



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월04일

(11) 등록번호 10-1953709

(24) 등록일자 2019년02월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C08B 37/08 (2006.01) A61K 31/728 (2006.01)

A61K 9/06 (2006.01) A61P 19/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7023974

(22) 출원일자(국제) 2013년02월26일

심사청구일자 2017년09월06일

(85) 번역문제출일자 2014년08월27일

(65) 공개번호 10-2014-0127286

(43) 공개일자 2014년11월03일

(86) 국제출원번호 PCT/CZ2013/000023

(87) 국제공개번호 WO 2013/127374

국제공개일자 2013년09월06일

(30) 우선권주장

PV 2012-136 2012년02월28일 체코(CZ)

(56) 선행기술조사문현

US20060084759 A1

KR1020110025530 A

WO2009148405 A1

(73) 특허권자

콘티프로 에이.에스.

체코 도르니 도브로우치 561 02, 도르니 도브로우
치 401

(72) 발명자

울포바 루시

체코 746 01 오파바 나 리브너쿠 27

프라브다 마틴

체코 538 61 코치 코치 44

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 14 항

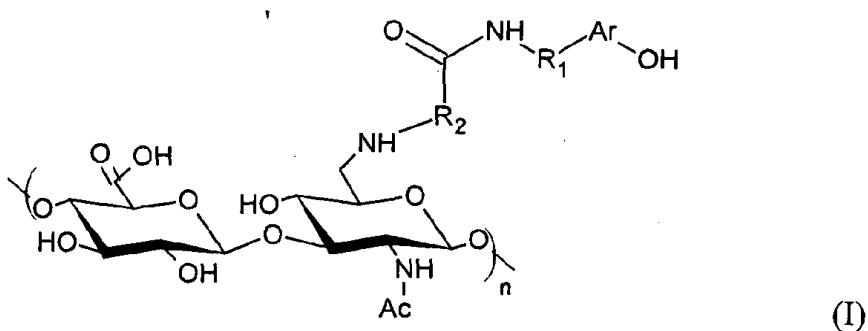
심사관 : 이예리

(54) 발명의 명칭 하이드로겔을 형성할 수 있는 히알루론산계 유도체, 이의 제조 방법, 상기 유도체를 기재로 하는 하이드로겔, 하이드로겔의 제조 방법, 및 조직 공학, 코스메틱, 의학 또는 재생 의학, 특히 관절 연골 또는 골 조직 결합의 치료를 위한 스캐폴드 형태에서의 하이드로겔의 용도에 관한 것이다.

(57) 요 약

본 발명은 화학식 (I)에 따른 새로운 히알루로난 유도체, 이의 제조 방법, 새로운 유도체를 기재로 하는 하이드로겔, 하이드로겔의 제조 방법, 및 조직 공학, 코스메틱, 의학 또는 재생 의학, 특히 관절 연골 또는 골 조직 결합의 치료를 위한 스캐폴드 형태에서의 하이드로겔의 용도에 관한 것이다.

화학식 (I):



(72) 발명자

포글라로바 마르셀라

체코 549 63 마호프 마호프 132

넵코바 미로슬라바

체코 565 01 호첸 스코르제니체 129

니에도바 크쥐슈토프

폴란드 피엘-1616 글레스조프 마르글로바 4

벨레브니 블라드미르

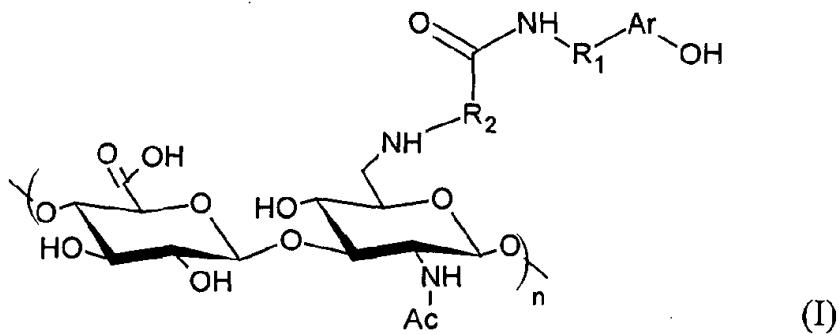
체코 564 01 잠버크 사도바 1466

명세서

청구범위

청구항 1

화학식 (I)에 따른 히알루론산계 유도체:



상기 식에서,

Ar은 폐닐이고 R₁은 에틸렌이거나, 또는 Ar은 인돌이고 R₁은 에틸렌이거나, 또는 Ar은 인돌이고 R₁은 카르복시에틸렌이며,

R₂는 탄소수 3 내지 7의 알킬이고,

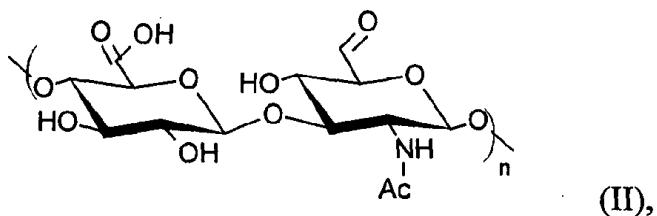
n은 1 내지 7500임.

청구항 2

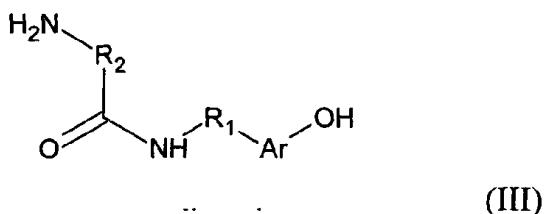
화학식 (I)에 의해 정의되는 유도체의 제조 방법으로서,

화학식 (II)에 따른 히알루론산의 알데하이드 유도체를 먼저 제조하는 단계로서,

화학식 (II)에서 n은 1 내지 7500이고, 알데하이드 유도체는 양성자성 매질에서 산화 시스템 4-아세타미도-TEMPO/NaClO를 사용해 제조되며, 치환율은 5% 내지 15%이고, 분자량은 10000 g/mol 내지 2000000 g/mol인, 단계:



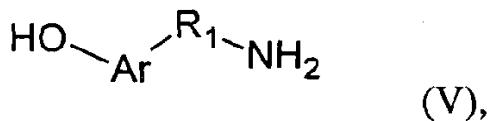
화학식 (III)에 따른 화합물을 별도로 제조하는 단계로서:



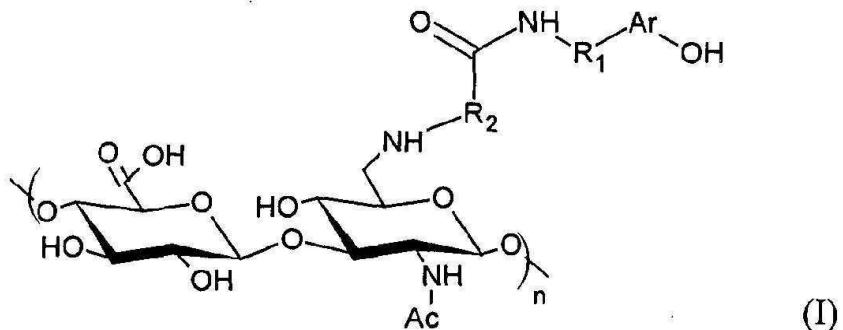
화학식 (III)에서, Ar은 폐닐이고 R₁은 에틸렌이거나, 또는 Ar은 인돌이고 R₁은 에틸렌이거나, 또는 Ar은 인

돌이고 R_1 은 카르복시에틸렌이며, R_2 는 탄소수 3 내지 7의 알킬이고,

화학식 (III)에 따른 화합물은, Z가 1차 아미노기를 보호하는데 통상적으로 사용되는 보호기인 화학식 (IV)에 따른 스페이서 전구체를, 화학식 (V)에 따른 리간드와, 카르복실 관능기를 활성화시키는 제제의 존재 하 비양성자성 매질 내에서, 40°C 내지 150°C의 온도에서 1시간 내지 24시간 동안 반응시켜, 화학식 (VI)에 따른 화합물을 제조한 다음, 상기 보호기 Z를 제거함으로써, 화학식 (III)에 따른 화합물을 제조하는 것인, 단계:



화학식 (II)에 따른 히알루론산의 알데하이드 유도체를, 화학식 (III)에 따른 화합물과, 피콜린-보란 복합체의 존재 하에 실온에서 pH 3 내지 8에서 1시간 내지 72시간 동안 반응시켜, 화학식 (I)에 따른 유도체를 제조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법:



청구항 3

제2항에 있어서,

상기 화학식 (V)에 따른 리간드가 티라민 (tyramine), 세로토닌 및 5-하이드록시트립토판으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서,

상기 화학식 (IV)에서 Z가 tert-부톡시카르보닐이고 R_2 가 탄소수 3 내지 7의 알킬인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 5

제2항 또는 제3항에 있어서,

상기 스페이서 전구체와 상기 리간드의 반응은 1,1'-카르보다이이미다졸의 존재 하에 테트라하이드로푸란 (THF) 또는 N,N -다이메틸포름아미드 (DMF)의 매질 중에서 2시간 내지 6시간 동안 50°C에서 이루어지는 것을 특징으로 하는, 방법.

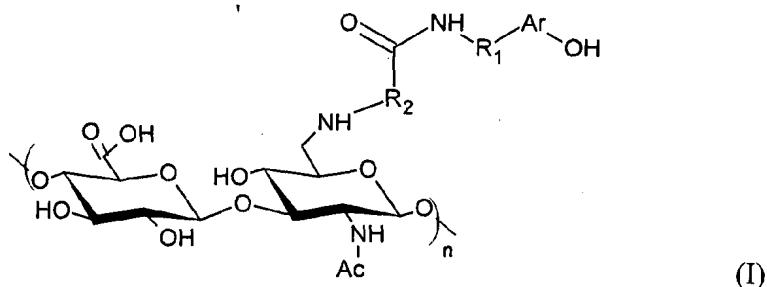
청구항 6

제2항 또는 제3항에 있어서,

상기 보호기 Z의 제거는 트리플루오로아세트산 또는 염산에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 7

화학식 (I)에 따른 가교된 유도체를 기재로 하는 하이드로겔:



상기 식에서,

Ar은 페닐이고 R₁은 에틸렌이거나, 또는 Ar은 인돌이고 R₁은 에틸렌이거나, 또는 Ar은 인돌이고 R₁은 카르복시에틸렌이며,

R₂는 탄소수 3 내지 7의 알킬이고,

n은 1 내지 7500임.

청구항 8

제7항에 따른 하이드로겔의 제조 방법으로서,

상기 화학식 (I)에 따른 유도체에 pH 4 내지 10에서 반응성 폐녹시 라디칼의 발생물질 (generator)을 처리하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 반응성 폐녹시 라디칼의 발생물질은 시스템 호스래디쉬 퍼옥시다제 및 하이드록실 라디칼 소스로 이루어진 군으로부터 선택되며,

상기 하이드록실 라디칼 소스는 과산화수소 수용액, 또는 옥시다제-산소-기질 시스템--인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 옥시다제-산소-기질 시스템은, 갈락토스 옥시다제 - 갈락토스 또는 글루코스 옥시다제 - 글루코스인, 방법.

청구항 11

제7항의 하이드로겔을 포함하는 코스메틱용 조제물.

청구항 12

제7항의 하이드로겔을 포함하는, 의학 또는 재생 의학용 조제물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 조제물이, 상처 치유용 커버링 (covering), 수술후 유착의 형성을 방지하기 위한 생분해성 장벽, 연조직 증대를 위한 제제, 조직 결합의 충전재 (filling), 조직 공학용 스캐폴드 (scaffold)를 포함하는 것을 특징으로

하는, 의학 또는 재생 의학용 조제물.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 조제물이 관절 연골 결합 및 골 결합을 치료하기 위한 시딩형 (seeded) 또는 비-시딩형 (non-seeded) 스캐폴드를 포함하는 것을 특징으로 하는, 의학 또는 재생 의학용 조제물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 하이드로겔의 제조에 적절한 새로운 히알루론산 유도체, 및 이의 제조 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 유도체를 기재로 하는 하이드로겔, 이의 특성, 이의 용도 및 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

히알루로난은, 교대로 나타나는 β -1,4 및 β -1,3 글리코시드 결합에 의해 결합된 D-글루쿠론산 및 D-N-아세틸글루코사민으로 구성된 이당류 단위로 이루어진 다당류이다. 생체내 (*in vivo*) 중량 평균 분자량 (이하 분자량으로 언급되는 경우, 이는 항상 중량 평균 분자량임)의 범위는 3 kDa 내지 20 MDa이다. 이것은, 분자량 및 농도에 따라, 고 점성 용액을 형성하는 수성 매질에 쉽게 용해되는 다당류이다.

[0003]

하이드로겔은, 일정 부분 이상 친수성 폴리머로 구성된 불용성 네트워크에 의해, 수중에 형성되는 물질이다¹. 처음에 친수성 폴리머로부터 불용성 네트워크를 형성하는 방법이 몇 가지 있다. 이는 폴리머 소수성화², 또는 3-차원 폴리머 네트워크의 형성을 유도하는 추가적인 화학 반응에 참여할 수 있는 반응성 관능기를 가진 수용성 폴리머 유도체의 사용³⁻⁵이다.

[0004]

다수의 저자들이 가용성 히알루로난 유도체의 제조와 이의 후속적인 가교에 대해 개시한 바 있다.³⁻⁶ 과거, 하이드로겔의 가교 반응 및 제조에 폐놀 히알루로난 유도체를 사용하는 것은 충분히 언급되어 있다. Calabro 등⁴,^{7, 8}은, 히알루로난 D-글루쿠론산의 구조에 존재하는 카르복시를 폐놀의 아미노알킬 유도체와 반응시켜, 폐놀 히알루로난 유도체를 제조하는 방법을 개시하고 있다. 이 반응으로, 히알루로난 아미드가 합성된다. 상기한 합성이 진행되는데 중요한 특징은, 카르보다이이미드 유형의 탈수제 (예컨대, EDC)와의 반응에 이용되는, 히알루로난 카르복시의 활성화이다. 가장 많이 사용되는 아미노알킬 폐놀은 티라민⁶이다.

[0005]

일반적으로, 폐놀 히알루로난 유도체의 가교는 퍼옥시다제 (예컨대, 호스래디쉬 (horseradish) 퍼옥시다제 - HRP) 및 과산화수소 희석 용액을 첨가함으로써 개시된다. 호스래디쉬 퍼옥시다제 (호스래디쉬 퍼옥시다제, HRP, E.C.1.11.1.7)는 현재 유기 반응 및 생체내 변환 (biotransformation) 반응의 촉매로서 광범위하게 사용되고 있다⁹⁻¹³. 이는 매우 광범위한 기질 특이성을 특징으로 하므로, 다수의 유기 및 무기 화합물을 모두를 산화시킬 수 있다¹³⁻¹⁵.

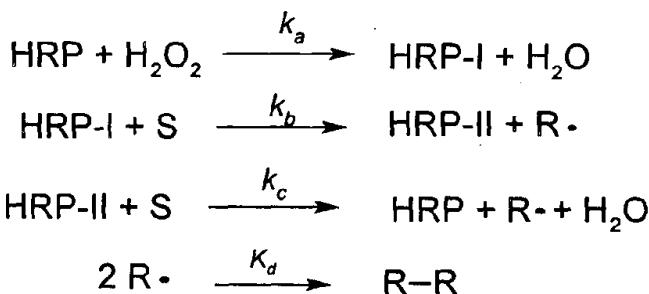
[0006]

이것은 철을 함유하는 헴 (hem)을 보결분자단 (prosthetic group)으로서 포함하는 효소이다. 철은 효소의 불활화된 상태에서 산화도 (III)를 가진다. 퍼옥사이드와의 반응으로, HRP-I라고 하는 중간산물이 형성된다. 헴 철 Fe^(III)은 옥시페릴기 (oxyferryl group)(Fe^{(IV)=O})로 산화되며, 동시에, 포르피린 사이클 상에 양이온성 π -라디칼이 형성된다. 이렇게 활성화된 효소는 기질 분자와 복합체를 형성할 수 있으며, 이러한 상호작용 중에 산화가 이루어진다.^{14, 16-18}

[0007]

산화된 효소가 이의 초기 형태로 다시 전환되는 것은 2단계로 진행된다. 제1 단계에서, 기질 분자 (S)와 HRP-I 간에 반응이 발생하여, 기질 라디칼 (R[·]) 및 효소 HRP-II의 부분 환원된 형태가 형성된다. HRP-II는 여전히 옥시페릴기 (Fe^{(IV)=O})를 가지고 있지만, 포르피린 π -라디칼은 더 이상 포함하지 않는다. 전자가 포르피린 라디칼로 전달되는 동안, 하나의 H⁺가 동시에 단백질에 의해 취해진다. HRP-II는 다시 기질과 반응하여, R[·]를 형성한다. 이 반응 동안에, 옥시페릴기 (Fe^{(IV)=O})는 Fe^(III)로 환원된다. 이 과정은 2개의 H⁺가 옥시페릴기의 산

소로 전달되는 과정과 조합된다. 양성자 하나는 기질 (또는 용매)로부터 유래되며, 다른 하나는 단백질로부터 유래된다. 이로써, 물 분자가 형성된다 (식 I 및 도식 I).



[0008]

[0009] 식 I: HRP에 의한 기질 산화의 촉매화 기전에 대한 간단한 설명.

[0010]

생성된 기질 라디칼은 많은 경우 함께 상호작용하여, 다이머 R-R을 형성할 수 있다. 이 과정은 더 이상 효소적으로 영향을 받지 않으며, 생성된 라디칼의 안정성 및 반응성과 관련있다.^{14, 16-26}

[0011]

따라서, 다당류의 폐놀 유도체의 효소 가교 반응의 경우, 기질 (폴리머에 결합된, 폐놀 - 반응성 리간드)은 효소에 의해 반응성 라디칼로 변환된다. 그런 다음, 이 라디칼은 다른 폐놀 라디칼과 반응하여, 다이티라민을 형성할 수 있다. 효소 반응의 기질 (리간드) 분자의 자유 이동성 (free mobility) 및 식 I을 정확히 따르는 반응의 진행을 고려하면, (페옥사이드가 충분한 양으로 사용되는 한) 효소는 모든 기질 분자를 점차적으로 반응성 라디칼로 변환시켜야 하며, 충분히 긴 반응 시간이 제공되는 경우 이들은 모두 점차적으로 이량체화 (또는 올리고머화)되어야 한다. 기질 (리간드)을 폴리머에 연결하는 경우, 폴리머의 가교도 (crosslinking degree)는, 설사 그 값에 도달하는 시간이 사용되는 효소의 양에 따라 달라짐에도 불구하고, 항상 동일한 값에 도달하여야 한다. 그러나, 실제로는 차이가 있다. 문헌²⁷에, 예상되는 분자내 가교 및 분자간 가교 비율과, 가교 위치들 사이의 폴리머 분절들의 분자량 간의 관계 (가교 밀도, 네트워크노드들 (networknodes) 간의 거리)가 상세히 개시되어 있으며, 가교를 유도하는 분자내 상호작용이 분자간 가교와 비교해, 유연성 측면에서 비-효율적인 것으로 언급되어 있다.

[0012]

또한, 그 문헌에 따르면, HA의 폐놀 유도체를 사용하는 경우, 효소의 양은 가교 반응의 속도 뿐만 아니라 하이드로겔의 형성되는 기계적 특성에도 유의한 영향을 미치는 것으로 공지되어 있다^{4, 6, 7, 28}. 문헌은, 유동학적 (rheologic) 측정에 의하면, 효소가 보다 높은 농도로 사용되는 경우 전단 계수 (modulus of shear) (G')가 더 높은 것으로 확인되었다고 언급하고 있다. 저자들에 따르면, 이러한 현상의 원인은 하이드로겔의 높은 가교 밀도이다. 가장 견고한 하이드로겔을 제조하여야 하는 경우, 가교 반응은 폐옥시다제가 상대적으로 높은 농도에서, 따라서 또한 보다 신속하게 진행되어야 한다. 그러나, 반응이 매우 빠르게 진행되면, 비-균질한 가교 하이드로겔이 형성될 수 있다. 그러면, 샘플에서 전혀 가교되지 않은 위치들이 나타날 수 있다. 더욱이, 반응이 매우 빠르게 진행되면, 겔을 이의 최종 적용 위치 등에 두었을 때, 문제가 발생할 수도 있다.

[0013]

그 원인은, 반응성 센터에서 기본 폴리머 사슬까지의 거리가 짧기 때문이다. 리간드의 가동성이 낮으면, 다이티라민을 형성하는 리간드 라디칼의 유효 충돌 (effective collision) 확률이 감소된다. 따라서, 시스템 내에 효소의 농도가 낮은 경우, 단위 시간 안에 반응성 리간드 형태는 소량 형성될 수 있다. 그로 인해, 가교 반응은 느리게 진행되며, 효율성이 낮다.

[0014]

Park 등²⁹은, 반응성 리간드와 폴리머 사슬 사이에 적정 스페이서를 삽입함으로써, 폴리머에 결합된 리간드의 반응성을 높이고자 시도하였다. 그 문헌에서는, 다당류 사슬과 폐놀 또는 아닐린 고리 사이에 친수성 사슬을 삽입하여, 이를 치환기의 반응성을 높이는 방법을 개시하고 있다. 친수성 사슬을 폴리머 구조에 도입하는 주된 이유는, 이의 용해도를 향상시키고 반응성 센터 (폐놀 또는 아닐린 고리)로의 접근성을 개선하기 위한 것이었다. 반응성 센터로의 공간적인 접근성이 보다 용이해지면, 리간드들 간에 반응이 발생할 확률이 높아진다. 가장 빈번하게는, 이 단계는, 동일한 효소 활성을 유지하면서도, 치환도 증가, 농도 증가 및 하이드로겔 가교의 균질성 향상을 야기하게 된다. 더욱이, 저자에 따르면, 이러한 친수성 사슬이 하이드로겔 구조에 도입되는 덕분에, 하이드로겔의 생체안정성 및 기계적 특성이 증가된다. 그러나, Park 등은, 분자량 3500 Da의 친수성 폴리머 PEG를 "스페이서"로서 사용하므로, 따라서, 종료 시에는 이것은 오히려 코폴리머이다. 그러나, 하이드로겔 구조에

대한, 심지어 낮은 치환 수준의 이러한 개입은, 오리지널 폴리머의 물리적 특성을 상당히 바꾼다. 더욱이, 허알루로난의 경우, 가교 농도가 높을수록 하이드로겔의 경도가 증가하며, 동시에 이의 취성 (fragility)도 증가하게 되어, 조직 공학에서 원하는 용도로 사용하기에는 바람직하지 않다. 예를 들어, 관절 연골용 스캐폴드 (scaffold)뿐만 아니라 스캐폴드용으로 설계되는 물질에 관한 한, 응력이 충분한 세기와 저항성으로 걸리게 되어, 부서지기 쉬운 물질은 이보다 높은 하중에서 비가역적으로 변형되며, 하이드로겔의 경우에는 심지어 완전히 파괴되기도 한다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0015]

- (비특허문헌 0001) Slaughter, B. V.; Khurshid, S. S.; Fisher, O. Z.; Khademhosseini, A.; Peppas, N. A., Hydrogels in Regenerative Medicine. *Advanced Materials* 2009, 21 (32-33), 3307-3329.
- (비특허문헌 0002) Benedetti, L.; Cortivo, R.; Berti, T.; Berti, A.; Pea, F.; Mazzo, M.; Moras, M.; Abatangelo, G., Biocompatibility and biodegradation of different hyaluronan derivatives (Hyaff) implanted in rats. *Biomaterials* 1993, 14 (15), 1154-1160.
- (비특허문헌 0003) Calabro, A.; Gross, R. A.; Darr, A. B. Hydroxyphenyl cross-linked macromolecular network and applications thereof. 2004.
- (비특허문헌 0004) Calabro, A.; Akst, L.; Alam, D.; Chan, J.; Darr, A. B.; Fukamachi, K.; Gross, R. A.; Haynes, D.; Kamohara, K.; Knott, D. P.; Lewis, H.; Melamud, A.; Miniaci, A.; Strome, M. Hydroxyphenyl cross-linked macromolecular network and applications thereof. 2008 (WO2006/010066).
- (비특허문헌 0005) Tan, H.; Chu, C. R.; Payne, K. A.; Marra, K. G., Injectable in situ forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2009, 30 (13), 2499-2506.
- (비특허문헌 0006) Darr, A.; Calabro, A., Synthesis and characterization of tyramine-based hyaluronan hydrogels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2009, 20 (1), 33-44.
- (비특허문헌 0007) Kurisawa, M.; Lee, F.; Chung, J. E. Formation of Hydrogel in the Presence of Peroxidase and Low Concentration of Hydrogen Peroxide 2009 (WO2009/148405).
- (비특허문헌 0008) Lee, F.; Chung, J. E.; Kurisawa, M., An injectable enzymatically crosslinked hyaluronic acid-tyramine hydrogel system with independent tuning of mechanical strength and gelation rate. *Soft Matter* 2008, 4, 880-887.
- (비특허문헌 0009) Akkara, J. A.; Senecal, K. J.; Kaplan, D. L., Synthesis and characterization of polymers produced by horseradish peroxidase in dioxane. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 1991, 29 (11), 1561-1574.
- (비특허문헌 0010) Shutava, T.; Zheng, Z.; John, V.; Lvov, Y., Microcapsule modification with peroxidase-catalyzed phenol polymerization. *Biomacromolecules* 2004, 5 (3), 914-21.
- (비특허문헌 0011) Ghan, R.; Shutava, T.; Patel, A.; John, V. T.; Lvov, Y., Enzyme-Catalyzed Polymerization of Phenols within Polyelectrolyte Microcapsules. *Macromolecules* 2004, 37 (12), 4519-4524.
- (비특허문헌 0012) Higashimura, H.; Kobayashi, S., Oxidative Polymerization. John Wiley & Sons, Inc.: 2002.
- (비특허문헌 0013) Veitch, N. C., Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* 2004, 65 (3), 249-259.
- (비특허문헌 0014) Gilabert, M. A.; Phenoll, L. G.; Garcia-Molina, F.; Garcia-Ruiz, P. A.; Tudela, J.; Garcia-Canovas, F.; Rodriguez-Lopez, J. N., Stereospecificity of horseradish peroxidase. *Biol Chem* 2004, 385 (12), 1177-84.

- (비특허문헌 0015) Uyama, H.; Kobayashi, S., Enzymatic Synthesis of Polyphenols. Current Organic Chemistry 2003, 7, 1387.
- (비특허문헌 0016) Gilabert, M. A.; Phenoll, L. G.; Garcia-Molina, F.; Tudela, J.; Garcia-Canovas, F.; Rodriguez-Lopez, J. N., Kinetic characterization of phenol and aniline derivates as substrates of peroxidase. Biol Chem 2004, 385 (9), 795-800.
- (비특허문헌 0017) Gilabert, M. A.; Hiner, A. N.; Garcia-Ruiz, P. A.; Tudela, J.; Garcia-Molina, F.; Acosta, M.; Garcia-Canovas, F.; Rodriguez-Lopez, J. N., Differential substrate behaviour of phenol and aniline derivatives during oxidation by horseradish peroxidase: kinetic evidence for a two-step mechanism. Biochim Biophys Acta 2004, 1699 (1-2), 235-43.
- (비특허문헌 0018) Hewson, W. D.; Dunford, H. B., Oxidation of p-cresol by horseradish peroxidase compound I. J Biol Chem 1976, 251 (19), 6036-42.
- (비특허문헌 0019) Burner, U.; Obinger, C., Transient-state and steady-state kinetics of the oxidation of aliphatic and aromatic thiols by horseradish peroxidase. FEBS Letters 1997, 411 (2-3), 269-274.
- (비특허문헌 0020) Patel, P. K.; Mondal, M. S.; Modi, S.; Behere, D. V., Kinetic studies on the oxidation of phenols by the horseradish peroxidase compound II. Biochim Biophys Acta 1997, 1339 (1), 79-87.
- (비특허문헌 0021) Hewson, W. D.; Dunford, H. B., Stoichiometry of the reaction between horseradish peroxidase and p-cresol. J Biol Chem 1976, 251 (19), 6043-52.
- (비특허문헌 0022) Job, D.; Dunford, H. B., Substituent effect on the oxidation of phenols and aromatic amines by horseradish peroxidase compound I. Eur J Biochem 1976, 66 (3), 607-14.
- (비특허문헌 0023) Dunford, H. B.; Cotton, M. L., Kinetics of the oxidation of p-aminobenzoic acid catalyzed by horseradish peroxidase compounds I and II. J Biol Chem 1975, 250 (8), 2920-32.
- (비특허문헌 0024) Kalyanaraman, B.; Felix, C. C.; Sealy, R. C., Peroxidative oxidation of catecholamines. A kinetic electron spin resonance investigation using the spin stabilization approach. Journal of Biological Chemistry 1984, 259 (12), 7584-7589.
- (비특허문헌 0025) Won, K.; Kim, Y. H.; An, E. S.; Lee, Y. S.; Song, B. K., Horseradish Peroxidase-Catalyzed Polymerization of Cardanol in the Presence of Redox Mediators. Biomacromolecules 2003, 5 (1), 1-4.
- (비특허문헌 0026) Xu, Y.-P.; Huang, G.-L.; Yu, Y.-T., Kinetics of phenolic polymerization catalyzed by peroxidase in organic media. Biotechnology and Bioengineering 1995, 47 (1), 117-119.
- (비특허문헌 0027) Tonelli, A. E., Effects of crosslink density and length on the number of intramolecular crosslinks (defects) introduced into a rubbery network. Polymer 1974, 15 (4), 194-196.
- (비특허문헌 0028) Jin, R.; Hiemstra, C.; Zhong, Z.; Feijen, J., Enzyme-mediated fast in situ formation of hydrogels from dextran-tyramine conjugates. Biomaterials 2007, 28 (18), 2791-2800.
- (비특허문헌 0029) Park, K.-D.; Joung, Y.-K.; Park, K.-M. In situ Forming Hydrogel and Biomedical Use Thereof 2011 (WO2011/028031).

발명의 내용

[0016] 따라서, 본 발명의 목적은, 충분히 강하며 동시에 접착성이 있고, 오리지널 폴리머와 비교해 생물학적 및 물리적 특성의 어떠한 유의한 변화가 없는 물질을 제공하는 것이다. 히알루로난계 하이드로겔의 강도는 일반적으로, 가교 농도를 높임으로써, 예컨대 하이드로겔이 형성되는 용액내 폴리머의 농도를 높임으로써, 또는 폴리머의 치환율을 높임으로써 증가시킬 수 있다. 그러나, 당해 기술분야에서, 히알루로난의 경우, 이들 두가지 방법은 생

성되는 하이드로겔의 취성을 증가시키므로, 하이드로겔의 잠재적인 용도를 상당히 제한하게 된다.

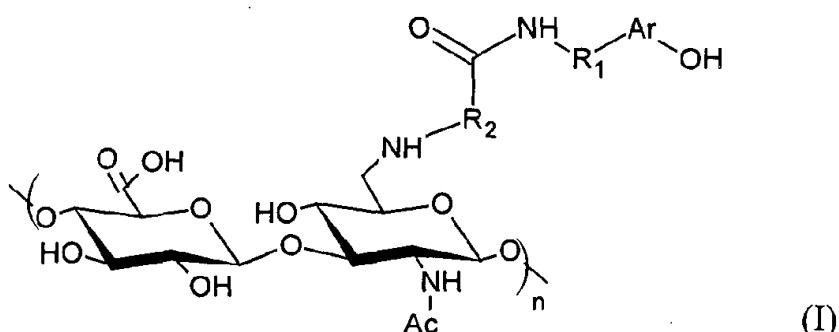
[0017] 본 발명에 의해 해결되는 과제는, 리간드 반응성과 하이드로겔의 강도를 증가시키면서 동시에, 오리지널 폴리머의 물리적 및 생물학적 특성을 유지하는, 상기한 유도체의 발견으로 구성된다. 놀랍게도, 반응성 리간드와 HA 사이에 본 발명에 따른 상대적으로 짧은 스페이서 (분자량이 약 130 Da)를 도입함으로써, 아직 매우 낮은 치환율에서도 최종 하이드로겔의 접착성을 유의하게 증가시킬 수 있다는 것을 확인하였다.

[0018] 따라서, 일 측면에서, 본 발명은, 리간드의 가동성을 증가시켜, 심지어 농도가 낮은 경우 (치환도가 낮고, 효소 활성이 낮음)에도 유효 충돌 확률을 높이는 것을 목적으로 하는, 소수성 스페이서를 통해 결합된 반응성 리간드를 가진 HA 유도체에 관한 것이다. 하이드로겔 내 스페이서의 중량 함량 (weight abundance)이 예를 들어, 불과 0.01% 내지 0.02%로 매우 낮더라도, 하이드로겔의 접착성 및 강도가, 스페이서가 삽입되지 않은 유사한 HA 유도체를 기재로 하는 하이드로겔 (즉, 동일한 농도, 몰 중량, 및 치환 / 가교율)과 비교해, 유의하게 증가한다는 것을 확인하였다. 이에, 본 발명은 하이드로겔의 제조에 적절한 이러한 새로운 히알루로난 유도체 및 이의 제조 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이러한 유도체를 기재로 하는 하이드로겔, 이의 용도 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

[0019] 하이드로겔은, 호스래디쉬 페옥시다제 또는 이의 유사체에 의해 촉매되는 반응에 의한, 개질된 히알루로난 사슬의 가교를 이용하는 방법에 의해 제조된다. 적절한 히알루로난 유도체는 이의 구조에 폐놀 또는 기본 다당류 사슬에 공유 결합된 헤테로아릴 폐놀 고리를 포함한다. 가교 절차는 시스템 내에 반응성 형태의 산소 (ROS)를 형성하는 것으로 시작되는, 연속적인 화학 반응들의 캐스케이드로서 기술될 수 있다. 이들은 혼합물에 첨가되거나, 또는 이들의 형성은 이의 발생물질로서 작용하는 화학적 화합물의 존재 하에 가능해진다. ROS는 효소 페옥시다제 또는 이의 유사체를 활성화하며, 이는 이후에 히알루로난 유도체의 구조 내에 존재하는 방향족 또는 헤테로방향족 고리의 이량체화 (또는 올리고머화)를 촉매한다. 이로써, 3-차원 폴리머 네트워크가 형성된다.

[0020] 본 발명에 따르면, 아미노알킬 폐놀 또는 아미노알킬 헤테로아릴 폐놀을 포함하는 리간드를 결합함으로써 개질되는 히알루로난 (예를 들어, 티라민, 5-하이드록시 트립토판, 세로토닌)은 이러한 하이드로겔의 제조에 사용된다. 본 발명에서 기술되는 히알루로난 유도체는 스페이서에 의해 다당류에 결합된 리간드를 포함한다. 이러한 스페이서가 HA 유도체의 구조 내에 존재하면, 이의 굴곡성 (flexibility) 덕분에, 참여 폴리머 분절의 형태적 배열의 가능성의 자유 및 탄성의 증가를 초래하며, 또한, 변형 에너지의 소멸의 가능성을 초래한다. 스페이서의 도입은 또한, 기본 폴리머 사슬로부터 반응성 방향족 중심 (폐놀, 헤테로아릴 폐놀)의 거리를 증가시키며, 효소와의 상호작용을 위한 이의 접근성을 개선하고, 생성되는 하이드로겔의 가교 반응의 경로 및 특성에 유의한 영향을 미친다.

[0021] 제1 측면에서, 본 발명은 화학식 (I)에 따른 히알루론산계 유도체에 관한 것으로서,



[0022]

[0023] 상기 식에서,

[0024] Ar은 폐닐이고 R₁은 에틸렌이거나, 또는 Ar은 인돌이고 R₁은 에틸렌이거나, 또는 Ar은 인돌이고 R₁은 카르복시에틸렌이며,

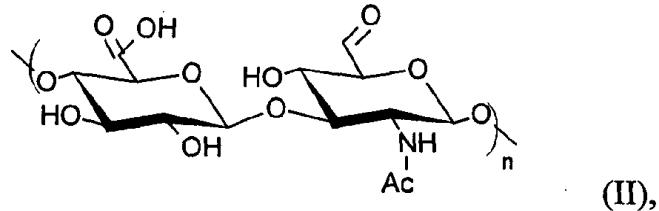
[0025] R₂는 탄소수 3 내지 7의 알킬이고,

[0026] n은 1 내지 7500이다.

[0027] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 화학식 (I)에 의해 정의되는 유도체의 제조 방법에 관한 것으로서,

[0028]

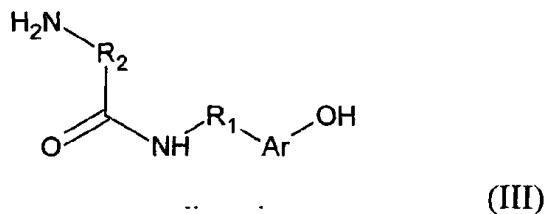
화학식 (II)에 따른 히알루론산의 알데하이드 유도체를 먼저 제조하는 단계로서, 알데하이드 유도체는 양성자성 매질에서 산화 시스템 4-아세타미도-TEMPO/NaClO를 사용해 제조되며, 치환율은 5% 내지 15%이고, 분자량은 10000 g/mol 내지 2000000 g/mol인, 단계:



[0029]

[0030]

화학식 (III)에 따른 화합물을 별도로 제조하는 단계로서, 화학식 (III)에서, Ar은 폐닐이고 R₁은 에틸렌이거나, 또는 Ar은 인돌이고 R₁은 에틸렌이거나, 또는 Ar은 인돌이고 R₁은 카르복시에틸렌이며, R₂는 탄소 수 3 내지 7의 알킬이고, n은 1 내지 7500이며,



[0031]

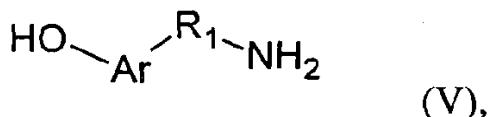
[0032]

화학식 (III)에 따른 화합물은, 카르복실 관능기를 활성화시키는 제제의 존재 하에 비양성자성 매질 내에서, 40°C 내지 150°C의 온도에서 1시간 내지 24시간 동안 화학식 (IV)에 따른 스페이서 전구체와 화학식 (V)에 따른 리간드의 반응에 의해 제조되어, 화학식 (VI)에 따른 화합물을 생성하며, 화학식 (IV)에서, Z은 1차 아미노기의 보호에 보편적으로 사용되는 보호기이며, 화학식 (III)에 따른 화합물은 보호기 Z를 제거함으로써 제조되는, 단계:

[0033]



[0034]



[0035]



및

[0036]

화학식 (II)에 따른 히알루론산의 알데하이드 유도체를 피콜린-보란 복합체의 존재 하에 실온에서 pH 3 내지 8에서 1시간 내지 72시간 동안 화학식 (III)에 따른 화합물과 반응시켜, 화학식 (I)에 따른 유도체를 생성하는 단계를 포함한다.

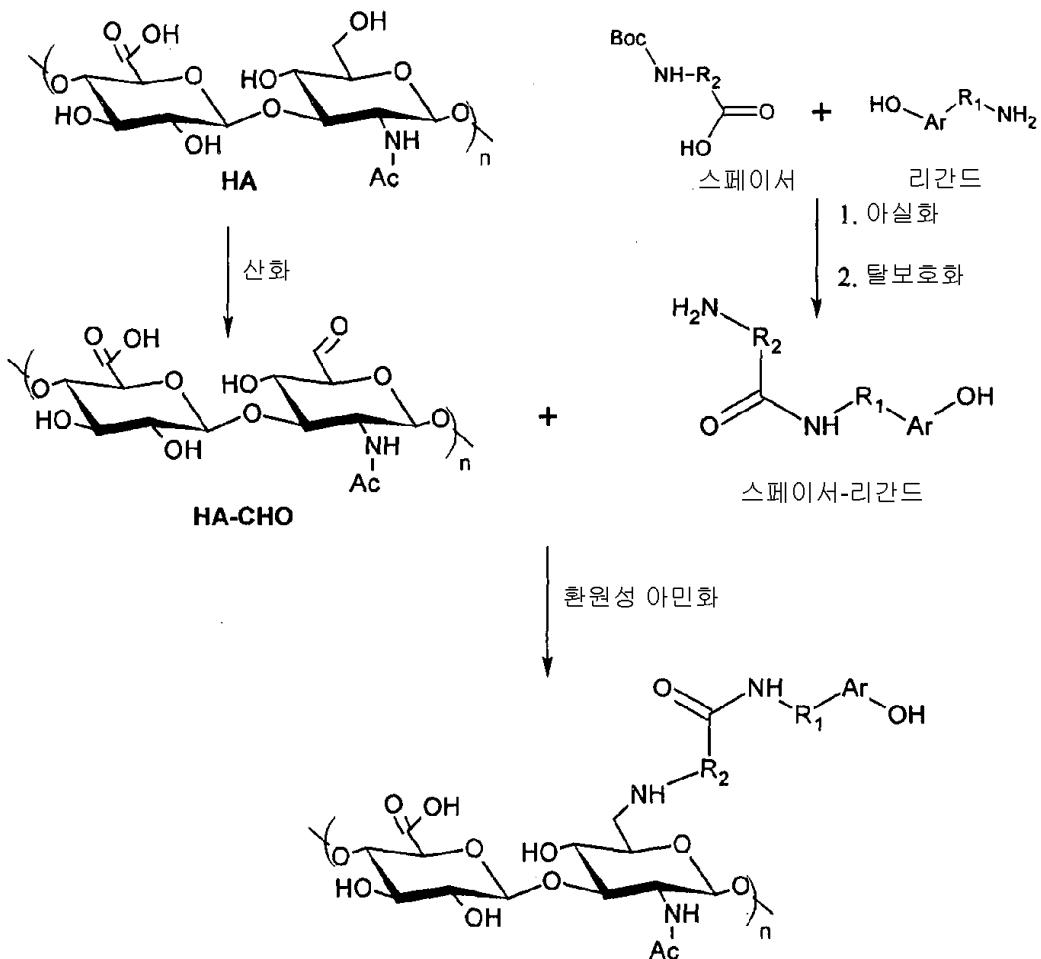
[0037]

따라서, 본 발명에 따른 유도체는 적절한 제제의 처리에 의해 올리고머화를 수행할 수 있는 리간드, 및 히알루로난 사슬과 리간드 사이에 삽입되는 신축성 스페이서를 포함한다. 본 발명의 화학식 (V)에 따른 리간드는 바람직하게는, 티라민, 세로토닌 및 5-하이드록시트립토판으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 화학식 (IV)에 따른 화합물, 즉, 스페이서 전구체는 바람직하게는, ω -[(*tert* 부톡시카르보닐) 아미노] 카르복실산의 유도체를 비롯한 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택되며, R₂는 탄소수 3 내지 7의 알킬이다.

[0038]

본 발명에 따른 방법의 또 다른 바람직한 구현예에서, 스페이서 전구체와 리간드의 반응은 1,1'-카르보다이이미다졸의 존재 하에 THF 또는 DMF에서 50°C에서 2시간 내지 6시간 동안 이루어진다.

- [0039] 또한, 보호기 Z의 제거는 트리플루오로 아세트산 또는 염산에 의해 수행되는 것이 바람직하다.
- [0040] 본 발명을 위해, 중간물을 스페이서-리간드는 화학식 HO-Ar-R₁-NH-CO-R₂-NH₂에 따른 화합물로 표시된다:
- [0041] 바람직하게는, 화학식 -CO-R₂-NH₂에 따른 화합물이 스페이서로서 사용되며, 식에서, R₂는 탄소수 3 내지 7의 알킬이다.
- [0042] 본 발명에 따른 유도체의 제조 방법은 도식 1을 특징으로 할 수 있다:



- [0043]
- [0044] 도식 1.: 본 발명에 따른 유도체 HA-스페이서-리간드의 가능한 제조 방법의 예
- [0045] 또한, 본 발명은 화학식 (I)에 따른 유도체의 가교에 의해 형성되는 하이드로겔 및 이의 제조 방법에 관한 것이다. 이러한 하이드로겔의 제조 방법은, 화학식 (I)에 따른 유도체를 반응성 폐녹시 라디칼 발생물질, 바람직하게는 시스템 호스래디쉬 폐옥시다제, 및 물에서의 과산화수소 용액일 수 있는 하이드록실 라디칼 소스, 또는 pH 4 내지 10에서 시스템 옥시다제-산소-기질, 예를 들어, 갈락토스 옥시다제 - 갈락토스 또는 글루코스 옥시다제 - 글루코스에 의해 처리하는 것으로 구성된다.
- [0046] 따라서, 반응성 리간드의 올리고머화를 위해, 리간드의 방향족 고리로부터 폐녹시 라디칼의 형성을 유도할 수 있는 제제가 사용된다. 본 발명에 따르면, 바람직하게는, 시스템 폐옥사이드 / 호스래디쉬 폐옥시다제가 사용된다. 폐옥사이드는 희석된 용액의 형태의 시스템에 투입될 수 있거나, 또는 인 시추 (in situ) 화학 반응에 의해 발생된다. 과산화수소는 산화 - 환원 반응에서 전자 수용체인 산소 및 각각의 전자 공여체로부터 다양한 종류의 효소 (옥시다제)를 사용해 혼합물에서 발생될 수 있다. 바람직하게는, 갈락토스 옥시다제 또는 글루코스 옥시다제와 이의 기질: 갈락토스 및 글루코스의 조합이 사용될 수 있다. 분자 산소의 존재 하에 폐녹시 라디칼의 형성을 유도할 수 있는 기타 제제는 효소인 티로신아제 (tyrosinase), 락타제 (lactase) 등이다.
- [0047] 이들 하이드로겔의 특성은, 일반적으로 알려진 바와 같이, 폴리머의 화학적 구조 및 이의 농도, 뿐만 아니라 가교제의 선택된 유형 및 이들의 사용량에 의해 영향을 받는다. 폴리머 (HA 유도체)의 물리 화학적 특성은 특히,

모노머 구조, 폴리머 사슬 분절의 형태 (conformation), 가교도 및 분자량에 의해 영향을 받는다. 폴리머의 기계적 특성도 이들에 의해 영향을 받는다. 폴리머가 기계적으로 응력을 받는 경우, 이의 변형이 발생하며, 여기서, 흡수된 에너지 중 일부는 소멸되는데 - 네트워크노드 및 폴리머 사슬 분절의 형태 변화에 소모되며, 에너지 중 일부는 열로 비가역적으로 변환된다. 소멸된 에너지의 양, 및 폴리머 구조 내에서 다양한 형태 배열을 취할 가능성은 거대분자 사슬의 강성도 (stiffness)와 관련이 있으며, 변형에 대한 물질의 탄성 저항 (elastic resistance)의 범위를 반영한다. 이후, 강성 비신축성 (inflexible) 사슬 및 이의 분절로 구성된 폴리머 물질은 변형에 대한 탄성 저항 및 취성을 낮은 수준으로 나타낼 수 있다.

[0048] 이들 폴리머의 탄성 증가는 본 발명의 방법에 따라 수행되며, 여기서, 신축성 분절이 폴리머 구조에 도입된다. 상기 분절은, 변형 에너지를 받는 경우 이들의 형태적 배열의 가능성, 및 상기 에너지의 소멸 가능성의 증가를 달성함으로써, 개별 분자의 이들의 결합에 대한 자유도 (freedom)가 보다 높아지는 것을 특징으로 한다. 따라서, 리간드와 기본 히알루로난 사슬 사이에 적절한 신축성 스페이서를 도입함으로써, 최종 물질의 탄성, 점착성, 및 강도가 보다 높아지며, 이는 예를 들어, 더 높은 하중에 노출되는 소정의 조직, 예컨대, 관절 연골 또는 뼈의 결합의 치료를 위한 스캐폴드용으로 의도되는 하이드로겔에 매우 유익하다. 전술한 바와 같이, 리간드와 기본 히알루로난 사슬 사이에의 신축성 스페이서의 도입은 바람직하게는, 가교 반응 촉매로서 사용되는 효소의 농도에 따라 하이드로겔의 기계적 특성이 달라지는 경우에도 사용될 수 있다. 리간드와 기본 히알루로난 사슬 사이에의 신축성 스페이서의 도입은, 폴리머의 부분 가교 이후라도, 상호간 이량체화를 위한 유도체의 반응성 기에게 충분한 입체적 접근성을 제공한다.

[0049] 이 용액은 가교 반응을 보다 효율적으로 만들므로, 제조되는 하이드로겔의 균질성을 더 높이며, 따라서, 가교제가 호스래디쉬 페옥시다제 및 과산화수소 (또는 또 다른 유형의 폐녹시 라디칼 발생물질)인 경우, 하이드록시페닐 또는 헤테로아릴 폐놀 (티라민, 세로토닌 등)에 의해 개질되는 가교 히알루로난과 관련된 기술적 문제점을 극복하게 한다.

[0050] 그러나, 놀랍게도, 본 발명자들은, 리간드와 기본 히알루로난 사슬 사이에 선별된 스페이서를 도입하면, 매우 낮은 치환율에서도, 상기 HA 유도체를 기재로 하는 최종 하이드로겔의 탄성, 점착성 및 강도의 범위를 유의하게 증가시킨다는 것을 추가로 확인하였다.

[0051] 또한, 본 발명은, 특히 조직 공학, 코스메틱, 의학 및 재생 의학 분야에서, 본 발명에 따른 유도체를 기재로 하는 하이드로겔의 용도에 관한 것이다. 본원에서 기술되는 하이드로겔의 용도는 특히, 조직 공학, 주로 관절 및 골 결합의 치료 분야에서 스캐폴드, 예컨대, 수술후 유착의 형성을 방지하는 생분해성 장벽로서 상처 치유용 커버링, 연조직 증대, 및 조직 결합의 충전 등을 위한 기본 물질을 목적으로 한다. 하이드로겔을 스캐폴드용 물질로서 사용하는 경우, 스캐폴드는 시딩형 (seeded) 또는 비-시딩형 (non-seeded)일 수 있다. 이들이 시딩형 스캐폴드인 경우, 스캐폴드에 병합되는 세포의 유형은 목적으로 하는 적용 위치에 따라 선별된다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1은 실시예 VIII, IX, XI 및 XII에 따라 제조된 유도체를 기재로 하는 하이드로겔의 압축 시 변형의 측정 동안 수득되는, 변형 특성 (응력-변형도 곡선)을 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

1. 유도체 합성 실시예

[0054] 히알루로난 유도체의 합성을 몇 단계에서 수행하였다 (도식 1 참조). 제1 단계는 알데하이드 히알루로난 유도체의 합성이다 (실시예 1.7). 또 다른 단계는 중간산물인 스페이서-리간드의 합성이며 (실시예 1.1 내지 1.6), 이는 이후에 환원성 아민화 과정에 의해 히알루로난에 연결하였다 (실시예 1.9 내지 1.14).

[0055] 실시예는 또한, 히알루로난 유도체의 합성을 포함하며, 여기서, 리간드 (티라민, 하이드록시트립토판)는 임의의 스페이서의 사용 없이 다양류에 직접 결합된다 (실시예 VIII). 이를 유도체 및 이로부터 제조되는 하이드로겔은 이의 특성을 본 출원에서 기술되는 유도체 (유도체 HA-스페이서-리간드 - 유도체 IX 내지 XIV)의 특성과 비교하는 데 사용하였다.

실시예 1.1: 6-아미노-N-[2-(4-하이드록시페닐) 에틸] 혼산아미드 (중간산물 스페이서-리간드 (I))의 합성

[0057] 6-[(*tert*-부톡시카르보닐) 아미노] 혼산 산 (1.00 g, 4.3 mmol)을 테트라하이드로푸란 (THF) 50 mL에 용해시켰다. 이 산 용액에, 1,1'-카르보다이이미다졸 (0.70 g, 4.3 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 50°C로 60분 동안

가열하였다. 그런 다음, 반응 용기를 불활성 가스로 세정하였다. 반응 혼합물에, 티라민 (0.59 g, 4.3 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 또 다른 2시간 동안 더 가열하였다. 그런 다음, THF를 감압 중류에 의해 제거하였다. 증발 잔류물을 에틸아세테이트 50 ml에 용해시켰다. 용액을 정제수 150 ml (3부분으로 나눔)로 세정하였다. 유기층을 분자망에서 건조하였다. 에틸아세테이트를 감압 중류로 제거하였다. 증발 잔류물을 에틸아세테이트 50 ml에 용해시켰다. 용액을 환류 하에 6시간 동안 가열하였다. 용매를 감압 중류로 제거하였다. 증발 잔류물을 에틸아세테이트 50 ml에 용해시켰다. 용액을 정제수 150 ml (3부분으로 나눔)로 세정하였다. 유기층을 분자망에서 건조하였다. 에틸아세테이트를 감압 중류로 제거하였다.

[0058]

$m = 0.75 \text{ g} (70\% \text{ 이론})$

[0059]

^1H NMR (D_2O , ppm) δ : 1.17 (m, 2 H, $\gamma\text{-CH}_2\text{-헥산 산}$); 1.48 (m, 2 H, $\beta\text{-CH}_2\text{-헥산 산}$); 1.58 (m, 2 H, $\delta\text{-CH}_2\text{-헥산 산}$); 2.17 (t, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-CO-}$); 2.73 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-Ph}$); 2.91 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-NH}_2$); 3.42 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-NH-CO-}$); 6.83 (d, 2 H, arom); 7.13 (d, 2 H, arom).

[0060]

^{13}C NMR (D_2O , ppm) δ : 24 ($\gamma\text{-C-헥산 산}$); 26 ($\delta\text{-C-헥산 산}$); 33 ($\beta\text{-C-헥산 산}$); 35 ($-\text{C-CO-}$); 39 ($-\text{C-NH}_2$); 40 (C-Ph); 63 ($-\text{C-NH-CO-}$); 115 (C3 arom); 126 (C1 arom); 130 (C2 arom.); 153 (C4 arom); 176 ($-\text{CO-}$).

[0061]

실시예 1.2: 4-아미노- N -[2-(4-하이드록시페닐) 에틸] 부탄아미드 (중간산물 스페이서-리간드 (II))의 합성

[0062]

4-[(*tert*-부톡시카르보닐) 아미노] 부탄 산 (0.50 g, 2.5 mmol)을 테트라하이드로푸란 (THF) 25 ml에 용해시켰다. 이 산 용액에, 1,1'-카르보다이이미다졸 (0.40 g, 2.5 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 50°C 로 60분 동안 가열하였다. 그런 다음, 반응 용기를 불활성 가스로 세정하였다. 반응 혼합물에, 티라민 (0.34 g, 2.5 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 또 다른 2시간 동안 더 가열하였다. 그런 다음, THF를 감압 중류에 의해 제거하였다. 증발 잔류물을 에틸아세테이트 50 ml에 용해시켰다. 용액을 정제수 150 ml (3부분으로 나눔)로 세정하였다. 유기층을 분자망에서 건조하였다. 에틸아세테이트를 감압 중류로 제거하였다. 증발 잔류물을 MeOH 50 ml에 용해시키고, 트리플루오로아세트산 (TFA) 2 ml을 첨가하였다. 용액을 환류 하에 6시간 동안 가열하였다. 용매를 감압 중류로 제거하였다. 증발 잔류물을 에틸아세테이트 50 ml에 용해시켰다. 용액을 정제수 150 ml (3부분으로 나눔)로 세정하였다. 유기층을 분자망에서 건조하였다. 에틸아세테이트를 감압 중류로 제거하였다.

[0063]

$m = 0.44 \text{ g} (80\% \text{ 이론})$

[0064]

^1H NMR (D_2O , ppm) δ : 1.75 (m, 2 H, $\beta\text{-CH}_2\text{-부탄 산}$); 2.16 (t, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-CO-}$); 2.59 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-In}$); 2.78 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-NH}_2$); 3.20 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-NH-CO-}$); 6.69 (d, 2 H, arom); 6.99 (d, 2 H, arom).

[0065]

^{13}C NMR (D_2O , ppm) δ : 23 ($\beta\text{-C- 부탄 산}$); 25 (t, 2 H, $-\text{C-CO-}$); 32 ($-\text{C-NH}_2$); 45 ($\text{CH}_2\text{-Ar}$); 60 ($-\text{C-NH-CO-}$); 115 (C3 arom); 117 (C1 arom); 129 (C2 arom.); 155 (C4 arom); 171 ($-\text{CO-}$).

[0066]

실시예 1.3: 8-아미노- N -[2-(4-하이드록시페닐) 에틸] 옥탄아미드 (중간산물 스페이서-리간드 (III))의 합성

[0067]

8-[(*tert*-부톡시카르보닐) 아미노] 옥탄 산 (0.50 g, 1.9 mmol)을 테트라하이드로푸란 (THF) 25 ml에 용해시켰다. 이 산 용액에, 1,1'-카르보다이이미다졸 (0.31 g, 1.9 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 50°C 로 60분 동안 가열하였다. 그런 다음, 반응 용기를 불활성 가스로 세정하였다. 반응 혼합물에, 티라민 (0.26 g, 1.9 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 또 다른 2시간 동안 더 가열하였다. 그런 다음, THF를 감압 중류에 의해 제거하였다. 증발 잔류물을 에틸아세테이트 50 ml에 용해시켰다. 용액을 정제수 150 ml (3부분으로 나눔)로 세정하였다. 유기층을 분자망에서 건조하였다. 에틸아세테이트를 감압 중류로 제거하였다. 증발 잔류물을 MeOH 50 ml에 용해시키고, 트리플루오로아세트산 (TFA) 2 ml을 첨가하였다. 용액을 환류 하에 6시간 동안 가열하였다. 용매를 감압 중류로 제거하였다. 증발 잔류물을 에틸아세테이트 50 ml에 용해시켰다. 용액을 정제수 150 ml (3부분으로 나눔)로 세정하였다. 유기층을 분자망에서 건조하였다. 에틸아세테이트를 감압 중류로 제거하였다.

[0068]

$m = 0.40 \text{ g} (75\% \text{ 이론})$

[0069]

^1H NMR (CDCl_3 , ppm) δ : 1.16-1.34 (m, 6 H, C4 az C6 $-\text{CH}_2\text{-옥탄 산}$); 1.56 - 1.44 (m, 4 H, C3 a C7 옥탄

산); 2.58 (m, 2 H, -CH₂-Ar); 2.78 (m, 2 H, -CH₂-NH₂); 3.19 (m, 2 H, -CH₂-NH-CO-); 6.68 (d, 2 H, arom); 6.98 (d, 2 H, arom).

[0070] ¹³C NMR(CDCl₃, ppm) δ : 21 (C7 옥탄 산); 24 (C4 옥탄 산); 26 (C6-옥탄 산); 28 (C5-옥탄 산); 33 (C3-옥탄 산); 35 (-C-CO-); 39 (-C-NH₂); 40 (C-Ph); 63 (-C-NH-CO-); 115 (C3 arom); 126 (C1 arom); 130 (C2 arom.); 153 (C4 arom); 176 (-CO-).

[0071] 실시예 1.4: 4-아미노-N-[2-(5-하이드록시-1H-인돌-3-일) 에틸] 부탄아미드 (중간산물 스페이셔-리간드 (IV))의 합성

[0072] 4-[(tert-부톡시카르보닐) 아미노] 부탄 산 (0.50 g, 2.5 mmol)을 N,N-다이메틸포름아미드 (DMF) 25 mL에 용해시켰다. 이 산 용액에, 1,1'-카르보다이이미다졸 (0.40 g, 2.5 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 50°C로 60분 동안 가열하였다. 그런 다음, 반응 용기를 불활성 가스로 세정하였다. 반응 혼합물에, DMF 25 mL에서의 5--하이드록시트립타민 하이드로클로라이드 (0.52 g, 2.5 mmol)와 트리에틸아민 (0.68 mL; 4.9 mmol)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 또 다른 2시간 동안 더 가열하였다. 에틸아세테이트 (100 mL)를 첨가함으로써 혼합물을 회석시켰다. 생성 용액을 정제수 300 mL (3부분으로 나눔)로 세정하였다. 유기층을 분자망에서 건조하였다. 에틸아세테이트를 감압 증류로 제거하였다. 중발 잔류물을 MeOH 50 mL에 용해시키고, 트리플루오로아세트산 (TFA) 2 mL을 첨가하였다. 용액을 환류 하에 6시간 동안 가열하였다. 용매를 감압 증류로 제거하였다. 중발 잔류물을 에틸아세테이트 50 mL에 용해시켰다. 용액을 정제수 150 mL (3부분으로 나눔)로 세정하였다. 유기층을 분자망에서 건조하였다. 에틸아세테이트를 감압 증류로 제거하였다.

[0073] m = 0.43 g (65% 이론)

[0074] ¹H NMR: (DMSO, ppm) δ : 1.77 (m, 2 H, β-CH₂-부탄 산); 2.20 (t, 2 H, -CH₂-CO-); 2.73 (m, 2 H, -CH₂-In); 2.81 (m, 2 H, -CH₂-NH₂); 3.30 (m, 2 H, -CH₂-NH-CO-); 6.60 (d, 1 H, C6-arom); 6.82 (s, 1 H, C4-arom); 7.03 (s, 1 H, C2-arom); 7.13 (d, 1 H, C7-arom).

[0075] ¹³C NMR (DMSO, ppm) δ : 23 (β-C- 부탄 산); 25 (t, 2 H, -C-CO-); 32 (-C-NH₂); 39 (CH₂-In); 60 (-C-NH-CO-); 102 (C4 arom); 110 (C6 arom); 111 (C7 arom.); 111 (C3 arom.); 123 (C2 arom); 127 (C7 - C- NH-arom); 131 (C4-C-C3- arom); 150 (C5 arom); 171 (-CO-).

[0076] 실시예 1.5: 6-아미노-N-[2-(5-하이드록시-1H-인돌-3-일) 에틸] 헥산아미드 (중간산물 스페이셔-리간드 (V))의 합성

[0077] 6-[(tert-부톡시카르보닐) 아미노] 헥산 산 (1.00 g, 4.3 mmol)을 N,N-다이메틸포름아미드 (DMF) 50 mL에 용해시켰다. 이 산 용액에, 1,1'-카르보다이이미다졸 (0.70 g, 4.3 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 50°C로 60분 동안 가열하였다. 그런 다음, 반응 용기를 불활성 가스로 세정하였다. 반응 혼합물에, DMF 25 mL에서의 5--하이드록시-트립타민 하이드로클로라이드 (0.91 g, 4.3 mmol)와 트리에틸아민 (0.68 mL, 4.9 mmol)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 또 다른 2시간 동안 더 가열하였다. 에틸아세테이트 (100 mL)를 첨가함으로써 혼합물을 회석시켰다. 생성 용액을 정제수 300 mL (3부분으로 나눔)로 세정하였다. 유기층을 분자망에서 건조하였다. 에틸아세테이트를 감압 증류로 제거하였다. 중발 잔류물을 MeOH 50 mL에 용해시키고, 트리플루오로아세트산 (TFA) 2 mL을 첨가하였다. 용액을 환류 하에 6시간 동안 가열하였다. 용매를 감압 증류로 제거하였다. 중발 잔류물을 에틸아세테이트 50 mL에 용해시켰다. 용액을 정제수 150 mL (3부분으로 나눔)로 세정하였다. 유기층을 분자망에서 건조하였다. 에틸아세테이트를 감압 증류로 제거하였다.

[0078] m = 0.75 g (60% 이론)

[0079] ¹H NMR: (DMSO, ppm) δ : 1.17 (m, 2 H, γ-CH₂-헥산 산); 1.48 (m, 2 H, β-CH₂-헥산 산); 1.58 (m, 2 H, δ-CH₂-헥산 산); 2.17 (t, 2 H, -CH₂-CO-); 2.73 (m, 2 H, -CH₂-In); 2.91 (m, 2 H, -CH₂-NH₂); 3.42 (m, 2 H, -CH₂-NH-CO-); 6.60 (d, 1 H, C6-arom); 6.82 (s, 1 H, C4-arom); 7.03 (s, 1 H, C2-arom); 7.13 (d, 1 H, C7-arom).

[0080] ¹³C NMR (DMSO, ppm) δ : 24 (γ-C-헥산 산); 26 (δ-C-헥산 산); 33 (β-C-헥산 산); 35 (-C-CO-); 39 (-C-

NH_2 ; 40 (C-In); 63 (-C-NH-CO-); 102 (C4 arom); 110 (C6 arom); 111 (C7 arom.); 111 (C3 arom.); 123 (C2 arom); 127 (C7 - C- NH- arom); 131 (C4-C-C3- arom); 150 (C5 arom); 171 (-CO-).

[0081] 실시예 1.6: 2-[*(6-아미노헥사노일) 아미노]-3-(5-하이드록시-1*H*-인돌-3-일)-프로판 산 (중간산물 스페이서-리간드 VI)의 제조*

6-[(*tert*-부톡시카르보닐) 아미노]헥산 산 (0.50 g, 2.2 mmol)을 테트라하이드로푸란 (THF) 50 ml에 용해시켰다. 이 산 용액에, 1,1'-카르보다이이미다졸 (0.35 g, 2.2 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 50°C로 60분 동안 가열하였다. 그런 다음, 반응 용기를 불활성 가스로 세정하였다. 반응 혼합물에, 5-하이드록시트립토판 (0.48 g, 2.2 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 또 다른 2시간 동안 더 가열하였다. 에틸아세테이트 (100 ml)를 첨가함으로써 혼합물을 희석시켰다. 생성 용액을 정제수 300 ml (3부분으로 나눔)로 세정하였다. 유기층을 분자망에서 건조하였다. 에틸아세테이트를 감압 증류로 제거하였다. 증발 잔류물을 MeOH 50 ml에 용해시키고, 트리플루오로아세트산 (TFA) 2 ml을 첨가하였다. 용액을 환류 하에 6시간 동안 가열하였다. 용매를 감압 증류로 제거하였다. 증발 잔류물을 에틸아세테이트 50 ml에 용해시켰다. 용액을 정제수 150 ml (3부분으로 나눔)로 세정하였다. 유기층을 분자망에서 건조하였다. 에틸아세테이트를 감압 증류로 제거하였다.

m = 0.62 g (85% 이론)

[0084] ^1H NMR: (DMSO, ppm) δ : 1.17 (m, 2 H, γ -CH₂-헥산 산); 1.48 (m, 2 H, β -CH₂-헥산 산); 1.58 (m, 2 H, δ -CH₂-헥산 산); 2.19 (t, 2 H, -CH₂-CO-); 2.51 (m, 2 H, -CH₂-In); 2.90 (m, 2 H, -CH₂-NH₂); 3.81 (m, 2 H, -CH₂-NH-CO-); (m, 2 H, -CH₂-NH-CO-); 6.61 (d, 1 H, C6-arom); 6.95 (s, 1 H, C4-arom); 7.02 (s, 1 H, C2-arom); 7.13 (d, 1 H, C7-arom).

[0085] ^{13}C NMR (DMSO, ppm) δ : 24 (γ -C-헥산 산); 26 (δ -C-헥산 산); 33 (β -C-헥산 산); 35 (-C-CO-); 39 (-C-NH₂); 40 (C-Ph); 55 (-C-NH-CO-); 102 (C4 arom); 110 (C6 arom); 111 (C7 arom.); 111 (C3 arom.); 123 (C2 arom); 127 (C7 - C- NH- arom); 131 (C4-C-C3- arom); 150 (C5 arom); 171 (-CO-).

[0086] 실시예 1.7: 알데하이드 유도체 (HA-CHO)의 제조 - 일반적인 절차 (VII)

히알루로난 (10.00 g, $M_w = 2 \text{ MDa}$)을 Na₂HPO₄·12 H₂O의 2.5% (w/w) 용액 750 ml에 용해시켰다. 용액을 5°C로 냉각시켰다. 생성 용액에, NaBr 2.60 g 및 4-아세타미도-2,2,6,6-테트라메틸파페리딘-1-옥실 0.05 g을 첨가하였다. 용액을 완전히 균질화한 후, NaClO 용액 3 ml (이용가능한 Cl₂ 중 10-15%)을 반응 혼합물에 첨가하였다. 15분 동안 계속 교반하면서 반응을 진행하였다. 프로판-2-올 40% 용액 100 ml을 첨가하여 반응을 중단시켰다. 생성물을 한외 여과로 정제하고, 프로판-2-올에 의한 침전에 의해 분리하였다.

[0088] IR (KBr): 3417, 2886, 2152, 1659, 1620, 1550, 1412, 1378, 1323, 1236, 1204, 1154, 1078, 1038, 945, 893 cm⁻¹.

[0089] ^1H NMR (D₂O) δ : 2.01 (s, 3 H, CH₃-), 3.37 - 3.93 (m, 히알루로난체 (body)), 4.46 (s, 1H, 아노머), 4.54 (s, 1H 아노머., -O-CH(OH)-), 5.27 (저미날 글리콜 (geminal glycol) -CH-(OH)₂).

[0090] 실시예 1.8: 티라민 유도체 (VIII)의 합성

[0091] 알데하이드 HA 유도체 (VII) (5.00 g)를 탈염수 500 ml에 용해시켰다. 용액의 pH를 아세트산에 의해 pH 3으로 조정하였다. 그런 다음, 티라민을 40% 프로판-2-올 100 ml에서의 용액 형태로 반응 혼합물 (1.70 g)에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 1시간 동안 더 교반하였다. 그 후, 40% 프로판-2-올 50 ml에서의 피콜린-보란 복합체 (0.50 g)의 용액을 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 12시간 더 교반하였다. 저분자량 밸러스트 (ballast) 성분을 한외 여과에 의해 생성물로부터 제거하였다. 프로판-2-올에 의한 첨가에 의해 생성물을 수득하였다. 열기 건조기 (40°C, 3일)에서의 건조에 의해 습기 및 잔여 프로판-2-올을 침전물로부터 제거하였다.

[0092] IR (KBr):: 3400, 2893, 2148, 1660, 1620, 1549, 1412, 1378, 1323, 1236, 1204, 1154, 1078, 1038, 945, 893 cm⁻¹.

[0093] ^1H NMR (D_2O) δ : 2.01 (s, 3 H, CH_3-), 2.66 – 2.77 (m, 4 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$), 3.00 (s, 1H, $\text{H}-\text{CH}-\text{NH}-$), 3.37 – 3.93 (m, 히알루로난체), 4.46 (s, 1H, 아노머), 4.54 (s, 1H 아노머., $-0-\text{CH}(\text{OH})-$), 6.59 (d, 2H, arom.), 7.04 (d, 2H, arom.).

실시예 1.9: C₆ 스페이서 (IX)를 포함하는 티라민 HA 유도체의 제조

[0095] 알데하이드 HA 유도체 (VII) (5.00 g)를 탈염수 500 ml에 용해시켰다. 용액의 pH를 아세트산에 의해 pH 3으로 조정하였다. 그런 다음, 6-아미노-N-[2-(4-하이드록시페닐) 에틸] 헥산아미드 (중간산물 (I)) (0.625 g, 2.5 mmol)를 HA-CHO 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 이후, 피콜린-보란의 복합체 (0.270 g, 2.5 mmol)를 반응 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 12시간 더 교반하였다. 생성물을 한외 여과에 의해 정제하고 프로판-2-올에 의한 침전에 의해 농축물로부터 분리하였다. 열기 건조기 (40°C, 3일)에서의 건조에 의해 습기 및 잔여 프로판-2-올을 침전물로부터 제거하였다.

[0096] IR (KBr):: 3425, 2893, 2148, 1660, 1620, 1549, 1412, 1378, 1323, 1236, 1204, 1154, 1078, 1038, 945, 893 cm^{-1} .

[0097] ^1H NMR (D_2O) δ : 1.25 (t, 2 H, $\gamma-\text{CH}_2-$ 아미노헥산 산), 1.48 (m, 2 H, $\delta-\text{CH}_2-$ 아미노헥산 산) 1.51 (m, 2 H, $\beta-\text{CH}_2-$ 아미노헥산 산), 2.01 (s, 3 H, CH_3-), 2.65 (m, 2H, $\text{Ph}-\text{CH}_2-$), 2.73 (m, 2H, $\varepsilon-\text{CH}_2-$ 아미노헥산 산), 3.37 – 3.93 (m, 히알루로난체), 4.46 (s, 1H, 아노머), 4.54 (s, 1H 아노머., $-0-\text{CH}(\text{OH})-$), 6.59 (d, 2H, arom.), 7.01 (d, 2H, arom.).

실시예 1.10: C₄ 스페이서 및 5-하이드록시 트립타민 (X)을 포함하는 HA 유도체의 제조

[0099] 알데하이드 HA 유도체 (VII) (3.00 g) a $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (7.50 g)를 탈염수 300 ml에 용해시켰다. 그런 다음, 4-아미노-N-[2-(5-하이드록시-1H-인돌-3-일) 에틸] 부탄 아미드 (0.40 g, 1.5 mmol) – (중간산물 (IV))를 HA-CHO 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 그 후, 피콜린-보란 (0.16 g, 1.5 mmol)의 복합체를 반응 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 12시간 더 교반하였다. 생성물을 한외 여과로 정제하고 프로판-2-올에 의한 침전에 의해 농축물로부터 분리하였다. 열기 건조기 (40°C, 3일)에서의 건조에 의해 습기 및 잔여 프로판-2-올을 침전물로부터 제거하였다.

[0100] IR (KBr):: 3400, 2893, 2148, 1660, 1620, 1549, 1412, 1378, 1323, 1236, 1204, 1154, 1078, 1038, 945, 893 cm^{-1} .

[0101] ^1H NMR (D_2O) δ : 1.73 (m, 2 H, $\beta-\text{CH}_2-$ 아미노부탄 산), 2.01 (s, 3 H, CH_3), 2.60 (m, 2H, $\gamma-\text{CH}_2-$ 아미노부탄 산), 2.93 (m, 2H, $\text{Ind}-\text{CH}_2-$), 3.37 – 3.93 (m, 히알루로난체), 4.46 (s, 1H, 아노머), 4.54 (s, 1H 아노머., $-0-\text{CH}(\text{OH})-$), 6.85 (d, 1H, arom.), 7.09 (s, 1H, arom), 7.21 (s, 1H, arom), 7.40 (s, 1H, arom).

실시예 1.11: C₄ 스페이서 (XI)를 포함하는 티라민화된 (tyraminated) HA 유도체의 제조

[0103] 알데하이드 HA 유도체 (VII) (3.50 g)를 탈염수 350 ml에 용해시켰다. 용액의 pH를 아세트산에 의해 pH 3으로 조정하였다. 그런 다음, 4-아미노-N-[2-(4-하이드록시페닐) 에틸] 부탄 아미드 (0.40 g, 1.8 mmol) – (중간산물 (II))를 HA-CHO 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 그 후, 피콜린-보란의 복합체 (0.19 g, 1.8 mmol)를 반응 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 12시간 더 교반하였다. 생성물을 한외 여과에 의해 정제하고 프로판-2-올에 의한 침전에 의해 농축물로부터 분리하였다. 열기 건조기 (40°C, 3 일)에서의 건조에 의해 습기 및 잔여 프로판-2-올을 침전물로부터 제거하였다.

[0104] IR (KBr):: 3425, 2893, 2148, 1660, 1620, 1549, 1412, 1378, 1323, 1236, 1204, 1154, 1078, 1038, 945, 893 cm^{-1} .

[0105] ^1H NMR (D_2O) δ : 1.25 (t, 2 H, $\gamma-\text{CH}_2-$ 아미노헥산 산), 1.48 (m, 2 H, $\delta-\text{CH}_2-$ 아미노헥산 산) 1.51 (m, 2 H, $\beta-\text{CH}_2-$ 아미노헥산 산), 2.01 (s, 3 H, CH_3-), 2.65 (m, 2H, $\text{Ph}-\text{CH}_2-$), 2.73 (m, 2H, $\varepsilon-\text{CH}_2-$ 아미노헥산 산), 3.37 – 3.93 (m, 히알루로난체), 4.46 (s, 1H, 아노머), 4.54 (s, 1H 아노머., $-0-\text{CH}(\text{OH})-$), 6.59 (d,

2H, arom.), 7.01 (d, 2H, arom).

[0106] 실시예 1.12: C₆ 스페이서 (XII)를 포함하는 티라민화된 HA 유도체의 제조

알데하이드 HA 유도체 (VII) (2.90 g)를 탈염수 300 mL에 용해시켰다. 용액의 pH를 아세트산에 의해 pH 3으로 조정하였다. 그런 다음, 8-아미노-N-[2-(4-하이드록시페닐) 에틸] 옥탄 아미드 (0.40 g, 1.4 mmol) - (중간산물 (III))를 HA-CHO 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 그 후, 피콜린-보란의 복합체 (0.15 g, 1.4 mmol)를 반응 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 12시간 더 교반하였다. 생성물을 한와 여과에 의해 정제하고 프로판-2-올에 의한 침전에 의해 농축물로부터 분리하였다. 열기 건조기 (40°C, 3일)에서의 건조에 의해 습기 및 잔여 프로판-2-올을 침전물로부터 제거하였다.

[0108] IR (KBr):: 3425, 2893, 2148, 1660, 1620, 1549, 1412, 1378, 1323, 1236, 1204, 1154, 1078, 1038, 945, 893 cm⁻¹.

[0109] ¹H NMR (D₂O) δ: 1.16-1.34 (m, 6 H, C4 az C6 -CH₂-옥탄 산); 1.56 - 1.44 (m, 4 H, C3 a C7 옥탄 산); 2.01 (s, 3 H, CH₃-), 2.58 (m, 2 H, -CH₂-Ar); 2.78 (m, 2 H, -CH₂-NH-), 3.37 - 3.93 (m, 히알루로난체), 4.46 (s, 1H, 아노머), 4.54 (s, 1H 아노머., -O-CH(OH)-), 6.59 (d, 2H, arom.), 7.01 (d, 2H, arom).

[0110] 실시예 1.13 : C₆ 스페이서 및 5-하이드록시 트립타민 (XIII)을 포함하는 HA 유도체의 제조

알데하이드 HA 유도체 (VII) (5.00 g) 및 Na₂HPO₄ . 12 H₂O (12.5 g)를 탈염수 500 mL에 용해시켰다. 그런 다음, 6-아미노-N-[2-(5-하이드록시-1H-인돌-3-일) 에틸] 헥산 아미드 (0.73 g, 2.5 mmol) - (중간산물 (V))를 HA-CHO 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 그 후, 피콜린-보란의 복합체 (0.27 g, 2.5 mmol)를 반응 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 12시간 더 교반하였다. 생성물을 한와 여과에 의해 정제하고 프로판-2-올에 의한 침전에 의해 농축물로부터 분리하였다. 열기 건조기 (40°C, 3일)에서의 건조에 의해 습기 및 잔여 프로판-2-올을 침전물로부터 제거하였다.

[0112] IR (KBr):: 3400, 2893, 2148, 1660, 1620, 1549, 1412, 1378, 1323, 1236, 1204, 1154, 1078, 1038, 945, 893 cm⁻¹.

[0113] ¹H NMR (D₂O) δ: 1.25 (t, 2 H, γ-CH₂- 아미노헥산 산), 1.48 (m, 2 H, δ-CH₂- 아미노헥산 산) 1.51 (m, 2 H, β-CH₂- 아미노헥산 산), 2.01 (s, 3 H, CH₃-), 2.65 (m, 2H, Ph-CH₂-), 2.73 (m, 2H, ε-CH₂- 아미노헥산 산), 3.37 - 3.93 (m, 히알루로난체), 4.46 (s, 1H, 아노머), 4.54 (s, 1H 아노머., -O-CH(OH)-), 6.85 (d, 1H, arom.), 7.09 (s, 1H, arom), 7.21 (s, 1H, arom), 7.40 (s, 1H, arom).

[0114] 실시예 1.14 : C₆ 스페이서 및 5-하이드록시 트립토판 (XIV)을 포함하는 HA 유도체의 제조

알데하이드 HA 유도체 (VII) (3.50 g) 및 Na₂HPO₄ . 12 H₂O (8.75 g)을 탈염수 350 mL에 용해시켰다. 그런 다음, 2-[(6-아미노헥사노일)아미노]-3-(5-하이드록시-1H--인돌-3-일)프로판 산 (0.60 g, 1.8 mmol) - (중간산물 (VI))를 HA-CHO 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 혼합하였다. 그 후, 피콜린-보란의 복합체 (0.19 g, 1.8 mmol)를 반응 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 12시간 더 교반하였다. 생성물을 한와 여과로 정제하고 프로판-2-올에 의한 침전에 의해 농축물로부터 분리하였다. 열기 건조기 (40°C, 3일)에서의 건조에 의해 습기 및 잔여 프로판-2-올을 침전물로부터 제거하였다.

[0116] IR (KBr):: 3400, 2893, 2148, 1660, 1620, 1549, 1412, 1378, 1323, 1236, 1204, 1154, 1078, 1038, 945, 893 cm⁻¹.

[0117] ¹H NMR (D₂O) δ: 1.25 (t, 2 H, γ-CH₂- 아미노헥산 산), 1.48 (m, 2 H, δ-CH₂- 아미노헥산 산) 1.51 (m, 2 H, β-CH₂- 아미노헥산 산), 2.01 (s, 3 H, CH₃-), 2.65 (m, 2H, Ph-CH₂-), 2.73 (m, 2H, ε-CH₂- 아미노헥산 산), 3.37 - 3.93 (m, 히알루로난체), 4.46 (s, 1H, 아노머), 4.54 (s, 1H 아노머., -O-CH(OH)-), 6.85 (d, 1H, arom.), 7.09 (s, 1H, arom), 7.21 (s, 1H, arom), 7.40 (s, 1H, arom).

[0118] 실시예 1.15: 스페이서 및 5-하이드록시트립토판을 포함하는 HA 유도체를 기재로 하고 티라민 유도체를 기재로

하는, 하이드로겔의 제조를 위한 일반적인 절차

[0119] 선정된 HA 유도체를 0.1 M PBS pH 7.4에 용해시킨다. 유도체는 원하는 농도에 따라 선택된다. 유도체의 용액에, 바람직한 양의 효소를 첨가한다. 완전히 균질화한 후, 희석된 과산화수소 용액을 첨가한다. 혼합물을 다시 균질화하고, 투명한 젤을 형성한다.

실시예 1.16: 티라민 유도체를 기재로 하는 하이드로겔의 제조

[0121] 실시예 1.8 (VIII)에 따라 제조된 HA 유도체 HA (폴리머 용액의 바람직한 농도에 따라) 40 mg 내지 60 mg을 pH 7.4의 0.1 M PBS 2 ml에 용해시킨다. 그런 다음, 효소 HRP의 용액 20 μ l (0.1 M PBS o pH 7.4 1 ml에 용해된 효소 HRP 24 mg)를 유도체 용액에 첨가하였다. 완전히 균질화한 후, H_2O_2 용액 100 μ l (pH 7.4의 0.1 M PBS 10 ml에 용해된 30% H_2O_2 33 μ l)를 첨가하였다. 혼합물을 균질화하고, 투명한 젤을 형성한다.

실시예 1.17: 스페이서를 포함하는 티라민 HA 유도체를 기재로 하는 하이드로겔의 제조

[0123] 실시예 1.9 (IX), 1.11 (XI) 또는 1.12 (XII)에 따라 제조된 HA 유도체 40 - 60 mg (폴리머 용액의 바람직한 농도에 따라)을 pH 7.4의 0.1 M PBS 2 ml에 용해시킨다. 유도체의 용액에, 효소 HRP의 용액 10 μ l (pH 7.4의 0.1 M PBS 1 ml에 용해된 효소 HRP 2.4 mg)를 첨가하였다. 완전히 균질화한 후, H_2O_2 용액 100 μ l (pH 7.4의 0.1 M PBS 10 ml에 용해된 30% H_2O_2 33 μ l)를 첨가하였다. 혼합물을 균질화하고, 투명한 젤을 형성한다.

2. 하이드로겔 특성의 차이

실시예 2.1 : 사용되는 HA 유도체의 유형 및 첨가되는 효소의 양에 따라 하이드로겔의 기계적 특성의 차이

[0126] 유도체 VIII (티라민, 스페이서가 병합되지 않음), IX, XI 및 XII (스페이서가 병합됨) 유래의 하이드로겔의 샘플을 사용되는 유도체의 유형에 따라 실시예 1.16 또는 1.17에 따라 제조하였다. 샘플을 완전히 균질화한 후, 실온에서 120분 동안 방치하였다. 비교 하이드로겔의 제조에 사용되는 유도체의 유사체는 항상 유사한 분자량 및 치환율을 가졌다. 모든 샘플은 치수가 동일하였으며, 일정한 실험실 조건 (온도, 압력, 습도)에서 시험하였다.

[0127] 압축 시 탄성 영률 (Young modulus of elasticity), 점착성 (tenacity), 압축 강도 및 상응하는 샘플 변형을 각 샘플에서 측정하였으며; 샘플의 점탄성적 특성에 대해, 전단 탄성 계수 및 손실각을 측정하였다.

[0128] 수득된 데이터는, 리간드와 기본 히알루로난 사슬 사이에 신축성 스페이서를 투입함으로써, 상기 유도체를 기재로 하는 하이드로겔의 탄성, 점착성 및 강도를, 임의의 스페이서를 포함하지 않는 유사한 히알루로난 유도체를 기재로 하는 하이드로겔과 비교해 높인다는 것을 명백히 의미한다.

[0129] 표 1은 이의 제조에 사용되는 유도체의 유형에 따라 하이드로겔의 기계적 특성을 비교한 것을 보여준다. 농도 (%)는, 하이드로겔이 제조되는 용액에서의 폴리머의 농도를 의미하며, 치환율 (%)은 치환율을 반응성 / 가교 리간드, 즉, 폴리머의 구조 단위 100 당 결합된 리간드의 수로 표시하며, HA의 경우, 폴리머의 구조 단위는 이당류 (또는 다이머) 글리코사민 + 글루쿠론산이다.

표 1

사용되는 유도체의 유형	실시예 VIII에 따른 HA 유도체	실시예 IX에 따른 HA 유도체	실시예 VIII에 따른 HA 유도체	실시예 XI에 따른 HA 유도체	실시예 XII에 따른 HA 유도체
Mw (kDa)/농도 (%)	320/3	250/3	280/2	280/2	285/2
치환율 (%)	3	3	2	1	1
압축 시 탄성 영률 (kPa)	6.59	5.68	8.99	3.87	8.19
압축 강도 (kPa)	73	310	108	167	218
압축 강도에서의 변형 (%)	67	68	58	65	65
점착성 (J/m^3)	9150	23460	8050	9670	13650
손실각 ($^\circ$)	0.12	0.18	0.19	0.96	0.43
전단 탄성 계수 (Pa)	1861	1534	876	504	1105

도면

도면1

