

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0121719

(43) 공개일자 2022년09월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/06 (2006.01) A61K 47/36 (2017.01)
 A61K 9/00 (2006.01) C08B 37/00 (2006.01)
 C08J 3/075 (2006.01) C08J 3/24 (2006.01)
 C08K 5/1539 (2006.01) C08K 5/1545 (2006.01)
 C08K 5/16 (2006.01) C08K 5/20 (2006.01)
 C08K 5/3415 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/06 (2013.01)
 A61K 47/36 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0021621

(22) 출원일자 2022년02월18일

심사청구일자 2022년02월18일

(30) 우선권주장

1020210024660 2021년02월24일 대한민국(KR)

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)

(72) 발명자

임권택

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

(74) 대리인

위병갑

전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 개질 쿠마린을 가교제로 이용한 근적외선 감응형 하이드로겔, 이의 제조방법 및 이를 이용한 약물 전달 시스템

(57) 요약

본 발명은 수불용성인 쿠마린을 개질하여 쿠마린-에스테르 결합 포함 가교제로 사용하고, 상기 가교제는 근적외선(NIR)에 반응하여 쿠마린-에스테르 결합이 분해되는 효과를 활용하여, 이를 이용한 근적외선 감응형 하이드로겔 담체에 관한 것으로, 클릭반응에 의하여 간편하게 제조될 수 있고, 특이적으로 외부에서 능동적으로 하이드로겔을 분해하여 약물을 방출함으로써, 이를 제약분야와 화장품 분야에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1

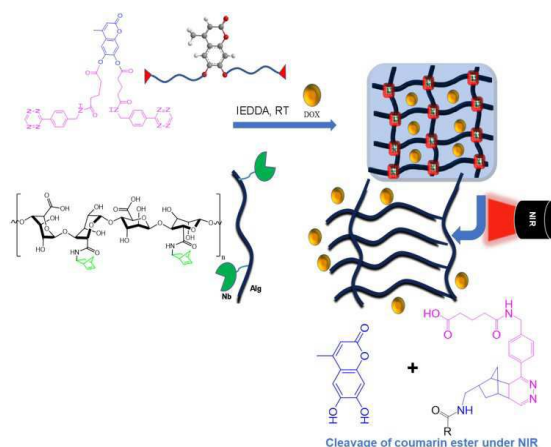


Figure 1. Schematic representation of the synthesis of coumarin based NIR responsive hydrogels and mechanism of drug release.

(52) CPC특허분류

A61K 9/0009 (2013.01)
C08B 37/0084 (2013.01)
C08J 3/075 (2013.01)
C08J 3/24 (2021.05)
C08K 5/1539 (2013.01)
C08K 5/1545 (2013.01)
C08K 5/16 (2013.01)
C08K 5/20 (2013.01)
C08K 5/3415 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345313658
과제번호	2018R1D1A3B07041437
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	지역대학우수과학자지원사업(1년~5년)
연구과제명	클릭반응을 이용한 약물전달용 고성능 고분자 임플란트 물질 합성 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	부경대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

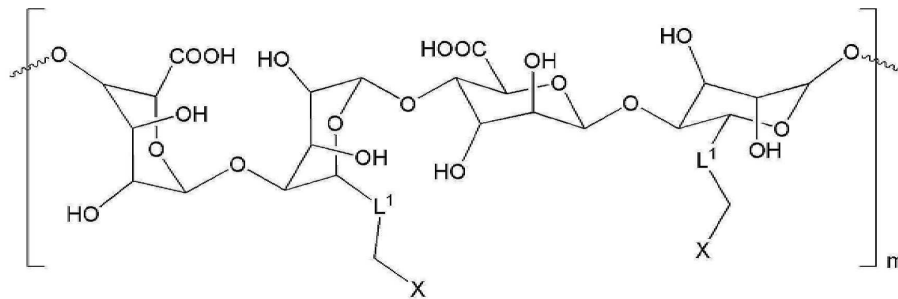
하기 화학식 1로 표시되는 알긴산 유도체; 및

하기 화학식 2로 표시되는 쿠마린-에스테르 결합 포함 가교제;를 포함하고,

하기 화학식 1의 치환기 X와 하기 화학식 2의 치환기 Y는 서로 클릭반응 가능한 조합인 것을 특징으로 하고,

상기 화학식 2로 표시되는 쿠마린-에스테르 결합 포함 가교제는 근적외선에 반응하여 상기 쿠마린-에스테르 결합이 분해되는 것을 특징으로 하는 하이드로겔.

[화학식 1]

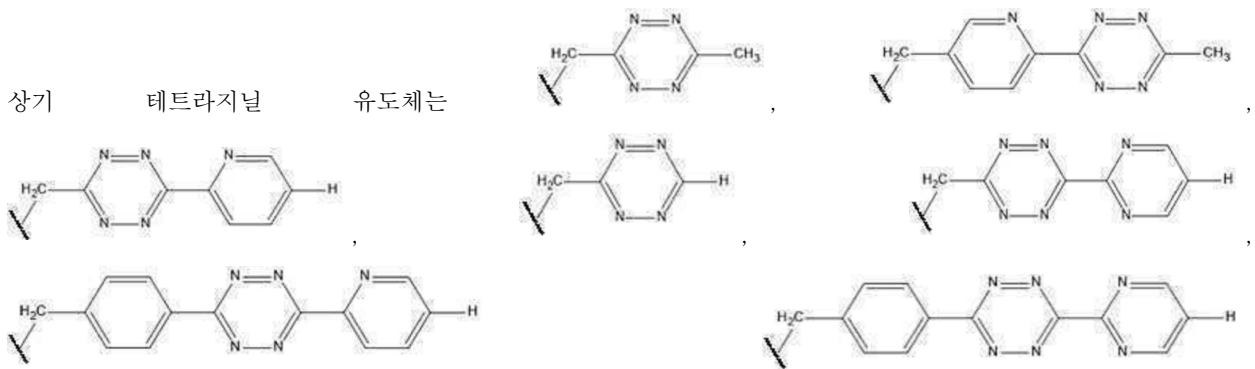
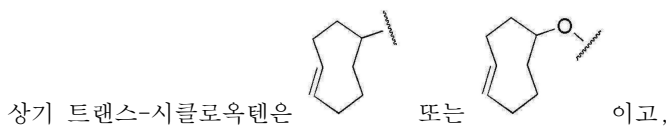
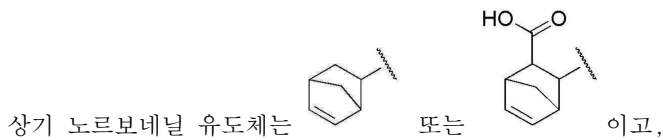


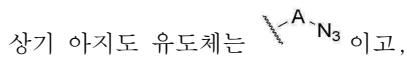
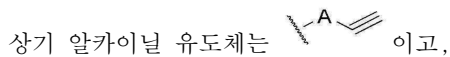
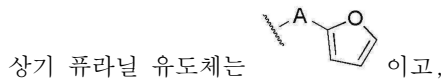
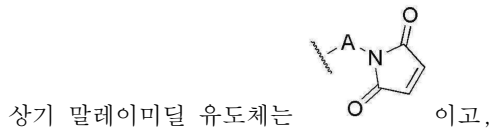
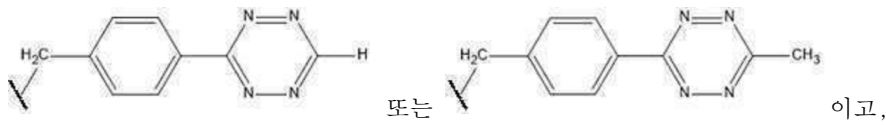
(상기 화학식 1에서,

m은 1-100,000의 정수이고;

L¹은 에스테르 (ester) 또는 아마이드 (amide) 결합이고;

X는 노르보네닐(norbornenyl), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene), 테트라지닐(tetrazinyl), 말레이미딜(maleimidyl), 퓨라닐(furanyl), 알카이닐(alkynyl), 또는 아지도(azido) 이고;

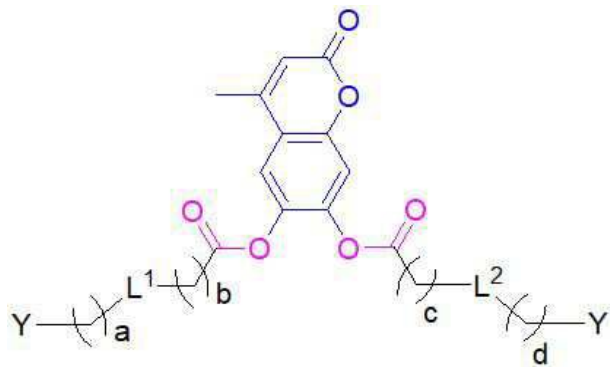




상기 A는 단일결합, C₁₋₅의 알킬레닐 또는 -Z¹-(CH₂CH₂O)-Z²-이고,

상기 Z¹ 및 Z²는 각각 단일결합 또는 C₁₋₅의 알킬레닐이다.)

[화학식 2]



(상기 화학식 2에서,

a, b, c 및 d는 각각 1-10의 정수이고;

L¹ 및 L²는 에스테르 (ester), 아민(amine), 아마이드 (amide), 에테르(ether) 또는 C₁₋₁₀의 알킬레닐 결합이고;

Y는 상기 화학식 1에서 X의 정의와 같다.)

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 하이드로겔은 내부에 약물을 도입할 수 있고,

상기 약물은 인슐린, 항 류마티스 제제, 프레드니솔론 21-아세테이트(prednisolone 21-acetate), 파클리탁셀 (paclitaxel), 독소루비신(doxorubicin), 레티노익 산(retinoic acid), 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), 텍사메타손(dexamethasone), 프레드니솔론(prednisolone), 셀레콕시브(celecoxib), 발데콕시브(valdecoxib), 니메술리드(nimesulide), 코르티손(cortisone), 코르티코스테로이드(corticosteroid), 글라브리딘(glabridin), 보스웰린 씨지(Boswellin CG), 알마 엑스트랙트(Alma extract), 알파 리포에이트(Alpha lipoate), 사비 화이트(Sabi white), 심 화이트(Symwhite 377), 루시놀(Rucinol), 커큐미노이드(curcuminoid), 모자반 추출물, 누에고치 추출물, 레티노이드(Retinoids), 비타민 A, 비타민 C, 베틀린산(Betulinic acid), TGF(Transforming growth factor), 코엔자임 Q10(coenzyme Q10), 아스코르브산(Ascorbic acid), 오노닌(Ononin), 동물 태반 유래의 단백질, 센티그라스 추출물, 연교 추출물, 클로렐라 추출물, α-리포산(α-lipoic acid), α-토코페롤(α-Tocopherol), 레티놀(Retinol), 글루타치온(Glutathione), 니스테인(Genistein), 퀘세틴(Quercetin), 프로필 갈레이트(Propyl gallate), 에피갈로카테킨 갈레이트(Epigallocatechin gallate), 갈로카테킨 갈레이트(Gallocatechin gallate), 실리빈(Silybin), 디오스메틴(Diosmetin), 캠퍼롤(Kaempferol), 에피카테킨(Epicatechin) 및 갈란긴(Galangin)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 하이드로겔.

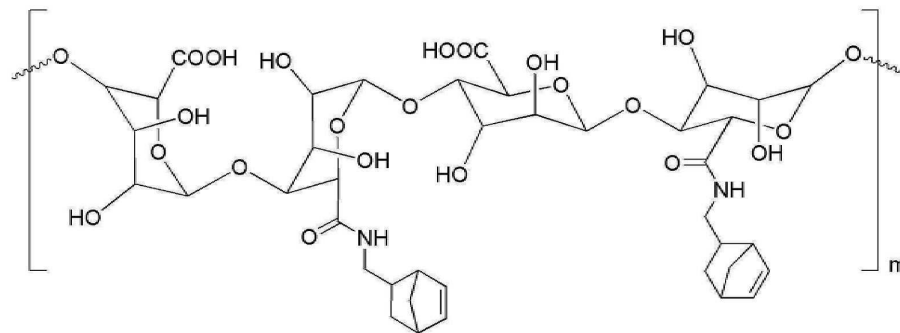
청구항 3

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 알긴산 유도체는,

하기 화학식 3로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 하이드로겔:

[화학식 3]



(상기 화학식 3에서,

m은 1-100,000의 정수이다.)

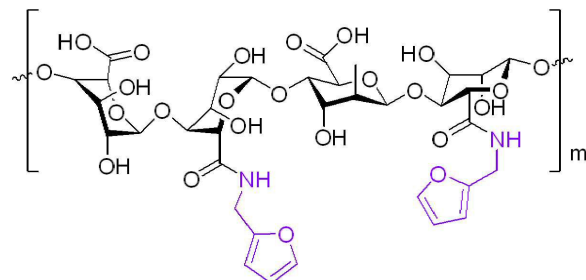
청구항 4

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 알긴산 유도체는,

하기 화학식 4로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 하이드로겔:

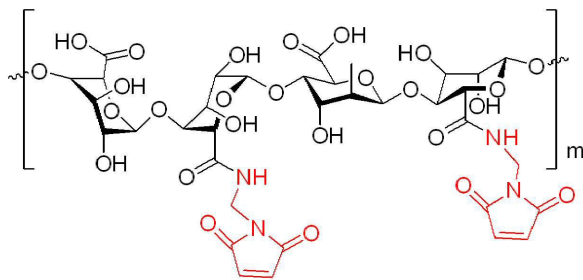
[화학식 4]



(상기 화학식 4에서,
m은 1-100,000의 정수이다.)

청구항 5

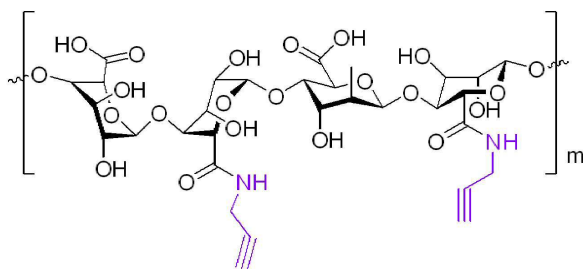
제1항에 있어서,
상기 화학식 1로 표시되는 알긴산 유도체는,
하기 화학식 5로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 하이드로겔:
[화학식 5]



(상기 화학식 5에서,
m은 1-100,000의 정수이다.)

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 화학식 1로 표시되는 알긴산 유도체는,
하기 화학식 6로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 하이드로겔:
[화학식 6]

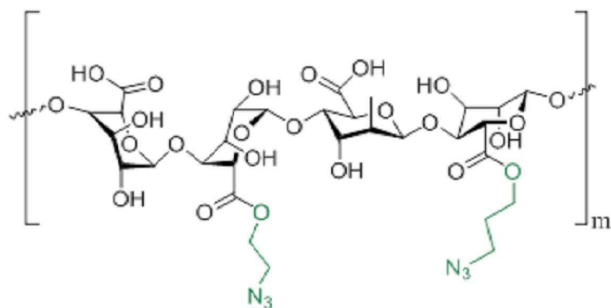


(상기 화학식 6에서,
m은 1-100,000의 정수이다.)

청구항 7

제1항에 있어서,
상기 화학식 1로 표시되는 알긴산 유도체는,
하기 화학식 7로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 하이드로겔:

[화학식 7]



(상기 화학식 7에서,

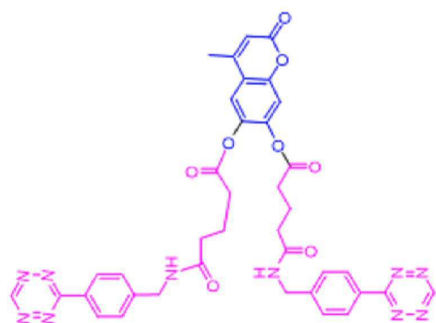
m은 1-100,000의 정수이다.)

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 화학식 2로 표시되는 가교제는 하기 화학식 8로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 하이드로겔:

[화학식 8]

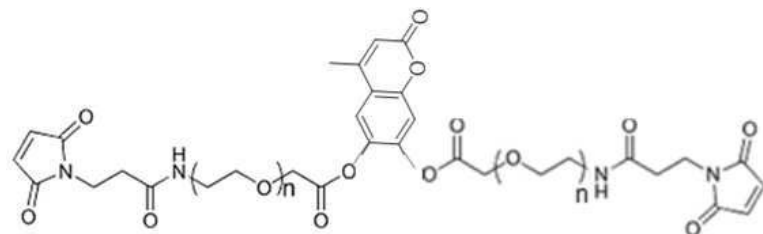


청구항 9

제1항에 있어서,

상기 화학식 2로 표시되는 가교제는 하기 화학식 9으로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 하이드로겔:

[화학식 9]



(상기 화학식 9에서,

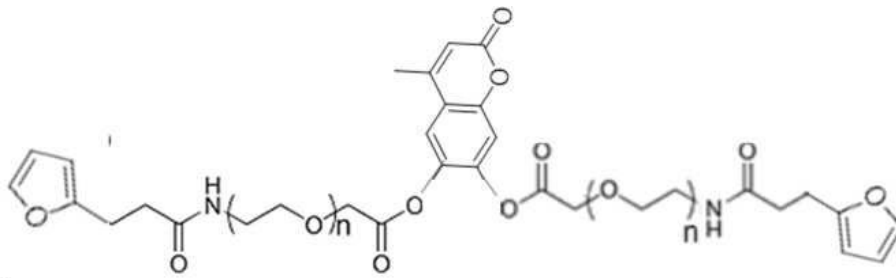
n은 1-150의 정수이다.)

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 화학식 2로 표시되는 가교제는 하기 화학식 10으로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 하이드로겔:

[화학식 10]



(상기 화학식 10에서,

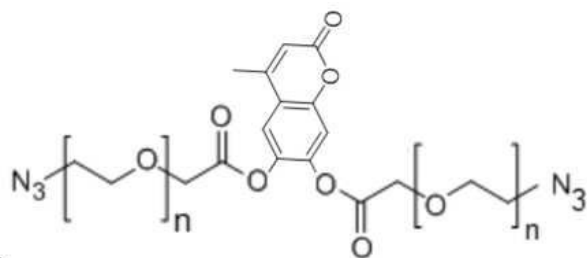
n은 1-150의 정수이다.)

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 화학식 2로 표시되는 가교제는 하기 화학식 11으로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 하이드로겔:

[화학식 11]



(상기 화학식 11에서,

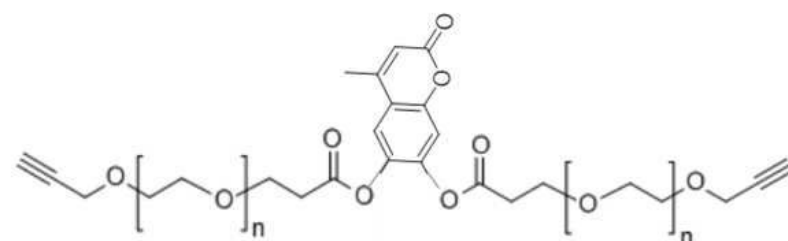
n은 1-150의 정수이다.)

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 화학식 2로 표시되는 가교제는 하기 화학식 12으로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 하이드로겔:

[화학식 12]



(상기 화학식 12에서,

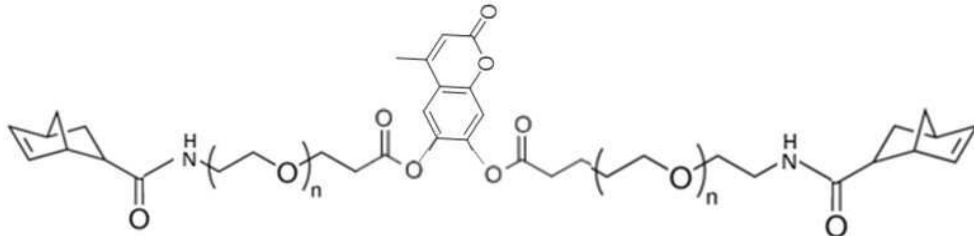
n은 1-150의 정수이다.)

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 화학식 2로 표시되는 가교제는 하기 화학식 12으로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 하이드로겔:

[화학식 13]



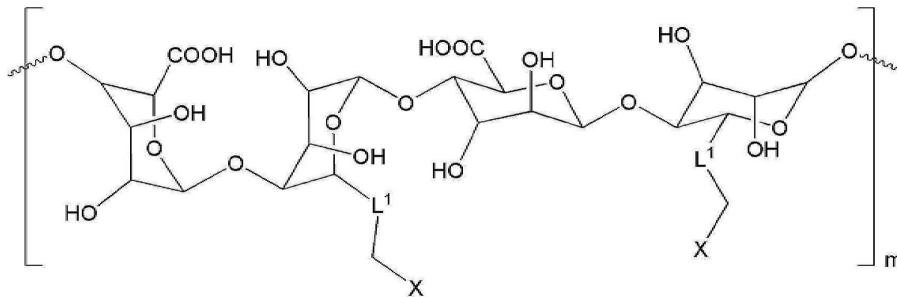
(상기 화학식 13에서,

n은 1-150의 정수이다.)

청구항 14

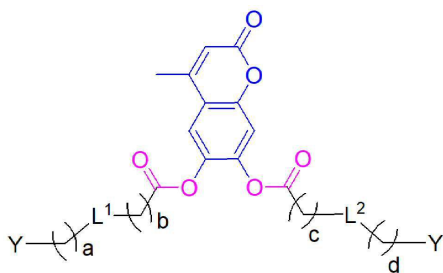
하기 화학식 1로 표시되는 알긴산 유도체, 및 하기 화학식 2로 표시되는 쿠마린-에스테르 결합 포함 가교제를 용매에 첨가하고 반응하는 단계(단계 1); 를 포함하는, 하이드로겔의 제조방법.

[화학식 1]



(상기 화학식 1은 제1항에서 정의한 바와 같다.)

[화학식 2]



(상기 화학식 2는 제1항에서 정의한 바와 같다.)

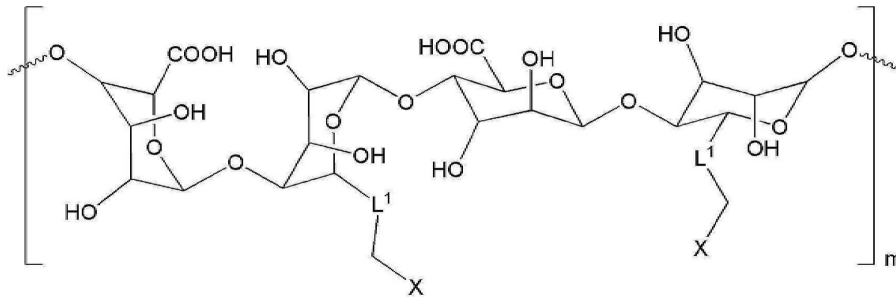
청구항 15

제1항의 하이드로겔을 포함하는, 약물전달체.

청구항 16

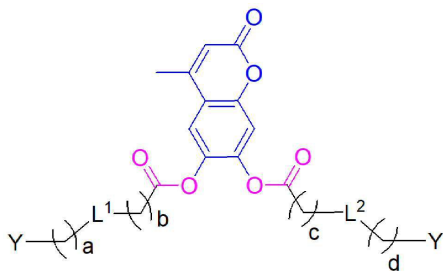
하기 화학식 1로 표시되는 알긴산 유도체, 하기 화학식 2로 표시되는 쿠마린-에스테르 결합 포함 가교제 및 약물을 용매에 첨가하고 반응하는 단계(단계 1);를 포함하는, 약물전달체의 제조방법.

[화학식 1]



(상기 화학식 1은 제1항에서 정의한 바와 같다.)

[화학식 2]



(상기 화학식 2는 제1항에서 정의한 바와 같다.)

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 약물은 인슐린, 항 류마티스 제제, 프레드니솔론 21-아세테이트(prednisolone 21-acetate), 파클리탁셀(paclitaxel), 독소루비신(doxorubicin), 레티노익 산(retinoic acid), 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(phenylbutazone), 메소트렉세이트(methotrexate), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 메클로레타민(mechlorethamine), 덱사메타손(dexamethasone), 프레드니솔론(prednisolone), 셀레콕시브(celecoxib), 발데콕시브(valdecoxib), 니메술리드(nimesulide), 코르티손(cortisone), 코르티코스테로이드(corticosteroid), 글라브리딘(glabridin), 보스웰린 씨지(Boswellin CG), 알마 엑스트랙트(Alma extract), 알파 리포에이트(Alpha lipoate), 사비 화이트(Sabi white), 심 화이트(Symwhite 377), 루시놀(Rucinol), 커큐미노이드(curcuminoid), 모자반 추출물, 누에고치 추출물, 레티노이드(Retinoids), 비타민 A, 비타민 C, 베툴린산(Betulinic acid), TGF(Transforming growth factor), 코엔자임 Q10(coenzyme Q10), 아스코르브산(Ascorbic acid), 오노닌

(Ononin), 동물 태반 유래의 단백질, 쉐티그라스 추출물, 연교 추출물, 클로렐라 추출물, α -리포산(α -lipoic acid), α -토코페롤(α -Tocopherol), 레티놀(Retinol), 글루타치온(Glutathione), 니스테인(Genistein), 퀘세틴(Quercetin), 프로필 갈레이트(Propyl gallate), 에피갈로카테킨 갈레이트(Epigallocatechin gallate), 갈로카테킨 갈레이트(Gallocatechin gallate), 실리빈(Silybin), 디오스메틴(Diosmetin), 캠퍼롤(Kaempferol), 에피카테킨(Epicatechin) 및 갈란긴(Galangin)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약물전달체의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 수불용성인 쿠마린을 개질한 쿠마린-에스테르 결합 포함 가교제로 사용하고, 상기 가교제는 근적외선(NIR)에 반응하여 쿠마린-에스테르 결합이 분해되는 효과를 활용하여, 이를 이용한 근적외선 감응형 하이드로겔 담체에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 지난 수십 년 동안 하이드로겔(hydrogel)은 풍부한 수분 함량과 천연 생체 조직의 환경과 유사한 부드러운 성질 등으로 인하여 실용적인 바이오 캐리어로 개발되었다. 알긴산(alginate)은 생체 적합성(biocompatibility), 생분해성(biodegradability) 및 저 가격성으로 인해 우수한 천연 하이드로겔 원료 물질 중의 하나이다. 알긴산은 고분자 사슬을 따라 α -L-guluronic acid (G)와 1,4-linked β -D-mannuronic acid (M)의 반복 단위로 구성된 갈색 해조류에서 얻어진다.

[0005] 알긴산 하이드로겔의 졸-겔(sol-gel) 전이는 이온성 가교 결합체(ionic cross-linker)로서 작용하는 2가 양이온의 존재 하에서 온화한 조건 하에서 매우 쉽게 일어난다. 그러나, 이온 결합에 의하여 가교된 알긴산 하이드로겔은 시간이 지남에 따라 매트릭스(matrix)로부터의 자연적인 이온 방출에 의해 기계적 강도를 잃는 것으로 나타났다. 한편, 기계적 성질이 장기간 유지될 수 있는, 공유 결합(covalent bond)으로 가교된 하이드로겔 구조는 알긴산 하이드록실(hydroxyl) 및 카르복실기(carboxyl group)를 변형시킴으로써 제조된다.

[0007] 최근에는, 푸란기가 도입된(furan-modified) 알긴산과 말레이미드 가교제(maleimide cross-linker)의 디엘스 알더(Diels-Alder) 반응을 통해 공유 결합으로 가교된 알긴산 하이드로겔이 생산되었다. 그러나 이러한 하이드로겔을 형성하기 위해서는 약 65°C의 비교적 높은 온도에서 오랫동안 반응 시간이 필요하다. 반면에, 역 전자 수요 디엘스 알더(inverse electron demand Diels-Alder, IEDDA) 반응은 온화한 조건에서 빠른 반응과 주위에 손상을 일으키지 않으면서 생체 적합 물질을 캡슐화 할 수 있는 유기 화학 반응으로, 주사 가능한 하이드로겔에 적합하다고 알려져 있다.

[0009] 지금까지 생리 조건에서 하이드로겔 가교 결합의 분해를 촉진시키기 위해 pH, 빛 및 초음파와 같은 몇 가지 자극-응답성 트리거(stimuli-responsive triggers)가 알긴산 하이드로겔에 도입되었다. 그중에 한가지 방법으로 UV 광 반응성 알긴산 하이드로겔이 개발되어, UV 조사에 의해 내부 염료 물질의 방출을 조절할 수 있었으나 자외선은 조직에 깊숙이 침투할 수 없으며 인체에 손상을 줄 수 있는 단점이 있다. 반면에, 근적외선(near infrared, NIR) 빛은 큰 부작용 없이 3 ~ 5 mm 정도 생체 조직에 깊숙이 침투할 수 있는 장점이 있다. 그 동안 근적외선 광 응답성 하이드로겔을 생산하는 일반적인 방법으로 산화 그래핀 나노시트(graphene oxide nanosheet), 탄소 나노 튜브(carbon nanotube) 및 금 나노 입자(gold nanoparticle)와 같은 근적외선 흡수 물질을 사용하는 것이 알려졌다.

[0011] 그러나, 이러한 종류의 방법들은 열 감응성 중합체(thermosensitive polymer)에 대해서만 가능하여 알긴산과 같은 생체 유래 고분자에 적용하기가 어렵고 또한 근적외선 빛이 꺼지면 분해반응이 멈추게 된다.

- [0013] 최근에 근적외선 염료인 인도시아닌 그린(Indocyanine green, ICG)과 디셀레나이드(diselenide) 결합을 이용한 근적외선 응답성의 하이드로 겔이 문헌에 발표되었다. 이것은 ICG 가 근적외선을 흡수하고 반응성 산소 종을 생성하여 산화 환원 민감성 디셀레나이드 결합을 분해하는 메커니즘으로 근적외선 감응성을 구현하는 것이다.
- [0015] 그러나, 필수 첨가제인 ICG가 수용성인 관계로 생체내 사용 중에 생리적인 조건에서 ICG 가 하이드로겔로부터 서서히 빠져나오는 성질과 특히 ICG는 화학적으로 불안정하여 생체내에서 장기간 온전하게 유지될 수 없는 성질이 있어, 생체내 적용 후 근적외선 조사가 필요한 시점까지 ICG가 하이드로 겔에 충분한 농도로 남아있지 못하는 단점이 있다.
- [0017] 이것은 근적외선 응답 효율을 크게 떨어뜨리고 실제 적용에 있어 사용 효과 실현에 중요한 걸림돌이 되고 있다.
- [0019] 따라서, ICG가 포함되지 않은 근적외선 감응형 하이드로 겔 시스템을 개발하는 과제가 보다 실용적인 근적외선 반응성 하이드로 겔을 제공하는 유망한 전략이 될 수 있다.
- [0021] 본 발명에서는 IEDDA 클릭 작용기가 각각 도입된 알긴산과 쿠마린 유도체 (coumarin derivatives) 구조를 가지는 가교제 사이의 클릭 반응을 이용하여 알긴산을 기반으로 한 새로운 NIR 반응성 하이드로겔에 대한 방법을 제공한다.
- [0023] 쿠마린 유도체는 근적외선 조사에 의하여 결합이 분해하는 특성이 있다. 본 발명에 의하면 온화한 환경조건 하에서 신속하게 하이드로겔 형성 및 DOX를 동시에 하이드로겔 매트릭스에 로딩할 수 있다. 그리고, 근적외선을 하이드로겔에 조사하면 하이드로겔 네트워크의 쿠마린 유도체 가교 결합을 파괴하여 하이드로겔의 분해 및 포획된 약물의 조절된 방출을 효과적으로 유도한다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0025] (특허문헌 0001) 등록특허공보 10-2099516호

발명의 내용

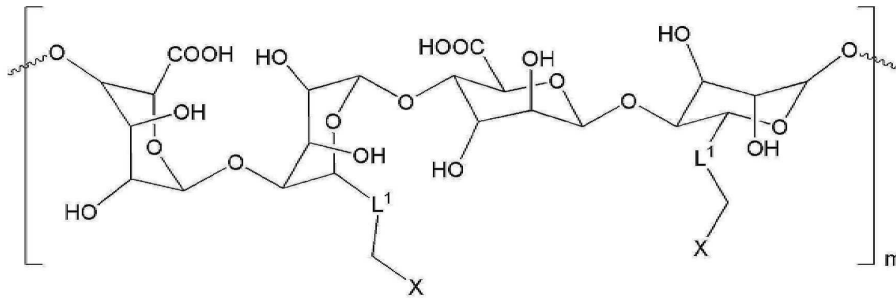
해결하려는 과제

- [0026] 본 발명의 목적은 본 발명의 목적은 근적외선 응답형의 알긴산 하이드로겔을 제공하는 것이다.
- [0027] 본 발명의 다른 목적은 상기 근적외선 응답형의 알긴산 하이드로겔의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 근적외선 응답형의 알긴산 하이드로겔을 포함하는 약물전달체를 제공하는 것이다.
- [0029] 발명의 다른 목적은 상기 근적외선 응답형의 알긴산 하이드로겔을 포함하는 약물전달체 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0031] 상기 목적을 달성하기 위하여,
- [0032] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 알긴산 유도체; 및
- [0033] 하기 화학식 2로 표시되는 쿠마린-에스테르 결합 포함 가교제;를 포함하고,
- [0034] 하기 화학식 1의 치환기 X와 하기 화학식 2의 치환기 Y는 서로 클릭반응 가능한 조합인 것을 특징으로 하고,
- [0035] 상기 화학식 2로 표시되는 쿠마린-에스테르 결합 포함 가교제는 근적외선에 반응하여 상기 쿠마린-에스테르 결합이 분해되는 것을 특징으로 하는 하이드로겔을 제공한다.

[0036] [화학식 1]



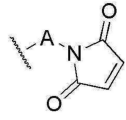
- [0037] (상기 화학식 1에서,
- [0038] m은 1-100,000의 정수이고;
- [0039] L¹은 에스테르 (ester) 또는 아마이드 (amide) 결합이고;
- [0040] X는 노르보네닐(norbornenyl), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene), 테트라지닐(tetrazinyl), 말레이미딜(maleimidy), 퓨라닐(furanyl), 알카이닐(alkynyl), 또는 아지도(azido) 이고;

- [0042] 상기 노르보네닐 유도체는 또는 이고,

- [0043] 상기 트랜스-시클로옥텐은 또는 이고,

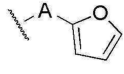
- [0044] 상기 테트라지닐 유도체는 , , , , , , , , , , , 이고,

[0045] 상기 말레이미딜 유도체는



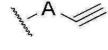
이고,

[0046] 상기 퓨라닐 유도체는



이고,

[0047] 상기 알카이닐 유도체는



이고,

[0048] 상기 아지도 유도체는

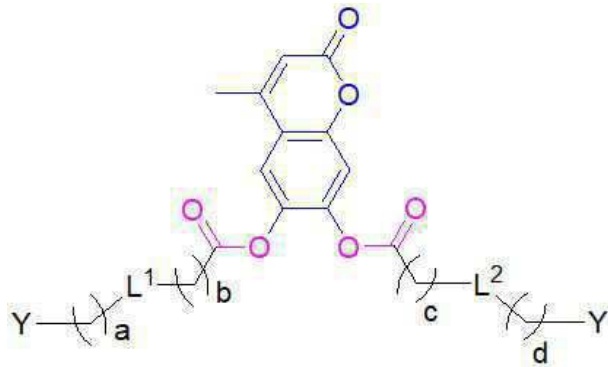


이고,

[0049] 상기 A는 단일결합, C₁₋₅의 알킬레닐 또는 -Z¹-(CH₂CH₂O)-Z²-이고,

[0050] 상기 Z¹ 및 Z²는 각각 단일결합 또는 C₁₋₅의 알킬레닐이다.)

[0052] [화학식 2]



[0053]

[0054] (상기 화학식 2에서,

[0055] a, b, c 및 d는 각각 1-10의 정수이고;

[0056] L¹ 및 L²는 에스테르 (ester), 아민(amine), 아마이드 (amide), 에테르(ether) 또는 C₁₋₁₀의 알킬레닐 결합이고;

[0057] Y는 상기화학식 1에서 X의 정의와 같다.)

[0059] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 알긴산 유도체, 및 상기 화학식 2로 표시되는 쿠마린-에스테르 결합 포함 가교제를 용매에 첨가하고 반응하는 단계(단계 1); 를 포함하는, 하이드로겔의 제조방법을 제공한다.

[0061] 나아가, 본 발명은 상기 하이드로겔을 포함하는 약물전달체를 제공한다.

[0063] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 알긴산 유도체, 상기 화학식 2로 표시되는 쿠마린-에스테르 결합 포함 가교제 및 약물을 용매에 첨가하고 반응하는 단계(단계 1);를 포함하는, 약물전달체의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0065] 본 발명에 따른 하이드로겔은 수불용성인 쿠마린을 개질한 쿠마린-에스테르 결합 포함 가교제를 사용함에 따라

서, 쿠마린에 수용성을 부여하여 하이드로겔의 가교제로 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 쿠마린-에스테르 결합이 근적외선 조사에 의해 분해되어, 선택적으로 외부에서 능동적으로 약물방출 거동을 제어할 수 있어, 이를 약물 전달체로서 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0067]

도 1은 알긴산과 쿠마린-에스테르 결합 포함 가교제가 클릭반응하여 약물을 함유한 하이드로겔을 형성하고, 근적외선 조사에 의하여 가교제의 쿠마린-에스테르 결합이 분해되어, 내부 약물을 방출하는 방법을 나타낸 도이다.

도 2은 COUM-Tz 가교제의 합성 스킴을 나타낸 도이다.

도 3은 제조예 1에 따른 Alg-Nb의 ^1H NMR스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 4는 제조예 6에 따른 COUM-Tz 가교제의 ^1H NMR스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 5은 실시예 1에 따른 HGCUM1 하이드로겔 형성 5분 후의 사진을 나타낸 도이다.

도 6은 실시예 1에 따른 HGCUM1 및 HGCUM2 하이드로겔의 팽윤비율을 나타낸 도이다.

도 7은 실시예 1에 따른 HGCUM1 및 HGCUM2 하이드로겔의 내부 단면 SEM 이미지를 나타낸 도이다.

도 8는 실시예 1에 따른 HGCUM1 하이드로겔에 근적외선 (808 nm, 4-watt power) 조사 15분 후 하이드로겔 분해 과정의 사진을 나타낸 도이다.

도 9는 실시예 2에 따른 하이드로겔 HGCUM1/DOX와 HGCUM2/DOX이 NIR 조사 유무에 따라 시간에 따른 내부 DOX 방출량을 나타낸 도이다.

도 10은 하이드로겔 전구체 Alg-Nb(제조예 1)와 COUM-Tz(제조예 6)와 HGCUM1 및 HGCUM2 하이드로겔(실시예 1)의 HEK-293 세포에 대한 독성 평가 결과를 나타낸 도이다.

도 11은 BT-20 암세포에 대한 항암 반응을 비교하기 위하여, free-DOX와 HGCUM1/DOX 및 HGCUM2/DOX 하이드로겔(실시예 2)을 근적외선 (808 nm, 4-watt power, 5 분) 조사 유무에 따른 세포 생존율을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0068]

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0070]

하이드로겔

[0071]

하기 화학식 1로 표시되는 알긴산 유도체; 및

[0072]

하기 화학식 2로 표시되는 쿠마린-에스테르 결합 포함 가교제;를 포함하고,

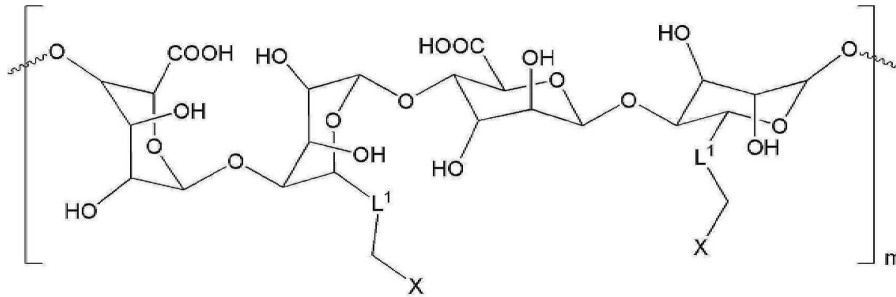
[0073]

하기 화학식 1의 치환기 X와 하기 화학식 2의 치환기 Y는 서로 클릭반응 가능한 조합인 것을 특징으로 하고,

[0074]

상기 화학식 2로 표시되는 쿠마린-에스테르 결합 포함 가교제는 근적외선에 반응하여 상기 쿠마린-에스테르 결합이 분해되는 것을 특징으로 하는 하이드로겔을 제공한다.

[0075] [화학식 1]



[0076]

[0077] (상기 화학식 1에서,

[0078] m은 1-100,000의 정수이고;

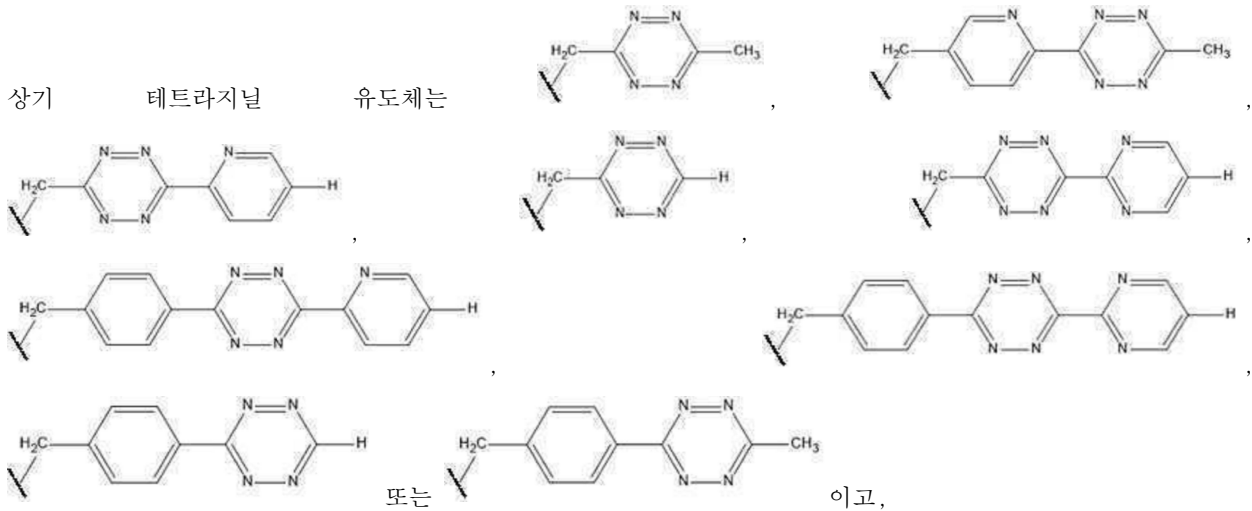
[0079] L¹은 에스테르 (ester) 또는 아마이드 (amide) 결합이고;

[0080] X는 노르보네닐(norbornenyl), 트랜스-시클로옥텐(trans-cyclooctene), 테트라지닐(tetrazinyl), 말레이미딜(maleimidyl), 퓨라닐(furanyl), 알카이닐(alkynyl), 또는 아지도(azido) 이고;

[0081] 상기 노르보네닐 유도체는 또는 이고,

[0082] 상기 트랜스-시클로옥텐은 또는 이고,

[0083] 상기 테트라지닐 유도체는



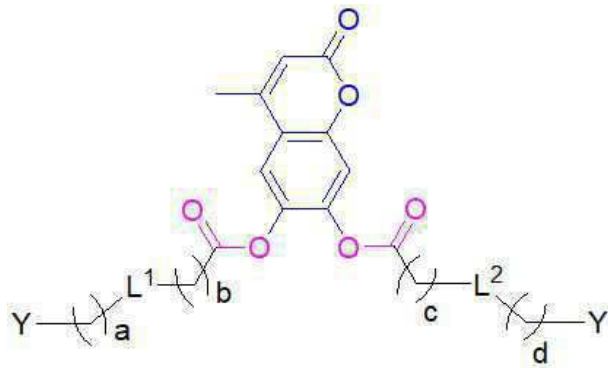
[0084] 상기 말레이미딜 유도체는 이고,

[0085] 상기 퓨라닐 유도체는 이고,

[0086] 상기 알카이닐 유도체는 이고,

- [0087] 상기 아지도 유도체는 A-N_3 이고,
- [0088] 상기 A는 단일결합, C_{1-5} 의 알킬레닐 또는 $-\text{Z}^1-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})-\text{Z}^2-$ 이고,
- [0089] 상기 Z^1 및 Z^2 는 각각 단일결합 또는 C_{1-5} 의 알킬레닐이다.)

[0091] [화학식 2]

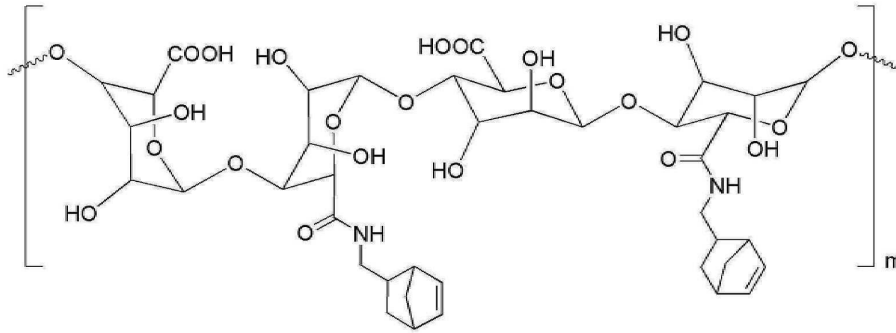


- [0092]
- [0093] (상기 화학식 2에서,
- [0094] a, b, c 및 d는 각각 1-10의 정수이고;
- [0095] L^1 및 L^2 는 에스테르 (ester), 아민(amine), 아마이드 (amide), 에테르(ether) 또는 C_{1-10} 의 알킬레닐 결합이고;
- [0096] Y는 상기화학식 1에서 X의 정의와 같다.)

- [0098] 상기 약물은 상기 약물은 인슐린, 항 류마티스 제제, 프레드니솔론 21-아세테이트(prednisolone 21-acetate), 파클리탁셀(paclitaxel), 독소루비신(doxorubicin), 레티노익 산(retinoic acid), 시스플라틴(cis-platin), 캄 토세신(camptothecin), Fluorouracil(5-FU), 도세탁셀(Docetaxel), 타목시펜(Tamoxifen), 아나스테로졸(anasterozole), 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), 코르티코스테로이드(corticosteroid), 글라브리딘(glabridin), 보스웰린 씨지(Boswellin CG), 알마 엑스트랙트(Alma extract), 알파 리포에이트(Alpha lipoate), 사비 화이트(Sabi white), 심 화이트(Symwhite 377), 루시놀(Rucinol), 커큐미노이드(curcuminoid), 모자반 추출물, 누에고치 추출물, 레티노이드(Retinoids), 비타민 A, 비타민 C, 베틀린산(Betulinic acid), TGF(Transforming growth factor), 코엔자임 Q10(coenzyme Q10), 아스코르브산(Ascorbic acid), 오노닌(Ononin), 동물 태반 유래의 단백질, 센티그라스 추출물, 연교 추출물, 클로렐라 추출물, α -리포산(α -lipoic acid), α -토코페롤(α -Tocopherol), 레티놀(Retinol), 글루타치온(Glutathione), 니스테인(Genistein), 퀘세틴(Quercetin), 프로필 갈레이트(Propyl gallate), 에피갈로카테킨 갈레이트(Epigallocatechin gallate), 갈로카테킨 갈레이트(Gallocatechin gallate), 실리빈(Silybin), 디오스메틴(Diosmetin), 캠퍼롤(Kaempferol), 에피카테킨(Epicatechin), 갈란긴(Galangin) 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.

- [0100] 바람직하게, 상기 화학식 1로 표시되는 알긴산 유도체는 하기 화학식 3 내지 7로 표시되는 화합물 중 어느 하나 일 수 있다.

[0101] [화학식 3]

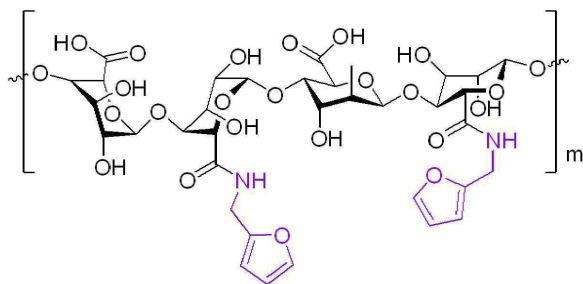


[0102]

[0103] (상기 화학식 3에서,

[0104] m은 1-100,000의 정수이다.)

[0106] [화학식 4]

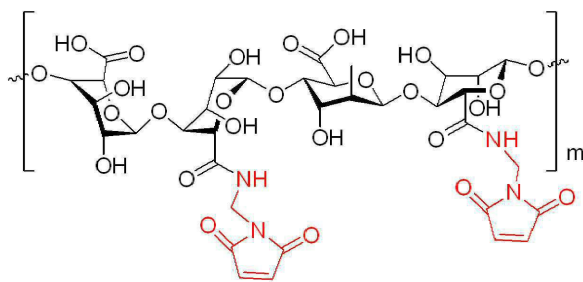


[0107]

[0108] (상기 화학식 4에서,

[0109] m은 1-100,000의 정수이다.)

[0111] [화학식 5]

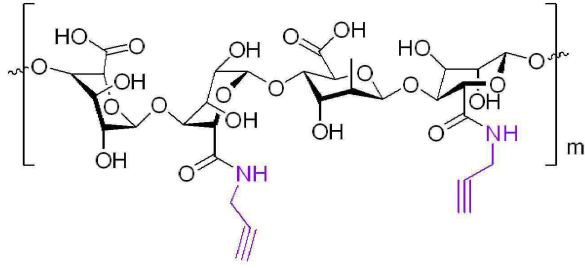


[0112]

[0113] (상기 화학식 5에서,

[0114] m은 1-100,000의 정수이다.)

[0116] [화학식 6]

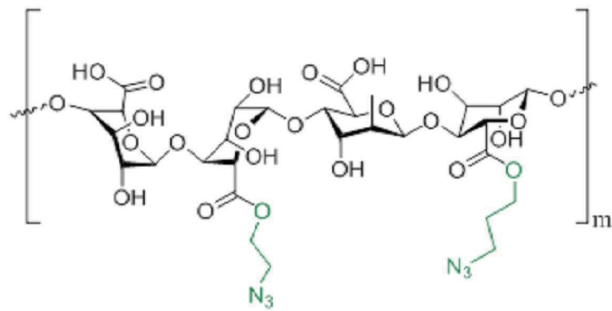


[0117]

[0118] (상기 화학식 6에서,

[0119] m은 1-100,000의 정수이다.)

[0121] [화학식 7]



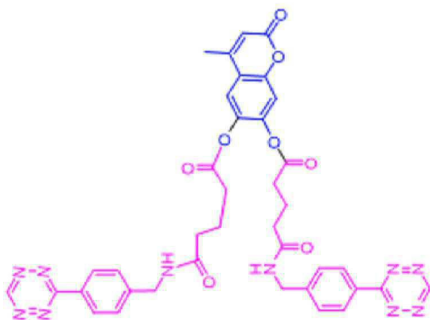
[0122]

[0123] (상기 화학식 7에서,

[0124] m은 1-100,000의 정수이다.)

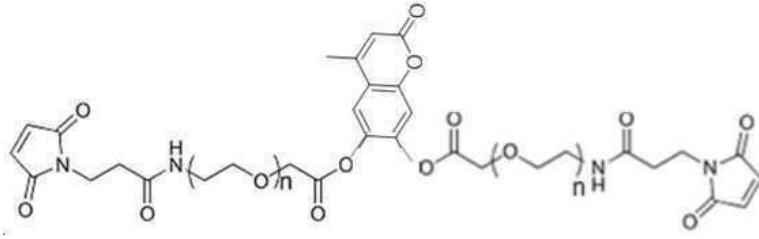
[0126] 바람직하게, 상기 화학식 2로 표시되는 가교제는 하기 화학식 8 내지 13으로 표시되는 화합물 중 어느 하나일 수 있다.

[0127] [화학식 8]



[0128]

[0130] [화학식 9]



[0131]

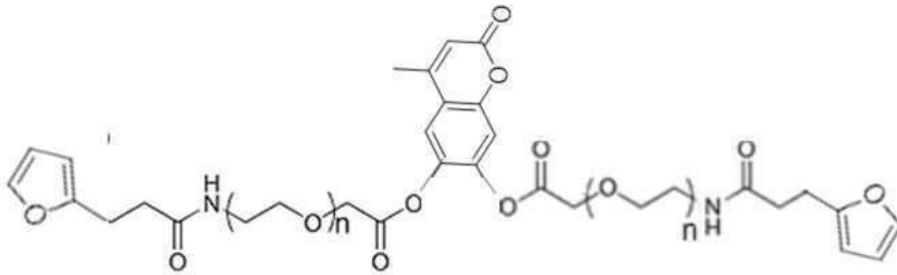
[0132]

[0133]

(상기 화학식 9에서,
n은 1-150의 정수이다.)

[0135]

[화학식 10]



[0136]

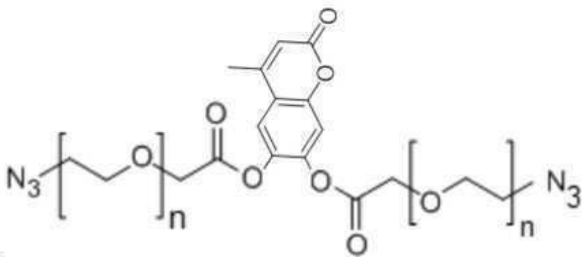
[0137]

[0138]

(상기 화학식 10에서,
n은 1-150의 정수이다.)

[0140]

[화학식 11]



[0141]

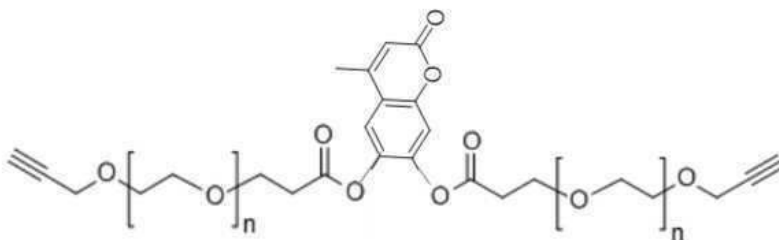
[0142]

[0143]

(상기 화학식 11에서,
n은 1-150의 정수이다.)

[0145]

[화학식 12]



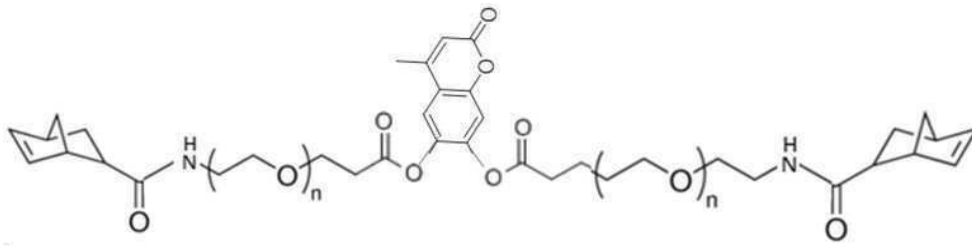
[0146]

[0147]

(상기 화학식 12에서,

[0148] n은 1-150의 정수이다.)

[0150] [화학식 13]



[0151]

[0152] (상기 화학식 13에서,

[0153] n은 1-150의 정수이다.)

[0155] 하이드로겔의 제조방법

[0156] 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 알긴산 유도체, 및 상기 화학식 2로 표시되는 쿠마린-에스테르 결합 포함 가교제를 용매에 첨가하고 반응하는 단계(단계 1);를 포함하는, 하이드로겔의 제조방법을 제공한다.

[0158] 상기 용매로는 PBS(phosphate buffer saline), 에틸알콜, DMSO(dimethyl sulfoxide), DMF(dimethylformamide) 및 이들의 혼합액 등을 사용할 수 있다.

[0160] 반응조건으로는, 비활성 가스 분위기 하에서 -10 내지 15 °C, 0.5 내지 3시간 반응할 수 있다.

[0162] 약물전달체 및 이의 제조방법

[0163] 본 발명은 상기 하이드로겔을 포함하는 약물전달체를 제공한다.

[0164] 본 발명에 따른 약물전달체는 수불용성인 쿠마린을 개질한 쿠마린-에스테르 결합 포함 가교제를 사용함에 따라, 쿠마린에 수용성을 부여하여 하이드로겔의 가교제로 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 쿠마린-에스테르 결합이 근적외선 조사에 의해 붕괴되어, 선택적으로 외부에서 능동적으로 약물방출 거동을 제어할 수 있어, 이를 약물 전달체로서 유용하게 사용할 수 있다.

[0166] 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 알긴산 유도체, 상기 화학식 2로 표시되는 쿠마린-에스테르 결합 포함 가교제 및 약물을 용매에 첨가하고 반응하는 단계(단계 1);를 포함하는, 약물전달체의 제조방법을 제공한다.

[0167] 상기 약물의 구체적인 예시는 상술한 바와 같다.

[0168] 상기 용매로는 PBS(phosphate buffer saline), 에틸알콜, DMSO(dimethyl sulfoxide), DMF(dimethylformamide) 및 이들의 혼합액 등을 사용할 수 있다.

[0169] 반응조건으로는, 비활성 가스 분위기 하에서 -10 내지 15 °C, 0.5 내지 3시간 반응할 수 있다.

[0171] 도 1에 상기 알긴산과 상기 가교제가 클릭반응하여 약물을 함유한 하이드로겔을 형성하고, 근적외선 조사에 의하여 가교제의 쿠마린-에스테르 결합이 붕괴하여 내부 약물을 방출하는 방법을 도시하였다.

[0172] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 알긴산은 알긴산나트륨 (Sodium alginate)을 에스테르화 반응 또는 아마이드화 반응 경로를 통하여 클릭작용기를 도입시킬 수 있다.

[0174] 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.

[0176] <제조예 1> 알긴산-노르보넨(AIg-Nb)의 합성

[0177] 알긴산나트륨 1g (COOH 5.32mmol)을 0.5% w/v의 농도로 완충 용액(pH 5.8, MES 0.1 M, NaCl 0.3 M 포함)에 용해하였다. 다음으로 N-hydroxysuccinimide (NHS) 0.36 g (3.16 mmol)과 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDCI) 1.11 g (5.8 mmol)을 상기 알긴산염 용액에 첨가하였다. 10분 간 교반한 후 5-norbornene-2-methylamine (Nb-NH₂) 0.32g (2.63mmol) 을 (몰 비율 NHS:EDC:Nb-NH₂ = 1:2:1) 혼합물에 추가하였다. 상온에서 24시간 동안 교반한 다음 히드록실아민으로 반응을 정지하였다. 혼합물은 과잉의 아세톤 용액에 침전시키고, 여과된 고체는 진공 오븐에서 건조한 후 증류수로 1% w/v 용액으로 다시 수화한 다음, 증류수로 4일 동안 13 kDa MWCO 투석 백에서 투석하였다. 마지막으로 동결건조하여 기능화 40.17%의 정제된 AlG-Nb를 77% 수율로 수득하였다.

[0178] 상기 제조예 1의 AlG-Nb의 ¹H NMR 스펙트럼을 도 3에 나타내었다.

[0180] <제조예 2> 알긴산-퓨란(AIg-Fu)의 합성

[0181] 알긴산나트륨 1.25g (COOH 작용기 대비 6.6452 mmol)을 0.5% w/v의 농도로 0.1 M의 MES와 0.3 M의 NaCl을 함유한 완충 용액에 용해하였다. 다음으로 알긴산염 용액에 NHS 0.45g (3.95mmol)와 EDCI 1.39g (7.25mmol)를 첨가하였다. 10분 간 교반한 후, 퓨릴 아민 0.32g (3.3mmol) (몰 비율 NHS:EDC:Fu-NH₂ = 1:2:1)을 혼합물에 추가했다. 상온에서 24시간 동안 교반하여 반응하였고, 그 후 반응은 히드록실아민을 넣어 정지하였다. 혼합물은 과잉의 아세톤에 침전하였고, 여과된 고체는 진공 오븐에서 건조하였다. 이것을 증류수에 1% w/v 용액으로 녹인 다음, 4일 동안 13 kDa MWCO 투석 백에서 증류수로 투석했다. 생성물을 동결 건조하여 정제된 AlG-Fu를 80 % 수율로 산출하였다.

[0183] <제조예 3> 알긴산-말레이미드(AIg-Mi)의 합성

[0184] 알긴산나트륨 1.25g (COOH 작용기 대비 6.6452 mmol)을 0.5% w/v의 농도로 0.1 M의 MES와 0.3 M의 NaCl을 함유한 완충 용액에 용해하였다. 다음으로 알긴산염 용액에 NHS 0.45g (3.95mmol)와 EDCI 1.39g (7.25mmol)를 첨가하였다. 10분 간 교반한 후, 1-(아미노메틸)-1H-피롤-2,5-디온 0.416g (3.3mmol) (몰 비율 NHS:EDC:Mi-NH₂ = 1:2:1)을 혼합물에 추가했다. 상온에서 24시간 동안 교반하여 반응하였고, 그 후 반응은 히드록실아민을 넣어 정지하였다. 혼합물은 과잉의 아세톤에 침전하였고, 여과된 고체는 진공 오븐에서 건조하였다. 이것을 증류수에 1% w/v 용액으로 녹인 다음, 4일 동안 13 kDa MWCO 투석 백에서 증류수로 투석했다. 생성물을 동결 건조하여 정제된 AlG-Mi를 82 % 수율로 산출하였다.

[0186] <제조예 4> 알긴산-알카인(AIg-Aky)의 합성

[0187] 알긴산나트륨 1.25g (COOH 작용기 대비 6.6452mmol)을 0.5% w/v의 농도로 MES 0.1 M과 NaCl 0.3 M을 함유한 완충 용액에 용해하였다. 상기 알긴산염 용액에 NHS 0.45g (3.95mmol)와 EDCI 1.39g (7.25mmol)을 첨가하였다. 10분 간 교반한 후 프로파길 아민(Aky-NH₂) 0.18g (3.3mmol) (몰 비율 NHS:EDC:Aky-NH₂ = 1:2:1)을 혼합물에 추가했다. 상온에서 24시간 동안 교반하여 반응하였고, 그 후 반응은 히드록실아민을 넣어 정지하였다. 혼합물은 과잉의 아세톤에 침전하였고, 여과된 고체는 진공 오븐에서 건조하였다. 이것을 증류수에 1% w/v 용액으로 녹인 다음, 4일 동안 13 kDa MWCO 투석 백에서 증류수로 투석했다. 생성물을 동결 건조하여 정제된 AlG-Aky를 78 % 수율로 산출하였다.

[0189] <제조예 5> 알긴산-나이트라이드(Alg-N₃)의 합성

[0190] 알긴산나트륨 1.25g (COOH 작용기 대비 6.6452 mmol)을 0.5% w/v의 농도로 0.1 M의 MES와 0.3 M의 NaCl을 함유한 완충 용액에 용해하였다. 다음으로 알긴산염 용액에 NHS 0.45g (3.95mmol)와 EDCI 1.39g (7.25mmol)를 첨가하였다. 10분 간 교반한 후, 3-아지도프로판올 0.33g (3.3mmol) (몰 비율 NHS:EDC:N₃-OH = 1:2:1)을 혼합물에 추가했다. 상온에서 24시간 동안 교반하여 반응하였고, 그 후 반응은 히드록실아민을 넣어 정지하였다. 혼합물은 과잉의 아세톤에 침전하였고, 여과된 고체는 진공 오븐에서 건조하였다. 이것을 증류수에 1% w/v 용액으로 녹인 다음, 4일 동안 13 kDa MWCO 투석 백에서 증류수로 투석했다. 생성물을 동결 건조하여 정제된 Alg-N₃를 79% 수율로 산출하였다.

[0192] <제조예 6> 쿠마린-테트라진 가교제(COUM-Tz) 합성

[0193] COUM-Tx (bis-tetrazine-coumarin, 4-methyl-2-oxo-2H-chromene-6,7-diyl bis(5-(4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)-5-oxopentanoate))는 다음과 같이 합성되었다(도 2 참조). 먼저 테트라진-카르복실산(50 mg, 0.165 mmol, 5-(4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzylamino)-5-oxopentanoic acid)을 둥근 바닥 플라스크에 있는 10 mL의 THF에 용해한 후 트리에틸아민(31.5 μL, 0.226 mmol)을 첨가하였다. 그 다음 염화 옥살릴(13.9 μL, 0.165 mmol) 및 촉매량의 DMF를 반응 혼합물에 조심스럽게 주입하고 질소 환경에서 0 °C에서 1시간 동안 교반하였다. 이어서 6,7-디히드록시-4-메틸쿠마린(14.495mg, 0.075mmol)을 첨가하고 혼합물을 상온에서 48시간 교반하였다. 반응이 끝난 후 생성물을 100 mL DCM으로 추출하여 2 x 100 mL의 물로 세척한 후 50 mL의 염수로 세척하였다. DCM층을 회전 증발기에서 농축하고 재결정하였다 (수율 71%). 상기 제조예 6의 COUM-Tz의 ¹H NMR을 도 4에 나타내었다.

[0195] <제조예 7> 쿠마린-말레이미드 가교제(COUM-Mi) 합성

[0196] 먼저 말레이미드-PEG-카르복실산(165mg, 0.165 mmol, 3-(2-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanamido)polyethoxy)propanoic acid)을 둥근 바닥 플라스크에 있는 10 mL의 DCM에 용해한 후 트리에틸아민(31.5 μL, 0.226 mmol)을 첨가하였다. 그 다음 염화 옥살릴(13.9 μL, 0.165 mmol)을 반응 혼합물에 조심스럽게 주입하고 질소 환경에서 0 °C에서 1시간 동안 교반하였다. 이어서 6,7-디히드록시-4-메틸쿠마린(14.495mg, 0.075mmol)을 첨가하고 혼합물을 상온에서 교반하였다. 반응이 끝난 후 생성물을 100 mL DCM으로 추출하여 2 x 100 mL의 물로 세척한 후 50 mL의 염수로 세척하였다. DCM층을 회전 증발기에서 농축하고 재결정하였다.(수율 84%)

[0198] <제조예 8> 쿠마린-퓨란 가교제(COUM-Fu) 합성

[0199] 먼저 퓨란-PEG-카르복실산(165mg, 0.165 mmol, 3-(2-(3-(furan-2-yl)propanamido)polyethoxy)propanoic acid)을 둥근 바닥 플라스크에 있는 10 mL의 DCM에 용해한 후 트리에틸아민(31.5 μL, 0.226 mmol)을 첨가하였다. 그 다음 염화 옥살릴(13.9 μL, 0.165 mmol)을 반응 혼합물에 조심스럽게 주입하고 질소 환경에서 0 °C에서 1시간 동안 교반하였다. 이어서 6,7-디히드록시-4-메틸쿠마린(14.495mg, 0.075mmol)을 첨가하고 혼합물을 상온에서 교반하였다. 반응이 끝난 후 생성물을 100 mL DCM으로 추출하여 2 x 100 mL의 물로 세척한 후 50 mL의 염수로 세척하였다. DCM층을 회전 증발기에서 농축하고 재결정하였다.(수율 88%)

[0201] <제조예 9> 쿠마린-아자이드 가교제(COUM-N₃) 합성

[0202] 먼저 아자이드-PEG-카르복실산(165mg, 0.165 mmol, 3-(2-azido polyethoxy)propanoic acid)을 둥근 바닥 플라스크에 있는 10 mL의 DCM에 용해한 후 트리에틸아민(31.5 μL, 0.226 mmol)을 첨가하였다. 그 다음 염화 옥살릴(13.9 μL, 0.165 mmol)을 반응 혼합물에 조심스럽게 주입하고 질소 환경에서 0 °C에서 1시간 동안 교반하였다. 이어서 6,7-디히드록시-4-메틸쿠마린(14.495mg, 0.075mmol)을 첨가하고 혼합물을 상온에서 교반하였다. 반응이 끝난 후 생성물을 100 mL DCM으로 추출하여 2 x 100 mL의 물로 세척한 후 50 mL의 염수로 세척하였다. DCM층을

회전 증발기에서 농축하고 재결정하였다.(수율 81%)

[0204] <제조예 10> 쿠마린-알카인 가교제(COUM-Aky) 합성

[0205] 먼저 알카인-PEG-카르복실산(165mg, 0.165 mmol, 3-(2-(prop-2-yn-1-yloxy)polyethoxy)propanoic acid)을 둥근 바닥 플라스크에 있는 10 mL의 DCM에 용해한 후 트리에틸아민(31.5 μ L, 0.226 mmol)을 첨가하였다. 그 다음 염화 옥살릴(13.9 μ L, 0.165 mmol)을 반응 혼합물에 조심스럽게 주입하고 질소 환경에서 0 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 교반하였다. 이어서 6,7-디히드록시-4-메틸쿠마린(14.495mg, 0.075mmol)을 첨가하고 혼합물을 상온에서 교반하였다. 반응이 끝난 후 생성물을 100 mL DCM으로 추출하여 2 x 100 mL의 물로 세척한 후 50 mL의 염수로 세척하였다. DCM층을 회전 증발기에서 농축하고 재결정하였다.(수율 79%)

[0207] <제조예 10> 쿠마린-노르보넨 가교제(COUM-Nb) 합성

[0208] 먼저 노르보넨-PEG-카르복실산(165mg, 0.165 mmol, 3-(2-(bicyclo-hept-5-ene-2-carboxamido)polyethoxy)propanoic acid)을 둥근 바닥 플라스크에 있는 10 mL의 DCM에 용해한 후 트리에틸아민(31.5 μ L, 0.226 mmol)을 첨가하였다. 그 다음 염화 옥살릴(13.9 μ L, 0.165 mmol)을 반응 혼합물에 조심스럽게 주입하고 질소 환경에서 0 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 교반하였다. 이어서 6,7-디히드록시-4-메틸쿠마린(14.495mg, 0.075mmol)을 첨가하고 혼합물을 상온에서 교반하였다. 반응이 끝난 후 생성물을 100 mL DCM으로 추출하여 2 x 100 mL의 물로 세척한 후 50 mL의 염수로 세척하였다. DCM층을 회전 증발기에서 농축하고 재결정하였다.(수율 77%)

[0210] <실시예 1> 알긴산 하이드로겔의 제조

[0211] 상기 COUM-Tz(제조예 6)와 Alg-Nb(제조예 1)을 생리적 온도에서 혼합하면 빠른 겔화 속도로 하이드로겔을 형성한다(도 5). 하이드로겔의 물리화학적 특성을 비교 평가하기 위하여 서로 다른 조성으로 2개의 하이드로겔 샘플을 제조하였다. 즉 pH 7.4 인산염 버퍼(PBS, 0.01M)에 2 w/v%로 용해한 400 μ L의 Alg-Nb과 DMSO : PBS (1 : 10 v/v)에 용해한 COUM-Tz를 Nb/Tz = 1/0.5 와 1/1 몰비에 해당하도록 혼합하여 하이드로겔을 각각 생성하였다. 2가지 하이드로겔의 구성과 약칭을 표 1에 나타내었다.

표 1

[0212]

Hydrogel	Feed ratio Nb/Tz ^a	Gelation time (min) ^b	Hydrogel Content (%) ^c
HGCOUM1	1/0.5	10.64 $\pm$ 0.72	93
HGCOUM2	1/1	4.22 $\pm$ 0.41	95

[0213] ^a노르보넨과 테트라진 작용기의 이온적 당량비

[0214] ^b37 $^{\circ}$ C 에서 측정된 겔화 시간

[0215] ^c중량법으로 측정

[0217] <실험예 1> 하이드로겔 함량(hydrogel content)

[0218] 하이드로겔을 동결건조한 후, 건조된 하이드로겔을 PBS로 씻어 미반응 반응물을 제거한다. 그리고 나서, 하이드로겔을 말려서 무게를 잰다. 하이드로겔 함량은 수학적 1로 계산하여, 상기 표 1에 그 결과를 나타내었다.

[0219] [수학적 1]

[0220] 하이드로겔 함량(%) = W1/W0 X 100

- [0221] 여기서 W0은 건성 하이드로겔의 1차 중량이고 W1은 팽윤과 세척 후 하이드로겔의 건조 중량이다.
- [0223] <실험예 2> 하이드로겔의 팽윤 비율
- [0224] 하이드로겔의 팽윤 성질은 간단한 중력법으로 측정하였다. 건조된 하이드로겔 원반을 생리학적 온도에서 pH 7.4의 PBS(0.01 M)에 담근다. 팽윤된 하이드로겔은 주어진 시간에 무게를 재고, 하이드로겔 무게의 증가가 관찰되지 않을 때까지 계속 측정한다. 팽윤 비율(SR)은 하기 수학적 식 2로 계산하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0225] [수학적 식 2]
- [0226]
$$SR(100\%) = (W_s - W_d)/W_d$$
- [0227] 여기서 Ws는 팽윤된 하이드로겔의 무게이고 Wd는 최종 건조된 하이드로겔의 무게다. 하이드로겔의 팽윤 비율은 5일 동안 PBS 용액에 담근 후 하이드로겔의 무게 증가를 측정하여 결정하였다.
- [0229] 도 6에 나타난 바와 같이, 가교제의 양이 증가하면 가교밀도가 높아져 알긴산염 하이드로겔의 팽윤 비율이 낮아진 것으로 나타났다. 모든 하이드로겔에서 팽윤 비율은 초기 2시간 동안 높게 나타났고, 그 후 24시간 동안 서서히 평형에 도달했다.
- [0231] <실험예 3> 하이드로겔의 형태학적 미세구조 관찰
- [0232] 건조된 알긴산 하이드로겔의 내부 형태학적 미세구조를 조사하기 위해 SEM을 이용하여 하이드로겔의 단면을 관찰하였다. 팽윤상태가 평형 조건에 도달한 후, 모든 물이 제거될 때까지 하이드로겔을 진공 상태에서 동결건조하고 동결건조된 하이드로겔을 수직으로 절단한 뒤 시편을 금으로 코팅하여 SEM 기기로 관찰하였다.
- [0233] 실시예 1의 HGC0UM 1과 HGC0UM 2 하이드로겔의 SEM 이미지를 도 7에 도시하였다.
- [0234] 도 7에 나타난 바와 같이 HGC0UM 하이드로겔의 내부 단면 형태학은 메조포러스 기공을 나타내었다. 그리고 많은 양의 COUM-Tz 가교제 농도로 제조된 HGC0UM 2의 SEM 이미지는 HGC0UM 1보다 미세한 기공이 더 많이 존재하였다.
- [0236] <실시예 2> 하이드로겔에 DOX(doxorubicin) 적재
- [0237] 하이드로겔에 DOX를 적재하기 위해, PBS에 용해한 DOX 1 mg/mL을 Alg-Nb 용액에 첨가하였다. 그 후, COUM-Tz를 상기 DOX/Alg-Nb 용액에 혼합하여 HGC0UM1/DOX 및 HGC0UM2/DOX 하이드로겔을 제조하였다.
- [0239] <실험예 4> NIR 조사에 의한 하이드로겔의 분해반응 조사
- [0240] 하이드로겔 디스크(9.4 mm 직경, 10 mm 두께)를 pH 7.4의 PBS 10 mL에 담근 후, NIR (808 nm, 4 W/cm²)로 15분 동안 조사했다. 그 다음 NIR을 제거하고 37 °C에서 24시간 동안 100 rpm 수평 셰이커를 사용하여 흔들어 주었다. 새로운 PBS로 용액을 바꾸어주면서 상기 과정을 매일 반복하였다. 그리고, 주어진 시간 간격에 따라 하이드로겔의 무게 감소를 측정했다.
- [0241] [수학적 식 3]
- [0242]
$$\text{체중 감소}(\%) = (W_d - W_r)/W_d \times 100$$
- [0243] 여기서 Wd는 처음에 건조된 하이드로겔의 중량이다. Wr은 분해되지 않고 남은 하이드로겔의 건조 중량이다.
- [0245] 도 8에 나타난 바와 같이, HGC0UM1 하이드로겔(도 5)은 NIR 조사 후 15분 이내에 고체 겔 구조가 완전히 분해되어 용액 상태로 변화한다. 상기 결과들은 하이드로겔 구조에서 쿠마린 에스테르 결합이 분해되면서 가교된 하이드로겔이 선형 알긴산염 사슬로 분해되는 것을 나타낸다. 반면에 아무런 처리도 하지 않은 순수한 하이드로겔의 경우 10일이 지나도록 분해되지 않았다.

- [0247] <실험예 5> NIR(근적외선) 조사에 의한 약물 방출 (시험관내 실험)
- [0248] 하이드로겔의 약물 방출 실험은 PBS에서 수행하였다. NIR(근적외선) 조사에 의한 약물 방출 실험의 경우, HGCoum1/DOX 과 HGCoum2/DOX 하이드로겔을 37 °C에서 pH 7.4 PBS 15 mL에 담긴 다음 808 nm NIR을 4 W/cm²의 세기로 15분 동안 처음 1회만 조사하였다. 그 다음, NIR 조사없이 37 °C에서 유지하였다. 주어진 시간 간격에 따라 3 mL의 샘플 용액을 취하여 485 nm와 780 nm의 파장에서 UV-vis 분석을 진행하였다. DOX의 양은 표준 검량선을 사용하여 측정하였다. 샘플링할 때마다 총 부피를 일정하게 유지하기 위해 신선한 용액 3 mL를 보충하였다. DOX 배출 비율은 누적치로 계산하였다.
- [0250] NIR 응답성 특성 때문에, 쿠마린 유도체 가교 연결로 구성된 알긴산염 하이드로겔은 약물이나 생체활성분자의 캡슐화 및 지속적인 방출에 사용될 수 있다. DOX를 하이드로겔의 방출 양상을 조사하기 위한 모델 약물로 선택하여 HGCoum1/DOX 과 HGCoum2/DOX 하이드로겔의 방출 성질을 관찰하였다.
- [0252] 도 9에 나타난 바와 같이, 실시예 2에 따른 HGCoum1/DOX 와 HGCoum2/DOX 하이드로겔은 외부 자극이 없으면 장기적으로 낮은 DOX 방출 속도를 나타내었다. 가장 높은 가교 밀도의 HGCoum 2 하이드로겔은 비교적 낮은 약물방출량을 보였다. 반면에, NIR 조사에 의해서 HGCoum1/DOX 과 HGCoum2/DOX 하이드로겔의 DOX의 누적 방출량이 상당히 증가함을 알 수 있다. 더구나, 가장 낮은 가교밀도의 HGCoum1/DOX 는 상대적으로 높은 방출량을 나타내었다. 즉, NIR 조사 후 5일 간의 HGCoum1/DOX의 약물의 누적 방출량은 78%, HGCoum2/DOX의 약물의 누적 방출량은 45%이었다. 10일 후에는 각각 93와 71%에 달했는데, 이것은 NIR 노출 없이 동일한 샘플들에서 같은 기간에 각각 21 및 12% 만 방출한 것과 뚜렷한 대조를 보였다. NIR 조사에 의해 가교 구조의 쿠마린 에스테르 결합 및 젤 네트워크를 분해하여 하이드로겔 구조로부터 약물 방출을 가속화하는 것으로 판단된다.
- [0254] <실험예 6> Alg-Nb, COUM-Tz (coumarin-di-tetrazine crosslinker), HGCoum1 하이드로겔 및 HGCoum1/DOX 하이드로겔의 세포 독성 분석
- [0255] 정상세포 HEK293(인간 배아 신장) 및 암세포 HeLa(인간 자궁 경부암)를 사용하여 독성 평가를 하였다. 각 세포를 배양하고 MEM (Minimum essential medium) 배지에서 유지시켰다. 배지에 10% FBS 및 1% 항생제(100 µg/mL 페니실린 및 100µg/mL 스트렙토마이신)를 보충하였다. 세포 배양물을 37°C, 5% CO₂ 가습 분위기에서 배양하고 배양 배지를 2일 간격으로 교체하였다.
- [0256] Alg-Nb(제조예 1) 및 COUM-Tz(제조예 6), HGCoum 하이드로겔(실시예 1) 및 HGCoum/DOX 하이드로겔(실시예 2)의 세포 독성 평가를 MTT 방법으로 수행하였다. Alg-Nb(제조예 1)는 PBS 용액(0.01M, pH 7.4)에 COUM-Tz(제조예 6)는 DMSO : PBS (1 : 10 v/v)에 각각 용해시켜 제조하였다.
- [0257] 첫 번째 단계에서 HEK293 세포(100 µL, 1×10⁴ cell/well)를 96-웰 플레이트에 시딩하였다. 세포를 5% CO₂ 분위기에서 37°C에서 24시간 동안 배양했다.
- [0258] 두 번째 단계에서 세포 배지를 다양한 농도(0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 0.25, 1.50, 1.75 및 2.0 mg/mL)의 Alg-Nb(제조예 1) 또는 COUM-Tz(제조예 6)로 처리한 HEK293 세포 등을 함유한 새로운 배지(100 µL)로 교체하여 24시간 동안 처리하였다. HGCoum 하이드로겔(실시예 1)의 경우에는 HeLa 세포를 트랜스웰 배양 플레이트(하부 챔버)에 시드하고 HGCoum 하이드로겔을 트랜스웰 배양 플레이트의 상단 챔버에 배치했다. 그 후, 세포는 48시간 동안 배양되었다.
- [0259] 세 번째 단계에서는 세포 배양액을 PBS 100 µL 로 세정하고 10 µL의 WST-1[®] 용액으로 교체하였다. 마지막으로, 460 nm에서 ELISA 마이크로 플레이트 판독기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 반응의 흡광도를 측정하고 상대 세포 생존력에 의해 세포 성장 저해율을 계산하였다.
- [0261] NIR 광선 조사에 의한 DOX 방출 및 그에 따른 항종양제 활성 평가를 위해 HeLa 세포를 트랜스웰 배양 플레이트

(하부 챔버)에 시드하고 DOX 및 HGCoum/DOX 하이드로겔(실시예 2)을 트랜스웰 배양 플레이트의 상단 챔버에 배치했다. 검체는 4 watt NIR 레이저로 5분 동안 조사되었다. 그 후, 세포는 48시간 동안 배양되었다. 검체의 항종양 활성도는 위에서 설명한 WST 분석을 사용하여 계산되었다.

- [0263] 도 10은 다양한 농도에서 세포 생존율 및 그에 상응하는 독성 수준을 나타내며, 그 결과 전구체(A1g-Nb 및 COUM-Tz)와 HGCoum 하이드로겔은 HEK293 세포 성장에 대한 억제효과를 나타내지 않아 생체적합성을 나타냄을 보여준다.
- [0265] 도 11은 DOX·HCl이 탑재된 HGCoum 하이드로겔 1 및 2 (실시예 2)로 처리한 세포 생존력을 평가한 결과이다. DOX·HCl이 탑재된 HGCoum 하이드로겔 1 및 2 (실시예 2)은 세포 생존율의 억제를 나타냈다. 특히, NIR 광선 조사에 의해 세포 생존율을 크게 억제하였는데, 이것은 NIR 조사에 의하여 가교 구조의 쿠마린 에스테르 결합 및 젤 네트워크를 분해하여 하이드로겔 구조로부터 약물 방출을 가속화하는 것으로 판단된다.
- [0266] DOX·HCl(도 10, 40 $\mu\text{g/ml}$)는 동일한 용량의 DOX·HCl이 탑재된 HGCoum 하이드로 겔 1 및 2(실시예 2) 추출물보다 더 높은 세포 독성을 나타내었으며 이는 하이드로겔에서 DOX·HCl의 지속적인 방출로 인한 것임을 알 수 있다.
- [0267] 상기 세포 독성 결과는 HGCoum 하이드로겔이 우수한 생체 적합성을 보이는 반면 DOX·HCl이 탑재된 HGCoum 하이드로 겔 1 및 2(실시예 2)은 NIR 광선 조사에 의하여 DOX·HCl의 방출을 효과적으로 촉진하며 HeLa 세포의 효과적인 세포 사멸을 유도하는 것을 확인할 수 있다.
- [0269] 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

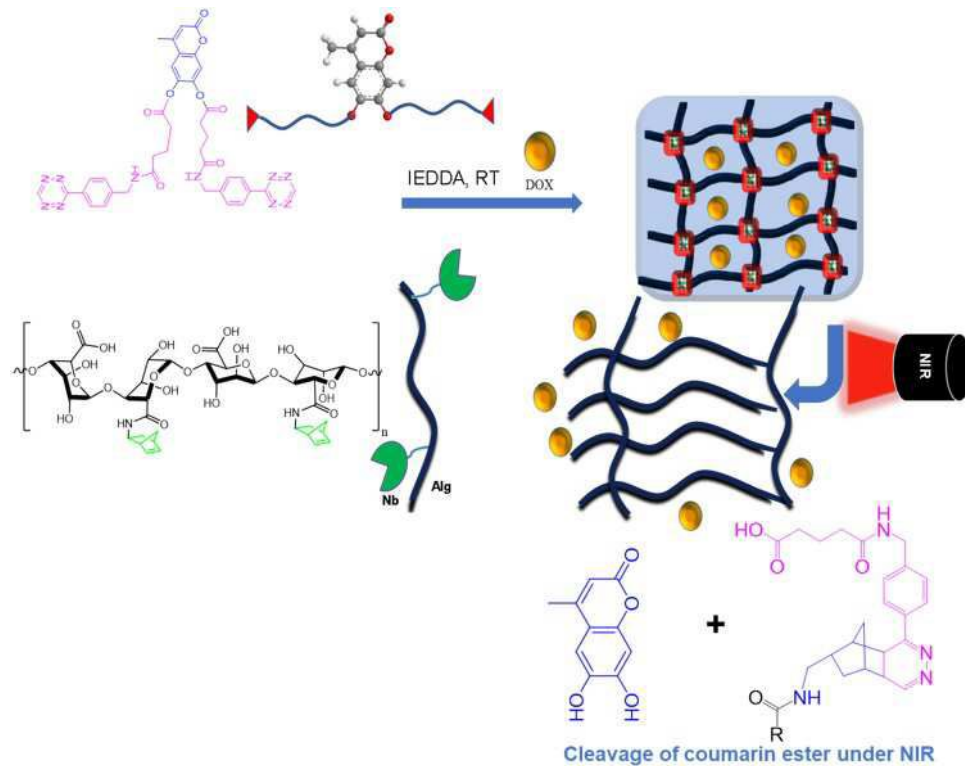


Figure 1. Schematic representation of the synthesis of coumarin based NIR responsive hydrogels and mechanism of drug release.

도면2

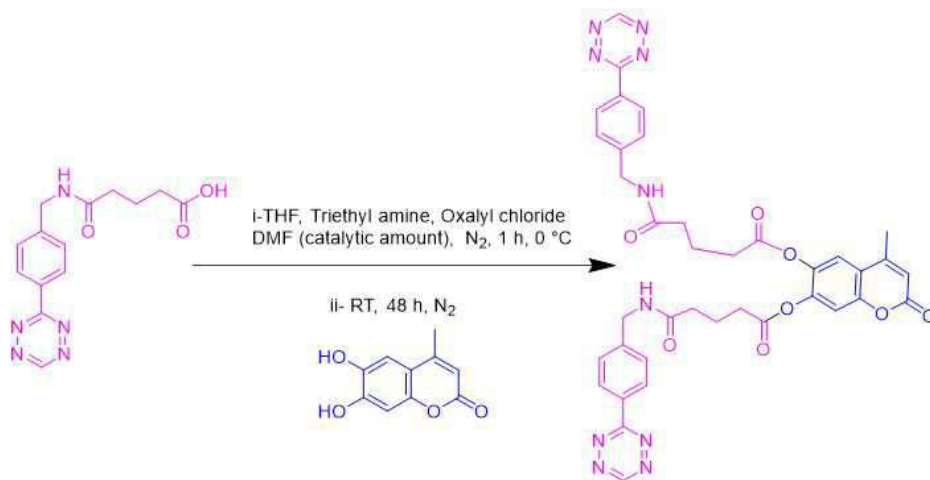


Figure 2. Scheme for the synthesis of IEDDA cross-linkable coumarin based cross-linker.

도면3

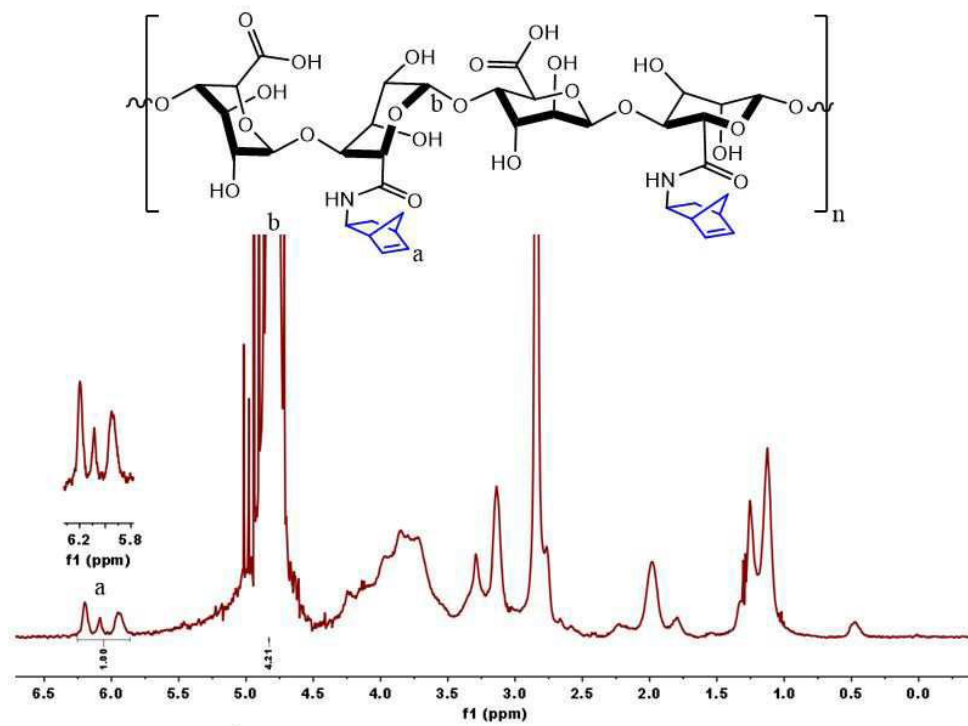


Figure 3. ^1H NMR spectrum of alginate-norbornene (Alg-Nb) in D_2O

도면4

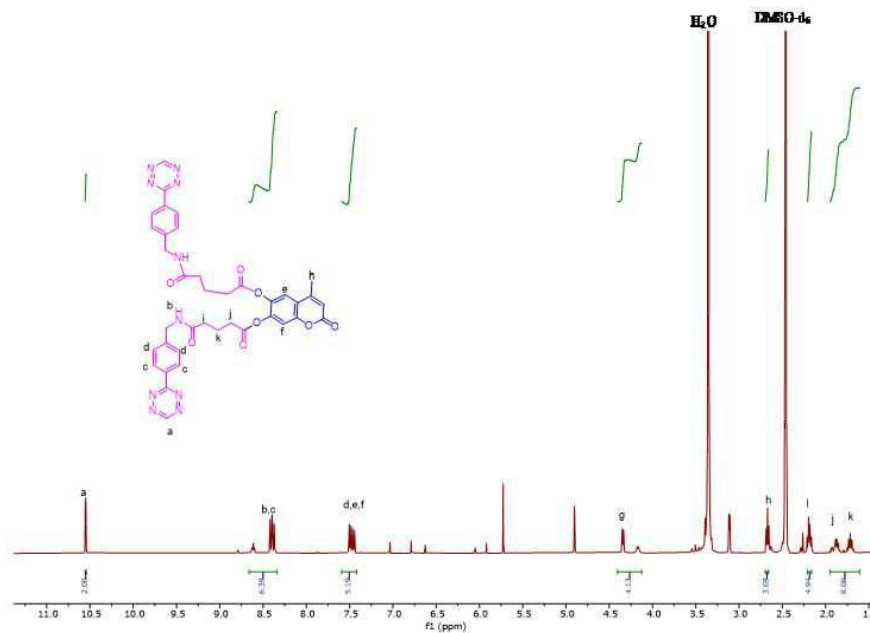


Figure 4. ^1H NMR spectrum of coumarin-di-tetrazine cross-linker (Coum-DTz) in

$\text{DMSO}-D_6$.

도면5



Figure 5. Gel state of HGCOUM-1 hydrogels

도면6

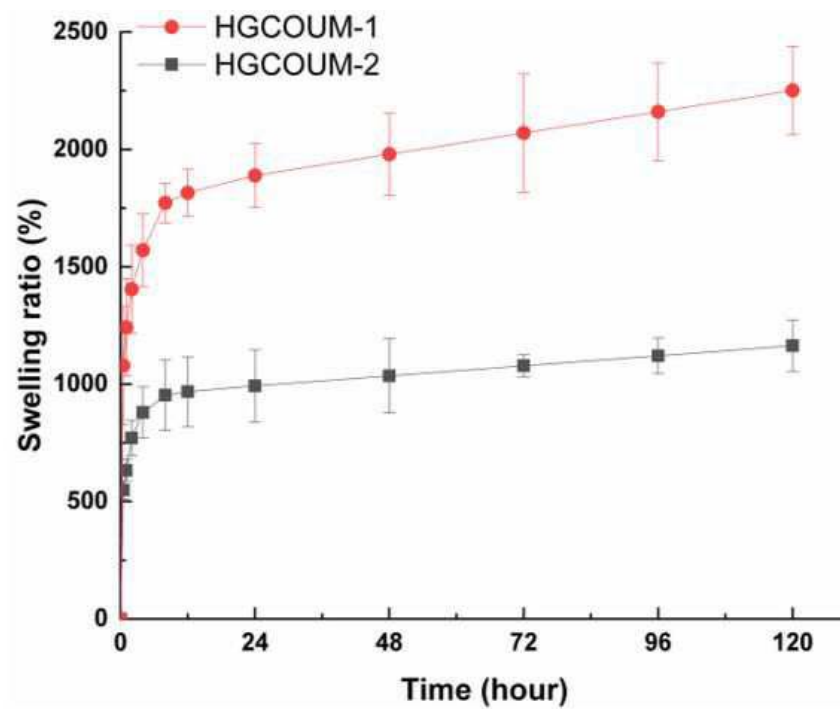


Figure 6. Swelling of hydrogels in PBS as a function of time.

도면7

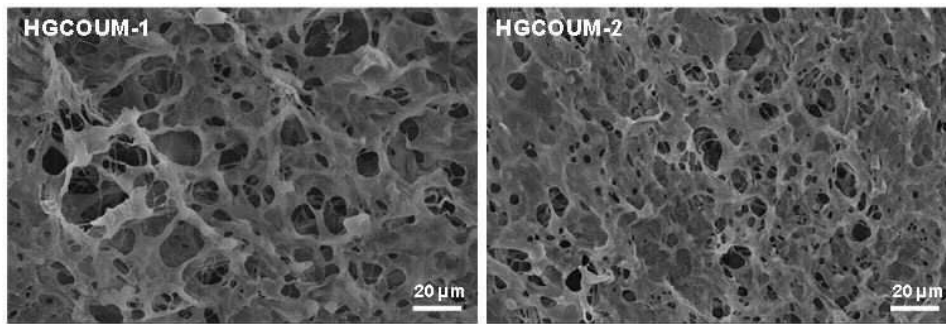


Figure 7. Scanning electron microscopic images of hydrogels to analyze their morphologies.

도면8



Figure 8. Sol state of HGCouM-1 after NIR irradiation. (2 watt, 15 minutes.)

도면9

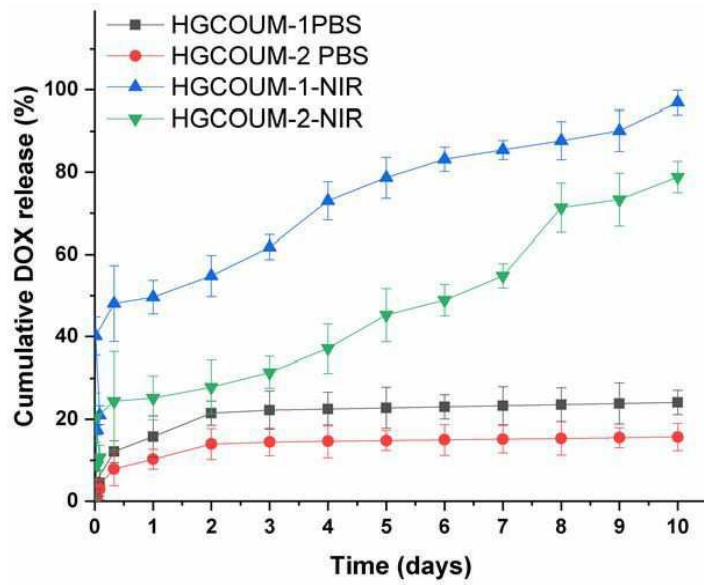


Figure 9. DOX release analysis from hydrogels at 37 °C in PBS before and after NIR irradiation (4-watt, 15 min.).

도면10

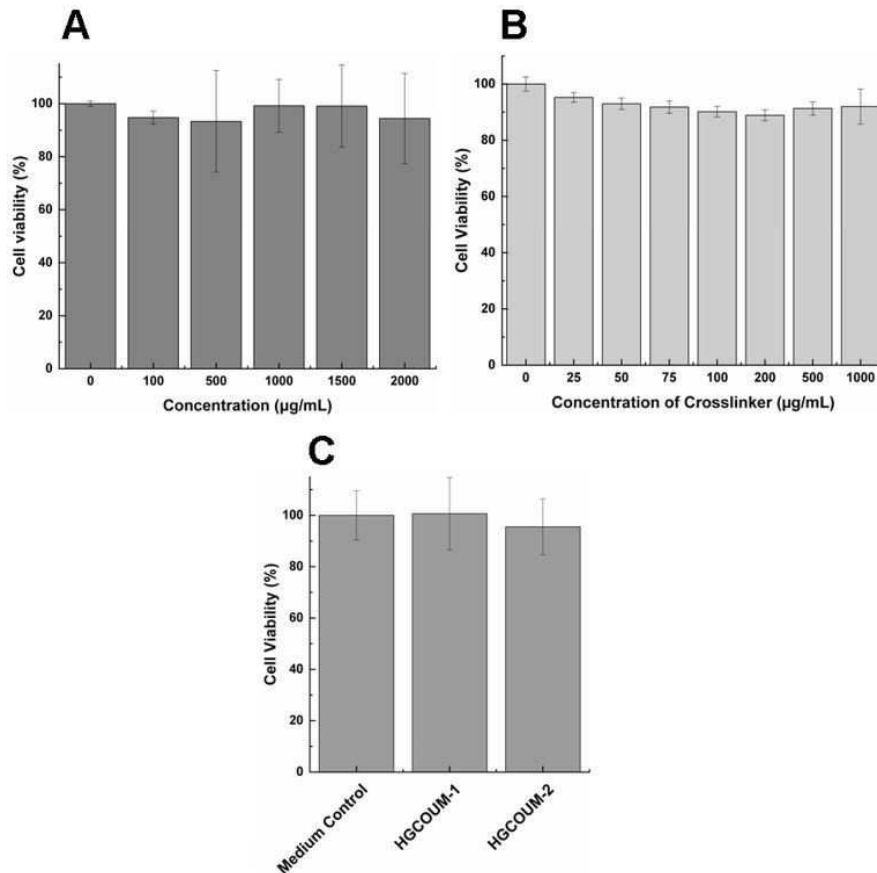


Figure 10. Cytocompatibility of precursors and hydrogels to HEK-293 cells incubated with (A)Alg-Nb, (B)Coumarin-di-tetrazine crosslinker, and (C)Blank hydrogels.

도면11

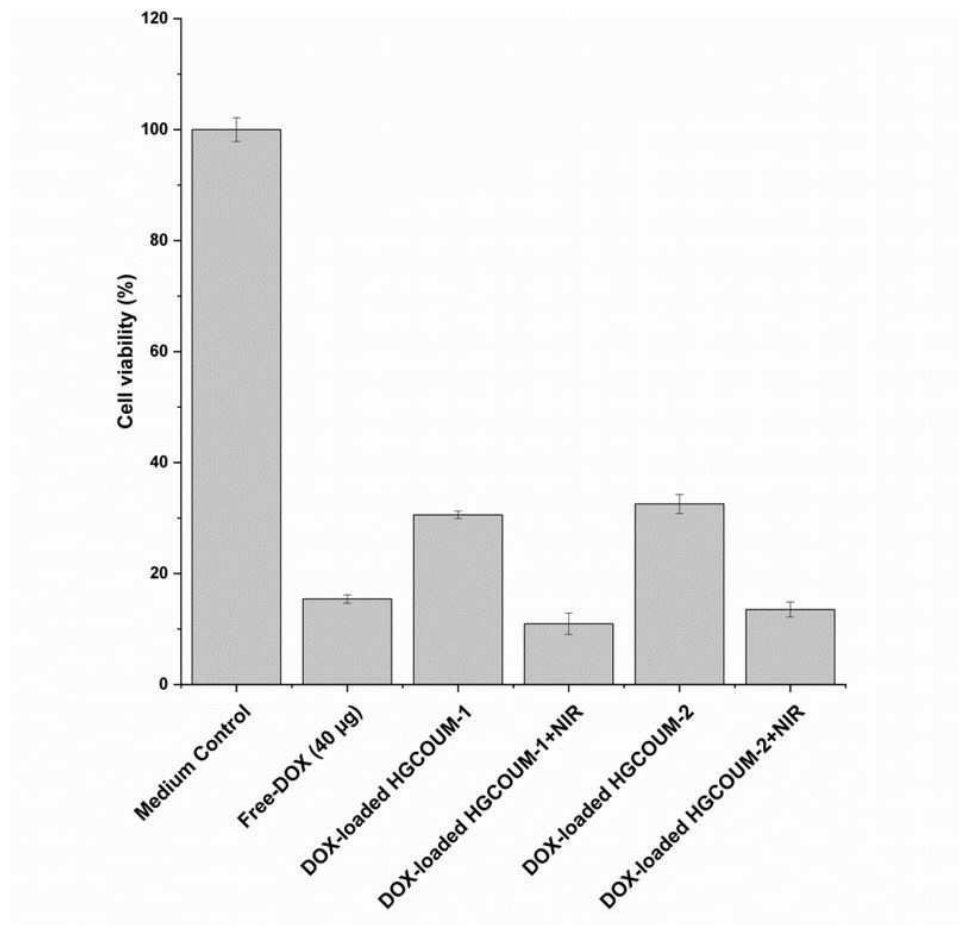


Figure 11. Anti-tumor activity of free-DOX and DOX loaded hydrogels in BT-20 cancer cells before and after NIR irradiation (4-watt, 5 min.).