031] 또한, 본 발명에 따른 올리고아민 보론산은 세포독성이 없고 생체분해성(Biodegradable)이며 생체적합성이 뛰어나다.

[0032] 이를 통해, 본 발명에 따른 올리고아민 보론산은 다양한 생체의학 분야에 있어 자극-감응성 나노- 및 마이크로-어셈블리, 센싱 어셈블리, 약물전달용 캡슐, 약물 방출제어제, 글리코컨쥬게이트(Glycoconjugate) 수용체 등을 설계하기 위한 매우 이상적인 소재가 될 수 있다.

[0033] 본 발명은 생체에 실제 적용이 가능한 것으로서 제약산업 분야에 미치는 파급효과가 매우 클 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1의 (A)는 OAB(5 mM Millipore water 내, pH 7.0)의 전도도 측정 결과(상단) 및 기준치로서 순수한 물(Millipore water, pH 7.0)의 전도도 측정 결과(하단); (B)는 1분 동안 천천히 CO₂ 버블링을 시행하기 전과 후, MeOH/(50% 에테르/헥산) 용액(1:1, v/v) 내 OAB의 외관 변화를 보여주는 사진;이다.

도 2의 (A)는 (a) ARS(1.44×10^{-4} M, 0.1 M 인산 완충액 내(pH 7.4)), (b) ARS(1.44×10^{-4} M) + OAB(1.5×10^{-3} M), (c) ARS(1.44×10^{-4} M) + OAB(1.5×10^{-3} M) + 글루코오스(0.5 M), (d) ARS(1.44×10^{-4} M) + OAB(1.5×10^{-3} M) + 프룩토오스(0.5 M)의 UV-visible 분광분석 결과(* 삽입도 = a, b, c, d 각 용액의 이미지); (B)는 글루코오스 및 프룩토오스 첨가에 따른 ARS/OAB 복합체의 572 nm에서의 형광 변화를 보여주는 그래프;이다.

도 3의 (A)는 OAB의 ¹H NMR 스펙트럼; (B)는 OAB의 ¹³C NMR 스펙트럼;(* MeOH-d₄, 400 MHz, 별표 = 잔류 용매 및 H₂O 피크)이다.

도 4는 OAB의 액체 크로마토그래피 질량 분광분석(LCMS) 결과이다.

도 5는 0.1 M 인산 완충액, pH 7.4에서 ARS(1.44×10^{-4} M) + OAB(1.5×10^{-3} M)의 외관을 보여주는 사진(* 좌측 = 당류 없음, 가운데 = 0.5 M 글루코오스, 우측 = 0.5 M 프룩토오스 함유)이다.

도 6의 (A)는 ARS-OAB 복합체의 농도 증가($0 \sim 1.0 \times 10^{-2}$ M)에 따른 ARS(1.44×10^{-4} M) 형광 프로파일($\lambda_{ex} = 468$ nm, $\lambda_{em} = 572$ nm); (B)는 OAB 존재시(pH 7.4, 0.1 M 인산 완충액) ARS(1.44×10^{-4} M)의 형광 강도 증가를 보여주는 그래프; (C)는 ARS(1.44×10^{-4} M) 및 OAB($0.71 \times 10^{-3} \sim 1.0 \times 10^{-2}$ M) 존재시, ARS-OAB(K_{eq1})를 계산하기 위한 $1/\Delta I_f$ vs. $1/R$ 플롯(* $K_{eq1} = 1215.0$);이다.

도 7의 (A)는 글루코오스 농도 증가($0 \sim 1.0$ M)에 따른 OAB(1.5×10^{-3} M) 결합 관련 ARS 형광 프로파일; (B)는 ARS 용액(1.44×10^{-4} M)을 포함한 3-성분계에서 OAB(1.5×10^{-3} M)와 글루코오스($0.10 \sim 1.0$ M)의 결합에 대한 [S]/P vs. Q 플롯(* $K_{eq} = 5.8$);이다.

도 8의 (A)는 프룩토오스 농도 증가($0 \sim 1.0$ M)에 따른 OAB(1.5×10^{-3} M) 결합 관련 ARS 형광 프로파일; (B)는 ARS 용액(1.44×10^{-4} M)을 포함한 3-성분계에서 OAB(1.5×10^{-3} M)와 프룩토오스($9.95 \times 10^{-3} \sim 1.0$ M)의 결합에 대한 [S]/P vs. Q 플롯(* $K_{eq} = 73.4$);이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 실시예 및 실험예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로 한정되는 것은 아니다.

[0036] **실시예**

[0037] (1) 재료 및 기기

[0038] 트리스(2-아미노에틸)아민(TAEA, Aldrich), N-메틸이미노디아세트산(MIDA, Alfa aesar), 트리에틸아민(TEA, Aldrich), N,N'-디이소프로필카르보다이미드(DIC, TCI), 3-카복시페닐보론산(CPBA, TCI), MeOH(LCMS grade), 트리플루오로아세트산(TFA; Aldrich) 및 Boc-아미노산 유도체(Boc-Lys(Boc)-OH*DCHA, TCI)를 입수한 그대로 사용하였다.

[0039] 다른 모든 시약들은 상업적으로 구입하여 그대로 사용하였다.

[0040] 핵자기 공명(NMR) 스펙트럼은 MeOH-d₄ 용매를 이용해 Agilent DD2 NMR(400 MHz) 분광계 상에 기록하였다.

[0041] 질량 스펙트럼은 Agilent 6300 Ion trap LC/MS 시스템을 이용해 기록하였다.

[0042] UV-visible 흡수 스펙트럼은 Perkin Elmer(Lambda-40) UV-vis 분광광도계(Quartz cell, Path length: 10 mm)를 이용해 확보하였다.

[0043] 형광 스펙트럼은 FluoroMate FS-2 형광 분광계를 이용해 기록하였다.

[0044] ARS 형광 강도는 여기 파장 468 nm 및 방출 파장 572 nm의 조건으로 측정하였다.

[0045] 전도도는 Thermo Scientific Orion 4-star pH/전도도 계측기를 이용해 측정하였다.

[0046] (2) Block-1의 합성

[0047] 트리스(2-아미노에틸)아민(5.3 mL, 54 mmol, 2 eq.)를 100 mL MeOH에 용해시켰다.

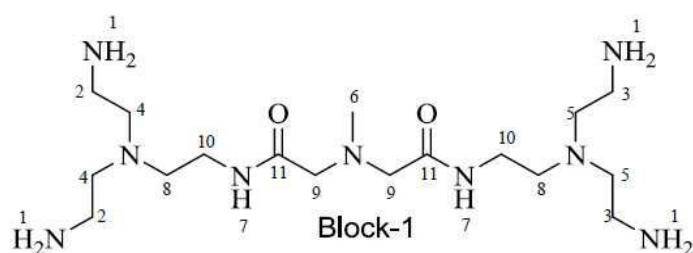
[0048] 별도의 플라스크에서 트리에틸아민(5 mL)을 천천히 첨가하면서 N-메틸이미노디아세트산(4.0 g, 27 mmol, 1 eq.)을 MeOH(35 mL)에 용해시켰다.

[0049] 이어서, N,N'-디이소프로필카르보다이미드(DIC)(8.4 mL, 54 mmol, 2 eq.)를 빙냉 하에서 천천히 첨가하고, 용액을 0°C에서 15분 동안 교반하였다.

[0050] 활성화된 디아세트산 용액을 적하 깔때기 내로 옮기고, 격렬하게 교반하면서 아민 용액에 천천히 첨가하였다.

[0051] 첨가 완료 후, 용액을 실온에서 24시간 동안 교반하였다.

[0052] 그 다음, 용매를 진공 하에서 제거하고, Block-1 조생성물을 MeOH-Et₂O로부터 2회 침전시켰다. (* 수율: 95%, 녹는점: 98°C)



[0053]

[0054] ¹H-NMR (400 MHz, MeOH-d₄) δ (ppm) = 1.22-1.30 (d, 24H, H1-5), 2.52-2.55 (s, 3H, H6), 2.60-2.69 (m, 2H, H7), 2.72-2.87 (m, 4H, H8), 3.32-3.41 (m, 4H, H9), 3.78-3.88 (m, 4H, H10). ¹³C-NMR (400 MHz, MeOH-d₄) δ (ppm) = 37.59 (s, C6), 39.67 (d, C2), 40.34 (d, C3), 41.91 (s, C10), 44.01 (m, C8), 53.10 (d, C4), 53.90 (d, C5), 61.65 (s, C9), 176.97 (s, C11). ESI-MS: m/z = 399 ([M-4]⁻), 437 ([M + CH₃OH + H]⁺), 263 ([M + 3ACN + 2H]²⁺). FT-IR (KBr, cm⁻¹): 1169(tertiary amines), 1584 (amide II), 1620 (amide I), 2945 (N-CH₃), 3300-3500 (primary amines).

[0055] (3) 올리고아민-2의 합성

[0056] Block-1(403 mg, 1 mmol, 1 eq.)을 50 mL MeOH에 용해시켰다.

[0057] 별도의 플라스크에서 Boc-Lys(Boc)-OH(1.39 g, 4 mmol, 4 eq.)를 MeOH(10 mL)에 용해시키고, 용액을 얼음으로 냉각시켰다.

[0058] Boc-아미노산은 그 디사이클로헥실아민 염의 형태로 입수되었고, 사용 전에 표준 프로토콜에 따라 자유 산으로 트랜스퍼하였다.

[0059] 이어서, DIC(619 μ L, 4 mmol, 4 eq.)를 천천히 첨가하고, 용액을 15분 동안 교반하였다.

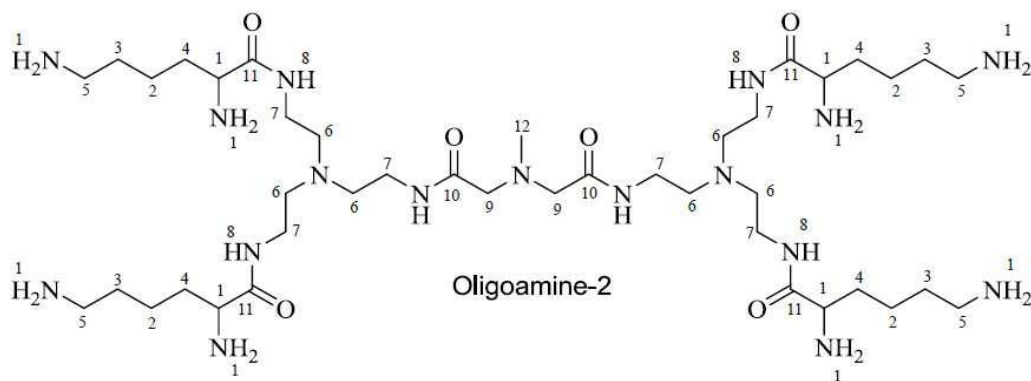
[0060] 활성화된 아미노산 용액을 적하 깔때기 내로 옮기고, 격렬하게 교반하면서 Block-1 용액에 천천히 첨가하였다.

[0061] 첨가 완료 후, 용액을 실온에서 밤새 교반하였다.

[0062] 그 다음, 용매를 진공 하에서 제거하였다.

[0063] 보호된 올리고아민 조생성물에 DCM 내의 트리플루오로아세트산(TFA)(30%) 용액을 첨가하고, 2시간 동안 교반하였다.

[0064] 그 다음, 용매를 진공 하에서 감소시키고, 잔류물을 MeOH-Et₂O로부터 2회 침전시켜 올리고아민-2를 수득하였다.
(* 수율: 95%, 녹는점: 119 ~ 121°C)



[0065]

[0066] ¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄) δ (ppm) = 1.17-1.23 (d, 20H, H1), 1.38-1.49 (m, 8H, H2), 1.62-1.73 (m, 8H, H3), 1.83-1.91 (m, 8H, H4), 2.91-3.05 (m, 11H, H5 and H12), 3.33-3.58 (m, 12H, H6), 3.67-3.80 (m, 12H, H7), 3.90-4.05 (m, 4H, H8), 4.05-4.28 (m, 4H, H9). ¹³C-NMR (400 MHz, MeOH-d₄) δ (ppm) = 20.51 (m, C3), 25.72 (m, C5), 29.75 (m, C2), 35.61 (s, C12), 35.71 (m, C4), 38.22 (m, C7), 43.33 (s, C6), 52.16 (d, C1), 56.52 (s, C9), 160.69 (m, C10), 168.30 (m, C11). ESI-MS: m/z = 525 ([M + 2MeOH + 2H]²⁺), 329 ([M + 3Na]³⁺). FT-IR (KBr, cm⁻¹): 1180 (tertiary amines), 1626 (amide II), 1679 (amide I), 2980 (N-CH₃), 3300-3500 (primary amines).

[0067] (4) OAB의 합성

[0068] 올리고아민-2(300 mg, 0.327 mmol, 1 eq.)를 10 mL MeOH에 용해시켰다.

[0069] 별도의 플라스크에서 3-카르복시페닐보론산(217 mg, 1.309 mmol, 4 eq.)을 MeOH(10 mL)에 용해시키고, 용액을 얼음으로 냉각시켰다.

[0070] 이어서, DIC(204 μ L, 1.309 mmol, 4 eq.)를 천천히 첨가하고, 용액을 0°C에서 30분 동안 교반하였다.

[0071] 격렬하게 교반하면서 활성화된 3-카르복시페닐보론산 용액을 올리고아민-2 용액에 천천히 첨가하였다.

[0072] 첨가 완료 후, 용액을 실온에서 24시간 동안 교반하였다.

[0073] 그 다음, 용매를 진공 하에서 제거하고, OAB 조생성물을 MeOH-Et₂O로부터 2회 침전시켰다. (* 수율: 정량)

[0074] ¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄) δ (ppm) = 1.05-1.13 (d, 8H, H1a), 1.19-1.31 (m, 4H, H1), 1.45-1.60 (m, 8H, H2), 1.64-1.77 (m, 8H, H3), 1.85-2.00 (m, 8H, H4), 2.89-2.99 (m, 8H, H5), 3.36-3.51 (m, 4H, H6), 3.73-3.85 (m, 12H, H7), 3.97-4.09 (m, 4H, H8), 4.19-4.50 (m, 4H, H9), 7.35-8.30 (m, 16H, H13, 15-17). ¹³C-NMR (400 MHz, MeOH-d₄) δ (ppm) = 21.15 (m, C2), 22.24 (m, C3), 26.60 (m, C4), 38.74 (m, C5), 41.38 (s, C10), 43.09 (m, C7), 44.18 (m, C1), 55.85 (m, C9), 112.34 (s, C15), 115.30 (s, C16), 118.25 (s, C14), 121.21 (s, C17-18), 161.67 (m, C13), 169.61 (s, C19), 172.25 (s, C20), 174.90 (s, C21). ESI-MS: m/z 527.0 ([M + 3Na]³⁺), (OAB m/z 1508). FT-IR (KBr, cm⁻¹): 1180 (tertiary amine), 1620 (amide II), 1679 (amide I), 2923 (N-CH₃), 3030(aromatic), 3300-3500(primary amines).

[0075] 실험 조건 및 방법

[0076] (1) ARS법에 의한 K_a 측정을 위한 방법론

[0077] * 회합상수(Association constant) 계산을 위한 식

$$[0078] \quad 1/\Delta I_f = (\Delta K \cdot p_o I_o K_{eq1})^{-1} / [R] + (\Delta K \cdot p_o I_o)^{-1} \quad (1)$$

[0079] (상기 식 (1)에서, ΔK, p_o, I_o는 모두 형광 분광광도계의 파라미터이고, [R]은 수용체(OAB)의 농도이고, I_f는 형광 강도이다)

$$[0080] \quad Q = [I]/[RI] = (I_{RI} - I)/(I - I_1) \quad (2)$$

[0081] (상기 식 (2)에서, Q는 측정된 흡광도이고, I_{RI}는 수용체-인디케이터(OAB-ARS) 복합체의 강도이고, I₁는 자유 인디케이터의 강도이다)

$$[0082] \quad P = [R_0] - 1/(Q \cdot K_{eq1}) - [I_0]/(Q+1) \quad (3)$$

[0083] (상기 식 (3)에서, R₀는 OAB의 총량이고, I₀는 ARS의 총량이다)

$$[0084] \quad [S]/P = (K_{eq1}/K_{eq})Q + 1 \quad (4)$$

[0085] (상기 식 (4)에서, [S]는 기질 농도이다)

[0086] (2) 형광 및 흡광 연구

[0087] 전형적인 ARS-OAB 형광 측정을 위해, 0.10 M 인산나트륨 1염기성 완충액(Sodium phosphate monobasic buffer) 내 1.44 x 10⁻³ M ARS 원액(Stock solution)(지난 7일 이내에 제조 및 냉장고에 저장된 것)을 0.10 M 인산나트륨 1염기성 완충액으로 10배 희석시키고, 4 M NaOH를 이용해 pH를 7.4로 만들어, 0.10 M 인산 완충액 내 pH 7.4의 1.44 x 10⁻⁴ M ARS 용액을 준비하였다(용액 A).

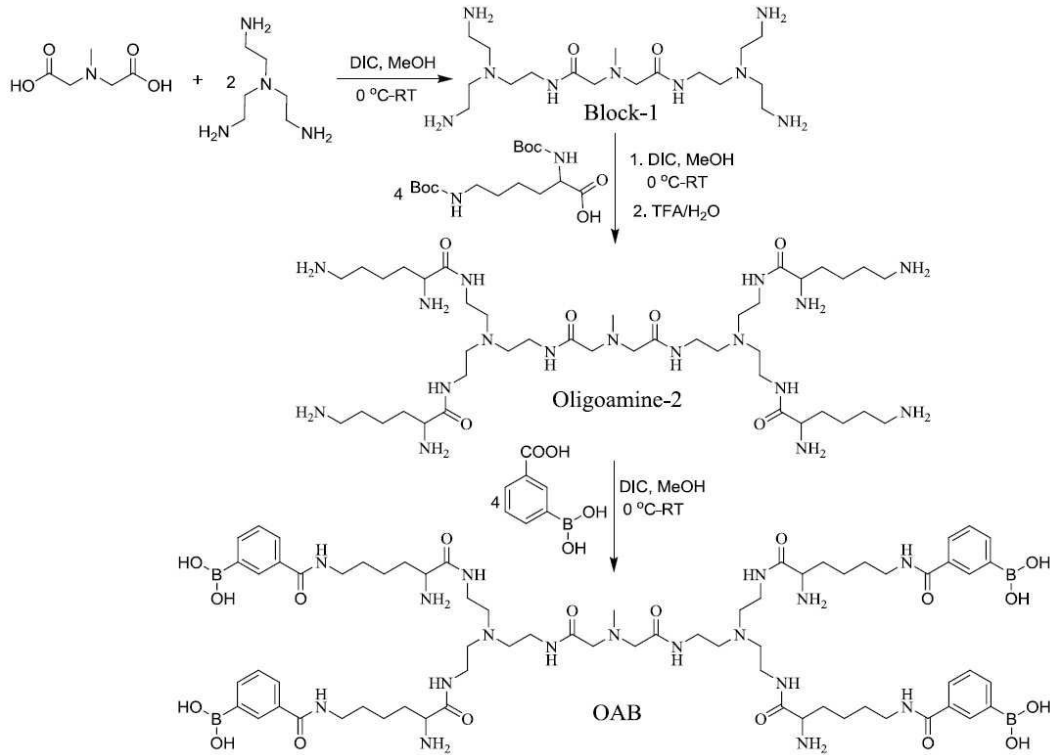
[0088] OAB를 용액 일부에 첨가하여 1.44 x 10⁻⁴ ARS, 1.5 x 10⁻² M OAB 용액을 만들고, 용액의 pH를 7.4로 조절하였다(용액 B).

[0089] 용액 B를 용액 A 내로 적정하여 일정한 농도의 ARS와 농도 범위 7.1 x 10⁻⁴ ~ 1.0 x 10⁻² M OAB의 혼합물을 만들었고, 각 혼합물을 10분 동안 그대로 두어 평형에 도달하도록 하였다.

[0090] 이어서, 형광 측정을 위해 용액 1 mL를 큐벳 내로 천천히 옮겼다.

- [0091] 방출 강도는 572 nm에서 기록하였다.
- [0092] 모든 정량적 실험에 대해 여기 파장은 468 nm로 설정하였다.
- [0093] 형광 강도 변화 및 평형 상수 사이의 관계는 식 (1)을 이용해 표현될 수 있다.
- [0094] ARS-OAB에 대한 회합상수(K_{eq1})는 $1/\Delta I_f$ vs. $1/[R]$ 플롯에서 절편의 뒀과 기울기로부터 계산되며, 2회의 측정을 통해 K_{eq} 의 평균 값을 구하였다.
- [0095] 1.5×10^{-3} M 농도의 OAB를 사용한 것을 제외하고는, 비슷한 방식으로 흡광도 연구를 수행하였다.
- [0096] (3) 3-성분계 분석을 통한 OAB와 단당류의 결합 연구(경합결합측정 연구)
- [0097] 경합결합측정 연구는 ARS-OAB 연구와 비슷한 방식으로 진행하였다.
- [0098] 1.44×10^{-4} M ARS 및 1.5×10^{-3} M OAB 용액을 0.10 M 인산나트륨 1염기성 완충액 내에서 pH 7.4로 만들었다(용액 B).
- [0099] 용액 B 일부에 단당류를 첨가하여 1.44×10^{-4} ARS, 1.5×10^{-3} M OAB, 2.0 M 단당류 용액을 만들었다(용액 C).
- [0100] 용액 C를 용액 B 내로 적정하여 일정한 농도의 ARS 및 OAB와 다양한 농도 범위의 단당류(글루코오스의 경우: 0.18 ~ 1.0 M, 프룩토오스의 경우: 0.01 ~ 1.0 M)로 이루어진 혼합물을 만들어, 가능한 많은 결합 곡선을 커버할 수 있도록 하였다.
- [0101] K_{eq} 는 식 (3) 및 (4)를 이용해 계산하였다.
- [0102] **실험 결과**
- [0103] (1) OAB의 합성 확인
- [0104] OAB는 N,N'-디이소프로필카르보디이미드(DIC)를 이용해 올리고아민-2를 3-카르복시페닐보론산 4 당량과 커플링시켜 합성되었다(그림 1).
- [0105] OAB 구조에서 자유 1차 아민 그룹의 개수는 ^1H NMR 분광 상 그들의 특징적인 방향족 양성자 신호에 기초해 계산하였다.
- [0106] OAB는 7.35 ~ 8.30 δ ppm에서 16개 양성자에 대한 피크를 나타내었는바, 이는 OAB 내에 4개의 1차 아민 그룹이 존재함을 의미한다.
- [0107] 액체 크로마토그래피 질량분석(Liquid chromatography mass spectrometry; LCMS) 결과, OAB(m/z 1508)에 대해 ESI-MS: m/z 527.0($[M + 3Na]^{3+}$)을 나타내었다.

[0108] [그림 1] 올리고아민 보론산(OAB)의 합성 과정



[0109]

[0110] (2) OAB와 CO₂의 가역적 결합 평가

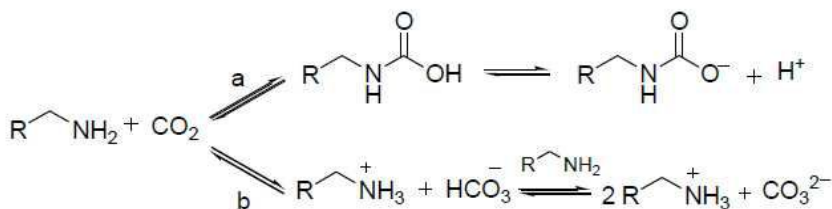
[0111] 전도도 측정에 의해, CO₂의 5 mM OAB 수용액(pH 7.0)에 대한 가역적 결합을 조사하였다.

[0112] CO₂ 또는 N₂를 용액 내로 천천히 버블링시키는 과정 중, OAB 용액에서의 전도도 변화를 시간 경과에 따라 측정하였다(도 1A).

[0113] 일정한 CO₂ 버블링 도중 처음에는 OAB 용액의 전도도가 급격하게 증가하였고, 분 범위에서 유의적인 변화 없이 안정 값에 도달하였다.

[0114] 이러한 전도도 증가는 CO₂가 OAB의 1차 아민 작용기에 결합하여 카바메이트를 형성했기 때문이다(그림 2).

[0115] [그림 2] CO₂와 아민 작용기의 결합과 관련된 서로 다른 모드: (a) CO₂의 공유결합에 의한 카바메이트 형성, (b) 물에서 CO₂의 용매화에 의해 탄산이 형성된 후 아민의 양성자화



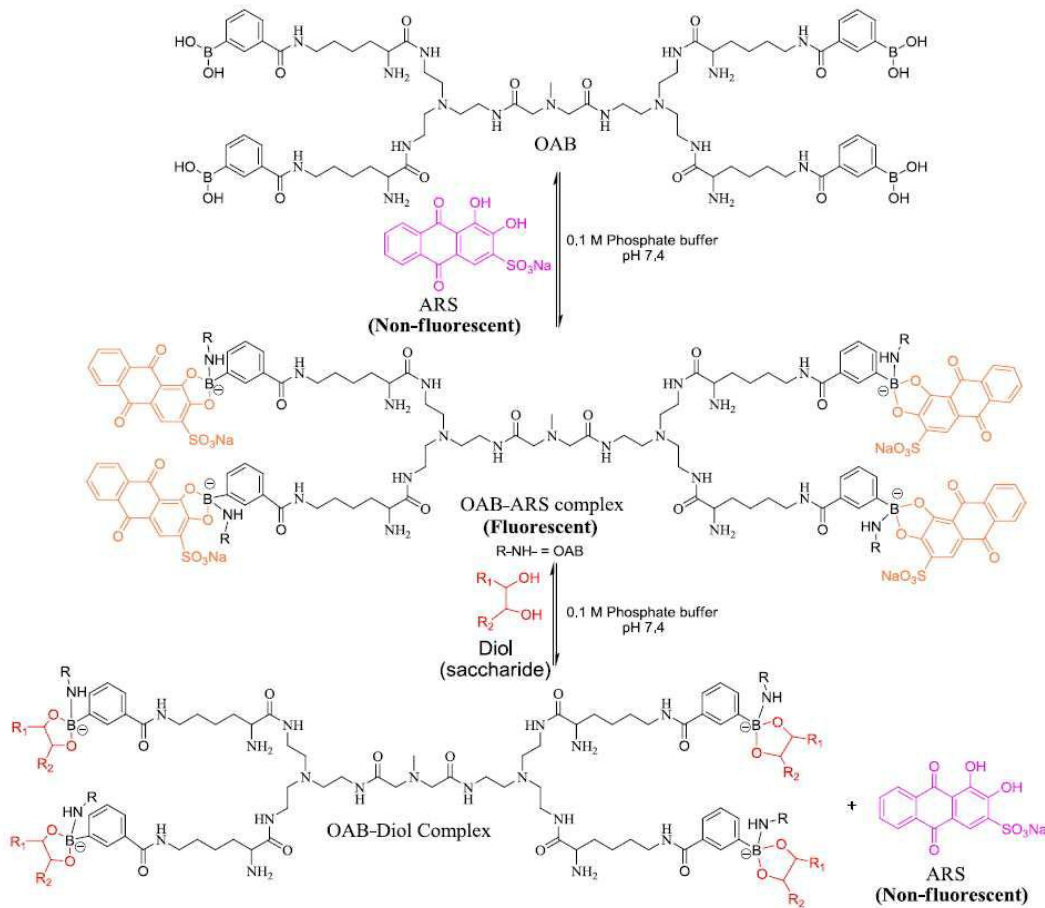
[0116]

[0117] 모든 1차 아민 작용기가 소모된 후, 더 이상의 반응은 일어나지 않았고, 그 결과 전도도는 안정 값에 도달하였다.

[0118] 안정 값에 도달한 후 전도도가 꾸준히 약하게 증가한 것은 높은 CO₂ 농도에서 보론산 부분이 천천히 카르복실화

되었기 때문일 수 있다.

- [0119] CO₂ 또는 N₂ 버블링 과정 중 중성 pH에서 OAB 및 순수한 물의 전도도를 비교할 필요가 있다.
- [0120] 도 1A에서 보듯이, OAB의 전도도 변화는 순수한 물의 기준 값보다 10배 더 높았으나, 이는 탄산수소염(Hydrogen carbonate) 종이 형성되었기 때문이다.
- [0121] 도 1B는 MeOH/(50% 에테르/헥산)(1:1, v/v) 용액 내 OAB의 디지털 사진이다.
- [0122] CO₂로 매우 천천히 버블링시킴에 따라 탁한 용액이 분 범위 내에서 즉시 깨끗한 용액으로 변화하였으나, 이는 용액에서의 카바메이트 형성 및 OAB 아민 그룹의 양성자화에 기인한 것일 수 있다(그림 2).
- [0123] (3) OAB와 당당류의 결합 평가(UV/visible 및 형광 분광분석)
- [0124] UV/visible 및 형광 분광분석을 이용해, 당당류의 OAB에 대한 결합을 평가하였다(도 2).
- [0125] 글루코오스(0.5 M)가 OAB/ARS 복합체 용액 내로 첨가됨에 따라, 0.1 M 인산 완충액(pH 7.4) 내 초기 OAB/Alizarin Red S(ARS) 복합체([OAB]:[ARS] = 10:1)의 465 nm에서의 흡광이 480 nm로 이동하였다.
- [0126] 흡광도의 적색 이동은 당당류가 OAB에 결합하여 OAB-결합 ARS를 대체하였음을 의미한다(도 2A 및 도 5).
- [0127] 글루코오스 대신 프룩토오스(0.5 M)를 첨가한 경우, 465 nm에서 OAB/ARS 복합체의 흡광도가 520 nm로 크게 적색 이동하였다.
- [0128] 이러한 실험 결과는 중성 pH 조건에서 OAB가 당당류에 대해 민감한 응답을 보이는 점을 뚜렷하게 증명해준다.
- [0129] 중성 pH에서 당당류의 OAB에 대한 결합은 비색 평가로도 확인할 수 있다.
- [0130] ARS/OAB 복합체 형성에 따라 ARS의 짙은 핑크(Dark pink) 색이 짙은 노랑(Dark yellowish) 색으로 변하였고, 당당류 결합에 따라 다시 색이 회복되었다(도 2A, 삽입도).
- [0131] (4) OAB와 당당류의 정량적 결합 평가(Wang의 경합결합측정법)
- [0132] Wang의 경합결합측정법에 기초하여, OAB와 당당류의 정량적 결합을 평가하였다.
- [0133] 여기 상태의 양성자는 ARS의 페놀 하이드록실 그룹에서 케톤 산소로 전달되고, 그 결과 자유 ARS의 형광 소광(Fluorescence quenching)이 일어난다.
- [0134] 따라서, 보론산 에스테르가 형성되면 형광 소광 메커니즘 제거를 통해 시스템의 형광이 증가할 것으로 예상된다(그림 3).
- [0135] [그림 3] 보론산과 탄수화물의 결합에 관한 Wang의 경합결합측정법(ARS를 비색 리포터(Colorimetric reporter)로 사용)



[0136]

[0137] OAB가 ARS 용액 내로 첨가되어 OAB/ARS 복합체를 형성함에 따라, ARS 용액의 형광 강도가 100배 증가하였다.

[0138] OAB/ARS 복합체의 형광 강도에 기초하여 OAB의 회합상수(Association constant; K_{eq})를 측정하였다. 또한 단당류의 비율에 의해 (OAB에 결합된) ARS가 대체됨에 따라 형광 강도가 감소하였다(도 2B).

[0139] pH 7.4에서, OAB와 ARS 결합에 대한 K_{eq} 는 $1.215 \times 10^3 M^{-1}$ 로 측정되었고, OAB의 글루코오스 또는 프룩토오스에 의한 결합에 대한 K_{eq} 는 각각 $5.8 M^{-1}$ 및 $73.4 M^{-1}$ 로 측정되었다(표 1).

[0140] 중성 pH에서 K_{eq} 값은 보고된 페닐보론산에 대한 값에 맞먹는 수치였으나, 이는 중성 pH에서 OAB에 포함된 페닐보론산 그룹이 자유 페닐보론산의 경우 못지않게 단당류와 강하게 결합함을 뚜렷이 확인시켜주는 것이다.

[0141] [표 1] OAB와의 회합상수(K_{eq})(* 0.1 M 인산 완충액, pH 7.4, 2회 측정의 평균 값)

Diol	K_{eq} (M^{-1}) of the complex at pH 7.4	
	PBA ^a	OAB
ARS	1300	1215
Glucose	4.6	5.8
Fructose	160	73.4

^aThe phenylboronic acid (PBA) values are as reported in the literature.²

[0142]

결과 검토

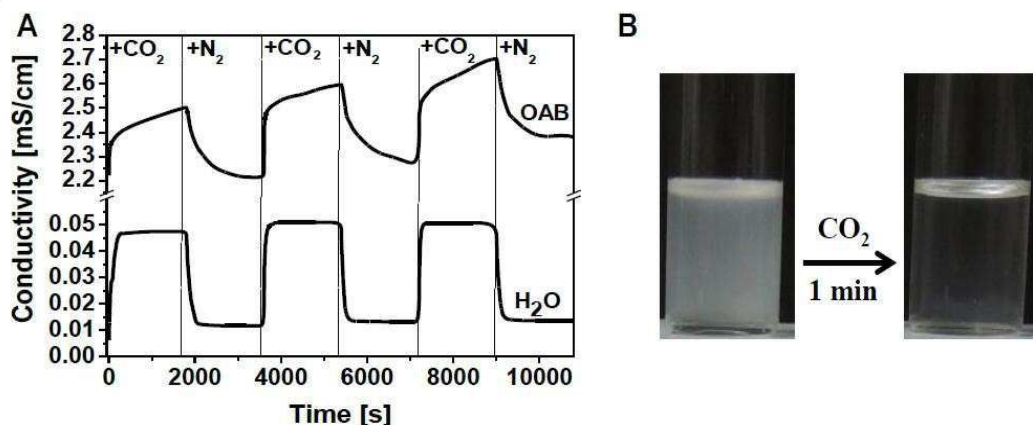
[0144] 본 발명에 따른 생체분해성(Biodegradable) OAB 구조는 생리학적 조건(pH 7.4)에서 단당류-감응성 거동을 나타내고, CO₂와 결합하여 전체 전하의 가역적인 전환을 보였다.

[0145] 생리학적으로 적절한 pH에서 CO₂ 처리에 따라 카바메이트를 형성하고 수중에서 운반물(예컨대, 약물)을 당류에 응답하여 방출하는 이중 자극-감응성 보론산-함유 올리고아민 패치는 아직까지 보고된 바가 없다.

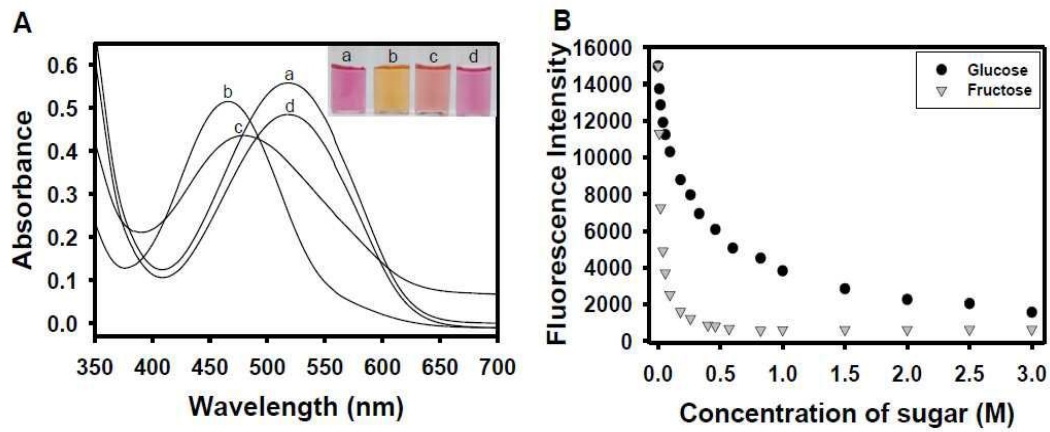
[0146] 따라서, 본 발명에 따른 OAB는 센싱, 약물전달 및 다양한 생체의학적 적용을 위한 스마트 복합체의 구조를 수립하는데 있어 매우 이상적인 소재가 될 수 있을 것이다.

도면

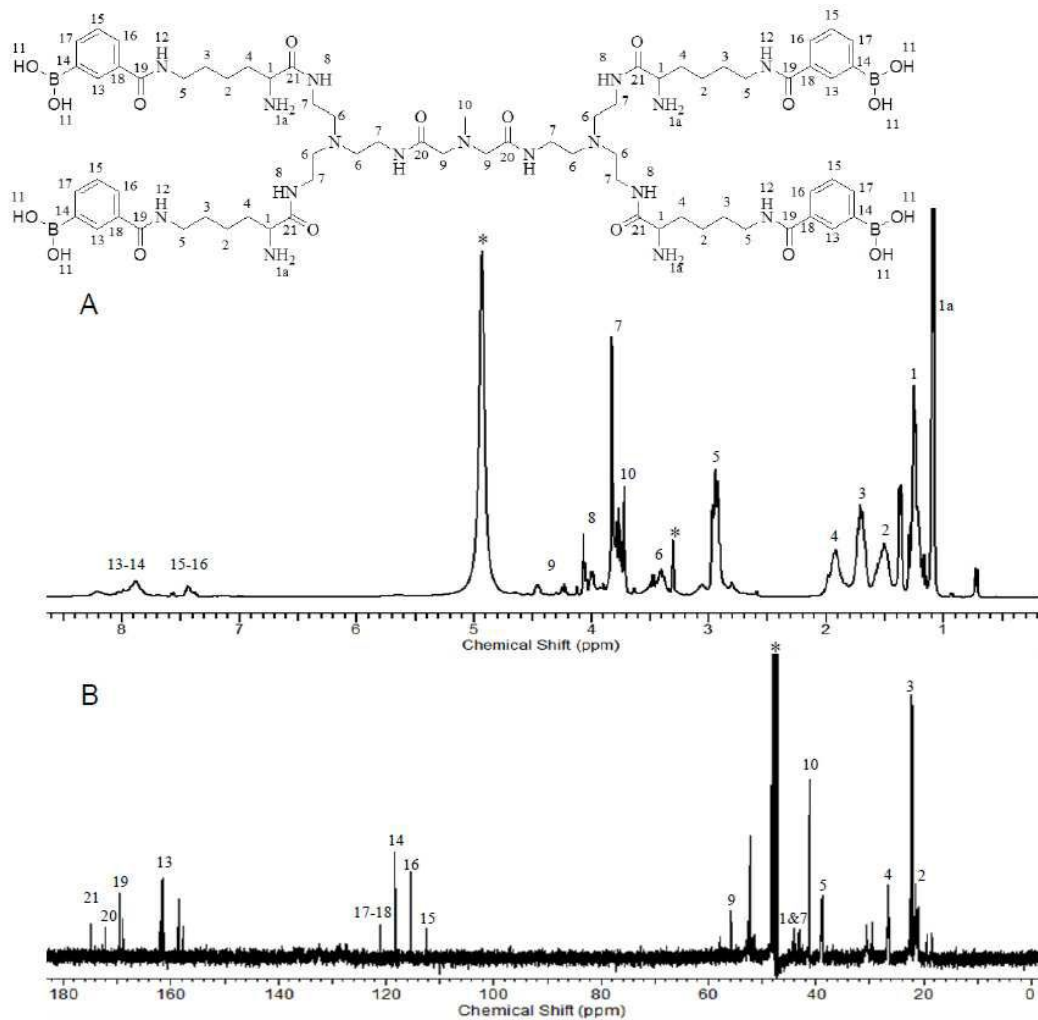
도면1



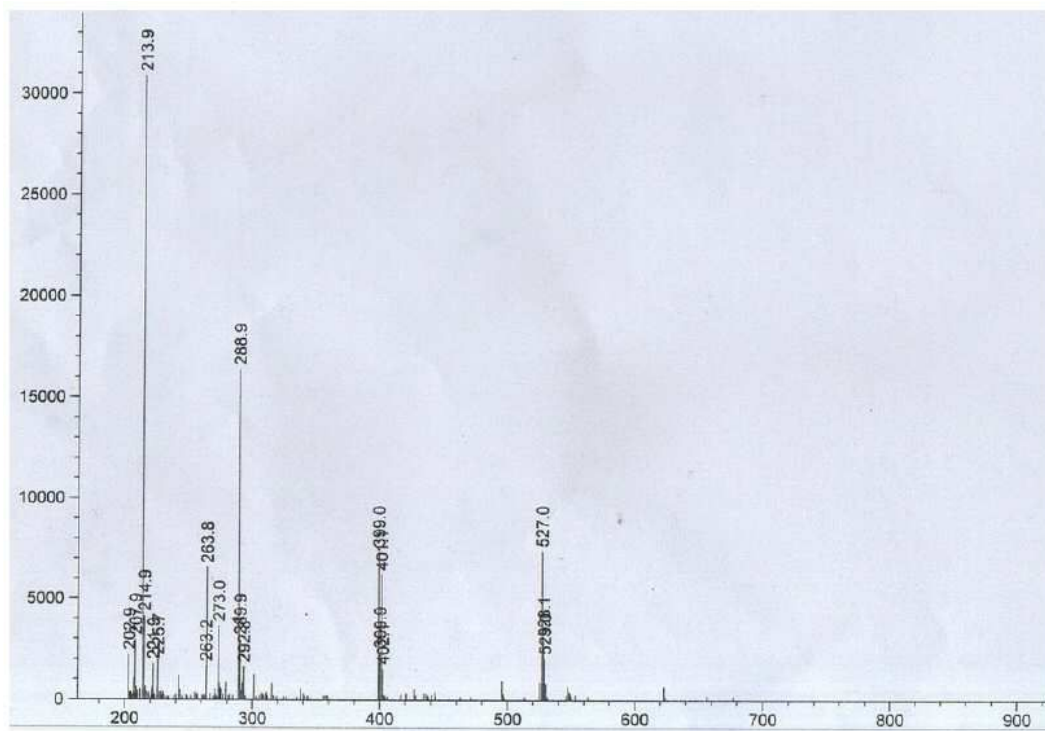
도면2



도면3



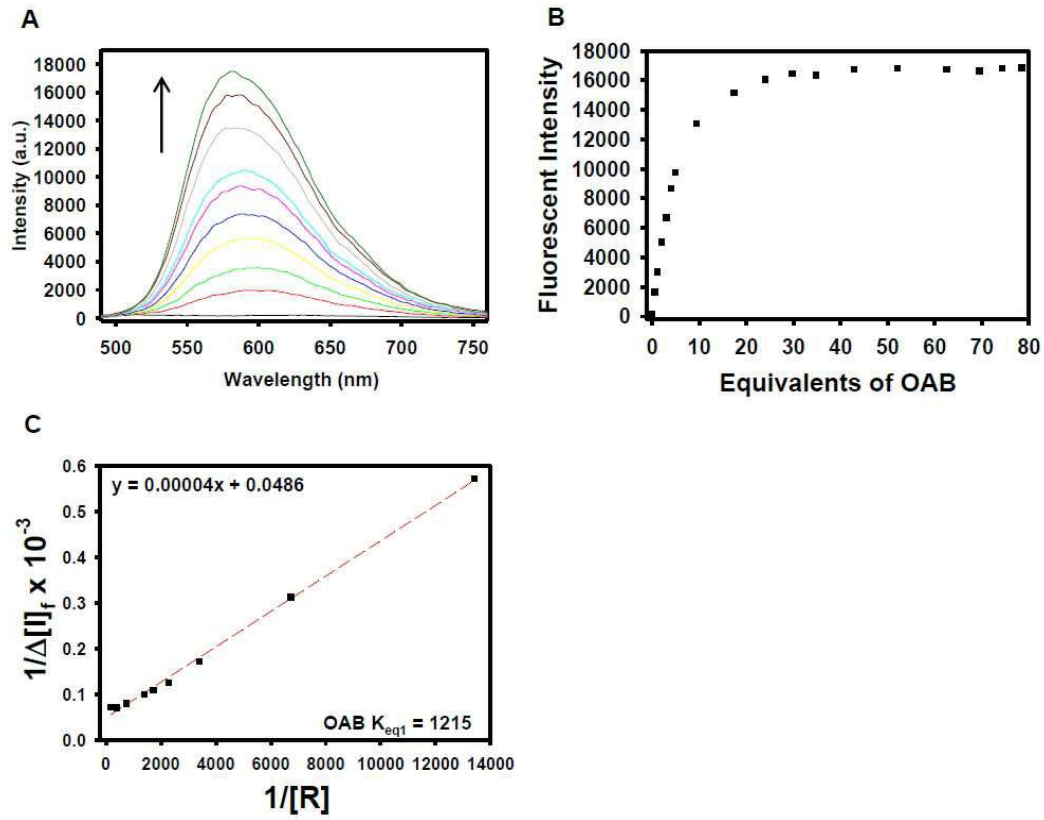
도면4



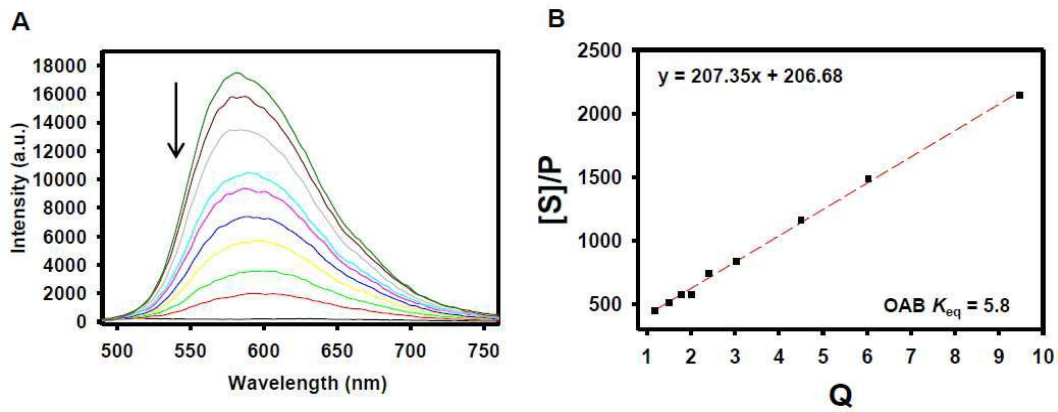
도면5



도면6



도면7



도면8

