



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년12월07일
(11) 등록번호 10-1805861
(24) 등록일자 2017년11월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08G 65/26 (2006.01) C08G 83/00 (2006.01)
C08L 71/00 (2006.01) C12N 15/87 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C08G 65/2621 (2013.01)
C08G 83/005 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0129250
(22) 출원일자 2016년10월06일
심사청구일자 2016년10월06일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020020020784 A
US04948700 A
US05124234 A

(73) 특허권자
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
김병수
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
제일특허법인

전체 청구항 수 : 총 15 항

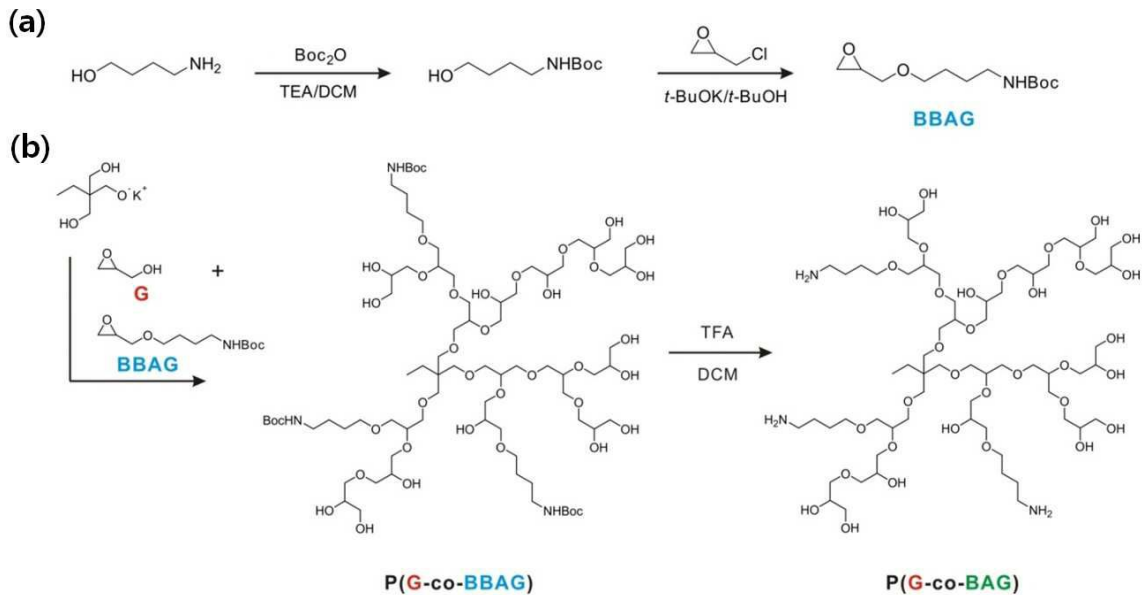
심사관 : 윤종화

(54) 발명의 명칭 **은폐된 자유 아민기를 갖는 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체의 제조**

(57) 요약

보호된 아민기를 갖는 글리시딜아민계 모노머 및 글리시딜알콜계 모노머의 혼합물에 폴리올 개시제를 가하여 공중합 반응시킨 후 탈보호시켜 제조되는 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체는, 폴리글리세롤 골격을 가짐으로써 생체적합성이 우수하고 자유 아민기를 가짐으로써 다양한 생물학적 분자와의 접합이 가능하며, 특히 상기 자유 아민기가 고차분지형 폴리글리세롤 골격의 내부에 은폐되어 높은 생체적합성을 유지할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C08L 71/00 (2013.01)

C12N 15/87 (2013.01)

C08L 2203/02 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

보호된 아민기를 갖는 글리시딜아민계 모노머 및 글리시딜알콜계 모노머의 혼합물에 폴리올 개시제를 가하여 공중합 반응시킨 후 탈보호시키는 단계를 포함하는, 고차분지형(hyperbranched) 폴리글리세롤계 공중합체의 제조 방법.

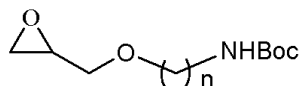
청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 글리시딜아민계 모노머는 하기 화학식 1로 표시되고,

상기 글리시딜알콜계 모노머는 글리시돌인, 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체의 제조방법:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서, n은 2 내지 6의 정수이고, Boc은 t-부틸옥시카보닐이다.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 화학식 1에서 n은 4인, 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체의 제조방법.

청구항 4

제 2 항에 있어서,

상기 폴리올 개시제는 트리메틸올프로판(TMP)이고,

상기 공중합 반응은 음이온성 개환 다중분지 중합반응(anionic ring-opening multibranching polymerization)인, 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체의 제조방법.

청구항 5

제 2 항에 있어서,

상기 화학식 1에서 n은 4이고,

상기 글리시딜아민계 모노머 및 상기 글리시딜알콜계 모노머는 1:99 내지 30:70의 몰비로 혼합되고,

상기 폴리올 개시제는 트리메틸올프로판(TMP)이며, 상기 공중합 반응은 음이온성 개환 다중분지 중합반응인, 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체의 제조방법.

청구항 6

글리시딜아민계 모노머 및 글리시딜알콜계 모노머가 공중합된 공중합체로서,

상기 글리시딜아민계 모노머는 보호된 아민기를 갖고, 상기 공중합체는 공중합 이후에 탈보호된, 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체.

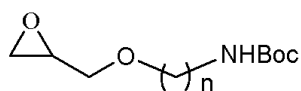
청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 글리시딜아민계 모노머는 하기 화학식 1로 표시되고,

상기 글리시딜알콜계 모노머는 글리시돌인, 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서, n은 2 내지 6의 정수이고, Boc은 t-부틸옥시카보닐이다.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 화학식 1에서 n은 4인, 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체.

청구항 9

제 6 항에 있어서,

상기 공중합체는 코어로부터 퍼져나간 다수의 분지형(branched) 사슬들을 포함하고,

상기 분지형 사슬들은

(a) 말단에 1차 아민기를 갖는 분지형 폴리글리세롤 사슬 및

(b) 말단에 하이드록실기를 갖는 분지형 폴리글리세롤 사슬을 포함하며,

이때 상기 분지형 사슬 (b)가 상기 분지형 사슬 (a)보다 더 긴 길이를 갖는, 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체.

청구항 10

제 6 항에 있어서,

상기 공중합체는 상기 글리시딜아민계 모노머 및 상기 글리시딜알콜계 모노머를 1:99 내지 30:70의 몰비로 포함하고, 3,000 내지 20,000 g/mol의 수평균분자량(Mn)을 갖는, 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체.

청구항 11

제 7 항에 있어서,

상기 화학식 1에서 n은 4이고,

상기 공중합체는 코어로부터 퍼져나간 다수의 분지형(branched) 사슬들을 포함하고, 상기 분지형 사슬들은 (a) 말단에 1차 아민기를 갖는 분지형 폴리글리세롤 사슬 및 (b) 말단에 하이드록실기를 갖는 분지형 폴리글리세롤

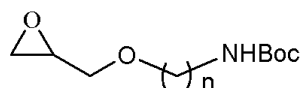
사슬을 포함하며, 이때 상기 분지형 사슬 (b)가 상기 분지형 사슬 (a)보다 더 긴 길이를 갖고,

상기 공중합체는 상기 글리시딜아민계 모노머 및 상기 글리시딜알콜계 모노머를 1:99 내지 30:70의 몰비로 포함하고, 3,000 내지 20,000 g/mol의 수평균분자량(Mn), 및 20~40 mV의 제타 전위를 갖는, 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체.

청구항 12

하기 화학식 1로 표시되는 화합물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서, n은 2 내지 6의 정수이고, Boc은 t-부틸옥시카보닐이다.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

상기 화학식 1에서 n은 4인, 화합물.

청구항 14

제 6 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 따른 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체를 포함하는, 생물학적 운반체.

청구항 15

제 14 항에 있어서,

상기 생물학적 운반체가 DNA 또는 RNA를 운반하는 것인, 생물학적 운반체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생물학/생의학 분야에서 운반체 등으로 사용될 수 있도록 1차 아민기를 갖는 고차분지형 폴리글리세롤(hyperbranched polyglycerol)계 공중합체 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체의 제조에 사용되는 모노머 화합물, 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 폴리에틸렌글리콜(PEG)은, 높은 생체적합성 및 낮은 면역원성과 독성으로 인해, 생물학 분야 및 약제 산업 분야에서 다방면으로 주목받는 주요 폴리에테르 중 하나이다. 그러나 PEG는 고분자 골격 내에 작용기가 부족한 한계로 인해 보다 넓은 분야로의 응용에 제한이 있다. PEG와 유사한 선형 폴리에테르의 대체 화합물로서, 고차분지형 폴리글리세롤(PG)은 수많은 하이드록실 작용기를 갖는 폴리에테르 골격으로 이루어진 3차원적인 독특한 구조와 용이한 제조성으로 인해 최근 관심이 급격히 증가하고 있다.

[0003] 최근 합성기술이 발전함에 따라, 글리시돌 및 기능성 에폭사이드 모노머를 이용하는 일반적인 개환 다중분지형 중합 방식으로 다양한 분자량 및 작용기를 갖도록 설계된 복잡한 구조의 PG가 개발되고 있다. 지금까지 복잡한

구조의 PG를 합성하고 이들의 물리화학적 물성을 조절하기 위해, 많은 종류의 기능성 에폭사이드 모노머가 개발되어 사용되었다. 특히, 아민 작용기를 갖는 폴리에테르가 표면 개질성과 생물학적 적합성이 우수한 이유로 활발히 연구되었다. 1차 아민기를 갖는 에폭사이드 모노머를 직접 중합시키는 것은 불가능하기 때문에, 종래에는 폴리에테르에 아민기를 도입하기 위해, 중합 후에 작용기를 도입하는 방식과 보호된 모노머 블록을 이용하여 직접 공중합하는 방식의 두 가지 방식이 일반적으로 사용되었다.

[0004] 코야마(Koyama) 등은 에틸렌옥사이드를 알릴글리시딜에테르(AGE)와 공중합시키고 이후 2-아미노에탄티올을 AGE와 티올-엔 커플링시켜 1차 아민 잔기를 도입하는 방법을 보고하였다. 또한, 프레이(Frey) 등은 기능성 모노머로서, N,N-다이벤질아미노글리시딜(DBAG), N,N-다이알릴글리시딜아민(DAGA) 및 에피사이아노히드린과 같은 보호된 글리시딜아민 유도체를 이용하는 방법을 보고하였다. 또한, 최근 사토(Satoh) 등은 N,N-치환된 글리시딜아민 유도체를 사용하여 다양한 아민기를 갖도록 설계된 폴리에테르를 얻는 방법을 보고하였다. 또 다른 주목할 만한 연구결과에 따르면, 린드(Lynd) 및 호커(Hawker)의 연구그룹이 N,N-다이이소프로필에탄올아민글리시딜에테르(DEGE)를 사용하여 폴리에테르를 제조하고, 생리학적으로 연관된 조건에서 pH-반응성 거동을 조사하였다. 그러나, 이들 종래기술은 모두 PEG와 같은 선형 폴리에테르에서의 랜덤 공중합에 대한 것으로 국한되어 있다.

[0005] 또한, 종래에 고차분지형 폴리글리세롤의 셸(shell)에 말단 아민기를 부가하려는 시도가 있었으나, 이 경우 고차분지형 폴리글리세롤을 먼저 합성한 뒤 추가적인 합성 반응에 의해 말단 아민기를 부가해야 하므로 합성 경로가 복잡하고, 또한 셸에 부가된 말단 아민기는 생체친화성을 크게 저하시켜 생의학 등의 분야에 사용하기가 부적절하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) Koyama, Y.; Umehara, M.; Mizuno, A.; Itaba, M.; Yasukouchi, T.; Natsume, K.; Suganaka, A.; Watanabe, K. Bioconj. Chem. 1996, 7, 298-301.
- (비특허문헌 0002) Obermeier, B.; Wurm, F.; Frey, H. Macromolecules 2010, 43, 2244-2251.
- (비특허문헌 0003) Reuss, V. S.; Obermeier, B.; Dingels, C.; Frey, H. Macromolecules 2012, 45, 4581-4589.
- (비특허문헌 0004) Herzberger, J.; Frey, H. Macromolecules 2015, 48, 8144-8153.
- (비특허문헌 0005) Isono, T.; Asai, S.; Satoh, Y.; Takaoka, T.; Tajima, K.; Kakuchi, T.; Satoh, T. Macromolecules 2015, 48, 3217-3229.
- (비특허문헌 0006) Lee, A.; Lundberg, P.; Klinger, D.; Lee, B. F.; Hawker, C. J.; Lynd, N. A. Polym. Chem. 2013, 4, 5735.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 따라서, 본 발명의 목적은 내부에 은폐된 1차 아민기를 갖는 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법에 의해 제조된 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체의 제조방법에 사용되는 신규의 모노머 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체의 생물학적/생의학적 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

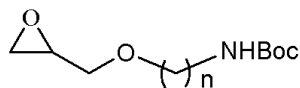
- [0011] 상기 목적에 따라, 본 발명은 보호된 아민기를 갖는 글리시딜아민계 모노머 및 글리시딜알콜계 모노머의 혼합물

에 폴리올 개시제를 가하여 공중합 반응시킨 후 탈보호시키는 단계를 포함하는, 고차분지형(hyperbranched) 폴리글리세롤계 공중합체의 제조방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 글리시딜아민계 모노머 및 글리시딜알콜계 모노머가 공중합된 공중합체로서, 상기 글리시딜아민계 모노머는 보호된 아민기를 갖고, 상기 공중합체는 공중합 이후에 탈보호된, 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공한다.

[0014] [화학식 1]



[0015] 상기 화학식 1에서, n 은 2 내지 6의 정수이고, Boc은 t-부틸옥시카보닐이다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체를 포함하는 생물학적 운반체를 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따른 고차분지형 공중합체는 폴리글리세롤 골격을 가짐으로써 생체적합성이 우수하고 자유 아민기를 가짐으로써 다양한 생물학적 분자와의 접합이 가능하며, 특히 상기 자유 아민기가 고차분지형 폴리글리세롤 골격의 내부에 은폐되어 높은 생체적합성을 유지할 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명에 따르면 신규의 글리시딜아민계 모노머를 사용하여 아민 작용기를 갖는 고차분지형 폴리글리세롤을 원포트(one-pot) 합성시킬 수 있고, 공중합 모노머 간의 비율 및 개시제/모노머 비율을 조절함으로써 아민기의 도입 비율 및 공중합체의 분자량을 제어할 수 있다.

[0020] 아울러, 상기 글리시딜아민계 모노머는 간단한 방식으로 합성되어 고차분지형 고분자의 제조 등에 유용하게 사용될 수 있다.

[0021] 따라서, 본 발명의 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체는 DNA, RNA 등의 생물학적 운반체 등과 같이 다양한 생물학적/생의학 분야에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 이하 도면을 참조하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 하기에 사용된 약어들의 의미는 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용에 설명하였다.

도 1: (a) BBAG 모노머의 합성법, 및 (b) $P(G\text{-co-BBAG})$ 의 음이온 개환 공중합 이후에 탈보호시켜 $P(G\text{-co-BAG})$ 를 합성하는 방법.

도 2. (a) BBAG 모노머, (b) $P(G_{113}\text{-co-BBAG}_{21})$ 공중합체 (고분자 7), 및 (c) 탈보호된 $P(G_{113}\text{-co-BAG}_{21})$ 공중합체에 대해 $DMSO-d_6$ 중에서 측정한 1H -NMR 스펙트럼.

도 3. G 및 BBAG 모노머(초기 공중합 비율 1:1)의 in situ 공중합 과정을 나타내는 ^{13}C -NMR 스펙트럼. G 및 BBAG 모노머에서 각각 얻은 54.9 및 53.2 ppm에서 에폭사이드의 메틴 탄소의 신호를 지정된 시간 이후에 취합하여 스펙트럼을 중첩시켰다 ($DMSO-d_6$, 150 MHz, $75^\circ C$).

도 4. G 및 BBAG의 공중합(초기 모노머 비율 = 1:1) 과정에서 얻은 정량적 ^{13}C -NMR 연속 측정으로부터 산출된 모노머 변환율과 총 변환율 간의 그래프.

도 5. $P(G_{125}\text{-co-BAG}_5)$ 공중합체(탈보호된 고분자 3)에 대한 800~1200 Da 범위의 확장 MALDI-ToF 질량 스펙트럼. 신호 간 거리는 공중합체 내의 각각의 모노머의 질량에 대응한다(G : 74.08 g/mol 및 BAG : 145.2 g/mol).

도 6. (a) $P(G_{125}\text{-co-BAG}_5)$ (탈보호된 고분자 3), $P(G_{170}\text{-co-BAG}_{16})$ (탈보호된 고분자 6), 및 $P(G_{113}\text{-co-BAG}_{21})$ (탈보

호된 고분자 7)로 처리된 RAW264.7 세포주의 세포 생존률 그래프, (b) 로다민 B-접합된 P(G₁₁₃-co-BAG₂₁) 공중합체의 HEK293T 세포내 유입을 공초점주사레이저현미경(CLSM)에 의해 관찰한 이미지.

도 7. 본 발명의 일례에 따른 고차분지형 폴리글리세롤 공중합체의 3차원적 모식도.

도 8 내지 11. 각각 BBAG 모노머의 ¹³C-NMR, COSY, HMQC 및 DEPT 스펙트럼(용매: DMSO-d₆).

도 12. P(G₅₆-co-BBAG₂)(고분자 1)의 ¹H-NMR 스펙트럼(용매: D₂O)

도 13. P(G₁₁₃-co-BBAG₂₁)(고분자 7)의 ¹H-NMR 스펙트럼(용매: D₂O)

도 14. P(G₁₁₃-co-BAG₂₁)(탈보호된 고분자 7)의 ¹H-NMR 스펙트럼(용매: D₂O)

도 15. P(G₁₁₃-co-BBAG₂₁) 고분자(고분자 7)의 DEPT 스펙트럼(용매: DMSO-d₆).

도 16. (a) P(G₁₄₉-co-BBAG₁₁) 고분자(고분자 5)의 ¹³C-NMR 스펙트럼, (b) P(G₁₁₃-co-BBAG₂₁) 고분자(고분자 7)의 ¹³C-NMR 스펙트럼(용매: DMSO-d₆).

도 17. (G₁₁₃-co-BBAG₂₁) 고분자(고분자 7)의 겔투과 크로마토그램.

도 18. (G₁₁₃-co-BBAG₂₁) 고분자(고분자 7) 및 (G₁₁₃-co-BAG₂₁) 고분자(탈보호된 고분자 7)의 ¹³C-NMR 스펙트럼(용매: DMSO-d₆).

도 19. 아세틸화된 (G₁₁₃-co-BBAG₂₁) 고분자(고분자 7)의 겔투과 크로마토그램.

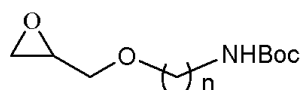
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.

[0024] 본 발명의 일 양태에 따르면, 보호된 아민기를 갖는 글리시딜아민계 모노머 및 글리시딜알콜계 모노머의 혼합물에 폴리올 개시제를 가하여 공중합 반응시킨 후 탈보호시키는 단계를 포함하는, 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체의 제조방법이 제공된다.

[0025] 일례로서, 상기 글리시딜아민계 모노머는 하기 화학식 1로 표시될 수 있다.

[0026] [화학식 1]



[0027]

[0028] 상기 화학식 1에서, n은 2 내지 6의 정수이고, Boc은 t-부틸옥시카보닐이다.

[0029] 바람직하게는, 상기 화학식 1에서 n은 4일 수 있다.

[0030] 또한, 상기 글리시딜알콜계 모노머는 글리시딜기와 1차 알콜기를 갖는 화합물일 수 있다. 일례로서, 상기 글리시딜알콜계 모노머는 1~3개의 글리시딜기와 1~3개의 1차 알콜기를 갖는 탄소수 3~10의 화합물일 수 있다. 다른 예로서, 상기 글리시딜알콜계 모노머는 1개의 글리시딜기와 1개의 1차 알콜기를 갖는 탄소수 3~6의 화합물일 수 있다. 또 다른 예로서, 상기 글리시딜알콜계 모노머는 글리시돌일 수 있다.

[0031] 바람직한 일례로서, 상기 글리시딜아민계 모노머는 상기 화학식 1로 표시되고, 상기 글리시딜알콜계 모노머는 글리시돌일 수 있다. 또는, 상기 글리시딜아민계 모노머는 상기 화학식 1에서 n이 4인 화합물이고, 상기 글리시딜알콜계 모노머는 글리시돌일 수 있다.

- [0032] 상기 공중합 반응은 상기 글리시딜아민계 모노머 및 상기 글리시딜알콜계 모노머 간에 1:99 내지 30:70의 범위, 3:97 내지 25:75의 범위, 또는 5:95 내지 20:80의 범위의 몰비(molar ratio)로 수행될 수 있다.
- [0033] 또한, 상기 공중합 반응에는 그 외에도 추가적인 공중합 모노머가 더 사용될 수 있다. 이와 같은 추가적인 공중합 모노머는 폴리에테르를 합성하는데 사용되는 통상적인 모노머일 수 있으며, 예를 들어 에틸렌옥사이드(E O)를 들 수 있다.
- [0034] 상기 공중합체의 제조방법을 도 1의 (b)에 개략적으로 나타내었다.
- [0035] 본 발명에 따르면, 보호기를 갖는 글리시딜아민계 모노머를 폴리글리세롤의 제조에 이용하고 폴리올 개시제를 사용하여 공중합 후 탈보호시킴으로써, 원포트(one-pot) 방식으로 아민기를 갖는 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체의 제조가 가능하다.
- [0036] 상기 폴리올 개시제는 예를 들어 3개 이상의 알콜기를 갖는 화합물일 수 있다. 구체적인 예로서, 상기 폴리올 개시제는 트리메틸올프로판(TMP)일 수 있다. 또한, 이때 상기 공중합 반응은 음이온성 개환 다중분지 중합반응(anionic ring-opening multibranching polymerization)일 수 있다.
- [0037] 바람직한 일례에 따르면, 상기 화학식 1에서 n 은 4이고, 상기 글리시딜아민계 모노머 및 상기 글리시딜알콜계 모노머는 1:99 내지 30:70의 몰비로 혼합되고, 상기 폴리올 개시제는 트리메틸올프로판이며, 상기 공중합 반응은 음이온성 개환 다중분지 중합반응일 수 있다.
- [0038] 또한, 상기 탈보호는 통상적인 방식으로 수행될 수 있으며, 예를 들어 트라이플루오로아세트산(TFA) 등을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 글리시딜아민계 모노머 및 글리시딜알콜계 모노머가 공중합된 공중합체로서, 이때 상기 글리시딜아민계 모노머는 보호된 아민기를 갖고, 상기 공중합체는 공중합 이후에 탈보호된, 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체가 제공된다.
- [0040] 상기 공중합체는 공중합체를 구성하는 반복단위 중에 상기 글리시딜아민계 모노머로부터 유래된 단위 및 상기 글리시딜알콜계 모노머로부터 유래된 단위를 가질 수 있다.
- [0041] 예를 들어, 상기 글리시딜아민계 모노머는 상기 화학식 1로 표시되고, 상기 글리시딜알콜계 모노머는 글리시톨일 수 있다. 또한, 이때 상기 화학식 1에서 n 은 4일 수 있다.
- [0042] 상기 글리시딜아민계 모노머 및 글리시딜알콜계 모노머는 앞서 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체의 제조방법에서 설명한 바와 같은 종류 및 비율로 공중합체에 포함될 수 있다.
- [0043] 바람직한 일례로서, 상기 글리시딜아민계 모노머가 상기 화학식 1로 표시되고, 상기 글리시딜알콜계 모노머가 글리시톨일 수 있다.
- [0044] 또한, 상기 공중합체는 상기 글리시딜아민계 모노머 및 상기 글리시딜알콜계 모노머를 1:99 내지 30:70의 범위, 3:97 내지 25:75의 범위, 또는 5:95 내지 20:80의 범위의 몰비(molar ratio)로 포함할 수 있다.
- [0045] 상기 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체는 수지상(dendritic) 구조를 가질 수 있고, 전체적으로 구의 형태를 가질 수 있으며, 구체적으로 외곽층에 해당하는 셸(shell)과 내부에 위치하는 코어(core)를 갖는 구의 형태를 가질 수 있다.
- [0046] 구체적인 예에 따르면, 상기 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체는 코어로부터 퍼져나간 다수의 분지형(branched) 사슬들을 포함한다. 이때 상기 코어는 개시제로 사용된 폴리올로부터 유래된 단위를 포함할 수 있다.
- [0047] 보다 구체적인 예에 따르면, 상기 분지형 사슬들은 (a) 말단에 1차 아민기를 갖는 분지형 폴리글리세롤 사슬 및 (b) 말단에 하이드록실기를 갖는 분지형 폴리글리세롤 사슬을 포함한다.
- [0048] 예를 들어, 상기 분지형 사슬 (a)는 분지형의 폴리글리세롤아민 사슬일 수 있으며, 상기 분지형 사슬 (b)는 분지형의 폴리글리세롤 사슬일 수 있다.
- [0049] 즉, 상기 분지형 사슬들은 코어로부터 수지상(dendritic)으로 퍼져나가면서 다수의 분지(branch)로 분화되고,

각 분지는 1차 아민기 또는 하이드록실기로 말단화된다.

[0050] 상기 다수의 분지형 사슬들은 길이가 모두 동일하지는 않으며, 대체적으로 상기 분지형 사슬 (b)가 상기 분지형 사슬 (a)보다 더 긴 길이를 갖는다.

[0051] 즉, 말단에 1차 아민기를 갖는 분지형 사슬의 말단으로부터 코어까지의 사슬 길이를 L_a 이라 하고, 말단에 하이드록실기를 갖는 분지형 사슬의 말단으로부터 코어까지의 사슬 길이를 L_b 라 할 때, L_b 는 대체적으로 L_a 보다 큰 값을 갖는다.

[0052] 즉, 상기 공중합체는 코어로부터 퍼져나간 다수의 분지형(branched) 사슬들을 포함하고, 상기 분지형 사슬들은 (a) 말단에 1차 아민기를 갖는 분지형 폴리글리세롤 사슬 및 (b) 말단에 하이드록실기를 갖는 분지형 폴리글리세롤 사슬을 포함하며, 이때 상기 분지형 사슬 (b)가 상기 분지형 사슬 (a)보다 더 긴 길이를 가질 수 있다.

[0053] 예를 들어, 상기 공중합체 내에 존재하는 상기 분지형 사슬 (a)의 L_a 중 최대값과 상기 분지형 사슬 (b)의 L_b 중 최대값을 비교할 때, L_b 의 최대값이 L_a 의 최대값보다 더 크다.

[0054] 또한, 상기 공중합체 내에 존재하는 모든 상기 분지형 사슬 (b)의 길이의 평균을 L_m 이라 할때, 상기 공중합체 내에 존재하는 분지형 사슬 (a)의 총 갯수 중 상기 L_m 보다 작은 L_a 를 갖는 분지형 사슬 (a)의 갯수의 비율은 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상일 수 있다.

[0055] 도 7은 본 발명의 일례에 따른 고차분지형 폴리글리세롤 공중합체의 3차원적 모식도를 나타낸 것이다. 도 7에서 보듯이, 상기 공중합체는 자유 아민기가 고차분지형 폴리글리세롤 골격의 내부에 은폐되어 높은 생체적합성을 유지할 수 있다.

[0056]

[0057] 상기 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체는 1,000 내지 50,000 g/mol의 범위, 2,000 내지 30,000 g/mol의 범위, 또는 3,000 내지 20,000 g/mol의 범위의 수평균분자량(M_n)을 가질 수 있다.

[0058] 구체예로서, 상기 공중합체가 상기 글리시딜아민계 모노머 및 상기 글리시딜알콜계 모노머를 1:99 내지 30:70의 몰비로 포함하고, 3,000 내지 20,000 g/mol의 수평균분자량(M_n)을 가질 수 있다.

[0059] 또한, 상기 공중합체는 1~3의 범위, 1~2의 범위, 또는 1~1.7의 범위의 다분산지수(polydispersity index, M_w/M_n)를 가질 수 있다.

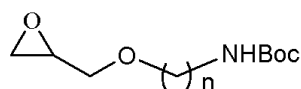
[0060] 또한, 상기 공중합체는 10~60 mV의 범위, 15~50 mV의 범위, 또는 20~40 mV의 범위의 제타 전위를 가질 수 있다. 공중합체의 제타전위가 상기 바람직한 범위 내일 때, DNA, RNA 등의 생물학적 분자와 전기적 인력에 의해 보다 강하게 접합될 수 있다.

[0061] 또한, 상기 공중합체는 -50℃ 내지 10℃의 범위, -40℃ 내지 0℃의 범위, 또는 -35℃ 내지 -5℃의 범위의 유리전이온도(T_g)를 가질 수 있다.

[0062] 구체적인 일례에 따르면, 상기 화학식 1에서 n 은 4이고, 상기 공중합체는 코어로부터 퍼져나간 다수의 분지형(branched) 사슬들을 포함하고, 상기 분지형 사슬들은 (a) 말단에 1차 아민기를 갖는 분지형 폴리글리세롤 사슬 및 (b) 말단에 하이드록실기를 갖는 분지형 폴리글리세롤 사슬을 포함하며, 이때 상기 분지형 사슬 (b)가 상기 분지형 사슬 (a)보다 더 긴 길이를 갖고, 상기 공중합체는 상기 글리시딜아민계 모노머 및 상기 글리시딜알콜계 모노머를 1:99 내지 30:70의 몰비로 포함하고, 3,000 내지 20,000 g/mol의 수평균분자량(M_n), 및 20~40 mV의 제타 전위를 가질 수 있다.

[0063] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이 제공된다:

[0064] [화학식 1]



[0065]

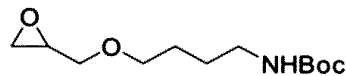
[0066] 상기 화학식 1에서, n 은 2 내지 6의 정수이고, Boc은 t-부틸옥시카보닐이다.

[0067] 상기 화학식 1의 화합물은 앞서 살펴 보았듯이 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체의 제조에 모노머로서 사용

될 수 있다.

[0068] 바람직하게는, 상기 화학식 1에서 n은 4일 수 있으며, 즉 하기 화학식 1a로 표시될 수 있다.

[0069] [화학식 1a]



[0070]

[0071] 상기 화학식 1a의 화합물은 Boc-보호된 부탄올아민글리시디에테르(Boc-protected butanolamine glycidyl ether)로 불리거나, 또는 t-부틸 4-((옥시란-2-일)메톡시)부틸카바메이트로 명명될 수 있다.

[0072] 상기 화학식 1a의 화합물은 예를 들어 (1) 4-아미노-1-부탄올을 다이-t-부틸 다이카보네이트와 반응시켜 t-부틸 N-(4-하이드록시부틸)카바메이트를 제조하는 단계; 및 (2) 상기 t-부틸 N-(4-하이드록시부틸)카바메이트를 에피클로로히드린과 반응시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0073] 상기 화학식 1a의 화합물의 제조방법을 도 1의 (a)에 개략적으로 나타내었다. 상기 단계 (1)의 반응시에 트라이에틸아민과 같은 아민계 화합물을 더 첨가할 수 있다. 상기 단계 (2)의 반응은 예를 들어 실온 내지 30℃의 온도에서 15~35 시간 동안 수행될 수 있다. 또한, 상기 반응은 포타슘 t-부톡사이드와 같은 염기 존재 하에서 수행될 수 있다. 또한, 상기 에피클로로히드린은 상기 t-부틸 N-(4-하이드록시부틸)카바메이트 대비 동일한 당량 내지 과량, 예를 들어, 5~20배 당량, 또는 5~10배 당량으로 사용될 수 있다.

[0074] 또한, 상기 화학식 1에서 n이 2, 3, 5 또는 6인 화합물은, 앞서의 화학식 1a의 화합물의 제조방법의 단계 (1)에서 4-아미노-1-부탄올 대신 4-아미노-1-에탄올, 4-아미노-1-프로판올, 4-아미노-1-펜탄올, 또는 4-아미노-1-헥산올을 사용함으로써 제조될 수 있다.

[0075] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 상기 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체를 포함하는 생물학적 운반체가 제공된다.

[0076] 상기 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체는 높은 양전하의 제타전위를 갖기 때문에 생물학적 분자와 전기적 인력에 의해 접합되어 생물학적 분자를 목적지로 운반할 수 있다.

[0077] 예를 들어, 상기 생물학적 운반체는 DNA 또는 RNA를 운반하는 것일 수 있다.

[0078] 상기 고차분지형 폴리글리세롤계 공중합체를 포함하는 운반체는 생물학적 분자와 접합되어 세포내 섭취 등의 방식으로 세포내로 유입될 수 있으므로, 생물학 및 생의학 분야에서 강력한 운반체로 사용될 수 있다.

[0079] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 보다 상세히 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0080] 이하의 실시예 및 시험예에서 사용된 약어들은 아래와 같은 의미를 갖는다:

[0081] - BBAG : Boc-보호된 부탄올아민글리시디에테르, 즉 t-부틸 4-((옥시란-2-일)메톡시)부틸카바메이트

[0082] - G : 글리시돌

[0083] - PG : 폴리글리세롤

[0084] - P(G-co-BBAG) : BBAG와 G의 공중합체

[0085] - P(G-co-BAG) : BBAG와 G의 공중합 이후 탈보호시켜 얻은 공중합체

[0086] **재료 및 측정방법:**

[0087] - 아래 실시예에서 사용된 시약과 용매들은 다른 언급이 없다면 Sigma-Aldrich사 및 Acros사에서 구매되었다.

- [0088] - CDCl_3 , D_2O , 및 $\text{DMSO}-d_6$ 와 같은 중수소화 NMR 용매들은 Cambridge Isotope Laboratory사에서 구매되었다.
- [0089] - ^1H -NMR 및 ^{13}C -NMR 스펙트럼은 400-MR DD2 (400 MHz) 및 VNMRs 600 (600 MHz) 분광기를 사용하여 CDCl_3 , D_2O , 및 $\text{DMSO}-d_6$ 용매로 얻었으며, 화학적 이동값은 TMS를 표준으로 하여 ppm 단위로 기록되었다.
- [0090] - 수평균분자량(Mn), 중량평균분자량(Mw) 및 분자량분포도(Mw/Mn)는 겔투과크로마토그래피(GPC, Agilent Technologies 1200 series)를 이용하여 폴리스타이렌을 표준물질로 0.01 M 리튬 브로마이드-함유된 다이메틸포름아마이드(DMF)를 용리액으로 하여 30°C에서 1.00 mL/분의 유속으로 측정되었다.
- [0091] - MALDI-ToF(matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry) 분석은 Ultraflex III MALDI 질량 분광기를 이용하여 α -사이아노-4-하이드록시신남산(CCA)을 매트릭스로 하여 수행되었다.
- [0092] - 시차주사열량법은 DSC(Q200 model, TA Instruments)를 이용하여 -80~50°C의 온도에서 10 K/min의 가온속도로 질소 분위기 하에서 수행되었다.
- [0093] - 제타전위는 Malvern Zetasizer Nano-ZS를 이용하여 측정되었다.

[0094] **실시예 1: BBAG 모노머의 합성**

[0095] 4-아미노-1-부탄올(10 g, 112 mmol)과 트리에틸아민(17.1 mL, 123 mmol)에 다이클로로메탄(CH_2Cl_2 , 35 mL)을 가한 용액에, 다이-*t*-부틸 다이카보네이트(Boc_2O , 25.7 g, 118 mmol)를 CH_2Cl_2 (100 mL)으로 녹인 용액을 30분간 상온에서 교반과 함께 천천히 적가하였다. 혼합물을 상온에서 6시간 동안 교반한 뒤, 감압 하에 농축하였다. 농축된 혼합물에 CH_2Cl_2 과 물을 첨가하고 유기층을 추출하여 Na_2SO_4 로 건조하였다. 유기층을 감압하에 농축하고 잔사를 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 CH_2Cl_2 /메탄올 (1:10 v/v) 용리액으로 정제하여, 무색 오일의 *t*-부틸 N-(4-하이드록시부틸)카바메이트를 제조하였다.

[0096] *t*-부틸 N-(4-하이드록시부틸)카바메이트(14.5 g, 76.6 mmol)의 *t*-부탄올 용액(100 mL)을, 포타슘 *t*-부톡사이드(8.50 g, 76.6 mmol)의 *t*-부탄올 용액(100 mL)에 가하고, 실온의 아르곤 조건 하에서 15분간 교반하였다. 교반 후에, 과량의 에피클로로히드린(35.9 mL, 459.6 mmol)을 30분간 적가하였다. 반응액을 실온에서 24시간 교반하고, 추가로 물(100 mL) 및 CH_2Cl_2 (200 mL)을 첨가하였다. 수용성층을 CH_2Cl_2 로 추출하고 유기층을 합하여 MgSO_4 로 건조하였다. 유기층을 감압하에 농축하고 잔사를 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 CH_2Cl_2 /헥산(1:100 v/v) 용리액으로 정제하여, 무색 오일상의 BBAG 모노머 11.2g(60%)를 얻었다.

[0097] ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, COSY, HMQC, 및 DEPT 분광법 및 ESI-MS와 같은 다양한 광학분석 및 질량분석을 통해, BBAG 모노머가 성공적으로 합성되었음을 확인하였다(도 2 및 도 8 내지 11 참조).

[0098] ^1H -NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ ppm 3.61 (dd, 1H, J = 11.6 및 2.8 Hz, e), 3.34-3.40 (m, 2H, f), 3.18 (dd, 1H, J = 11.5 및 6.3 Hz, d), 3.03-3.05 (m, 1H, c), 2.88 (q, 2H, J = 6.7 Hz, i), 2.68 (dd, 1H, J = 4.3 및 5.1 Hz, b), 2.49 (dd, 1H, J = 5.1 및 2.6 Hz, a), 1.42-1.47 (m, 2H, g), 1.36-1.39 (m, 2H, h), 1.34 (s, 9H, j).

[0099] ^{13}C -NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ ppm 158.66, 80.38, 74.24, 73.29, 53.41, 46.46, 42.88, 31.34, 29.65, 29.34.

[0100] $\text{MS}(m/z + \text{Na}^+, \text{ESI}^+) \text{ calcd for } \text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{NO}_2 \text{ 268.3, found 268.3.}$

[0101] **실시예 2-1: P(G₅₆-co-BBAG₂)의 합성 (교분자 1)**

[0102] 트리메틸올프로판(TMP)(54.6 mg, 0.407 mmol)을 2목 둥근바닥 플라스크에 넣었다. 포타슘 메톡사이드의 메탄올 용액(25 wt %, 45 μL , 0.163 mmol)을 메탄올 0.70 mL로 희석하고, 상기 플라스크에 가한 뒤 실온의 아르곤 분

위기 하에서 30분간 교반하였다. 회전증발기를 이용하여 과량의 메탄올을 제거하고, 결과물을 진공 오븐(90℃, 3 시간)에서 건조하여 개시제의 백색 염을 수득하였다. 플라스크를 아르곤으로 퍼징하고 90℃에서 가열하였다.

[0103] t-부틸 4-(옥시란-2-일메톡시)부틸카바메이트(BBAG)(0.30 g, 1.22 mmol) 및 글리시돌(G)(1.54 g, 23.23 mmol)의 혼합물을 주사기펌프를 이용하여 상기 플라스크에 12시간 동안 적가하였다. 모노머의 첨가가 완료되면, 반응을 5시간 더 진행하였다. 그 결과 얻은 공중합체를 메탄올 1.0 mL에 용해시켜 균일한 고분자 용액을 만들고, 과량의 다이에틸에테르로 침전시킨 후, 침전물을 다이에틸에테르로 두 번 세척하였다. 수득한 고분자를 90℃의 진공 하에서 하루 동안 건조시켰다. 고분자의 합성 수율은 약 90%이었다.

[0104] 공중합체의 Mn을 NMR 데이터(도 12 참조)로부터 아래 수학적 식 1~3을 이용하여 계산한 결과 4773 g/mol로 측정되었으며, NMR 적분의 오차범위를 고려할 때, Mn 값은 약 4800 g/mol이다:

[0105] [수학적 식 1]

[0106] 반복단위(BBAG)의 갯수 = 17.25 (적분값) / 9 (BBAG의 t-부틸의 양자 갯수) = 2

[0107] [수학적 식 2]

[0108] 반복단위(G)의 갯수 = [292.13 (적분값) - {(2 (BBAG 반복단위 갯수) × 7 (t-부틸을 제외한 BBAG의 양자 갯수))} / 5 (G 모노머(5H)의 양자 갯수) = 56

[0109] [수학적 식 3]

[0110] $M_n = 74.08 \text{ (G 모노머의 분자량)} \times 56 + 245.32 \text{ (BBAG 모노머의 분자량)} \times 2 + 134.17 \text{ (TMP의 분자량)} = 4773.29 \text{ g/mol}$.

[0111] 실시예 2-2 내지 2-7: P(G₅₆-co-BBAG₂)의 합성 (고분자 2 내지 7)

[0112] 상기 실시예 2-1과 동일한 절차를 반복하되, 반응시에 모노머/개시제 비율을 변화시켜 공중합체의 분자량을 조절하고 BBAG/G 모노머 비율을 조절하여, 다양한 조성의 고분자들을 각각 합성하였다.

[0113] 이후 합성된 각각의 고분자에 대해 NMR 데이터를 얻고 이로부터 고분자 조성 및 Mn 등을 산출하여, 하기 표 1에 정리하였다.

표 1

고분자 No.	고분자 조성 (목표)	고분자 조성 (NMR) ^a	Mn (목표)	%BBAG (목표)	Mn (NMR) ^a	%BBAG (NMR) ^a	Mn (GPC) ^b	Mw/Mn ^b (GPC) ^b
1	P(G ₅₇ -co-BBAG ₃)	P(G ₅₆ -co-BBAG ₂)	5093	5	4800	3.4	9000	1.3
2	P(G ₅₂ -co-BBAG ₆)	P(G ₆₁ -co-BBAG ₈)	5458	10	6600	11.6	10000	1.4
3	P(G ₁₁₄ -co-BBAG ₆)	P(G ₁₂₅ -co-BBAG ₅)	10051	5	10600	3.8	10000	1.4
4	P(G ₁₀₀ -co-BBAG ₁₀)	P(G ₁₀₀ -co-BBAG ₈)	9995	10	9500	7.4	12200	1.6
5	P(G ₂₂₈ -co-BBAG ₁₂)	P(G ₁₄₉ -co-BBAG ₁₁)	19968	5	13900	6.9	8500	1.3
6	P(G ₂₀₀ -co-BBAG ₂₂)	P(G ₁₇₀ -co-BBAG ₁₆)	20347	10	16700	8.6	12600	1.5
7	P(G ₁₀₀ -co-BBAG ₂₅)	P(G ₁₁₃ -co-BBAG ₂₁)	13675	20	13700	15.7	6800	1.2
a. ¹ H-NMR 분광법에 의해 산출됨. b. GPC-RI 에 의해 측정됨 (표준물질: 폴리스타이렌, 용매: DMF)								

[0114]

[0115]

[0116] 실시예 3: P(G₅₆-co-BAG₂)의 합성 (탈보호)

[0117] 앞서 제조된 Boc-보호된 P(G₅₇-co-BBAG₃) 공중합체(고분자 1)를 트라이플루오로아세트산(TFA)(1.0 mL)와 함께 CH₂Cl₂에 용해시켰다. 반응혼합물을 감압하에 농축하고 그 결과 얻은 탈보호된 고분자를 메탄올 1.0 mL에 용해시켜 균일한 고분자 용액을 제조한 뒤, 과량의 다이에틸에테르로 침전시켜, 침전물을 다이에틸에테르로 두 번

세척하였다. 그 결과 수득한 P(G₅₆-co-BAG₂) 고분자를 90℃의 진공 하에서 하루 동안 건조하였다.

[0118] 실시예 4: 로다민 B-접합된 고차분지형 P(G₁₁₃-co-BAG₂₁) 고분자의 제조

[0119] 로다민 B-접합된 고분자를 기존에 알려진 방법을 활용하여 다음과 같이 합성하였다.

[0120] 먼저 N-하이드록시석신이미드(2.3 mg, 0.02 mmol) 및 로다민 B(9.6 mg, 0.02 mmol)를 DMF 1.5 mL에 녹이고, 여기에 N,N'-다이사이클로헥실카보다이이미드(6.2 mg, 0.03 mmol) 및 4-다이메틸아미노피리딘(2.4 mg, 0.02 mmol)를 가하였다. 반응혼합물을 실온에서 30분간 교반하였다.

[0121] 상기 반응혼합물에, P(G₁₁₃-co-BAG₂₁)(고분자 7) 70 mg가 DMF 1.5 mL에 용해된 용액을 가하였다. 실온에서 48시간 교반 후에, 불용성의 잔사를 여과하고 회전 증발기에서 용매를 제거하였다. 잔사를 탈이온수에 용해시켜 탈이온수에 대해 7일간 투석하고, 동결건조시켜, 로다민 B-접합된 고분자를 정량적으로 수득하였다.

[0122] 시험예 1: ¹³C-NMR 연속 측정(¹³C-NMR Kinetics)

[0123] 먼저 개시제를 제조하기 위해, 트리메틸올프로판(TMP)(20 mg, 0.204 mmol)와 포타슘에톡사이드(25 wt %, 23 μL, 0.082 mmol)를 둥근바닥 플라스크에 넣고 50℃의 아르곤 분위기 하에서 반응시켰다. 회전 증발기를 이용하여 과량의 메탄올을 제거하고, 결과물을 90℃의 진공 오븐에서 3시간 건조시켜 개시제의 백색 염을 얻었다.

[0124] 4.0 mL의 바이알에 G (0.151 g, 2.04 mmol) 및 BBAG (0.500 g, 2.04 mmol)를 넣고 얼음수조에서 교반하여 모노머 혼합물을 제조하고, 여기에 상기 제조한 개시제를 첨가하였다. 반응혼합물을 아르곤 분위기 하의 통상적인 NMR 튜브로 옮기고 밀봉하였다.

[0125] ¹³C-NMR 분광법을 이용한 연속 측정을 수행하여 기록하였다(600 MHz VNMRs system, 5 mm PFG AutoXDB, 무용매 조건). 일반적인 ¹³C-NMR 연속 측정 실험은 64차례의 스캔으로 구성되고, 각 스캔은 13.7 μs 90° 펄스, 스펙트럼 폭 1894 Hz, 및 리사이클 지연 10초의 조건으로 수행된다. 본 발명에서는 총 43차례의 측정을 12시간 동안 수행하였다(플립 각도 45°, inverse gated decoupling).

[0126] 시험예 2: 공중합체의 제타전위 분석

[0127] 상기 실시예 2-1 내지 2-7에서 제조된 각각의 고분자 1 내지 7에 대해서, 상기 실시예 3의 방법에 따라 탈보호시킨 후, 제타 전위 및 유리전이온도(Tg)를 측정하여 하기 표 2에 정리하였다.

표 2

고분자 No.	고분자 조성 (목표)	고분자 조성 (NMR)		Tg (°C) (DSC)		제타전위 (mV)
		탈보호 이전	탈보호 이후	탈보호 이전	탈보호 이후	
1	P(G ₅₇ -co-BBAG ₃)	P(G ₅₆ -co-BBAG ₂)	P(G ₅₆ -co-BAG ₂)	-31.8	-18.7	24.4±0.7
2	P(G ₅₂ -co-BBAG ₆)	P(G ₆₁ -co-BBAG ₈)	P(G ₆₁ -co-BAG ₈)	-39.5	-25.1	27.7±1.5
3	P(G ₁₁₄ -co-BBAG ₆)	P(G ₁₂₅ -co-BBAG ₅)	P(G ₁₂₅ -co-BAG ₅)	-52.7	-30.9	24.0±2.2
4	P(G ₁₀₀ -co-BBAG ₁₀)	P(G ₁₀₀ -co-BBAG ₈)	P(G ₁₀₀ -co-BAG ₈)	-39.2	-26.0	25.9±5.3
5	P(G ₂₂₈ -co-BBAG ₁₂)	P(G ₁₄₉ -co-BBAG ₁₁)	P(G ₁₄₉ -co-BAG ₁₁)	-34.5	-7.1	34.9±1.1
6	P(G ₂₀₀ -co-BBAG ₂₂)	P(G ₁₇₀ -co-BBAG ₁₆)	P(G ₁₇₀ -co-BAG ₁₆)	-33.2	-22.9	25.5±2.0
7	P(G ₁₀₀ -co-BBAG ₂₅)	P(G ₁₁₃ -co-BBAG ₂₁)	P(G ₁₁₃ -co-BAG ₂₁)	-33.2	-5.6	31.3±3.1

[0130] **시험예 3: 분지도의 계산**

[0131] 하기 표 3의 ^{13}C -NMR의 상대 적분값을 이용하여, 공중합체의 분지도(degree of branching, DB)를 AB/AB_2 식에 따라 계산하였다.

[0132] [수학식 4]

$$DB_{\text{AB}/\text{AB}_2} = \frac{2D}{2D + \sum L}$$

[0133]

[0134] [수학식 5]

$$DB_{\text{고분자5}} = \frac{\{2 \times (3.19 + 6.13)\}}{\{2 \times (3.19 + 6.13) + (1 + 4.22 + 5.54)\}} = 0.63$$

[0135]

[0136] [수학식 6]

$$DB_{\text{고분자7}} = \frac{\{2 \times (3.53 + 8.42)\}}{\{2 \times (3.53 + 8.42) + (1 + 4.80 + 13.07)\}} = 0.56$$

[0137]

표 3

영역	화학적이동 (ppm)	상대 적분값	
		고분자 5	고분자 7
L_{13}	80.0-81.5	1.00	1.00
D	78.0-78.5	3.19	3.53
L_{14}	73.0-73.5	4.22	4.80
D	70.5-71.0	6.13	8.42
말단	68.7-69.2	2.60	5.13
L_{14}	69.2-69.5	5.54	13.7

[0138]

[0139]

[0140] **시험예 4: 세포독성 분석**

[0141] 쥐린 대식세포(murine macrophage) 세포주인 RAW264.7를 한국세포주은행(서울, 한국)에서 구입하였다. 세포독성 분석은 일반적인 MTT 분석법에 의해 수행되었다.

[0142] 먼저, 세포를 24-웰 플레이트에 1×10^5 세포/웰의 밀도로 접종하고, 5% CO_2 및 37°C 의 조건에서 24시간 배양하였다. RAW264.7 세포를 10% 소태아혈청(FBS) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM, Hyclone)에서 배양하였다. 배지를 제거한 후에, 세포를 인산완충식염수(PBS)로 세척하였다. 각 세포를 다양한 농도의 P(G-co-BAG) 용액(고분자 3, 6 및 7)으로 처리하고 18시간 추가 배양하였다.

[0143] MTT 분석에서, 각 웰을 PBS로 세척하고, 60 μL 의 MTT(thiazolyl blue tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich사) 용액(5.0 mg/mL) 및 940 μL 의 새 배지로 채웠다. 3시간 배양 후에, 1.0 μL 의 DMSO를 웰에 가하여 MTT-포르마잔을 용해시키고 이후 플레이트를 실온에서 15분간 천천히 흔들어주었다. 100 μL 의 각 샘플을 96-웰 플레이트에 옮기고 620 nm를 참조파장으로 하여 각 용액에 대해 540 nm 파장에서의 흡광도를 측정하였다.

[0144] **시험예 5: 세포내 유입**

[0145] HEK-293T 세포를 이용하여 로다민 B-접합된 고분자의 세포내 유입을 시험하였다. 세포를 24-웰 조직 배양 플레이트 내의 커버글라스 상에 1×10^5 세포/웰의 밀도로 접종하여 24시간 배양하였다. 초기 세포 배양 후에, 로다

민 B-접합된 고분자(고분자 7)를 물(0.50 mg/mL)에 용해시키고 각 웰에 가한 뒤, 37°C에서 24 시간 동안 추가로 배양하였다. PBS(pH 7.4)로 세척한 뒤, 4'6-다이아미디노-2-페닐인돌(DAPI, Sigma-Aldrich)(MEM 배지 중 20 mg/mL)을 37°C에서 배양하였다. 30분간 배양 후에, 세포를 상온에서 4% 폼알데하이드로 고정시켰다. 공초점 현미경(Olympus FV1000, 405, 473, 559 nm 레이저, 형광 검출 채널)을 이용하여 CLSM 이미지를 얻었다.

[0146] 시험 결과 및 분석

[0147] 앞서의 실시예 1에서는, BBAG 모노머를 도 1의 (a)에 나타낸 것과 같은 방식으로 합성하였다. 먼저, 4-아미노-1-부탄올을 다이-*t*-부틸 다이카보네이트(Boc₂O) 및 트라이에틸아민(TEA)의 다이클로로메탄(CH₂Cl₂) 용액을 이용하여 보호시켜 *t*-부틸 N-(4-하이드록시부틸)카바메이트를 제조하였다. 수득한 중간체를 에피클로로히드린과 반응시켜 Boc-보호된 부탄올아민글리시딜에테르(BBAG) 모노머, 즉 *t*-부틸 4-(옥시란-2-일메톡시)부틸카바메이트를 얻었다. 이후 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, HMQC, DEPT 분광법 및 ESI-MS와 같은 다양한 특성 분석을 통해, BBAG 모노머가 성공적으로 합성되었음을 확인하였다(도 2 및 도 8 내지 11 참조).

[0148] 이후 실시예 2-1 내지 2-7에서는, BBAG 모노머를 이용하여 트라이메틸올프로판(TMP) 및 포타슘 메톡사이드 용액의 반응에 의해 합성된 포타슘 알콕사이드 개시제를 이용한 음이온 개환 다중분지 중합 반응을 수행하였다. 즉, G 및 BBAG 모노머의 혼합물을 탈보호된 TMP 개시제에 서서히 가하고, 90°C에서 17시간 공중합시켜 고분자를 합성하였으며, 이때 모노머/개시제 비율을 변화시켜 공중합체의 분자량을 조절하고, BBAG/G 모노머 비율을 변화시켜 공중합체 내의 BBAG 도입량을 조절하였다.

[0149] 이와 같이 제조된 P(G-co-BBAG) 공중합체에 대하여, ¹H-NMR 및 GPC에 의해 분석하였다(도 2, 도 13, 도 14 및 표 1 참조).

[0150] 도 2에서 보듯이, ¹H-NMR 스펙트럼에서 BBAG 모노머 및 중합된 고분자에 대응하는 특징적인 양자 피크가 나타났다. 특히, Mn 값을 TMP 개시제의 메틸기 및 메틸렌기(각각 0.8 및 1.3 ppm의 피크) 및 폴리에테르 골격(3.3~3.8 ppm의 피크) 간의 피크 적분값 비에 의해 계산되었다(앞서 기재된 계산방법 참조). 또한, 개시제 및 폴리에테르 골격의 피크 대비 현저히 강한 BBAG 상의 *t*-부틸기의 양자 피크(1.36 ppm)를 적분함으로써 P(G-co-BBAG) 공중합체 내 BBAG의 도입량을 계산하였다. 그 결과, 전반적으로 ¹H-NMR 결과값이 목표 분자량에 근접한 것으로 나타났다.

[0151] ¹³C-NMR 스펙트럼의 분석을 통해 분지도(DB)를 계산하여 P(G-co-BBAG) 공중합체의 고차분지 특성을 확인하였다(도 15, 16 및 표 3 참조). 측정된 DB는 AB-타입의 선형(BBAG 블록) 및 AB₂-타입의 분지형(G 블록) 세그먼트로 구성된 PG 골격 내의 분지형 덴드리머 영역의 비율을 의미한다. 고분자 5 및 7의 DB는 약 0.63 및 0.56으로 각각 측정되었고, 이는 기존에 알려진 고차분지형 구조로부터 측정된 값에 대체로 부합하였다.

[0152] 또한 GPC 결과, 단분산으로 제어된 분자량을 나타내었다(표 1 및 도 17 참조). 폴리스타이렌을 표준물질로 하여 GPC로부터 계산된 공중합체의 Mn은 6800~12600이었으며 다분산지수(Mw/Mn)는 1.2~1.6로 측정되었다. ¹H-NMR 및 GPC로부터 계산된 분자량 간에 차이를 가지는 것은, 수력학(hydrodynamic)적인 고분자 전체 반경에 영향을 주지 않는 구상의 고차분지 구조 및 다중 하이드록실 관능기의 존재 때문인 것으로 보인다. 또한, 분자량 참조 물질로서 선형의 폴리스타이렌을 사용하는 것도 편차를 발생시킨 원인일 수 있다.

[0153] Boc-보호된 공중합체를 트라이플루오로아세트산(TFA)으로 1시간 처리하여 P(G-co-BAG) 공중합체를 얻었다. ¹H-NMR 스펙트럼의 1.34 ppm에서 강한 *t*-부틸기가 사라지는 것을 통해 Boc 잔기의 제거를 명확히 확인할 수 있다(도 2의 (c) 참조). 또한, ¹³C-NMR 분석을 통해서도 Boc기의 제거를 확인할 수 있다(도 18 참조). 이들 광학 분석 외에도, 간단한 닐하이드린(ninhydrin) 분석에 의해 1차 아민기의 생성을 확인할 수 있었다. Boc-보호된 고분자를 트라이플루오로아세트산(TFA)로 1시간 처리하여 P(G-co-BAG) 공중합체를 얻었다. P(G-co-BBAG) 공중합체 및 탈보호된 P(G-co-BAG) 공중합체를 메탄올, DMSO 및 DMF와 같은 극성 유기 용매에 녹였다. P(G-co-BBAG) 공중합체도 물에 대체로 녹았지만, 탈보호된 P(G-co-BAG) 공중합체는 물에 특히 잘 녹았다(도 14 참조).

[0154] GPC에 의해 1차 아민을 갖는 고분자를 분석하는 것은 아민기와 GPC 컬럼 간의 강한 상호작용에 의해 더욱 어렵

다. 그러나 아민기를 아세틸화하여 탈보호 후의 특성을 분석할 수 있다. 예를 들어, 고분자 7을 과량의 아세트산무수물로 처리한 후 GPC 분석한 결과 1.15의 매우 좁은 다분산지수(Mw/Mn)를 나타내었고, 이로부터 중합 이후에 작용기가 성공적으로 형성되었음을 확인할 수 있다(도 19 참조).

[0155] 앞서 수행한 공중합체의 합성 경로에 따라, BBAG 모노머의 단일중합을 추가로 시도하였으나, 수득한 BBAG의 단일중합체는 침전물로 회수한 후에도 통상의 용매(즉, 클로로폼, 다이클로로메탄, THF, 다이옥산, 에틸아세테이트, 메탄올, 에탄올, DME, DMSO, DMF, 클로로벤젠, 및 트라이클로로벤젠)에 용해되지 않아서 단일 중합체의 구조 분석이 제한되었다. 불용성의 침전물은 TFA로 처리한 후에도 용해되지 않았으며, 이는 BBAG 모노머의 단일중합 중에 가교가 발생하였기 때문으로 추측된다. 아울러, t-부틸 4-메톡시부틸카바메이트를 이용하여 강한 염기와 높은 온도 하에서 수행되는 반응은 Boc기의 탈보호를 발생시킬 여지가 있다. 특히 이와 같은 중합 조건 하에서 5% 미만으로 탈보호가 일어난다고 하더라도, 강염기와 높은 온도 하에서는 더 증가할 수 있다. 그러나, G 모노머와 공중합 시에는, G 모노머에 대비한 BBAG 모노머의 양이 5~20% 정도로 적기 때문에 Boc기에서 발생하는 부반응이 현저히 감소될 수 있다. 이는 TMP 개시제와 관련된 폴리에테르 골격과 Boc 피크와 같은 2개의 내부 피크 NMR 적분값을 관찰한 결과로도, 공중합 과정에서 Boc기가 탈보호될 우려가 없음을 확인할 수 있다.

[0156] 상기 시험예 1에서는 BBAG 모노머와 다른 모노머와의 공중합 과정을 관찰하였다. 2 종의 모노머가 공중합되는 과정을 관찰하기 위해, Frey 등에 의해 보고된 최신 방식에 따라 *in situ* ^{13}C -MR 과정을 측정하였다(도 3 참조). 특히, G 및 BBAG 모노머를 동등 몰 비율로 통상적인 75°C의 NMR 튜브 내에서 공중합하였다. 벌크 중합 과정에서, 풍부한 ^{13}C 동위원소로 인해 수 분 내에 정량적인 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 얻을 수 있었다. 2 종의 모노머가 소모되면서 중합이 진행되는 G 및 BBAG의 공중합 중에 얻은 일련의 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 도 3에 나타내었다. 소모된 모노머를 정량적으로 측정하기 위해, 2종의 에폭사이드 모노머에 존재하는 메틴(methine) 탄소의 공명 피크(G 및 BBAG에서 각각 54.9 및 53.2 ppm)를 공중합 과정에 관찰하였다. G 모노머는 매우 빠르게 사라져 75°C의 온도에서 초기 15분 후에도 소모량을 측정할 수 없었다. BBAG의 낮은 반응성은 BBAG 내의 긴 알킬렌 구조 때문에 다른 에폭사이드 모노머보다 개환 반응이 어렵기 때문인 것으로 보인다. 또한, BBAG 모노머로부터의 개환 생성물인 2차 알콕사이드 사슬 말단은, G 모노머의 빠른 양자 전달 반응에 기인한 1차 알콜보다 훨씬 안정성이 낮다. 그러므로, G 모노머로부터 생성된 보다 안정한 알콕사이드 사슬 말단은 역반응이 억제되므로 G 모노머의 변환율을 증가시킬 수 있다.

[0157] 모노머의 공중합 과정에서 총 모노머 변환율에 대비한 G 및 BBAG 각각의 모노머 변환율의 그래프를 도 4에 나타내었다. ^{13}C -NMR에서의 모노머 변환율은 처음에 0%이었으며, 중합 중에 일정하게 유지된 Boc-보호된 그룹의 신호에 대비한 각 모노머의 메틴기의 적분값을 계산하여 모노머 변환율을 얻었다. 도 4에서 보듯이, 초기 단계에서 고분자 사슬 내의 BBAG 단위의 몰 비율은 투입된 모노머보다 현저히 낮았고, 반응의 마지막 단계 무렵에 G 모노머의 소모가 급격히 증가하였다. 예를 들어, G 및 BBAG의 모노머 변환율은 각각 78% 및 19%이었다. 따라서, P(G-co-BBAG)의 공중합 과정에서 모노머 변환율에는 차이가 있다. 그러나, 상기 공중합은 일괄 중합방식으로 수행되었기 때문에, 공중합 과정에서 2종의 모노머 간의 변환율 차이가 발생할 수 밖에 없었던 것으로 보인다. 이와는 달리, 장시간 천천히 모노머를 용액에 첨가하는 방식으로 진행되는 실제 공중합 절차에서는 이와 같은 변환율 차이를 현저히 완화시킬 수 있을 것으로 예상된다. 이에 따라 공중합 과정의 변환율 문제는 해결될 수 있고, 사슬 말단에는 알콜(G 모노머 유래)과 아민(BBAG 모노머 유래)이 적절히 조합되어 형성될 것이다.

[0158] 공중합체 골격 내에 G 및 BAG 모노머의 도입 및 Boc기의 탈보호를 확인하기 위해 MALDI-ToF 분광법을 수행하였다(도 5 참조). 또한, P(G-co-BAG) 공중합체 내의 자유 아민기를 GPC에 의해 분석하였다. P(G-co-BAG) 공중합체 내의 관능성 모노머의 세그먼트의 존재를 도 5에 나타난 피크로부터 알 수 있었다. 예를 들어, 신호 간 거리는 다양한 비율로 공중합체 내에 도입된 각각의 모노머들의 질량의 단순 합에 대응하고, 이는 P(G-co-BAG) 공중합체의 공중합 및 탈보호가 이루어졌음을 명확히 보여준다.

[0159] 상기 시험예 2에서는 탈보호를 거쳐 자유 아민기가 고분자 내로 도입된 고분자에 대해, 제타 전위 측정에 의해 전하 밀도를 평가하였다. 예상과 같이, P(G-co-BAG) 공중합체는 24.4 mV와 34.9 mV 사이의 높은 양전하를 나타내었고, 이는 DNA 및 siRNA 운반체로서 유용함을 의미한다. 일반적으로 P(G-co-BAG) 내의 높은 아민 작용기의 양은 높은 제타 전위를 유도한다.

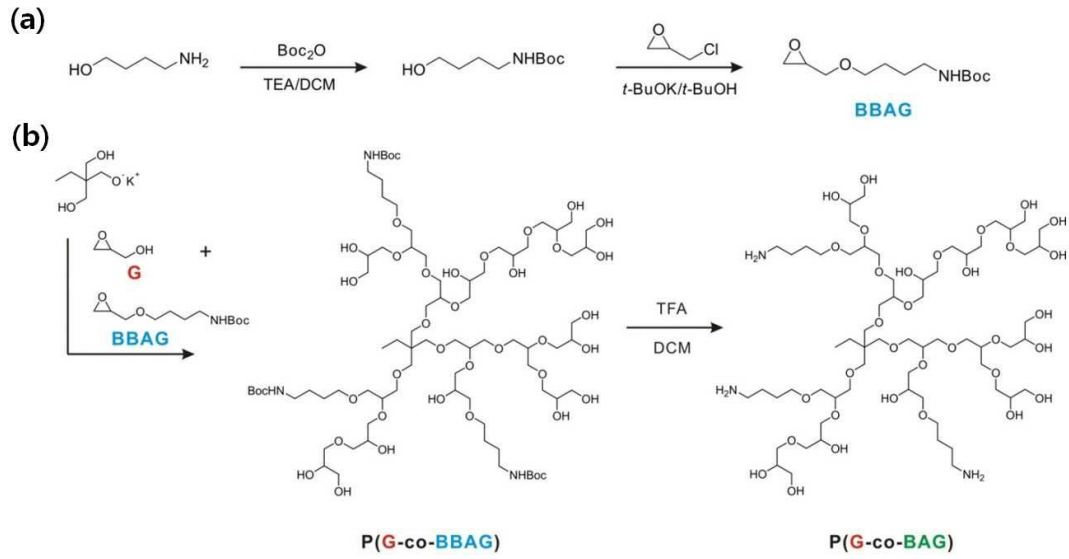
[0160] 또한, 시차주사열량법(DSC)에 의해 공중합체의 열적 특성 및 미세 구조를 측정하였다. 그 결과 P(G-co-BBAG) 공중합체의 유리전이온도(T_g)는 탈보호에 의해 -52.7°C 내지 -31.8°C의 범위에서 -30.9°C 내지 -5.6°C의 범위로 증가하여 P(G-co-BAG) 공중합체로 형성되었다. 공중합체의 T_g 는 BAG 함량 증가에 따라 그리고 분자량 감소에

따라 증가하였다. 이전에 알려진 순수한 PG의 Tg와 비교하여(PG₇₅: -27.2℃ 및 PG₁₅₀: -32.2℃), 고차분지형 공중합체의 Tg 값은 BAG에 의한 추가적인 분자간 상호작용에 의해 변화되었다. 또한, DSC 곡선에서 공중합체의 단일 Tg가 나타남으로써 공중합 모노머들 간에 상 분리 없이 성공적인 공중합이 이루어졌음을 알 수 있다.

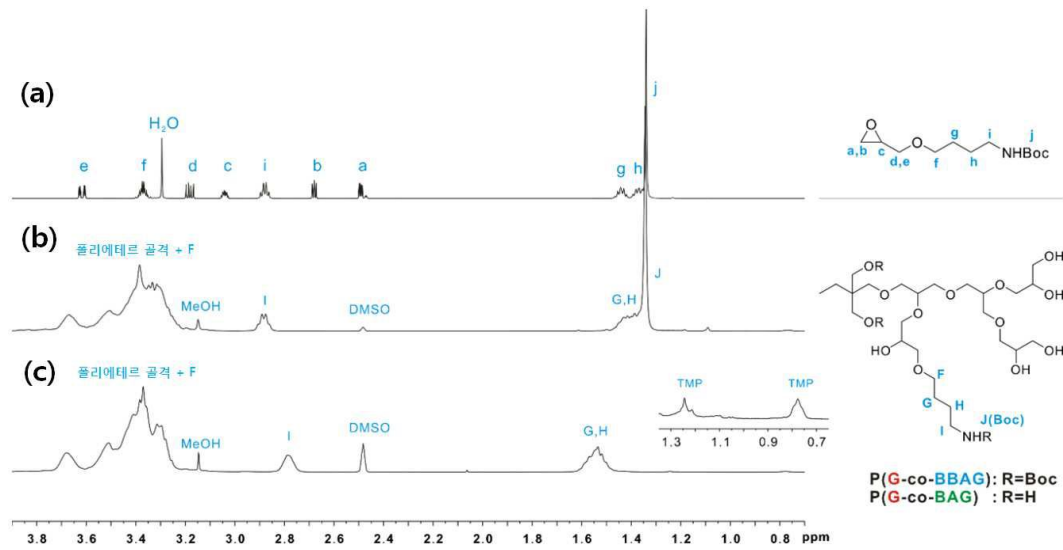
- [0161] 상기 시험예 3에서는 활성 아민기를 갖는 P(G-co-BAG) 공중합체에 대해 생의학 분야로의 적용을 위한 세포독성을 평가하였다. 서로 다른 아민 함량의 3개의 고분자(즉 아민 함량이 각각 3.8%, 8.6%, 및 15.7%인 고분자 3, 6 및 7)를 정상 세포 모델로서 뮤린 대식세포(murine macrophage) 세포주인 RAW264.7에 처리하였다. 각 고분자들의 세포독성을 미토콘드리아의 탈수소효소 활성화에 기반한 MTT 분석을 이용하여 시험하였다. 도 6의 (a)에서 보듯이, 다양한 농도의 고분자 용액으로 처리된 각각의 세포주들은, 일반적인 시험 농도 범위를 넘어서는 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 초과 농도에서도, 95% 초과 세포 생존율을 나타내었다. 많은 폴리아민들이 자유 아민기와 세포 간의 단단한 결합에 의해 심각한 세포독성을 나타내에도 불구하고, 본 발명의 P(G-co-BAG) 공중합체는 상대적으로 낮은 세포독성을 나타내었고, 이는 아민기가 고차분지형 PG의 셀에 은폐되어 보호됨으로써 세포 생존률이 향상되기 때문이다.
- [0162] 고차분지형의 PG 골격 내에 은폐된 아민 기의 용이한 도입은 다른 유기 또는 생물학적 분자와의 개질을 위한 플랫폼으로서 유용성을 제공할 수 있다. 이러한 목적을 위해, P(G-co-BAG) 공중합체 내의 자유 아민기를 더 기능화할 수 있고, 예를 들어 염료인 로다민과 접합하여 카보다이이미드 중간체를 거쳐 로다민 B-접합된 P(G-co-BAG) 공중합체를 얻을 수 있다.
- [0163] 제조 이후에는, 이의 세포내 유입을 공초점주사레이저현미경(CLSM)에 의해 관찰하였다. 세포 핵 염색에는 DAPI를 사용하였다. 도 6의 (b)에서 보듯이, 핵 주변 세포질 영역에 위치하는 P(G₁₁₃-co-BAG₂₁)로부터 뺀어나온 로다민 B-접합된 공중합체 줄기의 붉은 형광이 관찰되었으나, 세포 핵 내에서는 관찰되지 않았다.
- [0164] 상기 결과는 고차분지형 P(G-co-BAG)의 세포내 유입이 세포내 섭취(endocytosis)에 의한 것임을 의미한다. 이와 같은 세포 분석 결과를 통해 접합 화학 분야에의 유용성을 알 수 있으므로, 본 발명의 아민 잔기를 갖는 고차분지형 P(G-co-BAG) 공중합체는 생물학 및 생의학 분야에서의 강력한 플랫폼으로 사용될 수 있다.
- [0165] 이상의 실시예 및 시험예의 결과에 따르면, 신규의 글리시딜아민계 모노머를 사용하여 아민 작용기를 갖는 고차분지형 PG를 원포트(one-pot) 합성 방법에 의해 제조할 수 있었다. 구체적으로, Boc-보호된 부탄올아민글리시딜에테르(BBAG) 모노머를 사용하여 음이온 개환 다분지형 중합을 통해 글리시돌(G)로 중합시켜, 제어된 분자량(4800-16700 g/mol) 및 상대적으로 낮은 분자량 분포(1.2-1.6)를 갖는 고차분지형 P(G-co-BBAG)를 제조할 수 있었다. 또한, 공중합 이후에 탈보호시키는 공정에 의해 1차 아민 잔기를 원하는 비율(일반적으로 5-20% 모노머 비율)로 고차분지형 PG 골격에 도입할 수 있으며, 그 결과 PG에 다양한 전하 밀도 및 작용기를 도입할 수 있었다.
- [0166] 이와 같은 중합 과정이 ¹H-NMR 및 GPC에 의해 분석되었고, 두 종의 모노머(G와 BBAG) 간의 공중합 과정이 in situ ¹³C-NMR 분석에 의해 관찰되었으며, 그 결과 상기 공중합 모노머들 간에 중합 속도의 차이를 나타내었다. 또한 탈보호된 P(G-co-BAG) 공중합체 내의 자유 아민기에 의해, 원하는 분자와 손쉽게 정량적인 비율로 접합할 수 있다.
- [0167] P(G-co-BAG)의 높은 제타 전위 및 생체적합성 분석(in vitro)의 결과와 기능성 분자들의 접합에 따른 효과를 고려할 때, 본원발명은 고차분지형 PG 내에 은폐된 자유 아민기를 이용하여 생접합(bioconjugation) 화학 분야에 높은 잠재성을 가질 수 있다. 세포생존시험(cell viability assay) 결과, P(G-co-BAG) 고분자는 기존의 다른 폴리아민들을 능가하는 현저히 높은 생체적합성을 나타내었다. 이와 같은 생체적합성 뿐만 아니라, 고차분지형 PG의 골격에 도입된 자유 아민기에 의한 손쉬운 접합성으로 인해, 고차분지형의 P(G-co-BAG) 공중합체는 진보된 생물학적/생의학 분야에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 예상된다.

도면

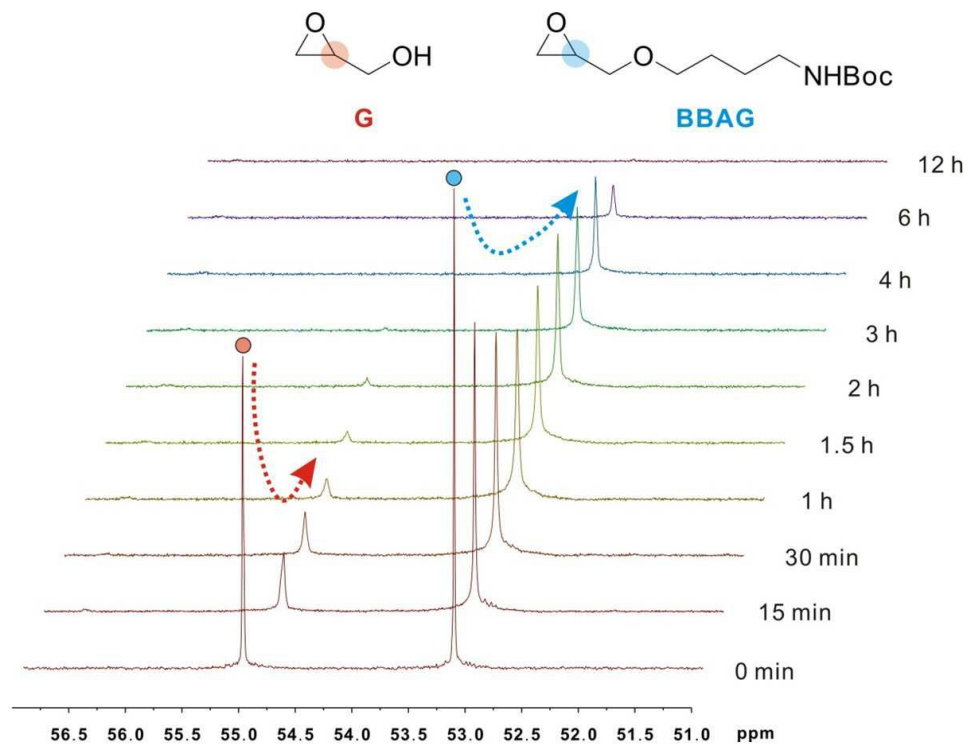
도면1



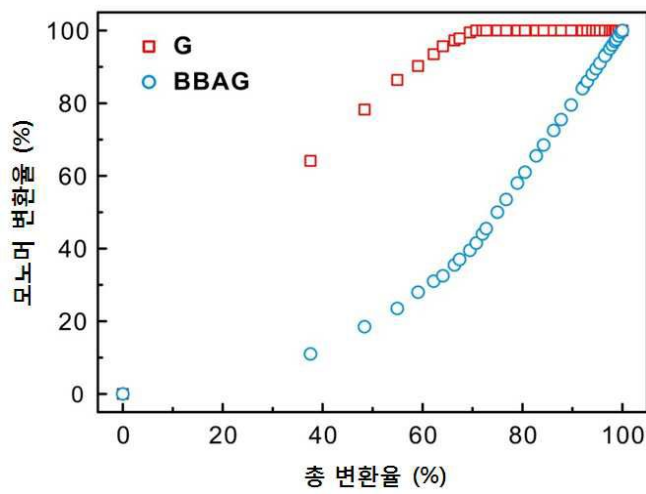
도면2



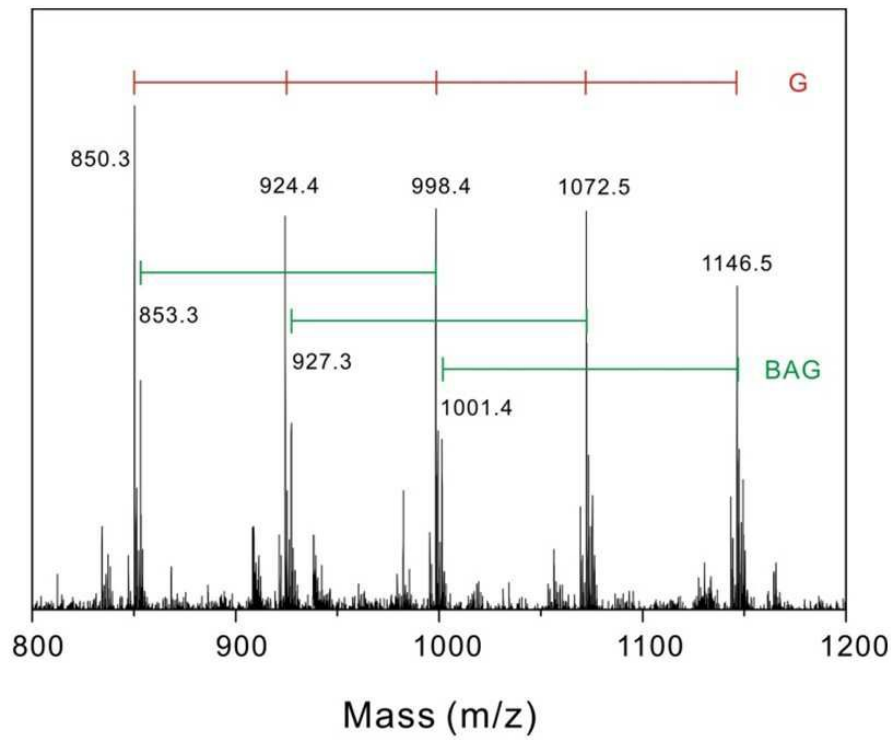
도면3



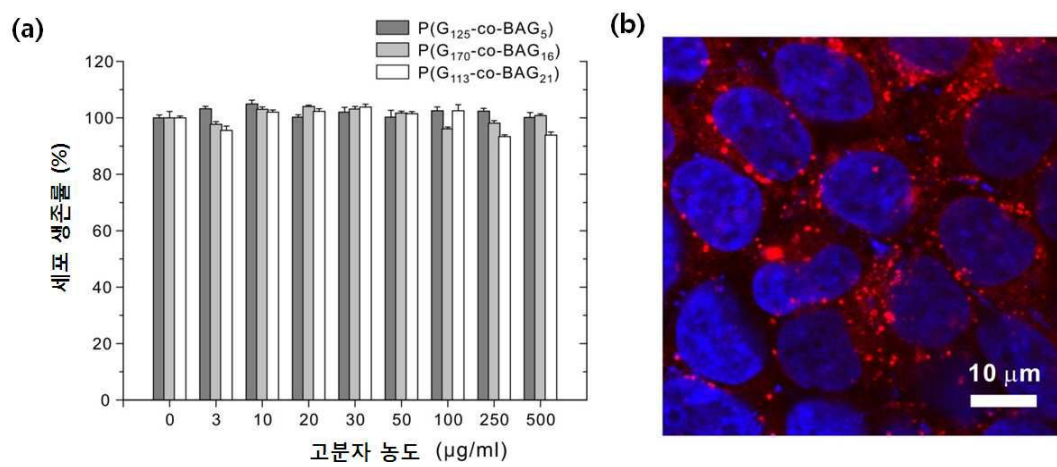
도면4



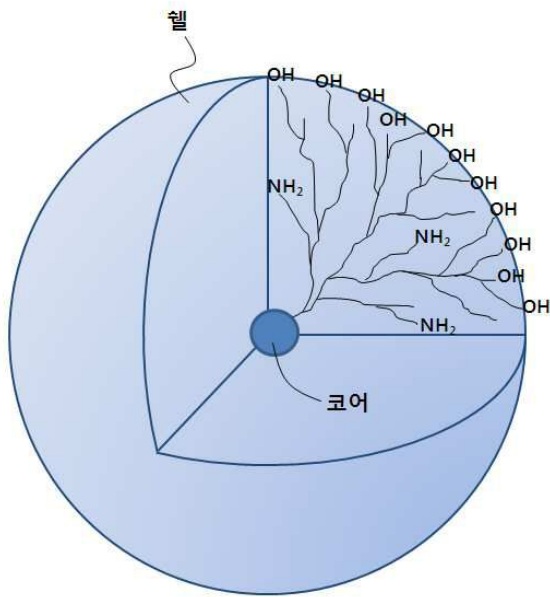
도면5



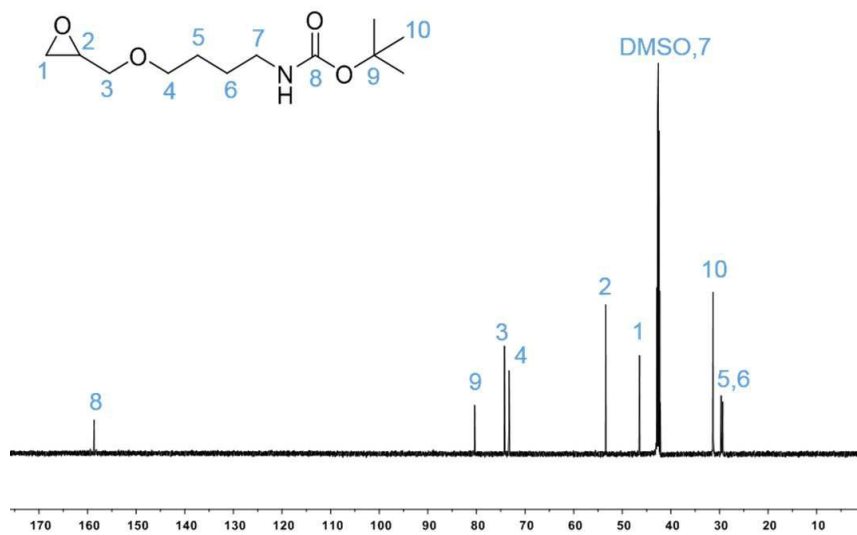
도면6



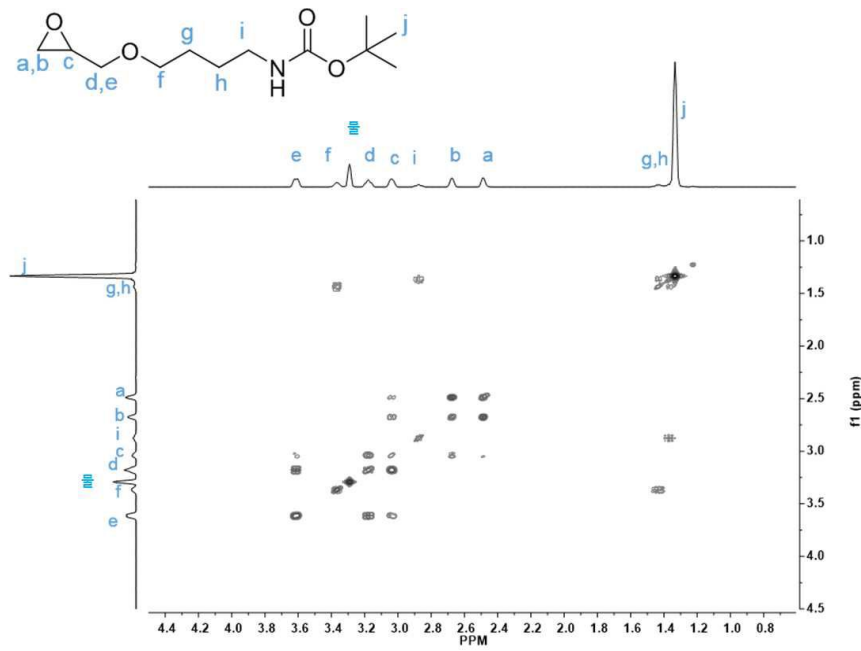
도면7



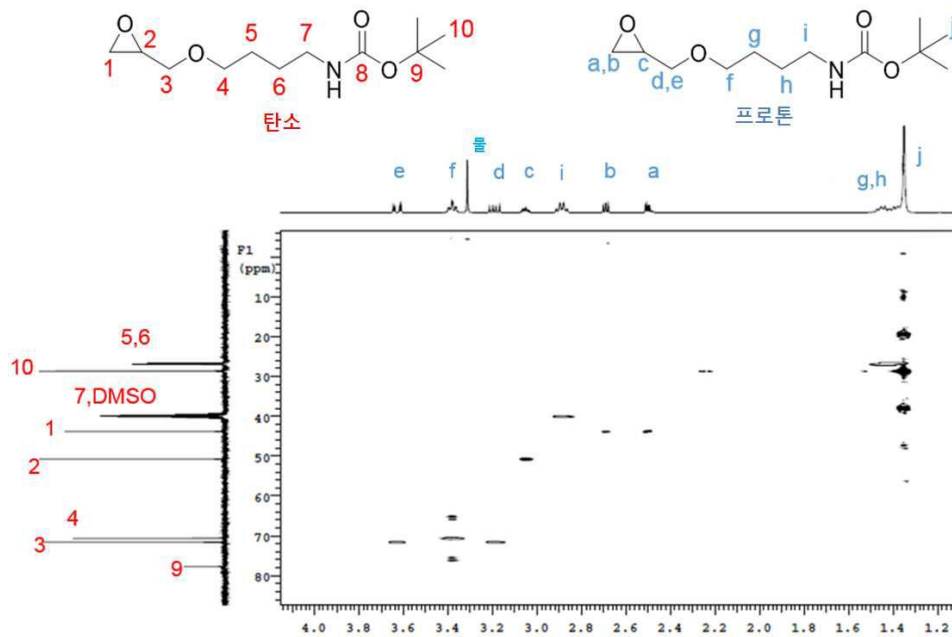
도면8



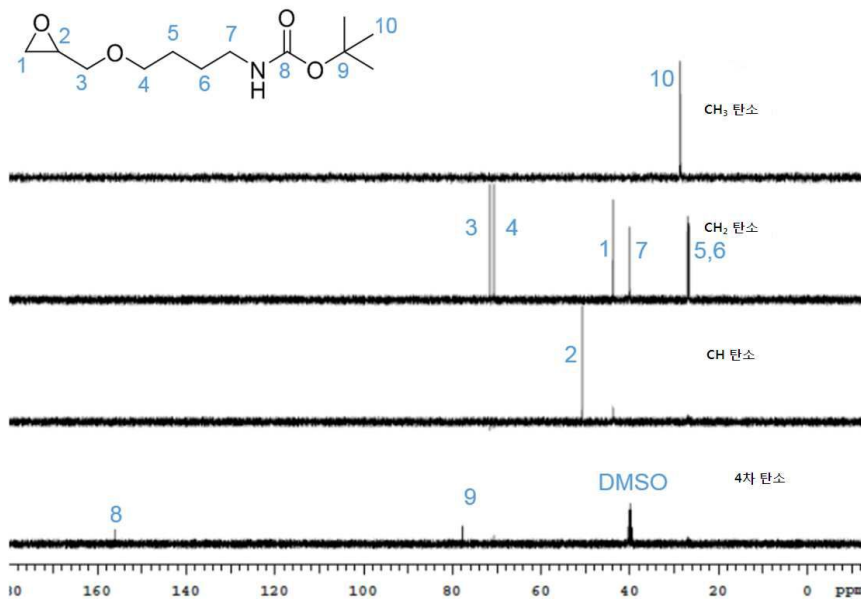
도면9



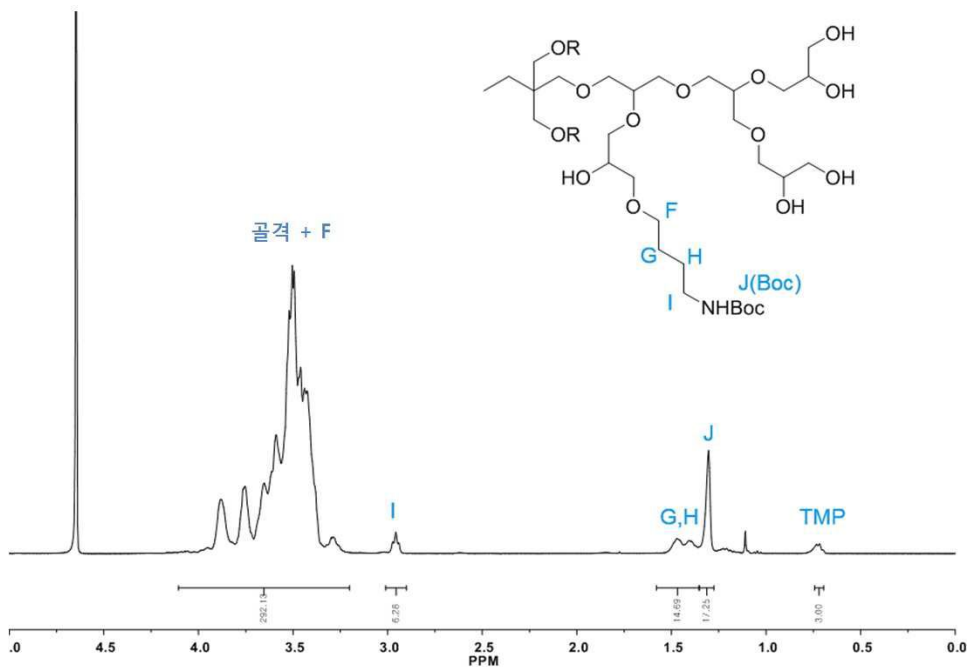
도면10



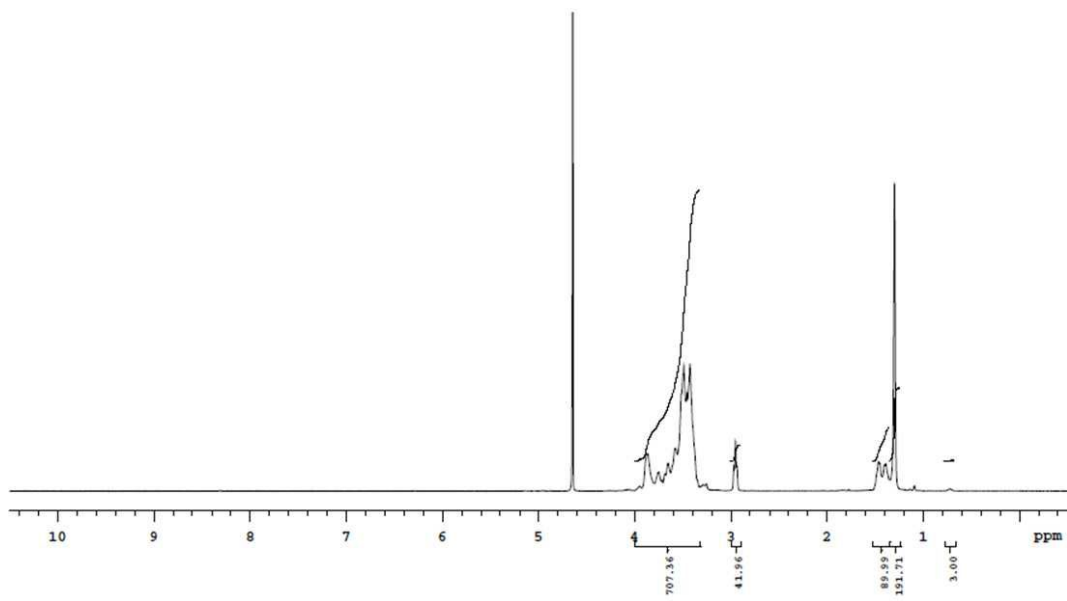
도면11



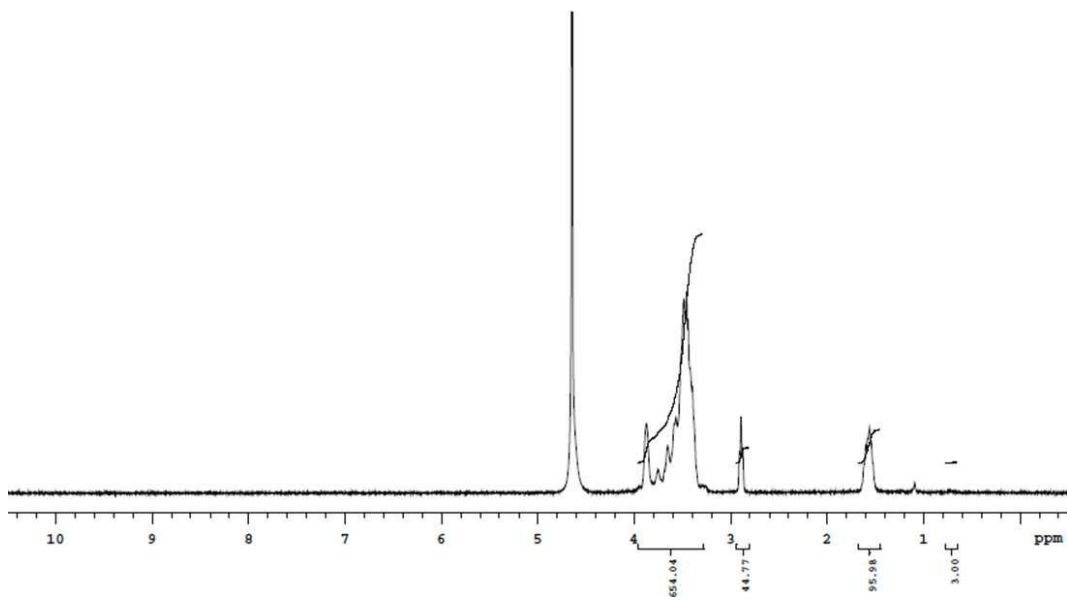
도면12



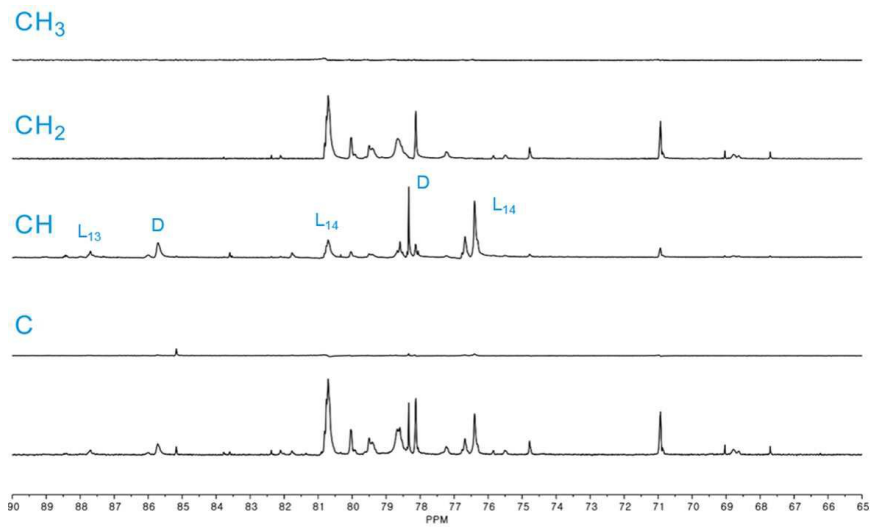
도면13



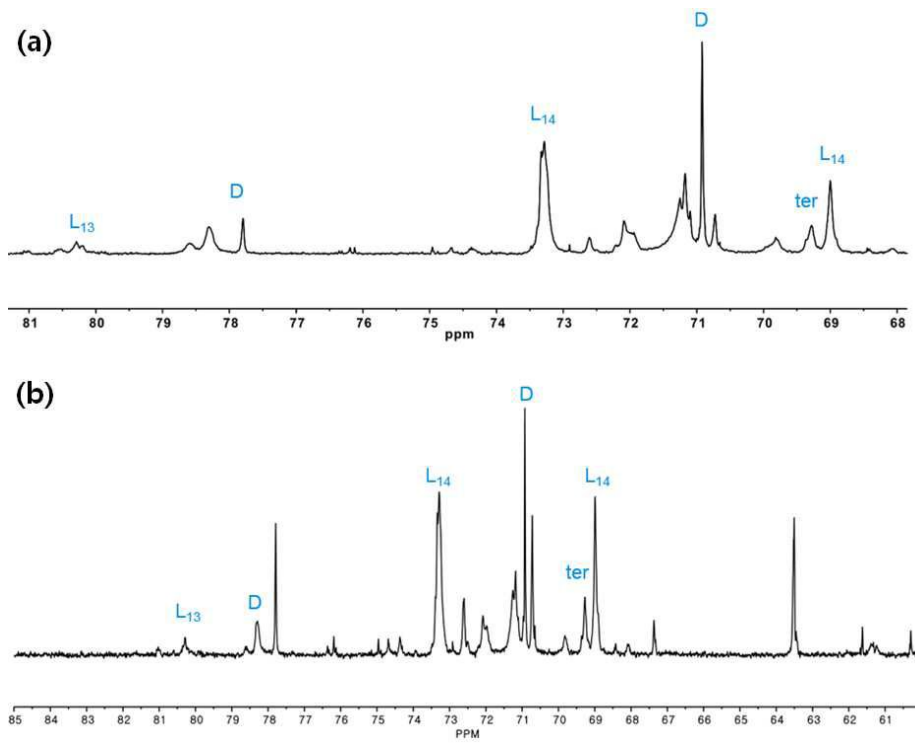
도면14



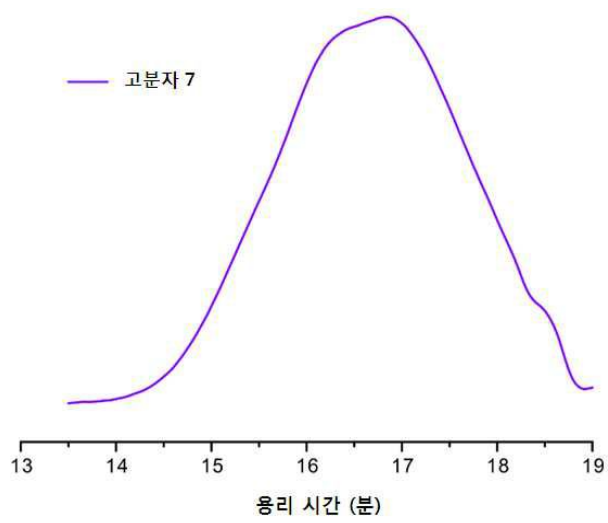
도면15



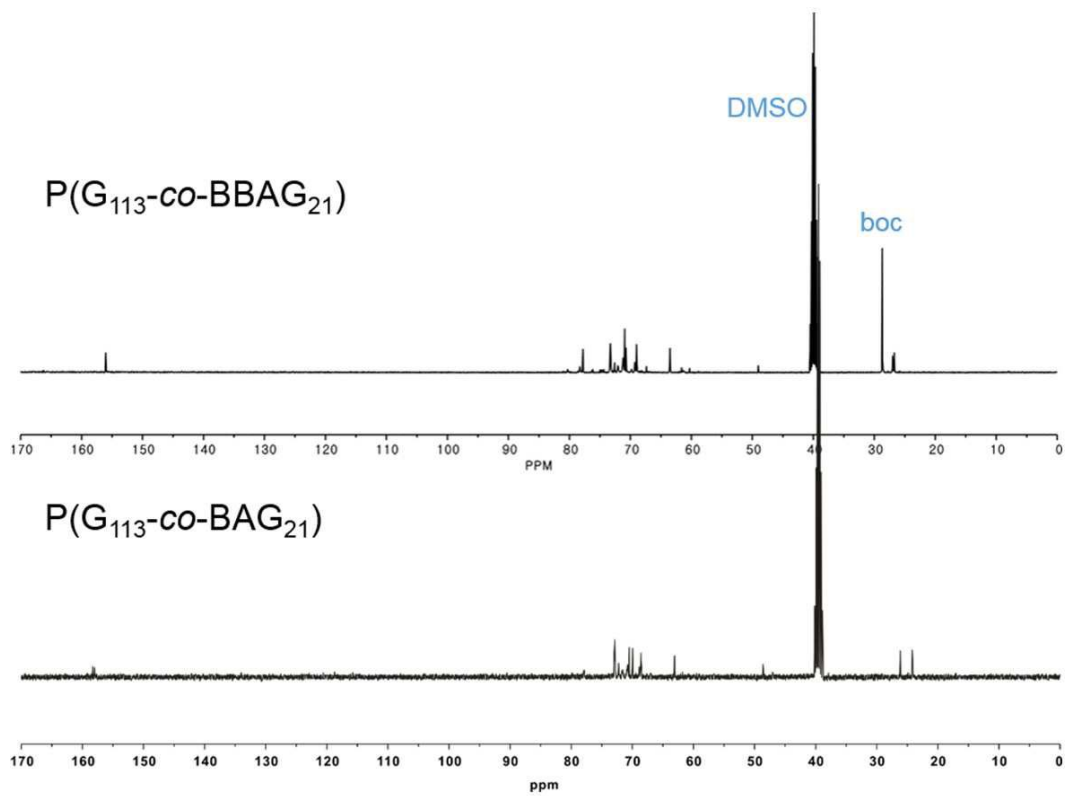
도면16



도면17



도면18



도면19

