

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0098800
(43) 공개일자 2020년08월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/52 (2006.01) A61F 2/00 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01) A61K 47/32 (2017.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61K 9/06 (2006.01)
A61L 27/14 (2006.01) A61L 27/54 (2006.01)
C08J 3/24 (2006.01) C08K 5/11 (2006.01)
C08L 35/06 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 27/52 (2013.01)
A61F 2/0059 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0016257

(22) 출원일자 2019년02월12일

심사청구일자 2019년02월12일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)

(72) 발명자

임권택

부산광역시 부산진구 당감로 118, 105동 1202호(
부암동, 협성피닉스타운)

(74) 대리인

위병갑

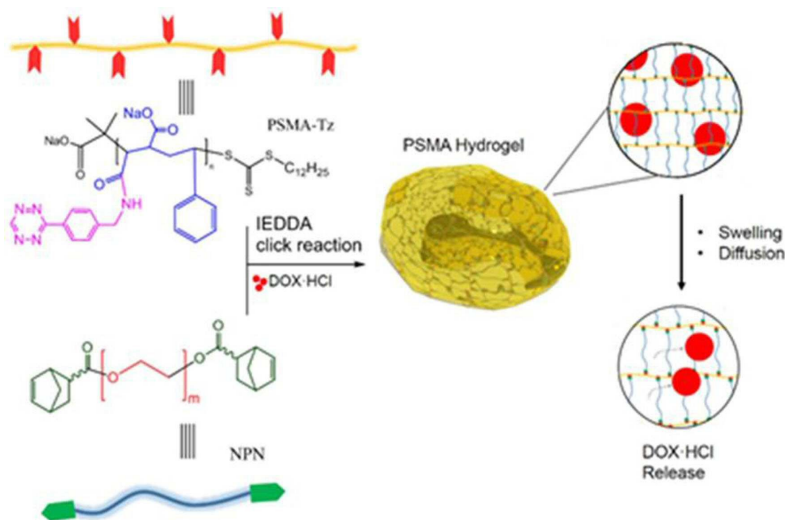
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 클릭 화학을 이용한 주입형 PSMA 유도체 하이드로겔, 이의 제조방법 및 이를 이용한 생체 내 겔 형성방법

(57) 요약

본 발명은 클릭 화학을 이용한 주입형 PSMA 유도체 하이드로겔, 이의 제조방법 및 이를 이용한 생체 내 겔 형성 방법에 관한 것으로, 본 발명의 주입형 PSMA 하이드로겔은 클릭 화학 반응을 이용한 가교를 통해 생체 내 원하는 위치에서 하이드로겔 형성이 빠르게 일어나는 효과가 있으며, 체내에서 장시간 안정성을 유지하고 우수한 생체적합성을 가져 주름살 개선을 위한 필러, 세포, 유전자, 단백질, 약물 전달을 위한 캐리어로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/704 (2013.01)
A61K 47/32 (2013.01)
A61K 9/0024 (2013.01)
A61K 9/06 (2013.01)
A61L 27/14 (2013.01)
A61L 27/54 (2013.01)
C08J 3/24 (2013.01)
C08K 5/11 (2013.01)
C08L 35/06 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2018R1D1A3B07041437
부처명	교육부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	지역대학우수과학자지원사업
연구과제명	클릭 화학을 이용한 주입형 PSMA 유도체 하이드로겔, 이의 제조방법 및 이를 이용한 생체
내 겔 형성방법	
기 여 율	1/1
주관기관	부경대학교
연구기간	2018.06.01 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

중합체로서, 테트라진(tetrazine), 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 도입된 것을 특징으로 하는 PSMA (poly(styrene-alt-maleic anhydride)); 및

가교제로서, 테트라진(tetrazine), 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 양말단에 도입된 PEG (polyethylene glycol);를 포함하고,

상기 중합체의 중량평균분자량(M_w)은 500-500,000 Da이고,

상기 가교제의 중량평균분자량(M_w)은 300-1,000,000 Da이고,

상기 중합체에 테트라진(tetrazine) 작용기가 도입된 경우, 상기 가교제 양말단 작용기는 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene)이고,

상기 중합체에 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 도입된 경우, 상기 가교제 양말단 작용기는 테트라진(tetrazine)이고,

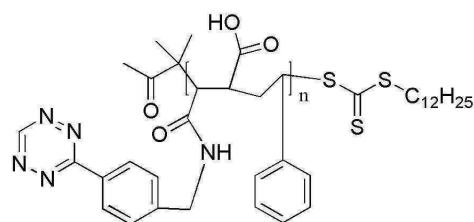
상기 중합체에 도입된 작용기와 가교제 양말단에 도입된 작용기가 상호 클릭반응으로 결합되어 가교된 것을 특징으로 하는 생체주입용 하이드로겔.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 중합체는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 생체주입용 하이드로겔:

[화학식 1]



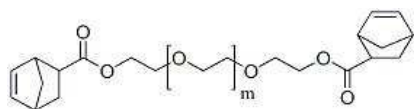
(상기 화학식 1에서, n은 1-250의 정수이다).

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 가교제는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 생체주입용 하이드로겔:

[화학식 2]



(상기 화학식 2에서, m 은 1-500의 정수이다).

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 가교제의 중량평균분자량(M_w)은 500-30,000 Da인 것을 특징으로 하는 생체주입용 하이드로겔.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 가교제의 중량평균분자량(M_w)은 1,000-20,000 Da인 것을 특징으로 하는 생체주입용 하이드로겔.

청구항 6

중합체로서, 테트라진(tetrazine), 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 도입된 것을 특징으로 하는 PSMA (poly(styrene-alt-maleic anhydride));

가교제로서, 테트라진(tetrazine), 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 양말단에 도입된 PEG (polyethylene glycol); 및

인슐린, 항 류마티스 제제, 프레드니솔론 21-아세테이트(prednisolone 21-acetate), 파클리탁셀(paclitaxel), 독소루비신(doxorubicin), 레티노익 산(retinoic acid)계열, 시스플라틴(cis-platin), 캄토세신(camptothecin), Fluorouracil(5-FU), 도세탁셀(Docetaxel), 타목시펜(Tamoxifen), 아나스테로졸(anastrozole), 카보플라틴(carboplatin), 토포테칸(topotecan), 베로테칸(belotecan), 이리노테칸(irinotecan), 글리벡(gleevec), 빈크리스틴(vincristine), 아스피린(aspirin), 살리실레이트(salicylates), 이부프로펜(ibuprofen), 나프로센(naproxen), 페노프로펜(fenoprofen), 인도메타신(indomethacin), 페닐부타존(phenyltazone), 메소트렉세이트(methotrexate), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 메클로레타민(mechlorethamine), 덱사메타손(dexamethasone), 프레드니솔론(prednisolone), 셀레콕시브(celecoxib), 발데콕시브(valdecoxib), 니메술리드(nimesulide), 코르티손(cortisone) 및 코르티코스테로이드(corticosteroid)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 약물;을 포함하고,

상기 중합체의 수평균분자량(M_n)은 500-500,000 Da이고,

상기 가교제의 중량평균분자량(M_w)은 300-1,000,000 Da이고,

상기 중합체에 테트라진(tetrazine) 작용기가 도입된 경우, 상기 가교제 양말단 작용기는 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 이고,

상기 중합체에 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 도입된 경우, 상기 가교제 양말단 작용기는 테트라진(tetrazine)이고,

상기 중합체에 도입된 작용기와 가교제 양말단에 도입된 작용기가 상호 클릭반응으로 결합되어 가교되고,

상기 중합체와 상기 가교제에 의해 형성되는 하이드로겔 내부 네트워크에 상기 약물이 담지되는 것을 특징으로 하는,

생체주입형 약물전달용 하이드로겔.

청구항 7

중합체로서, 테트라진(tetrazine), 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 도입된 것을 특징으로 하는 PSMA (poly(styrene-alt-maleic anhydride)); 및

가교제로서, 테트라진(tetrazine), 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 양말단에 도입된 PEG (polyethylene glycol);를 용매에 첨가하고 반응시켜, 가교결합을 유도하는 단계(단계 1);을 포함하고,

상기 중합체의 중량평균분자량(M_w)은 500-500,000 Da이고,

상기 가교제의 중량평균분자량(M_w)은 300-1,000,000 Da이고,

상기 중합체에 테트라진(tetrazine) 작용기가 도입된 경우, 상기 가교제 양말단 작용기는 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene)이고,

상기 중합체에 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 도입된 경우, 상기 가교제 양말단 작용기는 테트라진(tetrazine)이고,

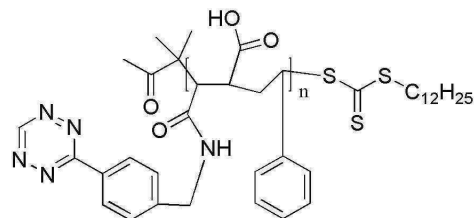
상기 중합체에 도입된 작용기와 가교제 양말단에 도입된 작용기가 상호 클릭반응으로 결합되어 가교된 것을 특징으로 하는 생체주입용 하이드로겔의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 중합체는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 제조방법:

[화학식 1]



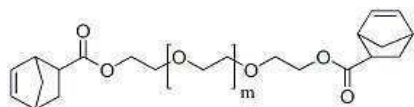
(상기 화학식 1에서, n 은 1-250의 정수이다).

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 가교제는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 제조방법:

[화학식 2]



(상기 화학식 2에서, m 은 1-500의 정수이다).

청구항 10

중합체로서, 테트라진(tetrazine), 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-

-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 도입된 것을 특징으로 하는 PSMA (poly(styrene-alt-maleic anhydride));

가교제로서, 테트라진(tetrazine), 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 양말단에 도입된 PEG (polyethylene glycol); 및

인슐린, 항 류마티스 제제, 프레드니솔론 21-아세테이트(prednisolone 21-acetate), 파클리탁셀(paclitaxel), 독소루비신(doxorubicin), 레티노익 산(retinoic acid)계열, 시스플라틴(cis-platin), 캄토세신(camptothecin), Fluorouracil(5-FU), 도세탁셀(Docetaxel), 타목시펜(Tamoxifen), 아나스테로졸(anastrozole), 카보플라틴(carboplatin), 토포테칸(topotecan), 베로테칸(belotecan), 이리노테칸(irinotecan), 글리벡(gleevec), 빈크리스틴(vincristine), 아스피린(aspirin), 살리실레이트(salicylates), 이부프로펜(ibuprofen), 나프로센(naproxen), 페노프로펜(fenopropfen), 인도메타신(indomethacin), 페닐부타존(phenyltazone), 메소트렉세이트(methotrexate), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 메클로에타민(mechlorethamine), 덱사메타손(dexamethasone), 프레드니솔론(prednisolone), 셀레콕시브(celecoxib), 발데콕시브(valdecoxib), 니메술리드(nimesulide), 코르티손(cortisone) 및 코르티코스테로이드(corticosteroid)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 약물;을 용매에 첨가하고 반응시켜, 가교결합을 유도하는 단계(단계 1);을 포함하고,

상기 중합체의 수평균분자량(M_n)은 500-500,000 Da이고,

상기 가교제의 중량평균분자량(M_w)은 300-1,000,000 Da이고,

상기 중합체에 테트라진(tetrazine) 작용기가 도입된 경우, 상기 가교제 양말단 작용기는 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene)이고,

상기 중합체에 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 도입된 경우, 상기 가교제 양말단 작용기는 테트라진(tetrazine)이고,

상기 중합체에 도입된 작용기와 가교제 양말단에 도입된 작용기가 상호 클릭반응으로 결합되어 가교되고,

상기 중합체와 상기 가교제에 의해 형성되는 하이드로겔 내부 네트워크에 상기 약물이 담지되는 것을 특징으로 하는,

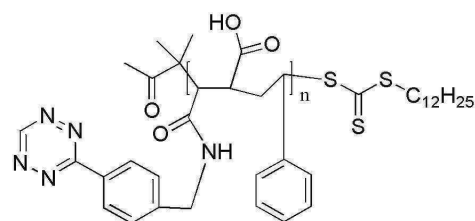
생체주입형 약물전달용 하이드로겔의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 중합체는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 제조방법:

[화학식 1]



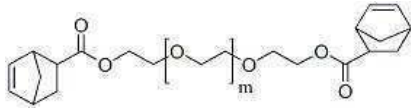
(상기 화학식 1에서, n은 1-250의 정수이다).

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 가교제는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 제조방법:

[화학식 2]



(상기 화학식 2에서, m 은 1-500의 정수이다).

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 클릭 화학을 이용한 주입형 PSMA 유도체 하이드로겔, 이의 제조방법 및 이를 이용한 생체 내 겔 형성 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 하이드로겔은 물 또는 생물학적 체액을 흡수하는 친수성의 3 차원 거대 분자 네트워크이다. 하이드로겔의 높은 수분 함량은 천연 세포 외 기질과 유사한 성질을 제공한다. 하이드로겔은 독특한 특성으로 인해 조직 공학에 대해 광범위하게 연구되어 왔으며, 특히 우수한 생체 적합성으로 약물 전달 시스템에 사용될 수 있는 능력을 가지고 있다. 하이드로겔은 주로 수용액에서 형성되므로 유기 용매에 노출되어 약물 변성 및 응집의 위험이 최소화되며, 내부 네트워크는 하이드로겔이 고체와 같은 특성을 갖게 한다. 이 네트워크는 물리적(물리적 젤) 또는 화학적 결합(화학 젤)으로 형성된다.

[0003] 그 동안 겔 내부 네트워크를 만들기 위한 화학적 겔 방법은 많은 발전을 이루어 왔다. 그 중에서 클릭 화학은 합성 유기 화학과 생체 공학에 유용하게 사용되어 왔으며 비교적 높은 기계적 강도를 갖는 가교 결합된 하이드로겔을 제조할 수 있다. 최근 클릭 화학에 관한 새로운 연구 결과, "금속 촉매가 필요없는" 반응이 알려졌으며, 이것은 반응이 생체 조건 하에서 뿐만 아니라 수성 매체에서도 빠르게 진행되어 가교 결합된 하이드로 겔을 형성하고 공기에 민감하지 않음을 보여주었다.

[0004] 한편 지난 10년 동안 주사 가능한 하이드로겔은 간단한 형성방식과 우수한 특성을 보이는 물론 수술 절차없이 인체에 적용되어 환자의 불편을 크게 감소시킬 수 있는 방법으로 많은 관심을 끌었다. 하이드로겔 구성 고분자 물질의 생체 적합성은 인체의 미세 환경 내에서 적용되는 중요한 특성이며, 우수한 생체 적합성을 가진 물질은 주사 가능한 하이드로겔의 성공적인 사용에 필수적이다. 또한 빠른 겔화 특성은 겔 전구체가 주사 부위로부터 멀리 퍼지는 것을 방지하기 때문에 in-situ 주입 가능한 하이드로겔 형성에서 또한 중요한 요구 사항이다.

[0005] 주사 가능한 하이드로겔의 장점으로 인하여 주름살 개선을 위한 필러, 항암제, 만성질환 치료제, 세포, 유전자, 단백질 전달을 위한 캐리어로 사용 가능하며 특히 암 세포의 국소 화학 요법에 적합하다. 예를 들면, 독소루비신은 화학 요법에서 널리 사용되는 항암제 중 하나인데 전통적으로 정맥 주사를 통해 투여된다. 그러나 정맥 주사법은 용량 의존적인 심장 독성 약기를 포함하는 다양한 문제를 가지고 있고, 약물의 장기 사용은 다중 약물 내성을 유도할 수 있으며 암 조직뿐만 아니라 정상 조직에도 세포 독성을 발휘한다. 따라서 주사 가능한 하이드로겔은 경구투여나 정맥투여 화학 요법의 부작용을 최소화하면서 이러한 문제를 극복하기 위한 유망한 접근법이 될 수 있다.

[0006] 따라서, 하이드로겔 형성에 사용되는 고분자의 분자량을 쉽게 조절할 수 있고 작용기를 다양하게 도입할 수 있어, 이로 인하여 하이드로겔의 안정성과 기계적 강도가 우수한 물질이 바람직하다.

[0007] 이에 본 발명자들은 PSMA 기반으로 하는 생체주입용 하이드로겔을 제조하고 본 발명의 방법에 따라 제조된 생체 주입용 하이드로겔은 클릭 화학 반응을 이용한 가교를 통해 생체 내 원하는 위치에서 하이드로겔 형성이 빠르게 일어나는 효과가 있으며, 본 발명에 의해 형성된 PSMA 하이드로겔은 체내에서 장시간 안정성을 유지하고 우수한 생체적합성을 갖는 것을 확인함에 따라 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국공개특허 제10-2017-0042986호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 생체주입용 하이드로겔을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 생체주입형 약물전달용 하이드로겔을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 생체주입용 하이드로겔의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 생체주입형 약물전달용 하이드로겔의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0014] 본 발명은

[0015] 중합체로서, 테트라진(tetrazine), 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 도입된 것을 특징으로 하는 PSMA (poly(styrene-alt-maleic anhydride)); 및

[0016] 가교제로서, 테트라진(tetrazine), 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 양말단에 도입된 PEG (polyethylene glycol);를 포함하고,

[0017] 상기 중합체의 중량평균분자량(M_w)은 500-500,000 Da이고,

[0018] 상기 가교제의 중량평균분자량(M_w)은 300-1,000,000 Da이고,

[0019] 상기 중합체에 테트라진(tetrazine) 작용기가 도입된 경우, 상기 가교제 양말단 작용기는 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 이고,

[0020] 상기 중합체에 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 도입된 경우, 상기 가교제 양말단 작용기는 테트라진(tetrazine)이고,

[0021] 상기 중합체에 도입된 작용기와 가교제 양말단에 도입된 작용기가 상호 클릭반응으로 결합되어 가교된 것을 특징으로 하는 생체주입용 하이드로겔을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은

[0023] 중합체로서, 테트라진(tetrazine), 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 도입된 것을 특징으로 하는 PSMA (poly(styrene-alt-maleic anhydride));

[0024] 가교제로서, 테트라진(tetrazine), 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 양말단에 도입된 PEG (polyethylene glycol); 및

[0025] 인슐린, 항 류마티스 제제, 프레드니솔론 21-아세테이트(prednisolone 21-acetate), 파클리탁셀(paclitaxel), 독소루비신(doxorubicin), 레티노익 산(retinoic acid)계열, 시스플라틴(cis-platin), 캄토세신(camptothecin), Fluorouracil(5-FU), 도세탁셀(Docetaxel), 타목시펜(Tamoxifen), 아나스테로졸(anastrozole), 카보플라틴(carboplatin), 토포테칸(topotecan), 베로테칸(belotecan), 이리노테칸(irinotecan), 글리벡(gleevec), 빈크리스틴(vincristine), 아스피린(aspirin), 살리실레이트(salicylates), 이부프로펜(ibuprofen), 나프로센(naproxen), 페노프로펜(fenopropfen), 인도메타신(indomethacin), 페닐부타존(phenyltazone), 메소트렉세이트(methotrexate), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 메클로에타민(mechlorethamine), 덱사메타손(dexamethasone), 프레드니솔론(prednisolone), 셀레콕시브(celecoxib), 발데콕시브(valdecoxib), 니메술리드(nimesulide), 코르티손(cortisone) 및 코르티코스테로이드(corticosteroid)로

이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 약물;을 포함하고,

[0026]

상기 중합체의 수평균분자량(M_n)은 500-500,000 Da이고,

[0027]

상기 가교제의 중량평균분자량(M_w)은 300-1,000,000 Da이고,

[0028]

상기 중합체에 테트라진(tetrazine) 작용기가 도입된 경우, 상기 가교제 양말단 작용기는 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene)이고,

[0029]

상기 중합체에 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 도입된 경우, 상기 가교제 양말단 작용기는 테트라진(tetrazine)이고,

[0030]

상기 중합체에 도입된 작용기와 가교제 양말단에 도입된 작용기가 상호 클릭반응으로 결합되어 가교되고,

[0031]

상기 중합체와 상기 가교제에 의해 형성되는 하이드로겔 내부 네트워크에 상기 약물이 담지되는 것을 특징으로 하는,

[0032]

생체주입형 약물전달용 하이드로겔을 제공한다.

[0033]

나아가 본 발명은

[0034]

중합체로서, 테트라진(tetrazine), 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 도입된 것을 특징으로 하는 PSMA (poly(styrene-alt-maleic anhydride)); 및

[0035]

가교제로서, 테트라진(tetrazine), 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 양말단에 도입된 PEG (polyethylene glycol);를 용매에 첨가하고 반응시켜, 가교결합을 유도하는 단계(단계 1);을 포함하고,

[0036]

상기 중합체의 중량평균분자량(M_w)은 500-500,000 Da이고,

[0037]

상기 가교제의 중량평균분자량(M_w)은 300-1,000,000 Da이고,

[0038]

상기 중합체에 테트라진(tetrazine) 작용기가 도입된 경우, 상기 가교제 양말단 작용기는 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene)이고,

[0039]

상기 중합체에 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 도입된 경우, 상기 가교제 양말단 작용기는 테트라진(tetrazine)이고,

[0040]

상기 중합체에 도입된 작용기와 가교제 양말단에 도입된 작용기가 상호 클릭반응으로 결합되어 가교된 것을 특징으로 하는 생체주입용 하이드로겔의 제조방법을 제공한다.

[0041]

더 나아가 본 발명은

[0042]

중합체로서, 테트라진(tetrazine), 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 도입된 것을 특징으로 하는 PSMA (poly(styrene-alt-maleic anhydride));

[0043]

가교제로서, 테트라진(tetrazine), 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 양말단에 도입된 PEG (polyethylene glycol); 및

[0044]

인슐린, 항 류마티스 제제, 프레드니솔론 21-아세테이트(prednisolone 21-acetate), 파클리탁셀(paclitaxel), 독소루비신(doxorubicin), 레티노익 산(retinoic acid)계열, 시스플라틴(cis-platin), 캄토세신(camptothecin), Fluorouracil(5-FU), 도세탁셀(Docetaxel), 타목시펜(Tamoxifen), 아나스테로졸(anastrozole), 카보플라틴(carboplatin), 토포테칸(topotecan), 베로테칸(belotecan), 이리노테칸(irinotecan), 글리벡(gleevec), 빈크리스틴(vincristine), 아스피린(aspirin), 살리실레이트(salicylates), 이부프로펜(ibuprofen), 나프로센(naproxen), 페노프로펜(fenoprofen), 인도메타신(indomethacin), 페닐부타존(phenyltazone), 메소트렉세이트(methotrexate), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 메클로레타민(mechlorethamine), 텍사메타손(dexamethasone), 프레드니솔론(prednisolone), 셀레코시브(celecoxib), 발데콕

시브(valdecoxib), 니메술리드(nimesulide), 코르티손(cortisone) 및 코르티코스테로이드(corticosteroid)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 약물;을 용매에 첨가하고 반응시켜, 가교결합을 유도하는 단계(단계 1);을 포함하고,

[0045] 상기 중합체의 수평균분자량(M_n)은 500-500,000 Da이고,

[0046] 상기 가교제의 중량평균분자량(M_w)은 300-1,000,000 Da이고,

[0047] 상기 중합체에 테트라진(tetrazine) 작용기가 도입된 경우, 상기 가교제 양말단 작용기는 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene)이고,

[0048] 상기 중합체에 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 도입된 경우, 상기 가교제 양말단 작용기는 테트라진(tetrazine)이고,

[0049] 상기 중합체에 도입된 작용기와 가교제 양말단에 도입된 작용기가 상호 클릭반응으로 결합되어 가교되고,

[0050] 상기 중합체와 상기 가교제에 의해 형성되는 하이드로겔 내부 네트워크에 상기 약물이 담지되는 것을 특징으로 하는,

[0051] 생체주입형 약물전달용 하이드로겔의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0052] 본 발명의 주입형 PSMA 하이드로겔은 클릭 화학 반응을 이용한 가교를 통해 생체 내 원하는 위치에서 하이드로겔 형성이 빠르게 일어나는 효과가 있으며, 본 발명에 의해 형성된 PSMA 하이드로겔은 체내에서 장시간 안정성을 유지하고 우수한 생체적합성을 가져 주름살 개선을 위한 필터, 세포, 유전자, 단백질, 약물 전달을 위한 캐리어로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0053] 도 1은 주입형 PSMA 하이드로 겔의 제조 및 약물 방출 메카니즘을 나타낸 도이다.

도 2은 PSMA(a), PSMA-Tz(b), PEG(C), NPN(d)의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 3은 PSMA(a), PSMA-Tz(b), PEG(C), NPN(d) 의 FT-IR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 4는 NPN, PSMA-Tz, PSMA 하이드로 겔의 사진을 나타낸 도이다.

도 5는 동결 건조한 PSMA 하이드로겔 1 (a), PSMA 하이드로겔 4.6 (b), PSMA 하이드로겔 10 의 SEM 사진을 나타낸 도이다.

도 6은 PSMA 하이드로겔의 주파수 스위프 테스트를 나타낸 도이다.

도 7는 PBS pH 6.5와 7.4에서 PSMA 하이드로겔의 약물 방출 양상을 나타낸 도이다 .

도 8는 서로 다른 농도의 전구체에 대한 HEK293 세포 (a)와 PSMA 하이드로겔, DOX·HCl를 탑재한 PSMA 하이드로겔, DOX·HCl 용액 등에 대한 HeLa 세포 (b) 의 시험관 독성 평가 결과를 각각 나타낸 도이다.

도 9는 DOX·HCl, PSMA 하이드로겔, DOX·HCl를 탑재한 PSMA 하이드로겔 등으로 24시간 동안 인큐베이션 처리한 HeLa 세포의 위상대비 현미경 사진을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0056] 생체주입용 하이드로겔

[0057] 본 발명은 중합체로서, 테트라진(tetrazine), 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 도입된 것을 특징으로 하는 PSMA (poly(styrene-

alt-maleic anhydride)); 및

가교제로서, 테트라진(tetrazine), 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 양말단에 도입된 PEG (polyethylene glycol);를 포함하고,

상기 중합체의 중량평균분자량(M_w)은 500-500,000 Da이고,

상기 가교제의 중량평균분자량(M_w)은 300-1,000,000 Da이고,

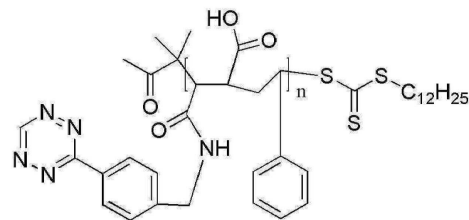
상기 중합체에 테트라진(tetrazine) 작용기가 도입된 경우, 상기 가교제 양말단 작용기는 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene)이고,

상기 중합체에 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 도입된 경우, 상기 가교제 양말단 작용기는 테트라진(tetrazine)이고,

상기 중합체에 도입된 작용기와 가교제 양말단에 도입된 작용기가 상호 클릭반응으로 결합되어 가교된 것을 특징으로 하는 생체주입용 하이드로겔을 제공한다.

본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 중합체는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 한다.

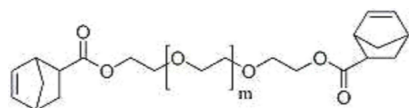
[화학식 1]



(상기 화학식 1에서, n 은 1-250의 정수이다).

본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 가교제는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 한다.

[화학식 2]



(상기 화학식 2에서, m 은 1-500의 정수이다).

본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 가교제의 중량평균분자량(M_w)은 500-30,000 Da이며, 바람직하게는 1,000-20,000 Da 일 수 있다.

생체주입형 약물전달용 하이드로겔

본 발명은 중합체로서, 테트라진(tetrazine), 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 도입된 것을 특징으로 하는 PSMA (poly(styrene-alt-maleic anhydride));

가교제로서, 테트라진(tetrazine), 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 양말단에 도입된 PEG (polyethylene glycol); 및

인슐린, 항 류마티스 제제, 프레드니솔론 21-아세테이트(prednisolone 21-acetate), 파클리탁셀(paclitaxel), 독소루비신(doxorubicin), 레티노익 산(retinoic acid)계열, 시스플라틴(cis-platin), 캄토세신(camptothecin), Fluorouracil(5-FU), 도세탁셀(Docetaxel), 타목시펜(Tamoxifen), 아나스테로졸(anastrozole), 카보플라틴(carboplatin), 토포테칸(topotecan), 베로테칸(belotecan), 이리노테칸(irinotecan), 글리벡(gleevec), 빈크리스틴(vincristine), 아스피린(aspirin), 살리실레이트(salicylates),

이부프로펜(ibuprofen), 나프로센(naproxen), 페노프로펜(fenoprofen), 인도메타신(indomethacin), 페닐부타존(phenyltazone), 메소트렉세이트(methotrexate), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 메클로에타민(mechlorethamine), 덱사메타손(dexamethasone), 프레드니솔론(prednisolone), 셀레콕시브(celecoxib), 발데콕시브(valdecoxib), 니메술리드(nimesulide), 코르티손(cortisone) 및 코르티코스테로이드(corticosteroid)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 약물;을 포함하고,

[0078] 상기 중합체의 수평균분자량(M_n)은 500-500,000 Da이고,

[0079] 상기 가교제의 중량평균분자량(M_w)은 300-1,000,000 Da이고,

[0080] 상기 중합체에 테트라진(tetrazine) 작용기가 도입된 경우, 상기 가교제 양말단 작용기는 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene)이고,

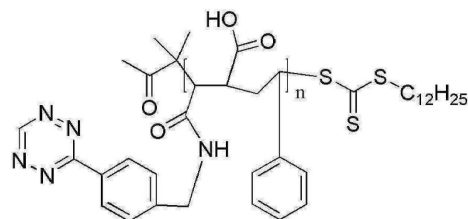
[0081] 상기 중합체에 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 도입된 경우, 상기 가교제 양말단 작용기는 테트라진(tetrazine)이고,

[0082] 상기 중합체에 도입된 작용기와 가교제 양말단에 도입된 작용기가 상호 클릭반응으로 결합되어 가교되고,

[0083] 상기 중합체와 상기 가교제에 의해 형성되는 하이드로겔 내부 네트워크에 상기 약물이 담지되는 것을 특징으로 하는, 생체주입형 약물전달용 하이드로겔을 제공한다.

[0084] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 중합체는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 한다.

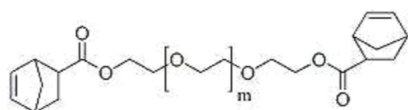
[0085] [화학식 1]



[0086] (상기 화학식 1에서, n 은 1-250의 정수이다).

[0088] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 가교제는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 한다.

[0089] [화학식 2]



[0091] (상기 화학식 2에서, m 은 1-500의 정수이다).

[0092] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 가교제의 중량평균분자량(M_w)은 500-30,000 Da이며, 바람직하게는 1,000-20,000 Da 일 수 있다.

[0094] 생체주입용 하이드로겔의 제조방법

[0095] 본 발명은 중합체로서, 테트라진(tetrazine), 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 도입된 것을 특징으로 하는 PSMA (poly(styrene-alt-maleic anhydride)); 및

[0096] 가교제로서, 테트라진(tetrazine), 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 양말단에 도입된 PEG (polyethylene glycol);를 용매에 첨가하고 반응시켜, 가교결합을 유도하는 단계(단계 1);을 포함하고,

[0097] 상기 중합체의 중량평균분자량(M_w)은 500-500,000 Da이고,

[0098] 상기 가교제의 중량평균분자량(M_w)은 300-1,000,000 Da이고,

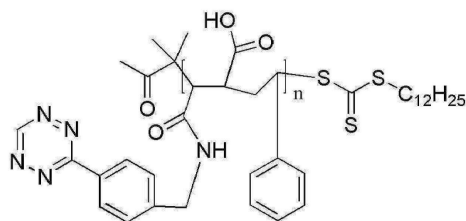
[0099] 상기 중합체에 테트라진(tetrazine) 작용기가 도입된 경우, 상기 가교제 양말단 작용기는 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene)이고,

[0100] 상기 중합체에 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 도입된 경우, 상기 가교제 양말단 작용기는 테트라진(tetrazine)이고,

[0101] 상기 중합체에 도입된 작용기와 가교제 양말단에 도입된 작용기가 상호 클릭반응으로 결합되어 가교된 것을 특징으로 하는 생체주입용 하이드로겔의 제조방법을 제공한다.

[0102] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 중합체는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 한다.

[0103] [화학식 1]

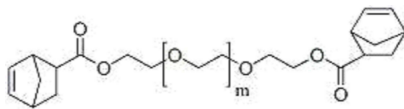


[0104]

[0105] (상기 화학식 1에서, n은 1-250의 정수이다).

[0106] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 가교제는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 한다.

[0107] [화학식 2]



[0108]

[0109] (상기 화학식 2에서, m은 1-500의 정수이다).

[0110] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 가교제의 중량평균분자량(M_w)은 500-30,000 Da이며, 바람직하게는 1,000-20,000 Da 일 수 있다.

[0112] 생체주입형 약물전달용 하이드로겔의 제조방법

[0113] 본 발명은 중합체로서, 테트라진(tetrazine), 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 도입된 것을 특징으로 하는 PSMA (poly(styrene-alt-maleic anhydride));

[0114] 가교제로서, 테트라진(tetrazine), 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 양말단에 도입된 PEG (polyethylene glycol); 및

[0115] 인슐린, 항 류마티스 제제, 프레드니솔론 21-아세테이트(prednisolone 21-acetate), 파클리탁셀(paclitaxel), 독소루비신(doxorubicin), 레티노익 산(retinoic acid)계열, 시스플라틴(cis-platin), 캄토세신(camptothecin), Fluorouracil(5-FU), 도세탁셀(Docetaxel), 타목시펜(Tamoxifen), 아나스테로졸(anastrozole), 카보플라틴(carboplatin), 토포테칸(topotecan), 베로테칸(belotecan), 이리노테칸(irinotecan), 글리벡(gleevec), 빈크리스틴(vincristine), 아스피린(aspirin), 살리실레이트(salicylates), 이부프로펜(ibuprofen), 나프로센(naproxen), 페노프로펜(fenoprofen), 인도메타신(indomethacin), 페닐부타존(phenyltazone), 메소트렉세이트(methotrexate), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 메클로레타민(mechlorethamine), 덱사메타손(dexamethasone), 프레드니솔론(prednisolone), 셀레콕시브(celecoxib), 발데콕시브(valdecoxib), 니메술리드(nimesulide), 코르티손(cortisone) 및 코르티코스테로이드(corticosteroid)로

이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 약물;을 용매에 첨가하고 반응시켜, 가교결합을 유도하는 단계(단계 1);을 포함하고,

[0116] 상기 중합체의 수평균분자량(M_n)은 500-500,000 Da이고,

[0117] 상기 가교제의 중량평균분자량(M_w)은 300-1,000,000 Da이고,

[0118] 상기 중합체에 테트라진(tetrazine) 작용기가 도입된 경우, 상기 가교제 양말단 작용기는 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene)이고,

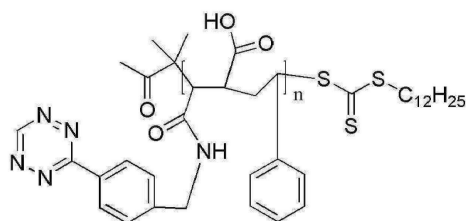
[0119] 상기 중합체에 노르보넨(norbornene), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene) 또는 1-메틸-시클로프로펜(1-methyl-cyclopropene) 작용기가 도입된 경우, 상기 가교제 양말단 작용기는 테트라진(tetrazine)이고,

[0120] 상기 중합체에 도입된 작용기와 가교제 양말단에 도입된 작용기가 상호 클릭반응으로 결합되어 가교되고,

[0121] 상기 중합체와 상기 가교제에 의해 형성되는 하이드로겔 내부 네트워크에 상기 약물이 담지되는 것을 특징으로 하는, 생체주입형 약물전달용 하이드로겔의 제조방법을 제공한다.

[0122] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 중합체는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 한다.

[0123] [화학식 1]

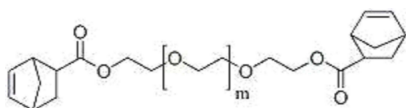


[0124]

[0125] (상기 화학식 1에서, n 은 1-250의 정수이다).

[0126] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 가교제는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 한다.

[0127] [화학식 2]



[0128]

[0129] (상기 화학식 2에서, m 은 1-500의 정수이다).

[0130] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 가교제의 중량평균분자량(M_w)은 500-30,000 Da이며, 바람직하게는 1,000-20,000 Da 일 수 있다.

[0132] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0134] 제조예 1. 폴리(스티렌-*alt*-말레익 안히드ريد) 테트라진 (PSMA-Tz)의 합성

[0135] 3-(*p*-벤질아미노)-1,2,4,5-테트라진을 물에 용해시키고 디클로로메탄(DCM)으로 추출하였다. 유기층을 버리고 물층을 Na_2HPO_4 0.2M로 알칼리화한 다음, DCM으로 다시 추출하였다. DCM 층을 Na_2SO_4 로 건조시키고 필터한 다음 용매를 감압하에 제거하여 핑크색 고체 상태의 3-(*p*-벤질아미노)-1,2,4,5-테트라진을 수득하였다.

[0136] PSMA(폴리(스티렌-*alt*-말레익 안히드ريد)) 공중합체(수평균분자량(M_n) = 5400, 말레산 무수물기 1.87mmol, 385mg)와 상기 핑크색 고체 상태의 3-(*p*-벤질 아미노)-1,2,4,5-테트라진(1.87mmol, 350mg)를 디메틸 포름아미드(DMF) 1.5mL에 첨가하였다. 반응은 질소하에 60℃의 오일조에서 4시간 동안 수행되었다. 용액을 과량의 10%

아세트산으로 침전시키고, 중합체를 테트라히드로푸란(THF)으로 세정하여 반응하지 않은 PSMA를 제거하였다. 생성된 PSMA-Tz(폴리(스티렌-alt-말레익 안히드리드) 테트라진)를 메탄올에 용해시키고 디에틸에테르로 침전시킨 후, 진공 오븐에서 40℃에서 밤새 건조시켜 최종 PSMA-Tz 생성물(제조예 1)을 수득하였다. PSMA-Tz의 화학구조는 도 1에 나타난 바와 같으며, 반응의 전환율은 92.0%로 측정되었다(표 1).

[0137] 상기 제조예 1의 PSMA와 PSMA-Tz의 ^1H NMR 및 FT-IR 스펙트럼을 도 2(a, b) 및 3(a, b)에 각각 나타내었다.

[0138] PSMA-Tz(제조예 1)의 ^1H NMR (600MHz, DMSO) (도 2b); δ 10.42-10.70 (br, 23H), 7.0-8.5 (br, 230H), 3.9-4.89 (br, 46H), 1.20-1.47 (m, 18H), 0.85 (t, 3H).

표 1

	고분자 (polymers)	Feed ratio ([M] _{Tz} /[M] _{PSMA})	Conv. (%) ^a	M_n theo. (g mol ⁻¹)	M_n , NMR (g mol ⁻¹)	$\bar{D}$ (M_w/M_n) ^b
제조예 1	PSMA ₂₃ -Tz	25	92.0	10100	9321	1.09
^a 전환율(conversion)은 중량분석(gravimetric analysis)에 의해 측정						
^b 분자량분포(molecular weight distribution)는 GPC에 의해 측정						

[0141] 제조예 2. PEG-노르보넨 (NPN) 가교제의 합성

[0142] 250mL 둥근 플라스크에서 다양한 분자량(1000, 4600 및 10000g/mol)의 폴리(에틸렌글리콜)(PEG)를 각각 DCM에 0.3 당량으로 용해시킨 다음 3.3 당량의 트라이에틸아민과 반응시켰다. 50mL 바이알에 4-N,N'-디시클로헥실카르보디이미드(DCC)를 DCM에 녹이고 3 당량의 5-노르보넨-2-카르복실산을 30분 동안 첨가하였다. 그 후, 노르보넨 용액을 상기 PEG 반응물이 담긴 플라스크 용액으로 적가하고, 반응물을 빙욕에서 30분 동안 교반하였다. 이어서, 혼합물을 실온으로 가져와 밤새 교반한 다음, 혼합물을 여과하고, 여액을 감압하에 용매를 증발시켜 점성 액체를 수득하였다. 액체를 디에틸에테르에서 2회 침전시키고 40℃의 진공 오븐에서 건조시켜 분자량 1000, 4600 및 10000g/mol의 PEG로부터 각각의 최종 NPN (노르보넨-PEG-노르보넨, Nb-PEG-Nb) 생성물(제조예 2-1, 2-2 및 2-3)을 수득하였다. NPN의 화학구조는 도 1에 나타난 바와 같으며, 전환율은 분자량 1000, 4600 및 10000g/mol의 PEG에 대하여 각각 98.5, 97.6, 96.0%로 얻어졌다(표 2).

[0143] 상기 제조예 2의 PEG 및 NPN의 ^1H NMR 및 FT-IR 스펙트럼을 도 2(c, d)와 3(c, d)에 각각 나타내었다.

[0144] PEG₁₀₄-노르보넨(제조예 2-2)의 ^1H NMR (600 MHz, CDCl₃) (도 2d); δ 5.79-6.28 (m, 2H), 4.09-4.24 (m, 2H), 3.43-3.78 (m, 416H).

표 2

	고분자 (polymers)	PEG M_w (g/mol)	Feed ratio ([M] _{Nb} /[M] _{PEG})	Conv. (%) ^a	M_n theo. (g mol ⁻¹)	M_n , NMR (g mol ⁻¹)	$\bar{D}$ (M_w/M_n) ^b
제조예 2-1	PEG ₂₂ -Nb	1000	2	98.5	1211	1200	1.14
제조예 2-2	PEG ₁₀₄ -Nb	4600	2	97.6	4823	4818	1.06
제조예 2-3	PEG ₂₂₆ -Nb	10000	2	96.0	10197	10186	1.08
^a 전환율(conversion)은 중량분석(gravimetric analysis)에 의해 측정							
^b 분자량분포(molecular weight distribution)는 GPC에 의해 측정							

[0147] 실시예 1. 역-전자-요구 디엘스 알더(IEDDA) 클릭 반응에 의한 PSMA 하이드로 겔의 제조

[0148] 도 1에 폴리(스티렌-alt-말레익 안히드리드) 테트라진 (PSMA-Tz) 및 PEG-노르보넨 (NPN) 가교제를 이용하여 역-

전자-요구 디엘스 알더 클릭 반응(Inverse-electron demand Diels Alder click reaction; IEDDA click reaction)에 의해 가교 결합된 PSMA 하이드로 겔(PSMA hydrogel)의 합성 경로를 나타내었다.

[0149] 구체적으로, 상기 PSMA-Tz(제조예 1)를 초음파 처리하에 0.2M Na_2HPO_4 10mL에 용해시키고 투석 (MWCO 3.5 kDa)에 의해 정제하여 과량의 염을 제거하였다. 80℃ 및 20torr에서 회전식 증발기에 의해 물을 제거한 후에 PSMA-Tz를 수득하여 진공하에 40℃에서 밤새 건조시켰다. 건조한 PSMA-Tz 및 NPN(제조예 2-1, 2-2 및 2-3)을 PBS(pH 7.4, 0.01M)에 각각 용해시켜 20%(w/v) 용액을 얻었다. 상기 PSMA-Tz 20%(w/v) 용액과 제조예 2-1, 2-2, 또는 2-3의 NPN 20%(w/v) 용액을 각각 테트라진:노르보넨=1:1의 몰비로 1.5 mL 튜브에 혼합하여 테트라진-노르보넨 "클릭" 반응을 통해 PSMA 하이드로겔(실시예 1-1, 3-2 및 3-3)을 얻었다.

[0150] 도 4에 도시된 바와 같이, NPN 및 PSMA-Tz는 반투명하였고, PSMA-Tz는 테트라진의 자연색 때문에 약간 붉은색이었다. 이때, 상기 PSMA 하이드로겔의 약칭은 각각 PSMA 하이드로겔 1(실시예 1-1), PSMA 하이드로겔 4.6(실시예 1-2), PSMA 하이드로겔 10(실시예 1-3)으로 명명하였고(표 3), 각 PSMA계 하이드로겔의 겔화 시간을 측정한 결과 및 특성을 표 4에 나타내었다.

표 3

[0151]

약칭	생성물	반응물	
	PSMA hydrogel	PSMA-Tz (분자량, Da)	NPN (분자량, Da)
PSMA 하이드로 겔 1	실시예 1-1	제조예 1 (9321)	제조예 2-1 (1200)
PSMA 하이드로 겔 4.6	실시예 1-2	제조예 1 (9321)	제조예 2-2 (4818)
PSMA 하이드로 겔 10	실시예 1-3	제조예 1 (9321)	제조예 2-3 (10197)

표 4

[0153]

	PSMA 하이드로겔 1 (실시예 1-1)	PSMA 하이드로겔 4.6 (실시예 1-2)	PSMA 하이드로겔 10 (실시예 1-3)
겔화 시간 (s)	49.8±19	776.3±13	1084±7
팽윤률 (%)	4.92±0.40	8.61±0.97	14.58±2.02
저장탄성률 (kPa)	1.76±0.13	0.68±0.092	0.38±0.05

[0155] 실시예 4. 독소루비신(doxorubicin, DOX)이 탑재된 PSMA 하이드로겔의 제조

[0156] 염산독소루비신(doxorubicin hydrochloride, DOX·HCl)을 PBS(pH 7.4, 0.01 M)에 0.5 mg/mL의 농도로 준비하였다. 준비된 0.5 mg/mL 농도의 DOX·HCl(21.25ug DOX/ 12.5uL PBS)을 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 준비된 20%(w/v) PSMA-Tz(제조예 1)용액(10mg PSMA-Tz/ 30uL PBS) 및 NPN(제조예 2-1 내지 2-3) 용액(10mg NPN/ 30uL PBS)에 각각 소량 첨가한 다음, 두 용액을 혼합하여 테트라진-노르보넨 클릭반응을 통해 DOX·HCl가 탑재된 하이드로겔(실시예 4-1, 4-2 및 4-3)을 제조하였다. 상기 DOX·HCl가 탑재된 PSMA 하이드로 겔(0.5mg/mL)은 5 mL 바이알에서 개별적으로 제조되었다.

[0158] 실험예 1. 실시예 1의 PSMA 하이드로겔의 형태학적 관찰

[0159] 실시예 1-1 내지 3-3의 PSMA 하이드로겔의 단면 형태는 SEM에 의해 조사되었다. 실시예 1-1 내지 3-3의 PSMA 하이드로 겔 각각을 탈 이온수에서 25℃에서 48시간 동안 완전히 팽윤시키고, 진공하에 48시간 동안 -40℃에서 동결 건조시켰다. 동결 건조된 각 샘플을 액체 질소에서 동결시킨 다음 블레이드를 사용하여 절단하고 금 도전 층으로 코팅하였다. 실시예 1-1 내지 3-3의 PSMA 하이드로겔의 SEM 이미지를 도 5에 도시하였다.

[0160] 도 5에 나타난 바와 같이 실시예 1-1(도 5a), 3-2(도 5b) 및 3-3(도 5c)의 모든 샘플이 다공성 구조를 갖는 것을 확인할 수 있다. 보다 구체적으로 실시예 1-1은 가장 작은 원형의 다공성 구조를 가졌으며, 실시예 1-2 및 3-3은 더 큰 다공성 구조를 갖는 것을 확인할 수 있다. 따라서 PSMA 하이드로겔의 다공성은 NPN의 분자량으로 조절할 수 있는 것을 확인하였다.

[0162] **실험예 2. 실시예 1의 PSMA 하이드로겔의 팽창 비율 측정**

[0163] 실시예 1-1 내지 3-3의 PSMA 하이드로겔의 팽창 특성 및 졸 분율은 고전적인 중량법에 의해 측정하였다. 각각의 하이드로겔을 제조한 후, -40℃에서 24시간 동안 동결 건조시켜 건조 중량(W_d)을 측정하였다. 다음으로, 하이드로겔을 37℃에서 24시간 동안 인산염 완충 식염수(PBS)(pH 7, 0.01M)에서 평형 상태로 팽창시켰다. 시료를 PBS에서 꺼내고 표면의 여분 PBS를 여과지로 빠르게 닦아서 무게(W_s)를 재었다. 팽창비(SR)는 하기 식 (1)에 의하여 계산하였다.

[0164]
$$SR = (W_s - W_d) / W_d \times 100\% \quad (1)$$

[0166] 상기 식 (1)에 의하여 계산한 PSMA 하이드로 겔의 팽창비는 각각 4.92%, 8.61%, 및 14.58% 였다. 이는 NPN의 분자량이 높을수록 PSMA-Tz 사슬 사이에 더 많은 공간(더 낮은 가교 결합 밀도)과 하이드로 겔과 물 분자 사이의 더 많은 상호작용을 제공한다는 것을 확인할 수 있었으며, 그 결과 가교제의 분자량이 증가함에 따라 보다 큰 다공성 및 보다 큰 팽창비를 얻을 수 있다.

[0167] 또한, PSMA 계 하이드로겔의 주파수 스위프테스트를 레오미터 ARES-G2로 평가하였다. 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 실시예 1-1, 3-2 및 3-2를 동일한 농도(20% w/v)에서 저장 탄성률(G') 값이 NPN 가교제의 분자량에 반비례하는 것을 확인하였다. 또한, 상기 표 4에서와 같이 0.3-1.7kPa의 범위였으며, 테스트된 모든 주파수 범위(0.1-100 rad/s)에서 PSMA 하이드로겔은 안정적인 것을 확인하였다.

[0169] **실험예 3. PSMA 하이드로겔에 탑재된 DOX·HCl의 방출 양상 분석(시험관내 실험)**

[0170] 상기 실시예 4-1 내지 4-3의 DOX·HCl가 탑재된 하이드로겔(0.5mg/mL)이 준비된 각 바이알(5 mL)에 PBS 용액(pH 6.5 또는 7.4, 0.01M, 3 mL)을 첨가하고 수평 교반기에서 100 rpm 및 37℃에서 배양하였다. 탑재된 DOX·HCl의 질량은 동일한 버퍼 용액에서 DOX·HCl의 표준 검량선을 사용하여 UV 분광법으로 결정하였다. 누적 약물 방출 (CDR)은 하기 식 (2)에 의해 계산하였다.

[0171]
$$CDR = (x_n + \sum_{i=0}^{n-1} x_i) / x_0 \times 100 \% \quad (2)$$

[0172] 여기서 x_n 은 시간 t에서 분취량의 DOX·HCl의 질량이고, n은 시간 t까지 추출된 총 분취량이다. x_0 는 최초 탑재된 DOX·HCl의 질량이고 x_i 는 분취된 DOX의 질량이다. 방출된 DOX·HCl의 양은 표준 검량선과 비교하여 계산하였다.

[0173] PBS pH 6.5와 7.4에서의 PSMA 하이드로겔의 약물 방출 양상을 도 7에 도시하였다.

[0174] 도 7에 나타난 바와 같이 가교제의 분자량을 증가시키면 DOX·HCl의 방출이 증가하는 경향이 있다. DOX·HCl은 하이드로겔로부터 48시간 내에 약 52%-86% 방출되었다. PBS pH 7.4에서 상기 실시예 1-1, 3-2 및 3-3의 DOX·HCl의 누적 방출은 각각 52.50%, 61.81%, 73.24%였다. 반면에 PBS pH 6.5(암세포 외 미세환경과 유사)에서 DOX·HCl의 누적 방출은 pH 7.4에서보다 약간 높았으며, 각각 67.31%, 78.26%, 86.43%였다.

[0175] 산성 조건 하에서 DOX·HCl의 아민 그룹의 양성자화는 DOX·HCl의 수용해도를 향상시킬 수 있다. DOX·HCl 방출은 하이드로 겔 팽창 과정과 확산 제어 메커니즘에 의해 관리될 수 있다. 또한, NPN의 분자량 증가는 DOX·HCl 방출을 더 빠르게 만들었으며, 이 현상은 하이드로 겔의 더 높은 기공 크기에 의해 하이드로 겔 매트릭스와 외부 수상(aqueous phase) 사이의 DOX·HCl 확산을 촉진시키는 것을 알 수 있다.

[0177] **실험예 4. PSMA-TZ, NPN, PSMA 하이드로겔 및 DOX·HCl이 탑재된 PSMA 하이드로겔의 세포 독성 분석**

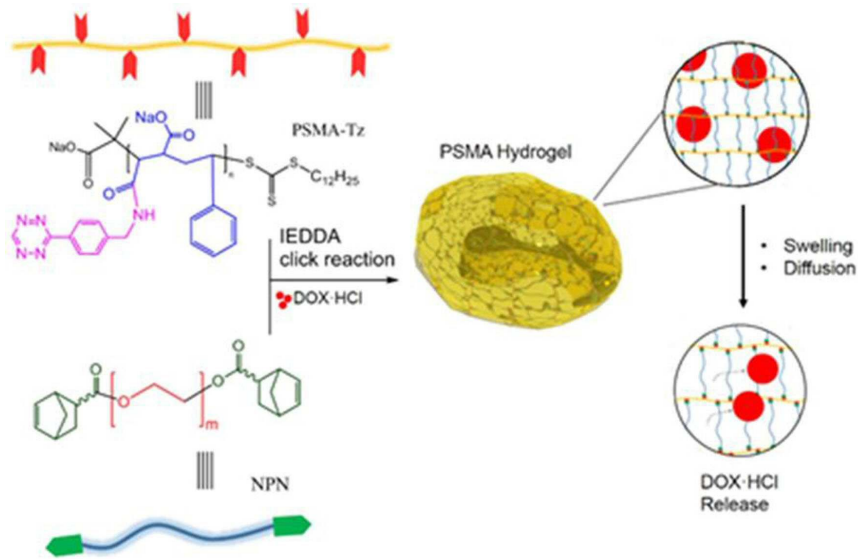
[0178] 정상세포 HEK293(인간 배아 신장) 및 암세포 HeLa(인간 자궁 경부암)를 사용하여 독성 평가를 하였다. 각 세포를 배양하고 MEM 배지에서 유지시켰다. 배지에 10% FBS 및 1% 항생제(100μg/mL 페니실린 및 100μg/mL 스트렙토마이신)를 보충하였다. 세포 배양물을 37℃, 5% CO₂ 가습 분위기에서 배양하고 배양 배지를 매 2일 간격으로 교

체하였다.

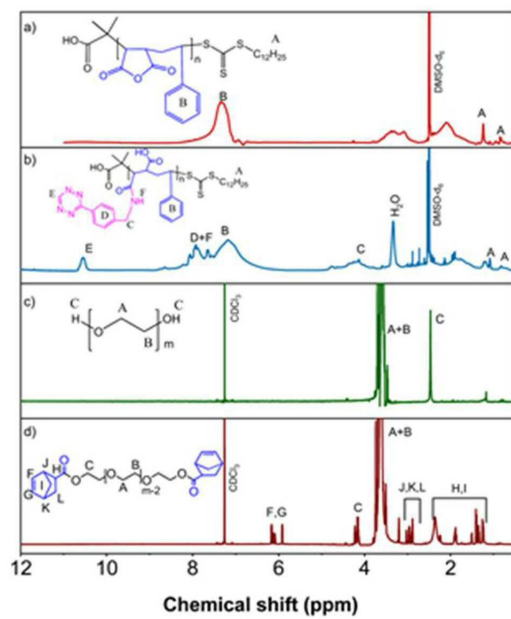
- [0179] 전구체(PSMA-Tz(제조예 1) 및 NPN(제조예 2-??)), PSMA 하이드로겔(실시예 1-1 내지 3-3) 및 DOX·HCl이 탑재된 PSMA 하이드로겔(실시예 4-1 내지 4-3)의 세포 독성 평가를 MTT 방법으로 수행하였다. 전구체 PSMA-Tz(제조예 1) 및 NPN(제조예 2-??)는 PBS 용액(0.01M, pH 7.4)에 용해시켜 제조하였다. 다른 한편으로, PSMA 하이드로겔 1, 4.6 및 10(실시예 1-1, 3-2 및 3-3)과 DOX·HCl이 탑재된 PSMA 하이드로겔 1, 4.6 및 10(실시예 4-1, 4-2 및 4-3)을 각각 37℃에서 PBS 용액(0.01M, pH 7.0)에 48시간 동안 처리하였다. 하이드로겔을 제거하고 추출물로서 세포 생존력을 평가하였다.
- [0180] 첫 번째 단계에서 HEK293 및 HeLa 세포(100 μL, 1×10^4 세포/웰)를 96-웰 플레이트에 시딩하였다. 세포를 5% CO₂ 분위기에서 37℃에서 24시간 동안 배양했다. 두 번째 단계에서 세포 배지를 다양한 농도(0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 0.25, 1.50, 1.75 및 2.0mg/mL)의 전구체로 처리한 HEK293 세포, PSMA 하이드로겔 또는 DOX·HCl을 탑재한 하이드로겔 추출물로 처리한 HeLa 세포 등을 함유한 새로운 배지(100 μL)로 교체하였다. 세 번째 단계에서는 세포 배양액을 100 μL 배지로 교체하고 10 μL의 WST-1[®] 용액으로 교체하였다. 그리고 96-웰 플레이트를 상기와 동일한 조건에서 3시간 동안 추가로 배양하였다. 마지막으로, 460nm에서 ELISA 마이크로 플레이트 판독기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 반응의 흡광도를 측정하고 상대 세포 생존력에 의해 세포 성장 저해율을 계산하였다.
- [0181] 도 8a는 다양한 농도에서 세포 생존율 및 그에 상응하는 독성 수준을 나타내며, 그 결과 전구체가 HEK293 세포 성장에 대한 억제효과를 나타내지 않아 생체적합성을 나타냄을 보여준다.
- [0182] 도 8b는 PSMA 하이드로겔 1, 4.6 및 10(실시예 1-1, 3-2 및 3-3)과 DOX·HCl이 탑재된 PSMA 하이드로겔 1, 4.6 및 10(실시예 4-1, 4-2 및 4-3)의 추출물로서 세포 생존력을 평가한 결과이다. PBS(0.01 M, pH.4)중의 Blank hydrogel(각각 실시예 1-1, 3-2 및 3-3) 추출물은 HeLa 세포에서 유의적인 세포 성장 억제를 나타내지 않았는데, 이는 하이드로겔이 생체 적합성을 나타내는 것을 의미하며, DOX·HCl이 탑재된 PSMA 하이드로겔 1, 4.6 및 10(실시예 4-1, 4-2 및 4-3) 추출물은 세포 생존율의 억제를 나타냈다.
- [0183] DOX·HCl(도 8b의 붉은색 막대그래프, 15ng/ml)는 동일한 용량의 DOX·HCl이 탑재된 PSMA 하이드로겔 1, 4.6 및 10(실시예 4-1, 4-2 및 4-3) 추출물 보다 더 높은 세포 독성을 나타내었으며 이는 하이드로겔(실시예 4)에서 DOX·HCl의 지속적인 방출로 인한 것임을 알 수 있다.
- [0184] 도 9는 배양 후 HeLa 세포의 형태를 나타낸 것으로, Blank hydrogel(각각 실시예 1-1, 3-2 및 3-3)로 처리된 세포의 형태 및 밀도는 대조군(비처리 세포)과 유사하였으며, Free DOX·HCl 및 DOX·HCl이 탑재된 PSMA 하이드로겔 1, 4.6 및 10(실시예 4-1, 4-2 및 4-3)로 처리된 세포에서는 분리되거나 덜 부착된 세포가 관찰되었다.
- [0185] 상기 세포 독성 결과는 PSMA 하이드로겔이 우수한 생체 적합성을 보이는 반면 DOX·HCl이 탑재된 PSMA 하이드로겔 1, 4.6 및 10(실시예 4-1, 4-2 및 4-3)은 DOX·HCl의 방출을 효과적으로 유지하며 HeLa 세포를 효과적으로 세포 사멸을 유도하는 것을 확인할 수 있다.
- [0187] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

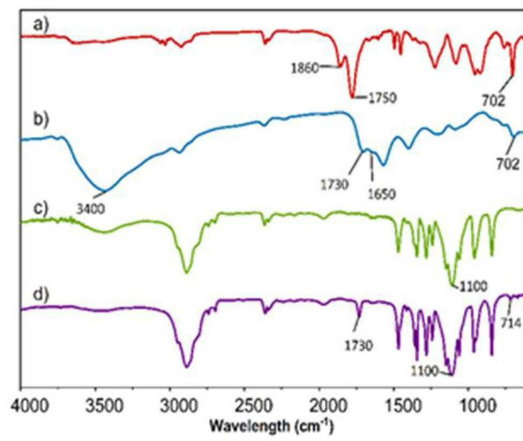
도면1



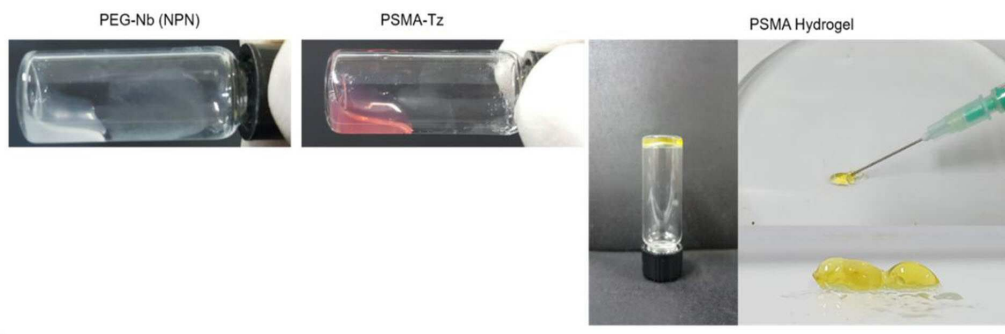
도면2



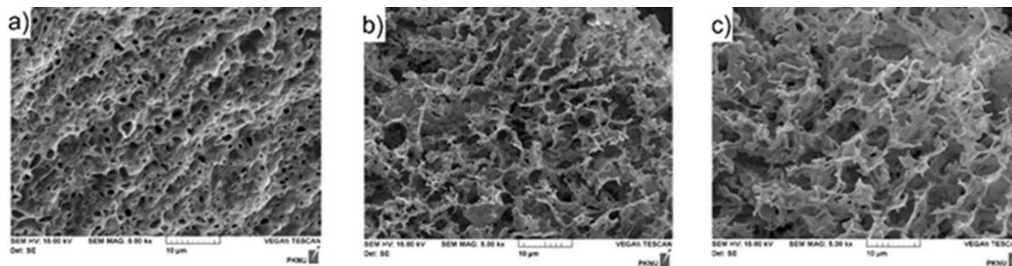
도면3



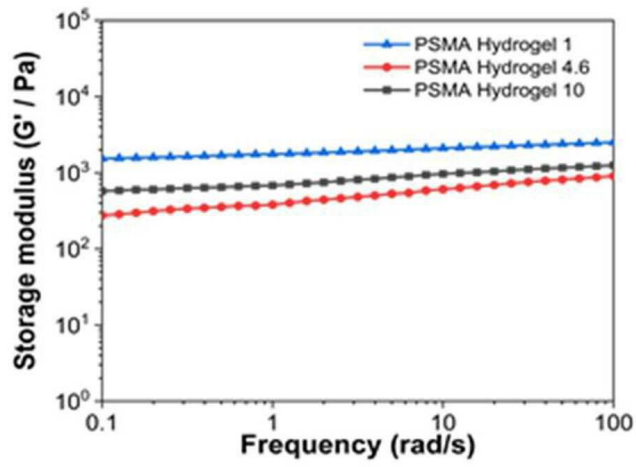
도면4



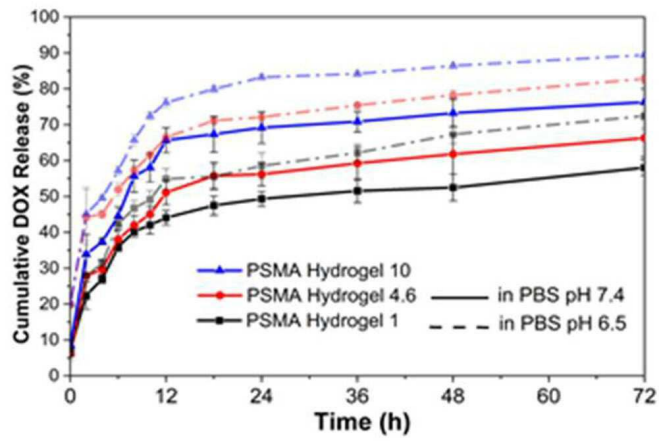
도면5



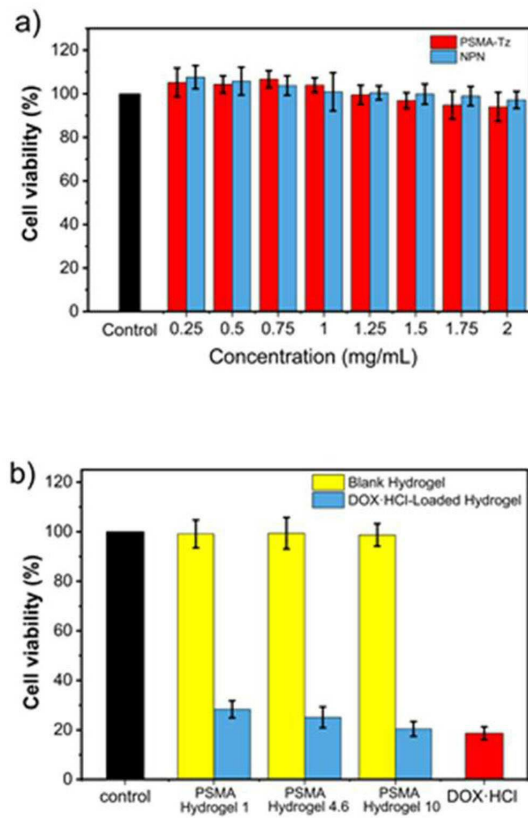
도면6



도면7



도면8



도면9

