

케토프로펜-폴리에틸렌글리콜 전구약물의 합성 및 가수분해

이세희 · 김희두 · 오승열[†]

숙명여자대학교 약학대학

(2002년 12월 14일 접수 · 2003년 3월 5일 승인)

Synthesis and Hydrolysis of Ketoprofen Prodrug Conjugated to Poly(Ethylene Glycol)

Se-hee Lee, Hee-doo Kim and Seaug-youl Oh[†]

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, 53-12 Chungpa-Dong 2ka Yongsan-Ku Seoul Korea

(Received December 14, 2002 · Accepted March 5, 2003)

ABSTRACT—The objective of this study is to prepare ketoprofen (KP) - poly(ethylene glycol) (PEG) conjugates and to investigate their degradation kinetics. KP-PEG conjugates were synthesized from KP and PEG methylester by esterification in the presence of DCC. The KP-PEG conjugates (KPEG) were characterized by IR and ¹H-NMR spectroscopy. The hydrolysis of KPEG with time was studied using HPLC by simultaneous quantification of KP and KPEG. The hydrolysis rate constant was high at low and high pHs, and showed minimum at pH 4 and 5. As the size of KPEG increases, hydrolysis rate increased. The slope of degradation rate profile suggests that catalytic reaction seems to occur by specific acid/base catalysis. These results suggest that KPEG could be used as a prodrug for KP, which releases KP slowly in the body.

Key words—Ketoprofen, Poly(ethylene glycol), Prodrug, Synthesis, Hydrolysis

비스테로이드성 소염진통제인 ketoprofen [3-benzoyl- α -methylbenzene-acetic acid] (Mw. 254.3)은 현재 중등도의 통증, 월경곤란증의 완화 및 급·만성 골관절염, 류마티스 관절염의 치료 등에 사용되고 있다. 경구투여 시 치료효과는 매우 크나 용해도가 낮고, 상복부의 통증, 위장관 점막의 궤양을 일으키는 단점이 있다. 특히 근·골격, 관절, 관절 주위, 연조직 부위 병변의 급작스러운 병세악화와 외과적 수술에 따른 통증의 완화에 근육주사로 투여되고 있으나 혈중 반감기가 짧아 (1.5-4 hr) 유효 혈중농도의 유지를 위해서는 50-100 mg을 최대 4시간 간격으로 투여하고 있다.¹⁾

이러한 단점을 개선하고 약물의 혈중 순환을 지속하기 위한 방법을 찾기 위한 다양한 연구가 이루어지고 있다. 이 중 약물과 고분자의 포함(conjugation)에 의한 방법은 체내에서의 약물의 동태를 최적화하여 약물의 방출을 제어하거나, 표적 기관과 조직에 약물을 선택적으로 송달하는 표적화 약물 전달시스템으로 많이 연구되고 있다.²⁾ Poly(ethylene glycol) (PEG)은 직선성의 polyetherdiol로서 생체적합성^{3,4)}이 있고 수용매와 유기 용매에 모두 용해되며 독성이 적은 고분자이다. 또한 매우 낮은 면역 반응성과 항원성을 가지며⁵⁾ 배설 속도가 좋아서⁶⁾ 약물 포함에 다양하게 이용 되는 고분자이

다. 본 연구에서는 용해도를 개선하고, 위장장애를 줄이며, 긴 혈중 순환시간을 가지는 KP의 전구약물을 개발하기 위해 KP에 3가지 분자량 ($M_n=750, 2000, 5000$)의 PEG를 포함시켜 중합체 전구약물(KPEG750, 2000, 5000)을 합성하였으며 IR 및 ¹H-NMR을 이용하여 구조를 확인하였다. 또한 이들 전구약물들이 체내에 투여 되면 가수분해에 의해 모약물로 전환되어 약효를 나타내기 때문에 본 연구에서는 여러 pH의 수용액 내에서 시간에 따른 가수분해 연구를 수행하였다.

실험방법

시약 및 기기

합성에 사용된 KP, 4-dimethylaminopyridine (4-DMAP)는 Sigma사 (St. Louis, MO, U.S.A.)에서, N,N-dicyclohexyl carbodiimide (DCC)는 ACROS사 (New Jersey, U.S.A.)에서, methylated poly(ethylene glycol) 750, 2000, 5000은 Aldrich사 (Milwaukee, WI, U.S.A.)에서 각각 구입하여 사용하였다. 분리에 사용된 용매인 methylene chloride, acetone, benzene, hexane, methanol, ethyl acetate는 덕산이화학 (Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. Column chromatography는 silica Gel 60 (230-400 Mesh, Labguard, U.S.A.)를 사용하였다. TLC는 TLC plates (general-purpose, with UV indicator)

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)710-9563, E-mail : syoh@sookmyung.ac.kr

를 Aldrich사 (Milwaukee, WI, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. Phosphate buffer 제조에 사용된 Na_2HPO_4 와 NaH_2PO_4 는 Katayama chemical사 (Kansai, Japan)에서, sodium azide는 Sigma 사 (St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였으며 ammonium phosphate buffer 제조에 사용된 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 는 덕산이화학 (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 실험에 사용된 증류수는 Nanopure ultrapure water system (Barnstead, Iowa, U.S.A.)을 사용하여 제조하였다. HPLC system은 Shimadzu CBM-10A system과 SIL-10A auto injector를 사용하였고 oven의 온도는 36°C 를 유지하였다. 컬럼은 Kromasil사 (Bohus, Sweden)의 KR100-10018 (4.6×250 mm)을 보호컬럼으로는 Waters사의 Guard-PakTM (Milford, MA, U.S.A.)을 사용하였고 시료 주입량은 $10 \mu\text{l}$ 로 하였다. 이동상으로는 acetonitrile과 0.05 M ammonium phosphate buffer (pH 3.0)를 42 : 58의 비율로 사용하였다. Flow rate은 1.6 ml/min 으로 하였고 검출은 UV를 이용하여 258 nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다. $^1\text{H-NMR}$ spectra는 Bruker-300 spectrometer (Karlsruhe, German)를 이용하여 tetramethylsilane을 내부표준물질로 사용하여 측정하였으며, chemical shift는 δ unit로, coupling constant는 Hz 단위로 나타내었다. IR spectra는 Jasco사의 FT/IR-430 (Hachioji, Japan)로 측정하였으며, frequency는 cm^{-1} 로 표시하였다.

KP-PEG 전구약물의 합성

KP, methylated PEG, DCC, 4-DMAP를 2:1:1.1:0.3 당량으로 하여 진공 상태에서 완전 건조 후 two-necked round bottomed flask에 미리 증류하여 무수상태로 한 methylene chloride를 용매로 하여 methylated PEG, DCC, 4-DMAP, KP 순으로 넣은 후 실온에서 6-8 시간 교반하였다. 반응의 초기에는 반응 속도를 늦추기 위하여 ice bath에서 반응을 진행하였다. 반응의 완결을 TLC를 이용하여 확인하고 glass filter를 이용하여 dicyclohexylurea (DCU)의 흰색 침전을 제거한 후 여액을 감압 농축하여 용매를 제거하고 잔사를 아세톤에 다시 녹인 후 여과하여 DCU를 완전히 제거하였다. 얻어진 반응물에서 4-DMAP와 반응이 안되고 남아있는 KP를 제거하기 위해 실리카겔을 이용해 column chromatography를 실시하여 순수한 KP-PEG 포함체 (KPEG)를 분리하였다. Column chromatography 시 이동상으로는 KPEG 750의 경우 5%의 methanol이 함유된 methylene chloride와 hexane : ethyl acetate=1 : 5인 용매를 15 : 1로 하였다. KPEG2000과 5000의 경우에는 9% methanol이 함유된 methylene chloride와 hexane : ethyl acetate=1 : 2인 용매

를 20 : 1로 하였다. 위의 용매를 이용하여 column chromatography를 실시하여 4-DMAP를 제거하고, 얻어진 KP와 KPEG의 혼합물을 hexane과 ethylacetate를 1 : 3으로 한 용매를 이용하여 재 column을 하였다. 극성이 낮은 KP이 먼저 용리되어 나오면, 용매를 methanol로 바꾸어 KPEG를 한꺼번에 용리시켰다. 용리된 KPEG에는 silicagel이 methanol에 용해되어 혼입되어 있을 수 있으므로 감압농축하여 용매를 제거하고 methylene chloride에 녹여 다시 여과하였다. 얻어진 KPEG액은 감압 농축하여 용매를 제거하고 freeze dryer를 이용해 48시간 동안 건조하였다. 모든 반응은 아르곤 가스 하에서 진행하였으며 모든 초자 기구들은 사용 전 flame-dry로 완전 건조하였다. 합성된 KPEG을 확인하기 위해 IR, $^1\text{H-NMR}$ 을 이용하였다.

KPEG의 가수분해 속도 연구

합성된 KPEG 내에 KP와 PEG가 1:1로 결합하였는지 확인하기 위하여 알칼리성 용매에서 KPEG (각각 5 mg)를 완전히 가수분해시키고 생성되는 KP의 양을 조사하였다. 2 N NaOH-ethanol (1:2, v/v) 용액에 일정량의 KPEG을 녹이고 실온에서 3시간 동안 교반하며 완전히 가수분해를 시켰다. 시료는 적정 농도로 희석한 후 HPLC로 정량하였다.⁷⁾ 0.1 M 인산염 완충액에서의 가수분해 속도 연구는 0.1 M 인산염 완충액을 pH 1부터 10 까지를 제조하여 사용하였다. 완충액에는 용액의 부패를 방지하기 위하여 0.2 g/L의 농도로 sodium azide를 넣어주었다. KPEG750, KPEG2000, KPEG 5000을 0.5 mM 농도로 각 pH의 인산염 완충액에 녹여 제조한 후 1.5 ml 용량의 eppendorf tube에 1.2 ml씩 넣고 항온배양기를 이용해 37°C 를 유지해주었다. 일정 시간 간격으로 시료를 취해 HPLC를 실시하였고 그 peak의 면적으로부터 생성된 KP를 정량하였다. 시료 채취시간은 예비실험을 통해 KPEG의 가수분해 정도가 약 10% 일어났을 때 마다의 시간 간격으로 정하였다. 모든 pH에서 가수분해 속도 연구는 KPEG의 피크가 나타나지 않을 때까지 행하였다.

결과 및 고찰

KPEG의 합성 및 확인

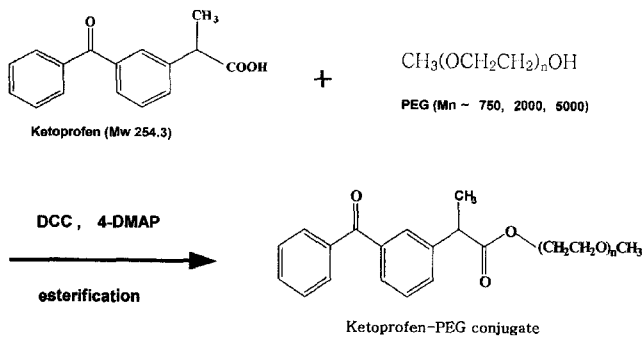
PEG는 두개의 수산화기를 가지고 있기 때문에 disubstituted products의 형성을 피하기 위해서 종종 많은 양의 PEG를 사용하는 방법이 사용되어졌다. 그러나 최종 화합물은 반응에 사용된 PEG와 극성이 유사하여 두 물질을 분리해 내기가 쉽지 않았다. Dal-Pozzo 등은 분자량이 1000 이하인 PEG의 경우 한 쪽의 hydroxyl group을 protection 하

기 위해 trityl group을 사용하기도 하였다.⁸⁾ 분자량이 1000 이상인 PEG의 경우 수산화기 한 쪽이 약물과 포함된 PEG와의 물리적 특성이 거의 흡사하기 때문에 모든 PEG에 KP를 포함시키기 위해 PEG에 포함되는 약물을 과도한 양으로 사용한다. 이때 반응 후 남은 PEG의 양은 줄일 수 있지만 PEG 양쪽의 수산화기에 약물이 모두 치환된 반응물 뿐만 아니라 부 반응물이 생성되는 위험이 있다. 한 예로 2-benzoxazolone-3-yl-acetic acid (BOAA)의 에스테르화 시 과량의 BOAA를 사용하였을 때 부 반응물인 N-acylurea 유도체가 합성되었다.⁹⁾ 또한 PEG를 과량으로 사용하였을 경우, 반응으로부터 얻은 화합물과 PEG를 분리해내는데 HPLC를 사용하였기 때문에 대량으로 반응을 진행하기에는 적합하지 않았다. 이 같은 단점들을 피하기 위해 본 실험에서는 부반응을 억제하고 순수하게 한쪽만 약물로 치환된 KPEG을 얻기 위하여 PEG의 한 쪽 수산화기가 methyl 기로 치환된 methylated PEG를 사용하였으며, PEG와 최종 합성물의 극성이 흡사하여 반응물에 반응을 안한 PEG가 섞여 있을 경우 순수한 KPEG만을 분리해내기 어렵기 때문에 KP를 과량 사용하여 반응을 진행시키고, TLC 상에서 PEG의 spot이 보이지 않을 때를 반응의 완결로 보았다.

Table I—Synthetic yield of methylated poly(ethylene glycol) esters of ketoprofen.

Compound	Average Mw.	Synthetic yield (%)
Ketoprofen	254.3	—
KPEG750	1004.3	79.9
KPEG2000	2254.3	70.7
KPEG5000	5254.3	50

본 실험에서는 DCC를 이용하여 KP의 카르복실기와 methylated PEG의 수산화기 사이의 esterification 반응을 유도하여 KP와 methylated PEG가 ester bond로 연결된 KP-PEG 포함체 (KPEG)를 얻었다 (Scheme 1).¹⁰⁾ 4-DMAP는 강염기로서 PEG와 KP의 반응의 촉매로써 사용되었다. 합성물의 수득률은 Table I에 나타나 있는데 PEG의 분자량이 증가할수록 수율이 낮아졌다. 합성한 KPEG의 포함은 IR 및 ¹H-NMR을 이용하여 확인하였다. KPEG750의 IR의 결과 (Figure 1)를 보면 ① KP의 -OH의 수소결합의 특이한 band인 매우 broad 한 peak가 사라졌다. ② 1697 cm⁻¹의 carbonyl band가 더 높은 파수 (1732 cm⁻¹)로 이동하였다. ③ 2872 cm⁻¹에서 크고 날카롭게 나타났던 aliphatic C-H stretching band가 사라졌다. ¹H-NMR (KPEG750)의 결과 (Figure 2)는 δ 1.75 (d, 3H, J=7.1 Hz), 3.59 (s, 3H), 3.74-3.92 (m, 64H-72H), 4.02-4.09 (m, 1H), 4.38-4.52 (m, 2H), 7.65-8.03 (m, 9H)로 KP와 PEG의 포함이 확인되었다. KPEG2000 및 KPEG5000의 IR 및 ¹H-NMR 데이터가 아래에 나타나 있다.



Scheme 1—The synthesis of ketoprofen-PEG conjugate.

KPEG2000: IR (pellet) : 2887, 1734, 1660, 1467, 1112 cm⁻¹
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ 7.41-7.78(m, 9H), 4.15-4.32(m, 2H), 3.85-3.93(m, 1H), 3.53-3.73 (m, 189H-193H), 3.38 (m, 3H), 1.55 (d, 3H, J= 7.1Hz)

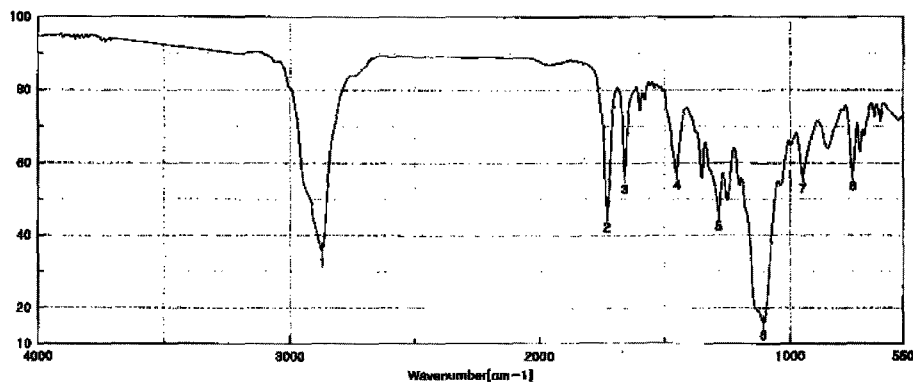


Figure 1—IR spectrum of KPEG 750.

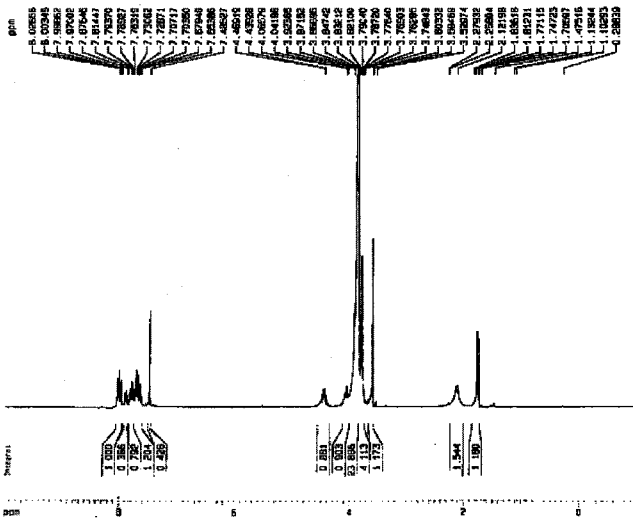


Figure 2—¹H-NMR spectrum of KPEG750.

KPEG5000: IR (pellet) : 2887, 1734, 1660, 1467, 1112 cm⁻¹
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ 7.41-7.78 (m, 9H),
 4.15-4.32 (m, 8H), 3.87 (m, 1H),
 3.53-3.87 (m, 41H) 3.38 (m, 3H),
 1.55 (d, 3H, J=7.1 Hz)

KPEG의 알칼리 가수분해 연구

KP와 PEG가 1:1로 결합하였는지 확인하기 위하여 알칼

리성 용매에서 KPEG를 완전히 가수분해시켜 KP를 정량한 결과 모든 분자량의 KPEG에서 생성된 KP의 양이 이론적 예측치와 정확히 일치함을 확인하였다. 즉 KPEG750, KPEG2000, KPEG5000에 함유되어 있는 KP의 이론적 무게 분율은 각각 25, 11, 5%인데 실험에 사용된 각각의 KPEG 용액으로부터 이론적 분율에 해당하는 KP를 회수하였다. 이는 KP와 PEG의 포합반응이 1:1로 이루어졌으며 column chromatography에 의해 KPEG와 반응하지 않은 KP가 완전히 분리되어 순수한 KPEG만을 얻었음을 알려주고 있다.

KPEG의 가수분해 속도 연구

대부분의 가수분해 반응은 산이나 염기를 가하면 분해가 가속된다. 용액이 완충되어 있으면, 분해 시에 산 또는 염기의 농도에 상당한 변화를 수반하지 않기 때문에 그 반응은 수소이온 또는 수산이온에 의하여 촉매된다고 할 수 있다. 이러한 가수분해에 대한 속도법칙에 수소이온농도 또는 수산이온농도를 포함하는 항이 포함되어 있을 때, 그 반응은 특정산-염기촉매작용에 따른다고 한다.¹¹⁾ 이 경우에 겔보기 속도상수의 log 값 (logk_{obs})을 pH에 대해 도시하면 기울기가 -1 (특정산촉매작용) 또는 +1 (특정염기촉매작용)인 직선을 얻게 된다. k_{obs}는 시간에 따른 농도를 측정하여 log(농도)-시간 plot에 의해 구할 수 있다.

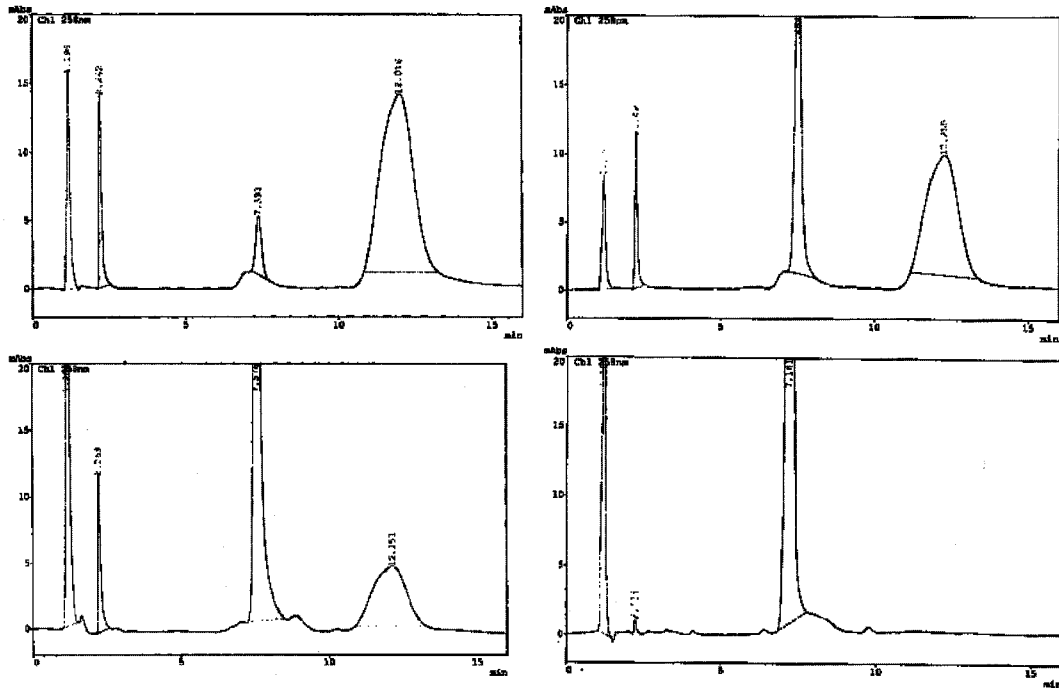


Figure 3—HPLC chromatogram showing the simultaneous separation and quantitation of KPEG and KP: degradation of KPEG750 after; (A) 2 hr, (B) 14 hr (C) 48 hr and (D) 431 hr in phosphate buffer solution (pH 1.0) at 37±0.1°C.

KPEG의 인산염 완충액에서의 가수분해 속도 연구는 HPLC를 이용하여 완충액 중에 가수분해 되지 않고 남아있는 KPEG의 양과 KPEG가 분해됨에 따라 증가하는 KP의 양을 동시 정량하면서 수행하였다. 크로마토그램 상에서 두 물질의 피크는 acetonitrile : 0.05 M ammonium phosphate buffer (pH 3.0)=42 : 58 인 이동상의 조건에서 완전히 분리되었다. Figure 3에서 볼 수 있는 것과 같이 시간이 지남에 따라 KPEG750의 피크는 작아지며 KP 피크의 크기는 커져서 가수분해가 진행되고 있음을 알 수 있다. 또한 KPEG의 분자량이 커짐에 따라서 KPEG의 retention time은 짧아지는 경향을 보였는데 이는 KPEG의 분자량이 커질수록 친수성이 증가하기 때문으로 사료된다. Figure 4를 보면 분해된 KPEG의 양과 증가된 KP의 양이 정확히 일치하고 있는데 이는 KP와 PEG가 정확히 1:1로 결합한 것을 나타내고 있으며 KPEG2000 및 KPEG5000에서도 동일한 결과를 얻었다.

모든 분자량의 KPEG에서 가수분해속도는 낮은 pH와 높

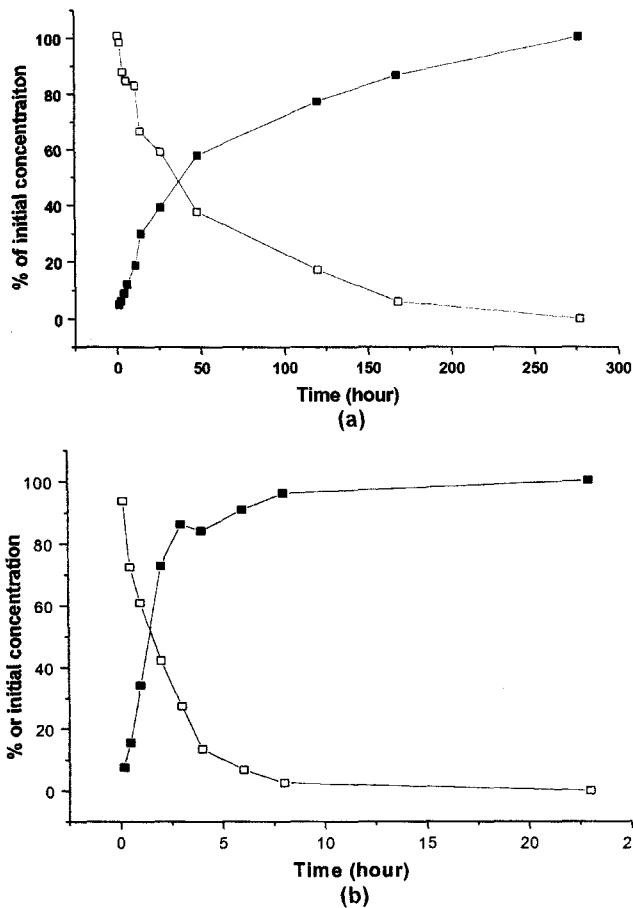


Figure 4-The kinetic profile of KPEG750 and KP in (A) pH 1 and (B) pH 10 phosphate buffer solution. Key : ■, KP, □; KPEG750.

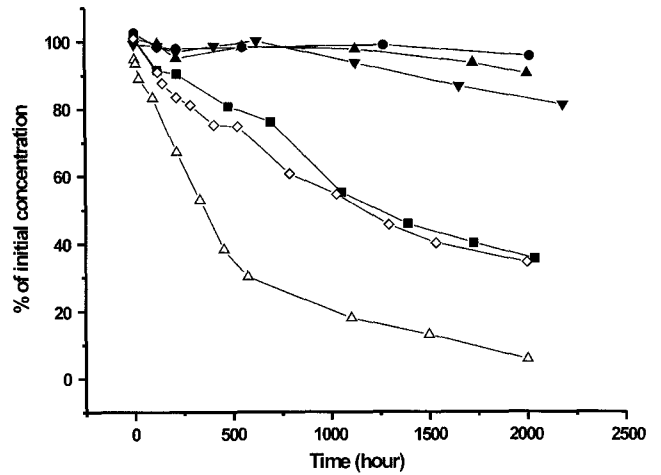


Figure 5-The degradation profile of KPEG750 in various pH phosphate buffer solutions. Key : ■; pH 3, ●; pH 4, ▲; pH 5, ▼; pH 6, ◇; pH 7, △; pH 8.

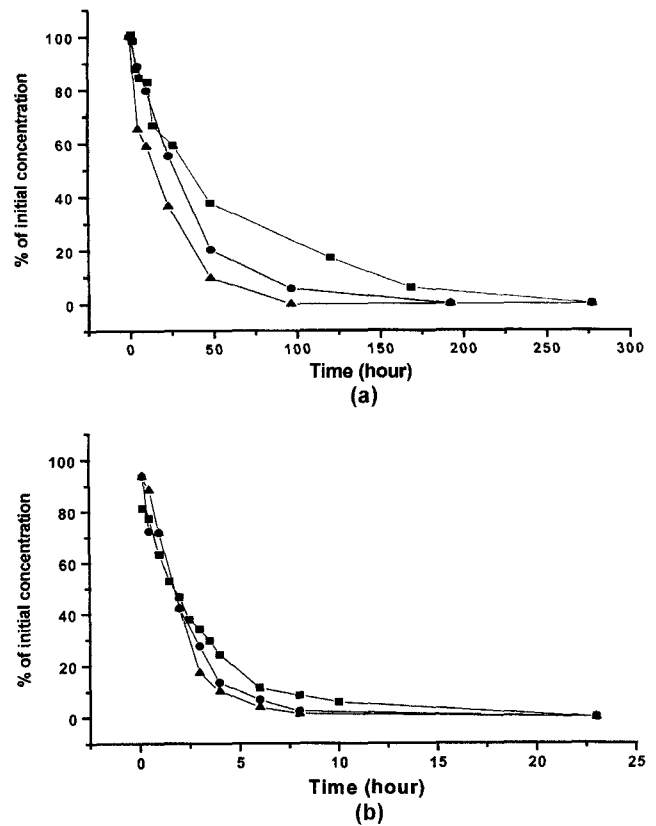


Figure 6-The degradation profile of KPEG750, 2000, 5000 in (A) pH 1, (B) pH 10 buffer solutions. Key : ■; KPEG750, ●; KPEG2000, ▲; KPEG5000.

은 pH에서 증가하였고 pH 4, 5에서 가장 느렸다 (Figure 5). KPEG의 분자량별로 살펴보면 모든 pH에서 분자량이 증가할수록 가수분해 속도는 증가하였다 (Figure 6). 이는 PEG의 길이가 증가할수록 수화 정도가 증가하여서 KPEG

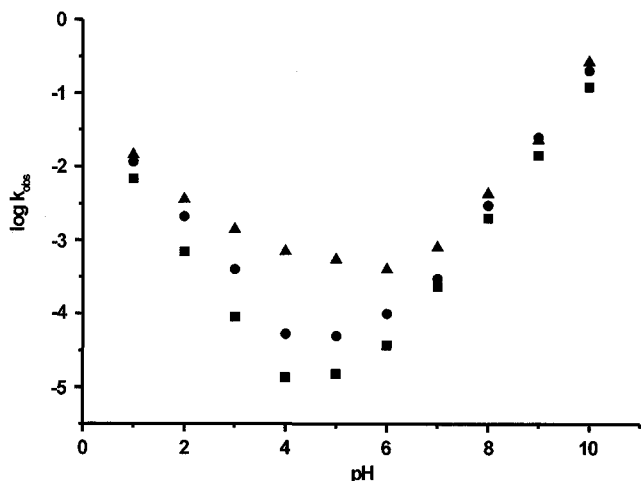


Figure 7—Rate-pH profile for the hydrolysis of KPEGs in phosphate buffer solution. Key : ■; KPEG750, ●; KPEG2000, ▲; KPEG5000.

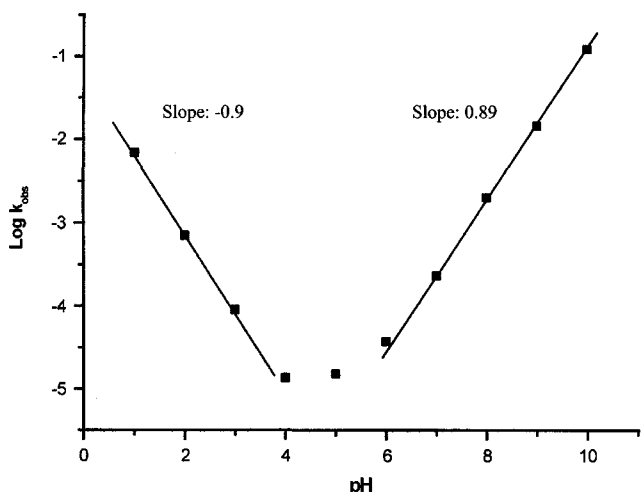


Figure 8—Linear fit of the rate-pH profile for the hydrolysis of KPEG750.

의 가수분해속도가 증가된 것으로 사료된다.

합성된 KPEG의 완충액에서의 시간에 따른 분해를 pH 1 부터 10 까지의 0.1M 인산염 완충액에서 조사한 후 k_{obs} 를 구하여 pH에 따라 도시한 결과가 Figure 7에 나타나 있다. KPEG 750의 경우 산성쪽에서 -0.90, 알칼리 쪽에서 0.89의 기울기를 보이는 것으로 나타나 KPEG750의 가수분해의 주된 메커니즘은 특정 수소-수산화이온 촉매에 의한 것으로 사료된다 (Table II). 그러나 KPEG2000과 5000의 경우 높은 pH에서는 기울기가 각각 +0.94 및 +0.8로 +1에 가까워 특정 수산화 이온 촉매작용을 나타냈으나 낮은 pH에서는 각각 -0.73 및 -0.51을 나타내 특정 수소이온 촉매작용을 보이지 않았다 (Table II). 이러한 결과는 PEG chain의 크기가 커질수록 ester 결합 부분이 PEG chain에 의해 입체적

Table II—The slope of Rate-pH profile for the hydrolysis of KPEGs

	KPEG750	KPEG2000	KPEG5000
Acid	-0.9	-0.7312	-0.5076
Base	0.88	0.9405	0.8906

Table III—Observed rate constant ($\log k_{obs}$) for the degradation of ketoprofen-poly(ethylene glycol) conjugates in phosphate buffer solutions with different pH values at 37°C.

PH	KPEG 750 ($\log k_{obs}$)	KPEG2000 ($\log k_{obs}$)	KPEG5000 ($\log k_{obs}$)
1	-2.162	-1.935	-1.838
2	-3.156	-2.677	-2.443
3	-4.045	-3.397	-2.853
4	-4.869	-4.280	-3.154
5	-4.815	-4.301	-3.259
6	-4.424	-4.023	-3.397
7	-3.632	-3.522	-3.096
8	-2.701	-2.522	-2.366
9	-1.841	-1.600	-1.636
10	-0.917	-0.695	-0.575

로 가려지게 되어 분해속도가 영향을 받았기 때문이라고 사료된다. 한편 pH 4부터 5 사이에서는 모든 KPEG에서 겔보기속도상수의 최소가 관찰되었는데 이 같은 결과는 수소이온이나 수산화이온이 반응에 참여하고 있기 때문이라고 할 수는 없으며 물에 의한 용매촉매효과를 말해주고 있다.

결론

Ketoprofen 과 methylated poly(ethylene glycol)을 N,N-dicyclohexyl carbodiimide를 이용하여 에스테르화 반응으로 포합체 전구약물을 3가지 합성하였고 IR 및 ¹H-NMR을 이용하여 확인하였으며 이들의 가수분해 반응속도를 pH에 따라 조사하였다. 가수분해 속도 연구 결과 모든 분자량의 전구약물에 있어서 pH 4~5에서 가수분해 속도가 가장 느렸고 pH 1 및 10에서 가장 큰 값을 나타냈으며 겔보기속도상수의 로그값을 pH에 따라 도시한 결과 특정산염기촉매작용이 일어남을 알았다. 이상의 결과는 KPEG이 체내에서 서서히 방출되어 서서히 약효를 나타낼 수 전구약물이 될 수 있음을 알려주고 있다.

감사의 글

이 연구는 한국과학재단 여자대학교 연구기반확충사업 (R06-2002-015-01003-0)의 연구비로 수행되었습니다.

문 헌

1. J. Reynolds, *Martindale*, Royal pharmaceutical society, **31th**, 55 (1996).
2. R. Duncan and J. Kopecek, Soluble synthetic polymers as potential drug carriers, *Adv. Polym. Sci.*, **57**, 53-101 (1984).
3. J. Bailey and J.V. Koleske Eds., *Poly(ethylene oxide)*, Academic Press, New York, (1976).
4. G.M. Powell, *Polyethylene glycol*, In Handbook of water soluble Gums and Resins (R.L. Davidson, Ed.), McGraw-Hill, New York, 18 31 (1980).
5. S. Dreborg and E.B. Akerblom, Immunotherapy with monomethoxypolyethylene glycol modified allergens, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **6**, 315-365 (1990).
6. T. Yamaoka, Y. Tabata and Y. Ikada, Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration in mice, *J. Pharm. Sci.*, **83**, 601-606 (1994).
7. M.G. Rimoli, L. Avallone, P. de Caprariis, A. Galeone, F. Forni and M.A. Vandelli, Synthesis and characterization of poly(D, L-lactic acid)-idoxuridine conjugate, *J. Control. Rel.*, **58**, 61-68 (1999).
8. A.D. Pozzo, A. Vigo and G. Donzelli, New monofunctional derivatives of polyethylene glycols via monotrityl intermediates, *Makromol. Chem.*, **190**, 2457-2461 (1989).
9. Z. Mincheva, N. Stambolieva and I. Rashkov, Preparation and properties of di-, tri- and polyethyleneglycol esters of 2-benzowazolone-3-yl-acetic acid, *Eur. Polym. J.*, **30**, 761-765 (1994).
10. A. Hassner and V. Alexznian, Direct room temperature esterification of carboxylic acids, *Tetrahedron Lett.*, **46**, 4475-4478 (1978).
11. A. Martin, Kinetics, chapter 12, in *Physical pharmacy (2nd Ed.)*, Lea & Febiger, Philadelphia (1985).