

(11) 공개번호 10-2020-0020423
(43) 공개일자 2020년02월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 9/06 (2006.01) A61K 47/32 (2017.01) A61K 47/34 (2017.01)	(71) 출원인 울산과학기술원 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(52) CPC특허분류 A61K 9/06 (2013.01) A61K 47/32 (2013.01)	(72) 발명자 차채녕 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(21) 출원번호 10-2018-0096125	김미래 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(22) 출원일자 2018년08월17일 심사청구일자 2018년08월17일	(74) 대리인 리앤목특허법인

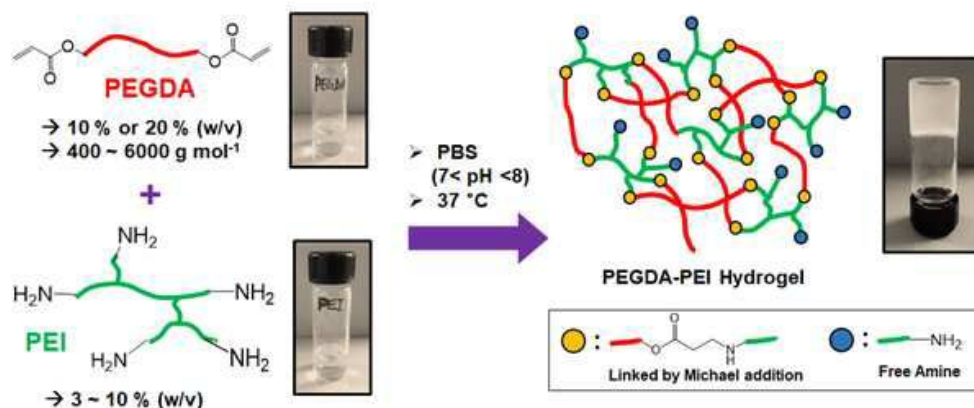
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 이중 모드 약물 방출 하이드로겔 및 그의 제조방법

(57) 요약

이중 모드 약물 방출 하이드로겔 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 상기 하이드로겔의 조정 가능한 기계적 특성 및 생분해성 특성으로 인해 약물 방출이 팽윤-제어 및 분해-제어된 메카니즘으로 순차적으로 제어되는 이중-모드 약물 방출 동역학(kinetics)을 나타내는바, 약물 전달 기술 분야에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 47/34 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711064929
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 바이오.의료기술개발
연구과제명 조직 재건용 바이오잉크 기술 개발
기 여 율 1/2
주관기관 울산과학기술원
연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711056855
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(미래부)
연구과제명 심장 조직 공학을 위한 하이브리드 나노섬유 기반 다기능성 나노복합체 하이드로젤 개발
기 여 율 1/2
주관기관 울산과학기술원
연구기간 2017.07.01 ~ 2018.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

5 % 내지 30 % (w/v) 농도의 폴리 (에틸렌 글리콜) 디아크릴레이트 (poly(ethylene glycol) diacrylate: PEGDA); 및 2.8 % 내지 10 % (w/v) 농도의 폴리에틸렌이민 (polyethyleneimine: PEI)이 서로 가교 (Crosslinking)되어 있는 하이드로겔 포함하는 약물 전달용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 PEGDA의 농도는 8 % 내지 11 % (w/v)인 것인 약물전달용 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 PEI의 농도는 2.8 % 내지 3.2 % (w/v)인 것인 약물전달용 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 PEGDA의 분자량은 600 내지 6000 g/mol인 것인 약물 전달용 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 약물은 이중 모드 (dual mode)로 서방출되는 것인 약물 전달용 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 이중모드는 팽윤-제어 및 분해-제어 메카니즘으로 순차적으로 제어되는 것인 약물 전달용 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 PEGDA의 분자량에 의해 약물 방출 거동이 조절되는 것인 약물 전달용 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 하이드로겔은 0.4 내지 600 KPa 의 탄성계수를 갖는 것인 약물 전달용 조성물.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 하이드로겔은 2 내지 80 KPa 의 저장계수를 갖는 것인 약물 전달용 조성물.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 하이드로겔은 약물을 더 포함하는 것인 약물 전달용 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 약물은 핵산, 단백질, 펩티드, 화합물, 및 세포로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인 약물 전달용 조성물.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 상기 가교는 개시제의 부존재하에서 가교된 것인 약물 전달용 조성물.

청구항 13

청구항 1에 있어서, 상기 가교는 마이클 첨가 반응에 의하여 가교된 것인 약물 전달용 조성물.

청구항 14

청구항 1에 있어서, 상기 하이드로겔은 인 시튜(in situ) 형성되는 것인 약물 전달용 조성물.

청구항 15

- (a) 5 % 내지 30 % (w/v) 농도의 PEGDA 용액, 2.8 % 내지 10 % (w/v) 농도의 PEI 용액, 및 용제를 혼합하여 하이드로겔 전구체 용액을 제조하는 단계; 및
- (b) 상기 제조된 하이드로겔 전구체 용액에 약물을 용해시키는 단계를 포함하는, 약물 전달용 하이드로겔의 제조방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 PEGDA 용액의 농도는 8 % 내지 11 % (w/v)인 것인 제조방법.

청구항 17

청구항 15에 있어서, 상기 PEI 용액의 농도는 2.8 % 내지 3.2 % (w/v)인 것인 제조방법.

청구항 18

청구항 15에 있어서, 상기 PEGDA의 분자량은 600 내지 6000 g/mol인 것인 제조방법.

청구항 19

청구항 15에 있어서, 상기 (b) 단계 이후, pH 7 내지 8, 및 35℃ 내지 38℃의 조건에서 하이드로겔을 형성하는 단계를 더 포함하는 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 이중 모드 약물 방출 하이드로겔 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 하이드로겔은 높은 수분 함량, 다공성 구조, 세포외 기질과의 유사성으로 인하여 높은 생체적합성을 갖는다. 이러한 특성들로 인하여 약물 전달 시스템이나 조직공학 등과 같은 바이오메디컬 분야에서 광범위하게 연구되고 있다.

[0003] 약물전달체로서 하이드로겔은 주변 조직에 특정 약물 농도를 장시간 동안 지속적으로 유지시켜 줌으로써 최소한의 투여로 치료효과를 극대화시킬 수 있다. 따라서, 원하는 기간 동안 약물을 서서히 방출하기 위해서, 하이드로겔의 강도 및 다공성의 정도, 분해되는 시간 등을 조절하게 된다.

[0004] 약물 전달에 사용되는 하이드로겔은 일반적으로 체외에서 형성되며 체내로 주입하기 전에 약물과 혼합하게 된다. 그러나 겔의 특성상 주사를 통한 주입이 어렵고, 겔을 외부에서 형성하여 체내로 이식하여야 하는 문제가 있다. 그리고 이식된 하이드로겔의 완전한 생분해를 유도하는 것 또한 어렵다. 이러한 문제점을 해결하기 위해, 체외에서는 용액 상태로 있어서 주입이 용이하고, 체내에 주입 후에는 겔이 형성되어 약물을 서방출하도록 하는 제형 개발에 많은 연구가 진행 되고 있으나 (한국 등록특허 10-1815780), 아직은 미비한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 일 양상은 5 % 내지 30 % (w/v) 농도의 폴리 (에틸렌 글리콜) 디아크릴레이트 (poly(ethylene glycol) diacrylate: PEGDA); 및 2.8 % 내지 10 % (w/v) 농도의 폴리에틸렌이민 (polyethyleneimine: PEI)이 서로 가교 (Crosslinking)되어 있는 하이드로겔 포함하는 약물 전달용 조성물을 제공하는 것이다.

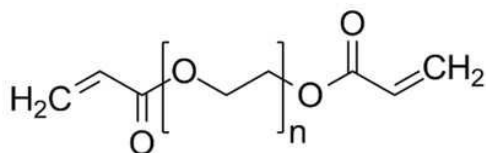
[0006] 또 다른 양상은 (a) 5 % 내지 30 % (w/v) 농도의 PEGDA 용액, 2.8 % 내지 10 % (w/v) 농도의 PEI 용액, 및 용제를 혼합하여 하이드로겔 전구체 용액을 제조하는 단계; 및 (b) 상기 제조된 하이드로겔 전구체 용액에 약물을 용해시키는 단계를 포함하는, 약물 전달용 하이드로겔의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 일 양상은 폴리 (에틸렌 글리콜) 디아크릴레이트 (poly(ethylene glycol) diacrylate: PEGDA); 및 폴리에틸렌이민 (polyethyleneimine: PEI)이 서로 가교(Crosslinking)되어 있는 하이드로겔 포함하는 약물 전달용 조성물을 제공한다.

[0008] 본 명세서에서 사용되는 용어, "폴리 (에틸렌 글리콜) 디아크릴레이트 (poly(ethylene glycol) diacrylate: PEGDA)"는 폴리에틸렌 글리콜 (poly(ethylene glycol): PEG)의 히드록실 말단기와 아크릴로일 클로라이드 (acryloyl chloride) 사이의 친핵성 치환 반응에 의해 생성될 수 있으며, 하기 화학식 1과 같은 구조를 갖는다.

[0009] [화학식 1]

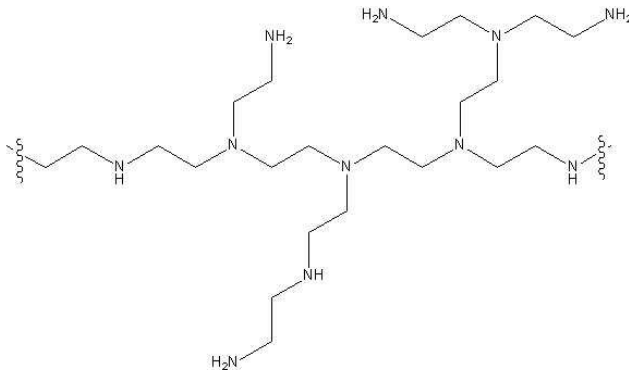


[0010]

[0011] 상기 화학식 1에서 n은 5 내지 400의 정수일 수 있다. 예를 들어, 5 내지 300, 5 내지 200, 5 내지 180, 5 내지 160, 5 내지 140, 5 내지 120, 5 내지 100, 5 내지 80, 6 내지 400, 6 내지 300, 6 내지 200, 6 내지 180, 6 내지 160, 6 내지 140, 6 내지 120, 6 내지 100, 6 내지 80, 7 내지 400, 7 내지 300, 7 내지 200, 7 내지 180, 7 내지 160, 7 내지 140, 7 내지 120, 7 내지 100, 7 내지 80, 8 내지 400, 8 내지 300, 8 내지 200, 8 내지 180, 8 내지 160, 8 내지 140, 8 내지 120, 8 내지 100, 8 내지 80, 9 내지 400, 9 내지 300, 9 내지 200, 9 내지 180, 9 내지 160, 9 내지 140, 9 내지 120, 9 내지 100, 9 내지 80, 10 내지 400, 10 내지 300, 10 내지 200, 10 내지 180, 10 내지 160, 10 내지 140, 10 내지 120, 10 내지 100, 10 내지 80 일 수 있다.

[0012] 본 명세서에서 사용되는 용어, "폴리에틸렌이민 (polyethyleneimine: PEI)"은 하기의 화학식 2와 같이 아민을 작용기로 가지며, 1 차, 2 차 및 3 차 아민기를 함유하는 분지형 폴리에틸렌이민일 수 있다.

[0013] [화학식 2]



[0014]

[0015] 본 명세서에서 사용되는 용어, "가교(crosslinking)"는 물리적 가교방식과 화학적 가교방식을 지칭할 수 있다. 같은 고분자를 사용하더라도 가교방식에 따라 전혀 다른 특성의 하이드로겔이 얻어질 수 있다. 물리적 가교방식은 이온결합, 수소결합, 반데르 발스 힘, 소수성 상호작용, 고분자의 결정에 의한 가역적 가교방식을 말한다. 화학적 가교방식은 공유결합에 의한 비가역적 가교방식을 말하고, 물리적 가교방식보다 안정적인 가교 구조를 형성한다. 일 실시예에 따르면, 상기 가교는 화학적 결합(공유결합)일 수 있다.

[0016] 일 구체예에 있어서, 상기 가교는 PEGDA의 아크릴기와 PEI의 아민기 사이에서 탄소-질소 간의 공유결합을 형성함으로써 일어날 수 있으며, 이를 통해 하이드로겔을 형성할 수 있다.

[0017] 본 명세서에서 사용되는 용어, "하이드로겔"은 수화겔 또는 수화젤이라고도 하고, 3 차원적 가교를 형성하고 있는 친수성 고분자 망상구조로서, 높은 수분함량을 가져 천연 조직과 거의 유사한 탄성을 나타낸다. 또한, 수상 환경에서 용해되지 않고, 다양한 고분자로부터 만들어질 수 있기 때문에 여러 가지 화학적 조성과 물성을 갖는다. 또한 가공이 용이하여, 응용에 따라 다양한 형태로 변형할 수 있다. 하이드로겔은 높은 함유율(water content)과 세포 외 기질(extracellular matrix)과의 물리화학적 유사성으로 인하여 높은 생체적합성을 갖는다.

[0018] 본 명세서에서 사용되는 용어, "약물 전달(drug delivery)"은 원하는 약리효과를 발생시킬 목적으로 약리적 활성성분의 약제학적 유효량을 생체 내로 전달하는 것을 의미한다.

[0019] 일 구체예에 있어서, 상기 PEGDA의 농도는 5 % 내지 30 % (w/v)일 수 있으며, 예를 들어, 5 % 내지 25 %, 10 % 내지 20 %, 또는 8 % 내지 11 %일 수 있다.

[0020] 일 구체예에 있어서, 상기 PEI의 농도는 2.8 % 내지 10 % (w/v)일 수 있다. 예를 들어, 2.8 % 내지 3.2 %, 2.8 % 내지 6 %, 또는 4 % 내지 9 % 일 수 있다. 여기에서 상기 PEI의 농도가 2.8 % 미만인 경우, 하이드로겔 결합에 관여하는 아민기가 부족하게 되며, 상기 PEI의 농도가 10% 초과인 경우, 용액 내 점도가 증가하게 되어 겔 형성 시간이 지연될 수 있다.

[0021] 일 구체예에 있어서, 상기 PEGDA는 400 내지 6000 g/mol 분자량을 가질 수 있으며, 예를 들어, 600 내지 2000(2K), 600 내지 3000(3K), 600 내지 4000(4K), 600 내지 6000(6K), 700 내지 2000(2K), 700 내지 3000(3K), 700 내지 4000(4K), 800 내지 2000(2K), 800 내지 3000(3K), 또는 800 내지 4000(4K) g/mol 일 수 있다. 여기에서, 상기 PEGDA 분자량이 400 g/mol 이하인 경우, 친수성 ethylene oxide 사슬이 고 분자량인 경우보다 짧아 상대적으로 전체 분자의 소수성 수준이 증가하고, 이에 따라, 친수성을 가지는 폴리에틸렌이민과의 가교결합이 약화될 수 있다. 또한, 상기 PEGDA의 분자량이 3000(3K) 이상인 경우, 폴리에틸렌이민의 아민기와 결합 가능한 아크릴기의 수가 상대적으로 부족하게 되고, 이에 따라, 겔 형성이 현격하게 저해될 수 있다.

[0022] 본 명세서에서 사용되는 용어, "이중 모드(dual mode) 서방출"은 생체 내에서 약물 노출기간을 증가시키기 위한 방법으로, 상기 "이중모드"는 순차적으로 발생하는 두 가지 분리된 방출모드로 구성될 수 있다. 상기 "서방출"은 1회 투여로 약물의 체내 유효 농도를 장시간, 예컨대 48시간 이상 유지하는 것을 의미한다. 상기 "방출"은 작용 부위에서 온도, PH, 광, 초음파, 글루코오스 등에 감응하여 초기 약물 방출이 유도될 수 있다. 따라서, 초

기의 팽윤-제어 메커니즘과 이후의 분해-제어 메커니즘에 의해 약물이 작용부위에서 특정 자극에 감응하여 이중 모드로 서서히 방출될 수 있다.

[0023] 일 실시예에 있어서, 상기 팽윤-제어 메커니즘은 초기의 약물 방출이 하이드로겔의 팽윤 작용에 의해 좌우됨을 나타내는 것이다. 팽윤은 하이드로겔의 망상구조와 주변 용액과의 삼투압으로 인한 용액 침투 및 이로 인한 사슬의 이완을 통해 하이드로겔의 수분 함량이 늘어나는 과정을 의미하며, 팽윤-제어 메커니즘이란 이 과정에서 하이드로겔에 포함된 약물이 확산을 통해 외부로 방출되는 것을 의미할 수 있다. 팽윤-제어 메커니즘에서 약물 방출 속도는 가교 결합 밀도 제어를 통한 확산 속도 조절을 통해 이루어질 수 있다.

[0024] 일 실시예에 있어서, 상기 분해-제어는 메커니즘은 후기의 약물 방출이 분해 작용에 의해 좌우됨을 나타내는 것이다. 이는 생분해성을 갖는 하이드로겔이 분해되면서 약물 방출 속도가 급격하게 증가되는 것을 의미할 수 있다. 생분해 속도가 확산 속도와 비슷하거나 더 느릴 경우, 약물 방출은 기존 팽윤-제어 메커니즘을 유지한 채 속도가 더 빨라지는 방식으로 이루어지며, 생분해 속도가 빠를 경우, 팽윤-제어 메커니즘과 큰 상관 관계 없이 급격하게 촉진될 수 있다.

[0025] 일 실시예에 따르면, 하이드로겔 내 약물방출 거동(drug release behavior)은 PEGDA의 분자량의 증가함에 따라 가교 결합 밀도가 낮아지고, 이에 따라 약물 방출 속도가 증가될 수 있었다. 따라서, 상기 PEGDA의 분자량을 조절함으로써, 약물 방출 거동을 세부적으로 조절할 수 있다.

[0026] 본 명세서에서 사용되는 용어, "탄성계수 (elastic moduli (E))"는 하이드로겔의 인장 혹은 압축을 통해 얻은 응력(stress)/변형도(strain)의 비율을 나타내며, 이는 PEGDA-PEI 하이드로겔의 기계적 강도(stiffness)를 의미하는 것이다. 또한, 이는 가교 반응의 완결을 위한 충분한 시간을 통해 가교된 하이드로겔에서의 가교 결합 밀도를 나타내며, 하이드로겔의 생분해가 일어나기 전 측정되므로 하이드로겔의 초기 강도를 의미할 수 있다. 하이드로겔은 구조 내에 많은 양의 물을 함유하고 있어 낮은 기계적 강도를 갖는바, 하이드로겔을 조직공학, 재생의학, 약물 전달, 면역 치료 등 다양한 분야에 사용하기 위해서는 기계적 특성을 향상시킬 필요가 있다. 특히, 하이드로겔이 약물 전달체로 사용되는 경우, 물이나 체액이 공급된 환경에서 스웰링으로 인해 그 구조를 오랜 시간 유지하는 것이 어려울 수 있다. 따라서 오랜 기간 약물전달이 필요한 경우나 높은 기계적 강도가 요구되는 분야에 적용하기 위하여 일 구체예에 따른 PEGDA의 농도 및 분자량, PEI의 농도를 조절하여 기계적 특성을 향상시킬 수 있다. 상기 하이드로겔의 탄성계수는 0.4 내지 600 KPa 일 수 있다. 예를 들어, 0.4 내지 500, 0.4 내지 450, 0.4 내지 400, 0.4 내지 350, 0.4 내지 300, 0.4 내지 250, 0.6 내지 600, 0.6 내지 500, 0.6 내지 450, 0.6 내지 400, 0.6 내지 350, 0.6 내지 300, 0.6 내지 250, 0.8 내지 600, 0.8 내지 500, 0.8 내지 450, 0.8 내지 400, 0.8 내지 350, 0.8 내지 300, 0.8 내지 250, 1 내지 600, 1 내지 500, 1 내지 450, 1 내지 400, 1 내지 350, 1 내지 300, 1 내지 250, 10 내지 600, 10 내지 500, 10 내지 450, 10 내지 400, 10 내지 350, 10 내지 300, 10 내지 250, 50 내지 600, 50 내지 500, 50 내지 450, 50 내지 400, 50 내지 350, 50 내지 300, 50 내지 250, 100 내지 600, 100 내지 500, 100 내지 450, 100 내지 400, 100 내지 350, 100 내지 300, 100 내지 250 KPa일 수 있다.

[0027] 본 명세서에서 사용되는 용어, "저장계수 (storage moduli (G'))"와 손실계수 (loss moduli (G''))는 유변학적(rheological) 반복 전단 측정을 통해 측정되며 하이드로겔의 탄성 성분과 점성 성분을 각각 나타내는 것으로, 이를 통해 겔 형성 과정에서 가교 반응 속도 (G' 와 G'' 가 만나는 시점) 및 가교 비율(전체 고분자 용액에서 겔로 가교된 부분의 비율 (G' 대 G''))을 측정할 수 있다. 또한, 저장계수가 클수록 반복 전단 조건 하에서 탄력적이고 부러지기 어려움을 나타낸다. 상기 하이드로겔의 저장계수는 2 내지 80 KPa 일 수 있다. 예를 들어, 2 내지 75, 2 내지 70, 2 내지 65, 2 내지 60, 2 내지 55, 2 내지 50, 2 내지 40, 2 내지 30, 4 내지 80, 4 내지 75, 4 내지 70, 4 내지 65, 4 내지 60, 4 내지 55, 4 내지 50, 4 내지 40, 4 내지 30, 6 내지 80, 6 내지 75, 6 내지 70, 6 내지 65, 6 내지 60, 6 내지 55, 6 내지 50, 6 내지 40, 6 내지 30, 10 내지 80, 10 내지 75, 10 내지 70, 10 내지 65, 10 내지 60, 10 내지 55, 10 내지 50, 10 내지 40 KPa 일 수 있다.

[0028] 본 명세서에서 사용되는 용어, "약물"은 핵산, 단백질, 펩티드, 화합물, 및 세포로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 약학분야에서의 약물전달목적 또는 조직공학분야에서의 인공조직 이식을 위한 조직재생 목적에 사용되는 것일 수 있다. 또한 친수성 약물에 한정되지 않고 소수성 내부 공동(cavity)를 갖는 분자구조를 도입하여 소수성 약물을 탑재할 수 있다.

[0029] 일 구체예에 있어서, 상기 단백질은 인슐린, 성장인자, 항체일 수 있다. 상기 화합물은 항암제, 항생제, 소염제, 진통제, 상피재생 촉진제, 마취제, 지혈제, 항균제, 항세균제, 항바이러스제, 항진균제, 항염증제, 항산화제, 방부제, 항히스타민제, 진양제, 해열제, 면역자극제, 피부과용 제제일 수 있다. 상기 세포는 줄기세포

일 수 있다.

- [0030] 본 명세서에서 사용되는 용어, "개시제"는 광 및/또는 열, 가교제 또는 촉매를 의미할 수 있다. 일반적으로 하이드로겔을 형성하기 위한 가교 결합 반응은 개시제의 사용을 포함한다. 예를 들어, vinyl 기반의 작용기를 이용한 라디칼 중합은 persulfates 및 phenones와 같은 라디칼 개시제를 필요로 한다. 그러나 이들 시약은 종종 농도에 따라 세포 독성을 나타내므로 투여량을 조심스럽게 선택해야 한다. 일 실시예에 따르면, PEGDA-PEI 하이드로겔은 독성을 갖는 별도의 가교제나 촉매의 사용이 없이 마이클 첨가반응에 의해 가교결합을 형성할 수 있기 때문에 인체에 무해하고, 따라서 약물 전달체로서의 활용도가 높다고 할 수 있다.
- [0031] 본 명세서에서 사용되는 용어, "인 시츄 (in situ) 형성 하이드로겔"은 통상적으로 생체 주입형 하이드로겔을 의미할 수 있다. 주입형 하이드로겔은 기존 하이드로겔의 특징을 가지면서 체외에서는 보통의 유체와 같이 유동성을 가지고 주입 후에는 화학적 또는 물리적 자극에 의해 겔화되어 체내 주입형 하이드로겔로 이용된다. 일 실시예에 따르면, PEGDA-PEI 하이드로겔은 마이클 첨가반응에 의해 가교결합을 형성하여 별도의 가교제나 촉매 없이 온화한 조건에서 형성 가능하기 때문에 인 시츄 (in situ) 형성 하이드로겔로 적합할 수 있다.
- [0033] 다른 양상은 (a) PEGDA 용액, PEI 용액, 및 용제를 혼합하여 하이드로겔 전구체 용액을 제조하는 단계; 및 (b) 상기 제조된 하이드로겔 전구체 용액에 약물을 용해시키는 단계를 포함하는, 약물 전달용 하이드로겔의 제조방법을 제공한다.
- [0034] 상기 방법에 있어서, PEGDA, PEI, PEGDA용액의 농도 및 분자량, 및 PEI 용액의 농도, 약물, 약물전달, 하이드로겔 등에 대해서는 상기한 바와 같다.
- [0035] 본 명세서에서 사용되는 용어, "용제 (solvent)"는 하이드로겔 전구체 용액을 제조하기 위하여, 고분자를 녹이는 데 사용되는 물질을 지칭하고, 당업계에서 통상적으로 사용되는 다양한 용제가 사용될 수 있으며, 예를 들어, 인산완충생리식염수 (Phosphate buffered saline: PBS)와 같은 평형염류용액일 수 있다.
- [0036] 본 명세서에서 사용되는 용어, "하이드로겔 전구체 용액"은 인큐베이션 되어 겔을 형성하기 이전 또는 체내에 주입되기 전의 액체상태를 의미할 수 있다.
- [0037] 일 구체예에 있어서, 상기 (b) 단계 이후, pH 7 내지 8, 및 35℃ 내지 38℃의 조건에서 하이드로겔을 형성하는 단계를 더 포함할 수 있으며, 예를 들어, 상기 조건은 생리학적 조건, 또는 생체 내 (in vivo)일 수 있다.

발명의 효과

- [0038] 일 양상에 따른 하이드로겔은 상기 하이드로겔의 조정 가능한 기계적 특성 및 생분해성 특성으로 인해 약물 방출이 팽윤-제어 및 분해-제어된 메카니즘으로 순차적으로 제어되는 이중-모드 약물 방출 동역학(kinetics)을 나타내는바, 약물 전달 기술 분야에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0039] 도 1은 PEGDA의 대표적인 ¹H-NMR 스펙트럼이다. 표는 아크릴기 피크와 (a, b, c) 히드록시에틸 피크 (d) 간 피크 적분비이다.
- 도 2는 생리적 조건하에서 제조된 인 시츄 (in situ) 가교 가능한 PEGDA-PEI 하이드로겔을 도식화한 것이다.
- 도 3은 상온 또는 37 °C에서 측정된 다양한 농도에서의 PEI의 점도를 확인한 결과이다.
- 도 4는 (a) A : 10 % PEGDA-5 % PEI, B : 20 % PEGDA-5 % PEI, C : 10 % PEGDA-3 % PEI, D : 20 % PEGDA-3 % PEI인 PEGDA-PEI 하이드로겔의 형광 현미경 이미지이다. (b) PBS에서 배양한 후, (E) FITC와 접합된 PEGDA-PEI 하이드로겔 이미지, 또는 (F) FITC와 접합되지 않은 PEGDA-PEI 하이드로겔 이미지이다.
- 도 5는 시간 경과에 따라 측정된 저장 (G') 및 손실 (G'') 계수의 변화에 의해 평가된 10 % PEGDA-5 % PEI의 반응 혼합물의 유변학적 특성으로, PEGDA의 농도별로 측정((a) PEGDA400, (b) PEGDA700, (c) PEGDA1K, (d) PEGDA2K)되었으며, 화살표는 겔 형성 지점을 나타낸다. (e)는 5% PEI 일 때, 10 % PEGDA 또는 20 % PEGDA의 겔화 시간(tgel)이고, (f)는 다양한 농도의 PEI에 따른, 20 % PEGDA700의 겔화 시간(tgel)이다.
- 도 6은 시간 경과에 따라 측정된 저장 (G') 및 손실 (G'') 계수의 변화에 의해 평가된 10 % PEGDA-5 % PEI의 반응 혼합물의 유변학적 특성을 확인한 것으로서, 이는 PEGDA의 농도별로 측정((a) PEGDA3K, (b) PEGDA6K)되었

다.

도 7은 시간 경과에 따라 측정된 저장 (G') 및 손실 (G'') 계수의 변화에 의해 평가된 20 % PEGDA-5 % PEI의 반응 혼합물의 유변학적 특성을 확인한 것으로서, 이는 PEGDA의 농도별로 측정((a) PEGDA400, (b) PEGDA700, (c) PEGDA1K, (d) PEGDA2K, (e) PEGDA3K, (f) PEGDA6K)되었으며, 화살표는 겔 형성 지점을 나타낸다.

도 8은 시간 경과에 따라 측정된 저장 (G') 및 손실 (G'') 계수의 변화에 의해 평가된 20 % PEGDA700과 (a) 3 % PEI, (b) 5 % PEI, (c) 10 % PEI의 반응 혼합물의 유변학적 특성을 확인한 것으로, 화살표는 겔 형성 지점을 나타낸다.

도 9는 (a) 10% 또는 20 % PEGDA-5 % PEI 하이드로겔의 PEGDA 분자량에 따른 탄성계수(E), (b) 10 % PEGDA 또는 (c) 20 % PEGDA와 다양한 농도의 PEI 하이드로겔의 PEGDA 분자량에 따른 탄성계수 (E), (d) PEGDA의 분자량에 따른 PEGDA의 아크릴기와 PEI의 아민기의 개수 밀도 비 (Φ_{Ac} / Φ_{Am})를 나타낸 것이다.

도 10은 유변학적 실험에서 겔화 후 가장 높은 G' 값으로부터 취한 PEGDA-PEI 하이드로겔의 저장 계수 (G')로, (a) PEGDA의 분자량에 따른 10 % 또는 20 % PEGDA와 5 % PEI 하이드로겔의 저장계수(G'), (b) 20 % PEGDA700과 다양한 농도의 PEI 하이드로겔의 저장계수(G')를 나타낸 것이다.

도 11은 (a) PEGDA-PEI 하이드로겔의 분해 메커니즘, (b) 다양한 PEGDA 분자량에 대한 10 % PEGDA-5 % PEI 하이드로겔의 정규화된 탄성 계수 (E / E_0)의 시간에 따른 변화, (c) 도 11(b) 및 도 12를 식 (1)에 대입하여 구한 분해 속도 상수 (k_d), 다양한 PEI 농도와 결합된 (d) 10 % PEGDA, (e) 20 % PEGDA 에 대한 분해 속도 상수 (k_d)를 나타낸 것이다.

도 12는 다양한 PEGDA의 분자량에 대한 20 % PEGDA-5 % PEI 하이드로겔의 정규화된 탄성 계수 (E / E_0)의 시간에 따른 변화를 나타낸 것이다.

도 13은 (a) PEGDA-PEI 하이드로겔 (10 % PEGDA-5 % PEI)의 약물 방출 프로파일로, 순차적으로 발생하는 두 가지 분리된 방출 모드(초기 팽윤-제어 메커니즘, 후기 분해-제어 메커니즘)를 확인한 결과이다. (b) 초기 약물 방출 프로파일, (c) 도 13(b) 및 14(b)의 값을 식 (2)에 대입하여 얻은 반응 속도 상수 (k_1), (d) 후기 약물 방출 프로파일, (e) 도 13(d) 및 14(c)의 값을 식(3)에 대입하여 얻은 반응 속도 상수 (k_2)를 나타낸 것이다.

도 14는 (a) PEGDA-PEI 하이드로겔 (20 % PEGDA, 5 % PEI)의 약물 방출 프로파일로, 순차적으로 발생하는 두 가지 분리된 방출 모드(초기 팽윤-제어 메커니즘, 이후 분해-제어 메커니즘)를 확인한 결과이다. (b) 초기 약물 방출 프로파일, (c) 후기 약물 방출 프로파일을 나타낸 것이다.

도 15는 PEG1-PEI 하이드로겔의 약물 방출 프로파일로부터 얻어진 k_1 및 k_2 값으로, 다양한 농도의 PEI와 (a), (b) 10 % PEGDA 및 (c), (d) 20 % PEGDA에서의 결과를 나타낸 것이다.

도 16은 PEGDA-PEI 하이드로겔의 약물 방출 프로파일로, (a) 3 % PEI-10 % PEGDA, (b) 10 % PEI-10 % PEGDA, (c) 3 % PEI-20 % PEGDA, (d) 10 % PEI-20 % PEGDA에서의 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 참고예 1. 실험재료

[0043] 1-1. 폴리 (에틸렌 글리콜) 디아크릴레이트 (poly(ethylene glycol) diacrylate: PEGDA)의 합성

[0044] 아크릴레이트는 PEG의 하이드록실 말단기와 아크릴로일 클로라이드 (acryloyl chloride) 사이의 친핵성 치환 반응에 의해 PEG에 접합되었다. 간단히 말해, 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG, Sigma Aldrich) (MW 1000, 2000, 3000 및 6000g mol⁻¹)을 먼저 디클로로 메탄에 30 %로 용해시켰다. PEG의 하이드록실기에 대하여 2 몰 당량의 아크릴로일 클로라이드 및 트리에틸아민 (Sigma Aldrich)을 혼합물에 첨가하고 실온에서 건조한 N₂로 24 시간 동안 교반하였다. 반응 후, 형성된 불용성 염을 여과하고, 혼합물을 회전 증발을 통해 농축시켰다. 과량의 디에틸 에테르를 첨가하여 생성물을 침전시켰다. 생성물을 디에틸 에테르로 3 회 세척하고, 진공하에 건조시켰다. 도 1에 나타난 바와 같이, 아크릴레이트 접합체를 ¹H-NMR (400MHz, Avance III HD, Bruker)로 확인하였다.

[0046] **참고예 2. 실험과정**

[0047] **2-1. PEGDA-PEI 하이드로겔 제조**

[0048] 인산 완충 식염수 (PBS, pH 7.4) 에 PEGDA 및 PEI의 용액을 다양한 비율로 혼합하여 전구체 용액을 제조하였다. 전구체 용액은 즉시 1mm 스페이서를 가진 몰드에 넣고 하이드로겔이 형성될 때까지 37 °C에서 배양하였다. 하이드로겔 디스크(직경 8mm)를 천공하고, 추가적인 특성화(characterization)가 이루어질 때까지 PBS에 담가 두었다.

[0050] **2-2. 유변학적 특성화(Rheological characterization)**

[0051] 유변학적 특성화를 수행하여 PEGDA-PEI 하이드로겔 형성의 겔화 동역학(kinetics) 분석 하였다. PEGDA 및 PEI 용액을 혼합하고 회전 디스크 유변특성측정장치(rheometer) (Kinexus, Malvern)의 샘플 홀더 상에 놓고, 저장계수 (G') 및 손실계수 (G'')의 변화를 37 °C의 작은 진폭 진동 전단(shear) 모드에서 가교 반응 동안 측정하였다. 실험하는 동안 회전 디스크의 주파수와 변형률은 각각 1 Hz와 10 %였다. 겔화 시간(t_{gel})은 겔화 시점을 나타내는 G' 및 G'' 의 곡선이 교차 지점으로 나타내었다.

[0053] **2-3. 압축 실험**

[0054] 다양한 PEGDA-PEI 하이드로겔의 강도(rigidity)은 압축 실험으로부터 얻은 탄성 계수를 계산하여 측정하였다. 간단히 말하면, 하이드로겔 디스크를 1 mm min⁻¹의 속도로 일축 압축하고, 변형률 대 응력(stress) 곡선을 얻었다 (모델 3343, Instron). 탄성계수는 곡선의 직선 영역의 기울기 (처음 10 %)로서 결정되었다.

[0056] **2-4. 시간 경과에 따른 탄성 계수의 변화를 측정**

[0057] 시간 경과에 따른 탄성 계수의 변화를 측정함으로써 생분해성을 분석하였다. PEGDA-PEI 하이드로겔을 37 °C에서 PBS로 배양하고, 이들의 탄성 계수를 지정된 시점에서 측정 하였다. 분해 속도 상수 (k_d)는 계수 대 시간 곡선을 다음의 지수함수형 감소 모델(exponential decay model)을 적용함으로써 얻어지며,

[0058] [식 (1)]

$$\frac{E_t}{E_0} = e^{-k_d t}$$

[0059] 여기서 E_t 는 시간 t 에서 측정 된 탄성 계수이고, E_0 는 초기 탄성 계수이다.

[0062] **2-5. 형광 현미경 이미징**

[0063] 하이드로겔 형성 후 PEGDA 및 PEI의 균질성(homogeneity)을 형광체를 접합시킨 후 하이드로겔 내의 분포를 관찰하여 평가하였다. 각각의 PEGDA-PEI 하이드로겔 디스크를 플루오르신 이소티오시아네이트 (fluorescein isothiocyanate: FITC, Sigma Aldrich) 용액을 PBS (0.1 mg mL⁻¹)에 넣어 암실 하의 실온에서 3 시간 동안 배양하여 아민기와 FITC 사이의 반응을 유도하였다. 접합은 세척 후에 하이드로겔 내에 잔류하는 형광 색상의 존재에 의해 확인되었다. FITC-접합된 하이드로겔을 형광 현미경 (XDS-3FL, Optika)으로 시각화하여 하이드로겔 내의 형광물질의 분포를 평가하였다. 또한, FITC-접합된 하이드로겔의 분해를 상기 언급 된 것과 동일한 조건 하에서 관찰하고, 변형되지 않은 하이드로겔과 비교하였다.

[0065] **2-6. BCATM Protein Assay**

[0066] 다양한 PEGDA-PEI 하이드로겔로부터의 약물 방출을 측정하여 기계적 특성 및 생분해성의 효과를 평가하였다. 모델 단백질 약물인 소 혈청 알부민 (3 mg mL⁻¹)을 하이드로겔 제조 전에 전구체 용액에 용해시켜 PEGDA-PEI 하이드로겔에 캡슐화(encapsulated)하였다. 하이드로겔을 37 °C에서 PBS에서 배양하고, 방출된 양을 다양한 시점에서 측정하였다 (BCATM Protein Assay, Thermo Fisher). 누적된 약물 방출 프로파일은 다음의 두 모델을 적용하였다.

[0067] [식 (2)]

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 \cdot t^n$$

[0068]

[0069] [식 (3)]

$$\frac{M_t}{M_\infty} = e^{-k_2 \cdot t}$$

[0070]

[0071] 여기서, M_t 는 시간 t 에서 방출된 양이고, M_∞ 는 하이드로겔에서의 총량이며, k_1 과 k_2 는 반응 속도 상수이고, n 은 방출 메커니즘과 관련된 지수이다. 식 (2)는 약물 방출의 초기 부분을 나타내기 위해 fractional 시간 의존성을 갖는 power-law 방출 모델 ('Ritger-Peppas model')을 적용한 반면, 지수함수형 방출 모델인 식 (3)은 이후에 발생하는 가속 방출을 나타내기 위해 적용되었다.

[0073] 실시예1. 농도 및 분자량을 달리한 PEGDA-PEI 하이드로겔의 제조

[0074] 본 실시예에서는 하이드로겔의 기계적 특성을 조절하기 위하여 PEGDA와 PEI의 용액을 다양한 비율로 혼합하여 생리학적 조건에서 인 시류 조건에서 가교 가능한 PEGDA-PEI 하이드로겔을 제조하였다. 각 하이드로겔은 농도 및 분자량을 달리한 것을 제외하고는 "참고예2. 실험과정"의 "2-1. PEGDA-PEI 하이드로겔 제조"에 기재된 방법과 동일한 과정에 의하여 제조하였다.

[0075] PEGDA의 농도를 10 % 또는 20 %로 조절하면서 PEGDA의 분자량을 400 (PEGDA400)에서 6000 (PEGDA6K) g /mol까지 변화시켰다.

[0076] PEI 농도도 3 % 에서 10 %로 조절되었다. PEI의 농도가 3% 미만인 경우, 하이드로겔 결합에 관여하는 아민기가 부족하게 되어 겔 형성이 저해되고, 10% 초과인 경우, 하이드로겔의 기계적 특성이 감소하기 시작하였으며, 또한 도 3에 나타난 바와 같이, 용액 내 점도가 증가하게 되어 겔 형성 시간이 지연되었다.

[0078] 실시예 2. 형광 현미경 이미징에 의한 PEGDA-PEI 하이드로겔의 균질성 확인

[0079] 본 실시예에서는 PEGDA-PEI 하이드로겔의 균질성(homogeneity)을 확인하기 위하여, 하이드로겔 중 PEI의 미반응 아민기와 형광 프로브(probe)(예 : FITC)를 화학적으로 접합시킨 후 하이드로겔 내에 분포된 형광물질을 현미경 이미징을 통해 분석하였다.

[0080] 그 결과, 도 4a에 나타난 바와 같이, 하이드로겔 구조 전반에서 일관된 형광 신호가 나타남을 확인하였다. 이는 PEGDA와 PEI가 네트워크 내에서 균질하게 혼합되어 분포되어 있음을 나타내는 것이다.

[0082] 실시예 3. PEGDA와 PEI 사이의 가교 반응 속도에 대한 PEGDA의 분자량과 농도 및 PEI의 농도의 영향을 확인

[0083] 본 실시예에서는 PEGDA와 PEI 사이의 가교 반응 속도에 대한 PEGDA의 분자량과 농도 및 PEI의 농도의 영향을 확인하기 위하여, 유변학적 특성화를 수행하였다. 시간 경과에 따라 혼합물의 점탄성 특성, 저장 계수 (G' , 탄성 성분) 및 손실 계수 (G'' , 점성 성분)의 변화를 측정함으로써 평가되었다.

[0085] **3-1. 겔 형성 여부에 대한 PEGDA의 분자량과 농도의 영향**

[0086] PEGDA와 PEI의 농도를 각각 10 %와 5 %로 유지하고, PEGDA의 분자량을 증가시키면서 겔화 지점을 PEGDA6K까지 관찰하였다.

[0087] 그 결과, 도 5a-d에 나타난 바와 같이, PEGDA 2K까지는 G '이 G '와 교차하는 겔화 지점이 나타났으나, 도 6에 나타난 바와 같이, PEGDA3K 및 PEGDA6K에서는 겔화 지점이 나타나지 않았음을 확인하였다.

[0088] 이는 PEGDA 3K 이상으로 분자량이 증가하면 PEI의 아민기에 비하여 상대적으로 PEGDA의 아크릴기의 수가 부족하게 되어 겔이 형성되지 않았음을 나타내는 것이다.

[0089] 반면, 도 7에 나타난 바와 같이, 5 % PEI를 유지하면서 PEGDA 농도를 20 %로 증가시킨 경우, 모든 PEGDA의 분자량에서 겔화 지점이 나타남을 확인할 수 있었다. 이는 PEGDA 농도가 20%로 증가됨에 따라 PEGDA3K 이상의 고 분자량의 PEGDA 분자에서도 총 아크릴기의 수가 증가되어 겔이 형성될 수 있었음을 나타내는 것이다.

[0091] **3-2. 겔화 시간 (가교반응속도)에 대한 PEGDA의 분자량과 농도의 영향**

[0092] 도 5e에 나타난 바와 같이, 10 %와 20 % PEGDA 모두 PEGDA의 분자량이 증가함에 따라 겔화 시간 (t_{gel}) 이 점진적으로 감소함을 확인하였다. 또한, PEGDA의 분자량에 대한 t_{gel} 의 감소율은 20 %의 PEGDA를 사용한 경우 더욱 높게 관찰되었다.

[0093] 이는 저 분자량의 PEGDA에서는 아크릴기의 수가 상대적으로 많아져 반응 속도를 빨라질 것으로 기대되는점과 상반된 결과이다. 저 분자량의 PEGDA에서는 친수성 ethylene oxide 사슬에 비해 소수성의 아크릴기가 다량 존재하여 PEGDA 분자의 소수성 수준이 상대적으로 증가하게 되고, 이에 따라, PEGDA와 친수성인 PEI간 안정하고 균질한 혼합을 방해하는 역할을 하였을 것으로 예상된다.

[0094] 결과적으로, 보다 큰 친수성을 갖는 고 분자량의 PEGDA는 PEI와의 유리한 상호작용을 가질 수 있으며, 초기 가교 결합 공정을 보다 안정적으로 유도할 수 있음을 알 수 있다.

[0096] **3-3. 겔화 시간 (가교반응속도) 에 대한 PEI의 농도의 영향**

[0097] 도 5f 및 도 8에 나타난 바와 같이, PEI 농도가 겔화 시간(t_{gel})에 미치는 영향은 확인하기 위하여, 20 % PEGDA700과 반응시키는 PEI 농도를 3 % 에서 10 %까지 변화시켰다.

[0098] 그 결과, t_{gel} 값은 PEI 농도가 증가함에 따라 감소함을 확인할 수 있었으며, 이는 가교 결합에 사용 가능한 아민기의 수가 PEI 농도에 따라 증가하기 때문이었다. 다만, 상기 실시예 1에 언급한 바와 같이, PEI의 농도가 10%를 초과하는 경우에는 용액 내 점도가 증가하게 되어 오히려, 겔 형성 시간이 지연될 것으로 예측되었다.

[0100] **실시예4. 하이드로겔의 강도에 대한 PEGDA의 분자량과 농도 및 PEI의 농도의 영향을 확인**

[0101] 본 실시예에서는 PEGDA-PEI 하이드로겔의 강도를 확인하기 위하여, 가교 반응의 완결을 위한 충분한 시간을 통해 완전-가교된 하이드로겔의 일축 압축 실험을 수행하여 탄성 계수를 측정하였다.

[0103] **4-1. 하이드로겔의 강도에 대한 PEGDA의 분자량의 영향**

[0104] PEGDA-PEI 하이드로겔의 강도(rigidity)에 대하여 PEGDA 분자량이 미치는 영향을 확인하기 위하여, PEI의 농도는 5 %로 유지시키면서 10 % 또는 20 % PEGDA 용액 내 PEGDA의 분자량을 증가시키면서 탄성계수를 측정하였다.

[0105] 그 결과, 도 9a에 나타난 바와 같이, 탄성 계수는 PEGDA700 이상에서는 PEGDA의 분자량이 증가함에 따라 감소함을 확인하였다. 예를 들어, 10 % PEGDA의 경우 PEGDA700에서 PEGDA2K로 갈수록, 20 % PEGDA의 경우 PEGDA700에서 PEGDA6K로 갈수록 탄성 계수가 감소하였다. 그러나, PEGDA400-PEI 하이드로겔의 탄성 계수는 PEGDA700-PEI

하이드로겔보다 현저히 낮음을 확인하였다.

[0106] 이는 PEGDA700에 비해 PEGDA400에 아크릴기가 더 많아 소수성이 증가하여 친수성 PEI와의 균질한 혼합을 방해하였고, 그에 따라, 가교 결합 반응의 정도가 감소되었음을 나타내는 것이다.

[0107] 또한, PEGDA의 분자량에 따른 탄성 계수의 전체 경향은 도 9b-c에 나타난 바와 같이, PEGDA 농도에 관계없이 모든 PEI 농도에서 도 9a에 도시된 것과 유사하였다.

[0109] 4-2. 하이드로겔의 강도에 대한 아크릴기와 아민기의 개수 밀도 비의 영향

[0110] PEGDA-PEI 하이드로겔의 기계적 특성에 대한 아크릴기와 아민기의 화학양론의 영향을 평가하기 위해, 아크릴기 대 아민기의 이론적인 개수 밀도 비 (Φ_{Ac} / Φ_{Am})를 계산하였다.

[0111] 그 결과, 도 9d에 나타난 바와 같이, PEGDA의 분자량이 증가함에 따라 Φ_{Ac} / Φ_{Am} 가 감소함을 확인하였다. 또한, 동일 농도에서 아크릴기의 수가 가장 많은 20 % PEGDA400에서, 5 % PEI인 경우가 3 % PEI (0.43), 10 % PEI (1.4)에 비해 Φ_{Ac} / Φ_{Am} 값이 1 (0.86) 에 가깝게 나타나는 것을 확인하였다.

[0112] 이는 가교 결합 반응은 아크릴기와 아민기 사이의 화학양론적 반응을 통해 일어나기 때문에, 1 에 가까운 비율 일수록 가교 결합 밀도가 증가한다고 볼 수 있다. 마찬가지로, Φ_{Ac} / Φ_{Am} 값이 1로부터 이탈될수록 가교 결합 밀도가 감소된다고 볼 수 있고, 결과적으로 하이드로겔 강도가 감소된다고 볼 수 있다. 따라서, 동일 농도에서 아크릴기의 수가 가장 많은 20 % PEGDA400에서 5 % PEI에 대해 가장 높은 강도가 나타났음을 알 수 있었다.

[0114] 4-3. 하이드로겔의 강도에 대한 PEGDA 및 PEI의 농도의 영향

[0115] PEGDA-PEI 하이드로겔의 강도에 대하여 PEGDA 및 PEI 농도가 미치는 영향을 확인하기 위하여, 10 % 또는 20 % PEGDA에 대하여 PEI 농도를 3 %에서 10 %까지 변화시켰다.

[0116] 그 결과, 도 9b-c에 나타난 바와 같이, 20 % PEGDA를 갖는 하이드로겔은 일반적으로 모든 분자량의 PEGDA에서 10 % PEGDA를 갖는 것보다 큰 탄성 계수를 가짐을 확인하였다. 또한, 주어진 PEI 농도에서, 하이드로겔이 형성될 수 있는 PEGDA의 분자량 범위도 20 % PEGDA에서 더 큼을 확인하였다. 예를 들어, 3 % PEI의 경우, 겔이 형성되기 위한 PEGDA의 최대 분자량은 10 % PEGDA에서 PEGDA2K였고, 20 % PEGDA에서 PEGDA3K였다. 유사하게, 10 % PEI의 경우, 겔이 형성되기 위한 PEGDA의 최대 분자량은 10 % PEGDA에서 PEGDA1K였고, 20 % PEGDA에서 PEGDA2K였다.

[0117] 한편, 도 9b-c에 나타난 바와 같이, 3 % PEI를 갖는 하이드로겔의 탄성 계수는 5 % PEI를 갖는 것보다 훨씬 낮은 반면, PEI 농도가 10 %까지 증가하면, 모든 분자량의 PEGDA에 대한 탄성 계수가 현저하게 감소함을 확인하였다.

[0118] 이는 3 % PEI의 경우, 5 % PEI에 비하여 아민 함량이 낮아 탄성계수가 낮게 나타남을 나타내는 것이다. 또한, PEGDA의 아크릴기의 수는 5 %PEI의 아민기에 의해 모두 소비되고 PEI 농도의 추가적인 증가는 PEI 분자의 상당한 화학양론적 과량을 초래하여 가교 결합 반응에 대한 제한 효과를 초래한다는 것을 나타낸다. 즉, 과량의 PEI 반응물의 존재는 오히려 가교 결합의 방해물로서 작용한다는 것을 의미한다. 이것은 또한 10 % PEI를 가진 하이드로겔의 탄성 계수가 일반적으로 3 % PEI를 가진 것보다 더 컸음에도 불구하고, 겔화를 위한 최대 분자량의 PEGDA가 10 % PEI (PEGDA2K)보다 3 % PEI (PEGDA3K)에 대해 더 높다는 사실을 설명하는데 도움이 된다. 즉, 10 % PEI에서의 매우 많은 PEI의 과량은 10 % PEI에서 가장 적은 수의 아크릴기에서의 가교 결합 반응을 제한함으로써 하이드로겔 형성을 방해한다.

[0120] 4-4. 하이드로겔의 강도 평가

[0121] 하이드로겔의 강도는 또한 도 5-8 에서와 같이 완전 겔화 후 반복 전단 조건하에서 G' 값으로 평가되었다.

[0122] 그 결과, 도 10a에 나타난 바와 같이, 10 % PEGDA-5 % PEI 의 하이드로겔에서 G' 의 경향은 탄성 계수의 경향과 유사하였다. 그러나, PEGDA 농도가 20 %로 증가하면, G' 값은 PEGDA의 분자량이 증가함에 따라 PEGDA2K까지 연속적으로 증가함을 확인하였다.

[0123] 이는 고 분자량 PEGDA로 가교 결합된 하이드로겔이 강도가 낮더라도 더 탄력적이었기 때문에 전단 조건하에서 구조적 완전성을 유지할 수 있었던 것이다. 반면, 저 분자량의 PEGDA로 가교 결합된 하이드로겔은 훨씬 더 높은 탄성 계수를 가지지만, 또한 훨씬 더 부서지기 쉽다. 따라서, 반복 전단 측정 동안 이러한 하이드로겔에 대한 광범위한 부러짐이 발생하여 G' 값이 감소하게 됨을 알 수 있었다.

[0124] 도 10b에 나타난 바와 같이, PEGDA의 농도와 분자량을 유지(20 % PEGDA700)하면서 PEI 농도를 변화시킨 하이드로겔에 대해서도 유사한 결과가 나타났다(G' 값은 PEI의 농도가 증가함에 따라 연속적으로 증가하였다). 10 % PEGDA700에서, G'의 경향은 도 9b에 나타난 (도 9b에 나타난 PEGDA 700의) 탄성 계수의 경향과 유사하였다. 그러나 20 % PEGDA700에서는, 5 % PEI는 탄성 계수가 가장 높았음에도 불구하고 G'는 다른 조건보다(10 % PEI 보다) 낮았는데, 이는 높은 강도를 가진 하이드로겔이 상당한 취성(brittleness) 또한 보유하고 있어 주어진 반복 전단 실험 조건에서 구조의 파괴가 일어난 것으로부터 기인한다.

[0126] 실시예 5. PEGDA-PEI 하이드로겔의 분해거동 확인

[0128] 5-1. PEGDA-PEI 하이드로겔의 분해메커니즘

[0129] PEI 사슬의 모든 아민이 PEGDA의 아크릴기와 반응할 가능성은 거의 없기 때문에 PEGDA-PEI 하이드로겔에 상당한 수의 미 반응 아민기가 남아있을 수 있다. 이는 가교 결합 반응이 진행됨에 따라 중합체 사슬의 conformational 및 translational 이동성이 감소하여 반응성이 감소하기 때문이다. 따라서, 도 11a에 나타난 바와 같이, PEGDA-PEI 하이드로겔의 ester 결합은 미 반응 아민기가 직접적으로 친핵성 공격을 하거나, 양성자화된 아민기와 증가된 hydroxide 이온으로 인해 가수분해된다고 보여지고, 그에 따라, 하이드로겔 분해가 촉진된다.

[0131] 5-2. PEGDA-PEI 하이드로겔의 분해거동에 대한 PEGDA의 분자량의 영향

[0132] 본 실시예에서는 PEGDA-PEI 하이드로겔의 분해거동 확인하기 위하여, 하이드로겔을 생리적 완충제(즉, PBS)에 담그고 탄성 계수의 변화를 시간에 따라 평가하였다. 탄성 계수 (E/E_0) 대 시간 (t) 프로파일의 분율 변화를 지수함수형 감소 모델 (식 (1))에 대입하여 분해 속도 상수 (k_d)를 얻었다. 모든 조건에서 PEGDA-PEI 하이드로겔은 다양한 속도로 완전한 구조적 분해를 나타내었다.

[0133] 도 11b-c 및 도 12에 나타난 바와 같이, PEGDA의 분자량과 농도를 변화시키는 동안 PEI의 농도는 5 %로 유지되었다.

[0134] 그 결과, 도 11c에 나타난 바와 같이, 10 % 및 20 % PEGDA의 경우, 분해 속도는 PEGDA의 분자량에 의해 크게 영향을 받았으며, 일반적으로 k_d 값은 PEGDA의 분자량이 증가함에 따라 증가함을 확인하였다. 이는 가교도가 낮은 하이드로겔이 더 빠른 분해를 나타내었는데, 이는 하이드로겔 내에 분해를 위해 끊어져야 할 ester 결합이 적었고, 고 분자량의 PEGDA에서 더 큰 팽윤 정도를 갖는 하이드로겔 내에 더 큰 삼투압이 있었기 때문이라고 예상되었다.

[0135] 또한, 도 11d-e에 나타난 바와 같이, PEI 농도를 변화시킨 PEGDA-PEI 하이드로겔에 대해서도 분해를 관찰하였다. 일반적으로 k_d 값은 10 %와 20 % PEGDA에서 PEI 농도에 관계없이 PEGDA의 분자량에 따라 증가함을 확인하였다. 최대 분자량의 PEGDA (즉, 10 % PEGDA2K 및 20 % PEGDA3K)에 대해, 5 % PEI에서 탄성 계수가 훨씬 더 높았음에도 불구하고, 5 % PEI에서의 k_d 값이 3 % PEI보다 현저히 높았다. 또한, 도 11d에 나타난 바와 같이, 3 % PEI를 갖는 10 % PEGDA의 분자량에 따른 k_d 의 변화는 5 % PEI의 경우보다 현저히 낮았다. 유사하게, 도 11e에 나타난 바와 같이, 20 % PEGDA에서 PEGDA의 분자량에 대한 k_d 의 증가는 PEI의 농도에 따라 더 두드러지게 나타났다. 이는 하이드로겔의 초기 강도의 차이에 관계없이, 고농도의 PEI에서 더 많은 양의 미 반응 아민기가 분해 과정을 촉진할 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

[0137] 5-3. PEGDA-PEI 하이드로겔의 분해거동에 대한 미 반응 아민기의 영향

[0138] 한편, 도 4b에 나타난 바와 같이, 가수분해를 통한 분해에 대한 미 반응 아민기의 영향은 화학 반응에 의해 하

이드로겔에서 아민기를 제거함으로써 추가로 확인되었다. PEGDA-PEI 하이드로겔에서 미 반응 아민기는 상기 언급한 바와 같이 FITC와 접합되었다.

[0139] 그 결과, 도 4b에 나타난 바와 같이, FITC- 연결된 하이드로겔(E)은 PBS에서 안정한 채로 유지되었으나, 변형되지 않은 하이드로겔(F)은 완전히 분해됨을 확인할 수 있었다. 이는 FITC- 연결된 하이드로겔은 자유 아민기가 모두 소모되었기 때문에 분해되지 않고 안정하게 유지된 것으로 보이고, 결과적으로, PEGDA-PEI 하이드로겔의 미 반응 아민기가 하이드로겔 분해를 일으킨다는 것을 보여 주었다.

[0141] 실시예 6. PEGDA-PEI 하이드로겔의 이중모드 약물 방출 프로파일 확인

[0142] in situ 가교 결합할 수 있는 PEGDA-PEI 하이드로겔의 조정 가능한 기계적 성질과 분해 거동과 결합된 것은 주사용 투여 형태로서 이상적이다. 따라서, 본 실시예에서는 도 13 및 도 14에 나타난 바와 같이, PEGDA-PEI 하이드로겔로부터 모델 약물인 소혈청알부민(Bovine serum albumin)의 방출을 시간에 따라 측정하고, 누적 약물 방출 대 시간 (t) 프로파일을 얻고 분석하였다.

[0143] 그 결과, 도 13a 및 도 14a에 나타난 바와 같이, PEGDA의 모든 분자량에서 PEGDA-PEI 하이드로겔의 전체적인 방출 프로파일은 순서대로 발생하는 두 개의 상이한 상(phase)으로 구성됨을 확인하였다. 즉, (1) fractional 시간 의존성 ($\sim t^n$, $0 < n < 1$)을 갖는 초기 power law 곡선, (2) 종점에 도달하기 전에 방출 속도의 빠른 상승을 나타내는 지수 곡선을 나타냈다. 이는 도 13a에 나타난 바와 같이, 초기 약물 방출은 중합에 의한 네트워크의 Fickian 확산과 사슬 이완의 결합으로 인한 하이드로겔의 팽윤 작용에 의해 좌우되며, 이후의 약물 방출은 하이드로겔 분해에 의해 촉진됨을 의미하는 것이다.

[0145] 6-1. 초기 약물 방출 속도에 대한 PEGDA의 분자량의 영향

[0146] 도 13b-c 및 도 14b에 나타난 바와 같이, 초기 12 시간 동안의 약물 방출 프로파일은 Ritger-Peppas 모델 (식 (2))을 적용하여 반응 속도 상수 (k_1)을 얻었다.

[0147] 그 결과, 도 13c에 나타난 바와 같이, 반응 속도 상수 (k_1) 값은 PEGDA의 분자량이 증가함에 따라 증가함을 확인하였다. 예를 들어, 20 % PEGDA에 대해서는 분자량이 PEGDA700에서 PEGDA3K로, 10 % PEGDA에 대해서는 PEGDA700에서 PEGDA2K로 증가되면서 반응 속도 상수가 증가하였다. 이는 일반적으로 가교 결합 밀도가 작은 하이드로겔로부터의 방출이 빠르기 때문임을 나타내는 것이다. 한편, PEGDA400-PEI 하이드로겔로부터의 방출 속도는 가장 큰 가교 결합 밀도를 가짐에도 불구하고 다른 어떤 조건보다 훨씬 높음을 확인하였다. 이는 가장 낮은 분자량의 PEGDA 에서 고도로 증가된 소수성이 다른 조건에서보다 하이드로겔로부터 친수성 분자를 빠져 나오는 것을 용이하게 하였음을 시사하는 것이다.

[0149] 6-2. 후기 약물 방출 속도에 대한 PEGDA의 분자량의 영향

[0150] 도 13d-e 및 도 14c에 나타난 바와 같이, 방출 속도의 급격한 증가를 나타내는 후속 약물 방출 프로파일은, 지수함수형 약물 방출 모델 (식 (3))을 적용하여 반응 속도 상수 (k_2)를 얻을 수 있었고, 이를 통해 하이드로겔 분해에 의해 지배되는 약물 방출의 경향을 확인할 수 있었다.

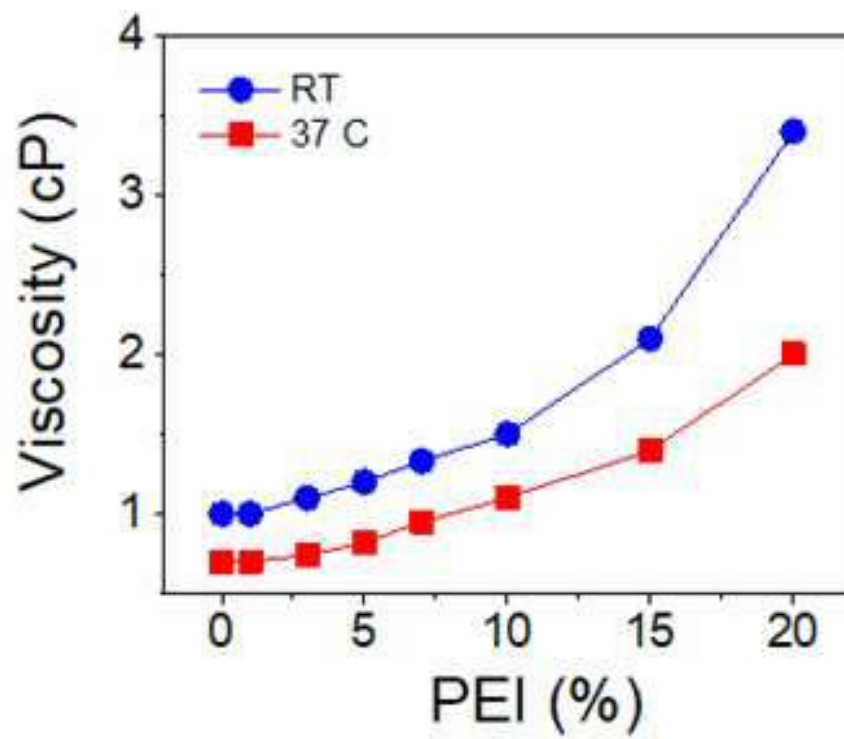
[0151] 그 결과, 도 13e에 나타난 바와 같이, 반응 속도 상수 (k_2) 값은 도 11에서의 분해 속도 상수 (k_d)의 경향과 유사하게, 10 % 및 20 % PEGDA에서 PEGDA의 분자량이 증가함에 따라 증가함을 확인하였다. 이는 초기의 팽윤-제어 메커니즘이후의 방출 kinetics는 크게 하이드로겔 분해에 의해 좌우된다는 것을 나타낸다.

[0153] 6-3. 다양한 PEI 농도에서의 약물 방출 프로파일 확인

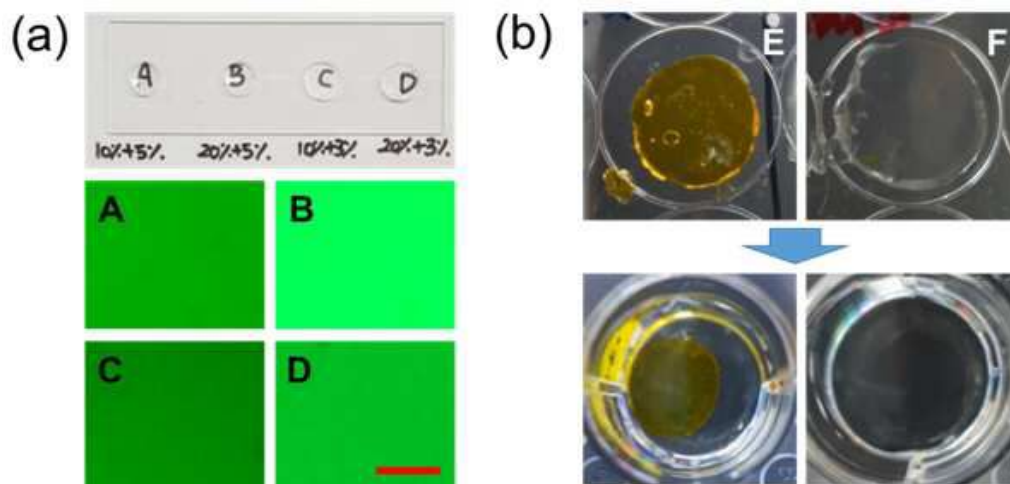
[0154] 도 15 및 도 16에 나타난 바와 같이, 이러한 순차적인 약물 방출 프로파일은 10 % 및 20 % PEGDA와 다양한 PEI 농도에 의해 가교 결합된 하이드로겔에서도 확인할 수 있었다.

[0155] 도 15a 및 15c에 나타난 바와 같이, 10 %와 20 % PEGDA 모두에 대한 k_1 값의 경향은 초기 약물 방출이 대부분

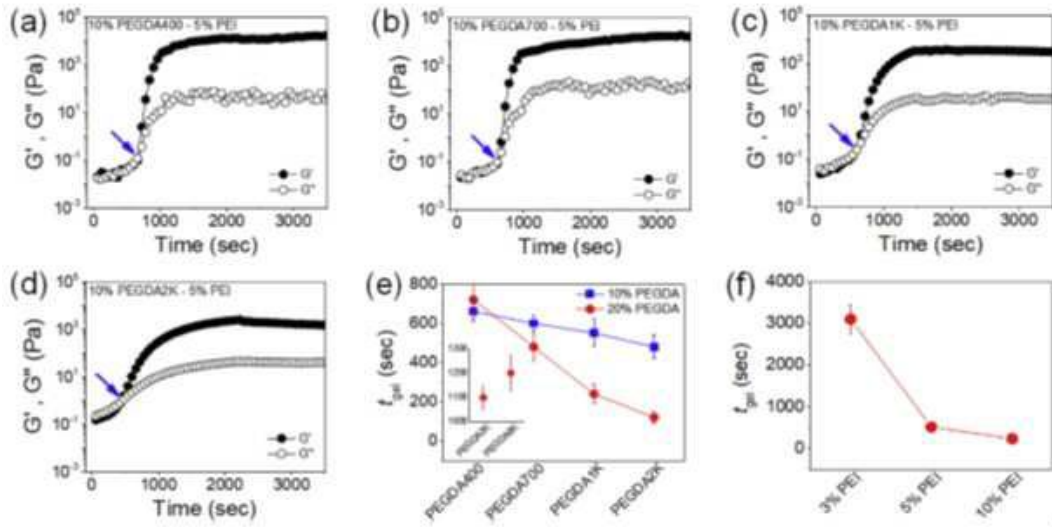
도면3



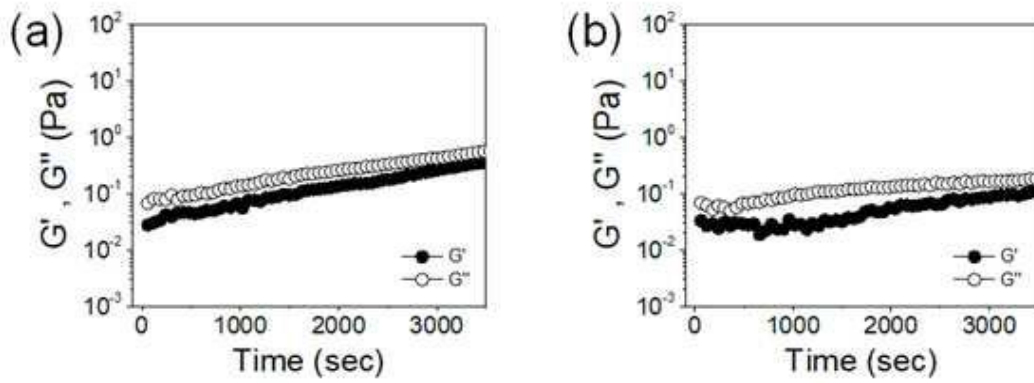
도면4



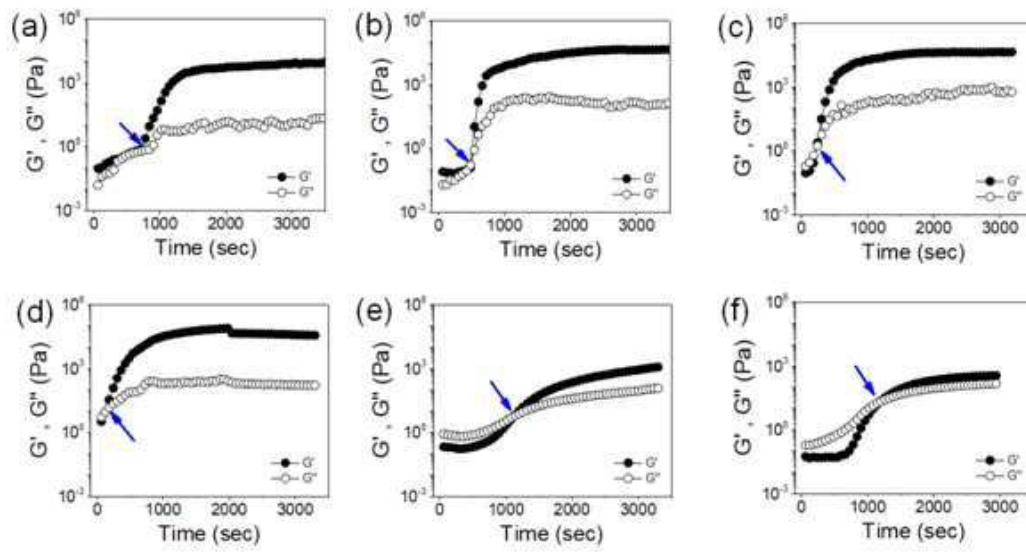
도면5



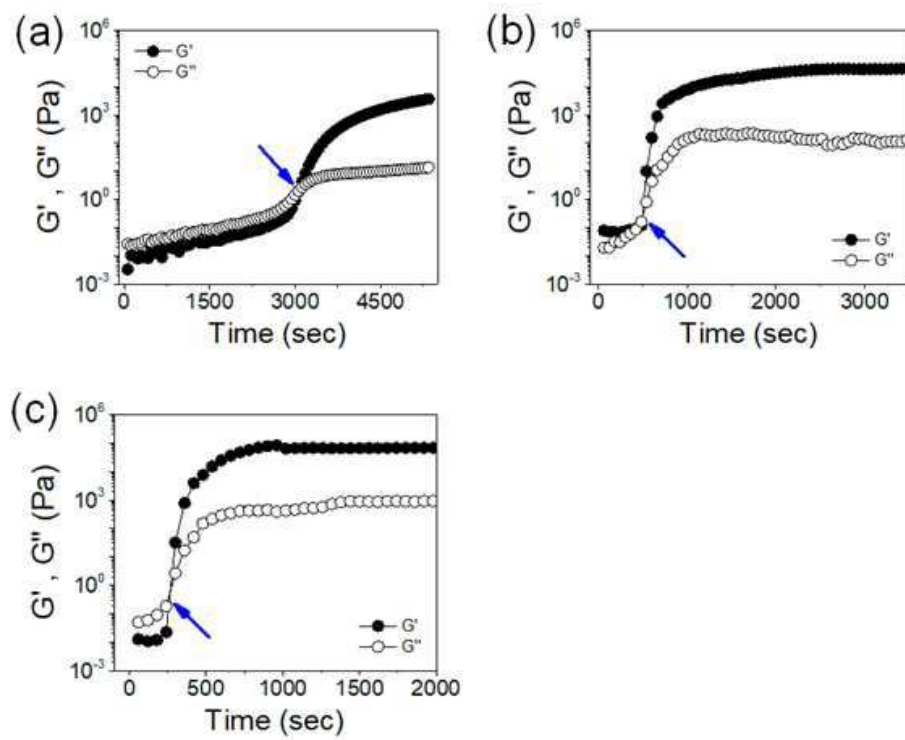
도면6



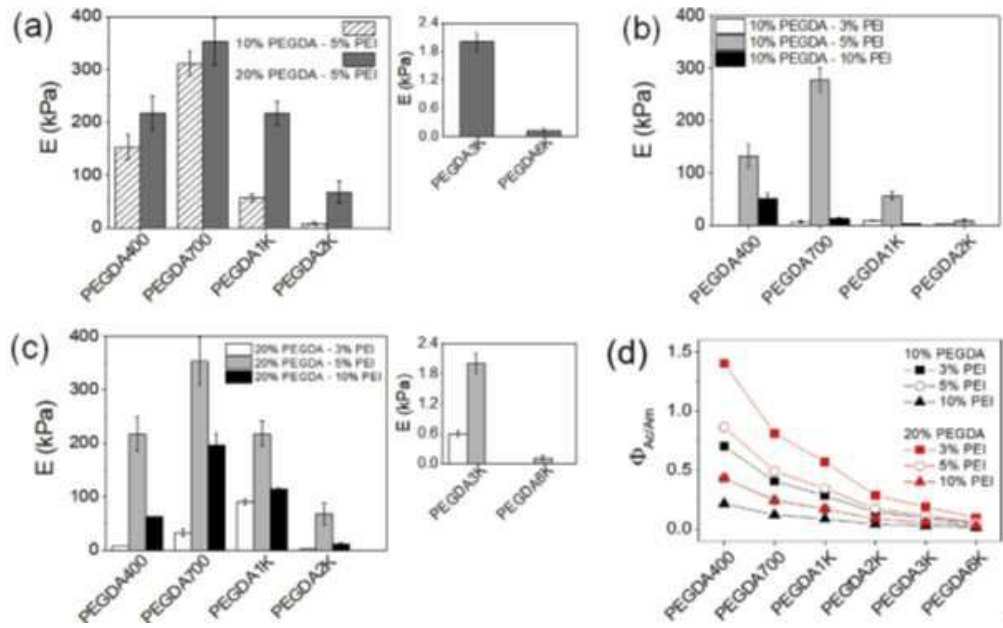
도면7



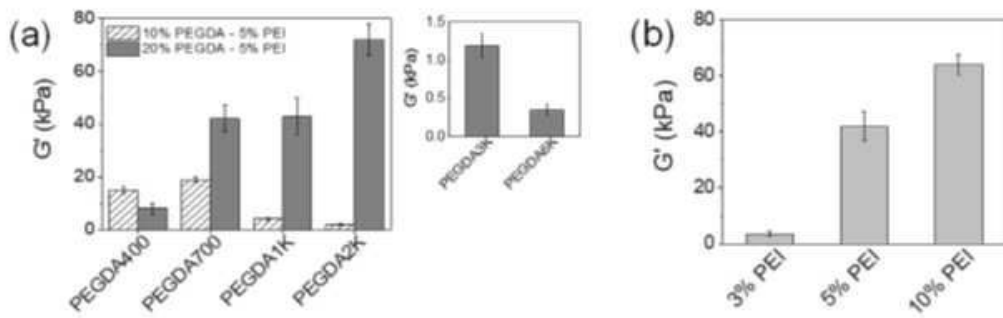
도면8



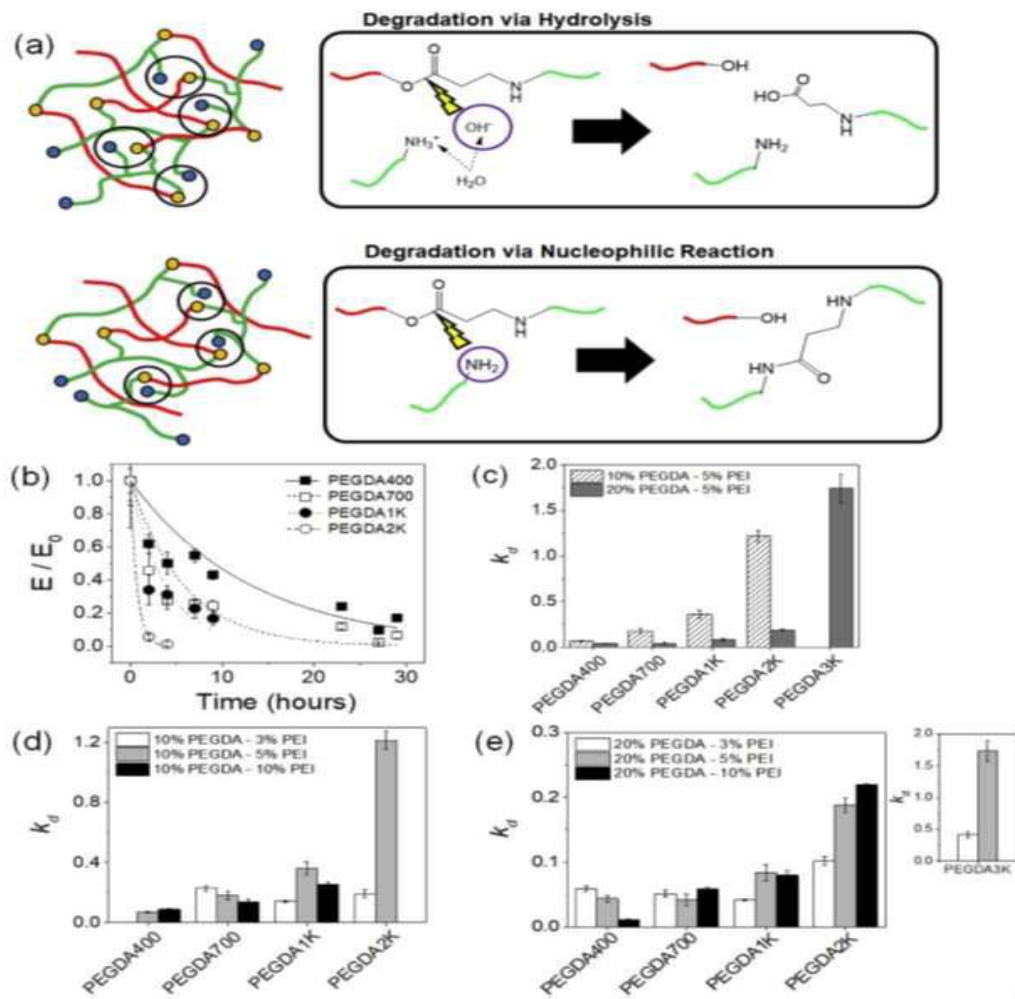
도면9



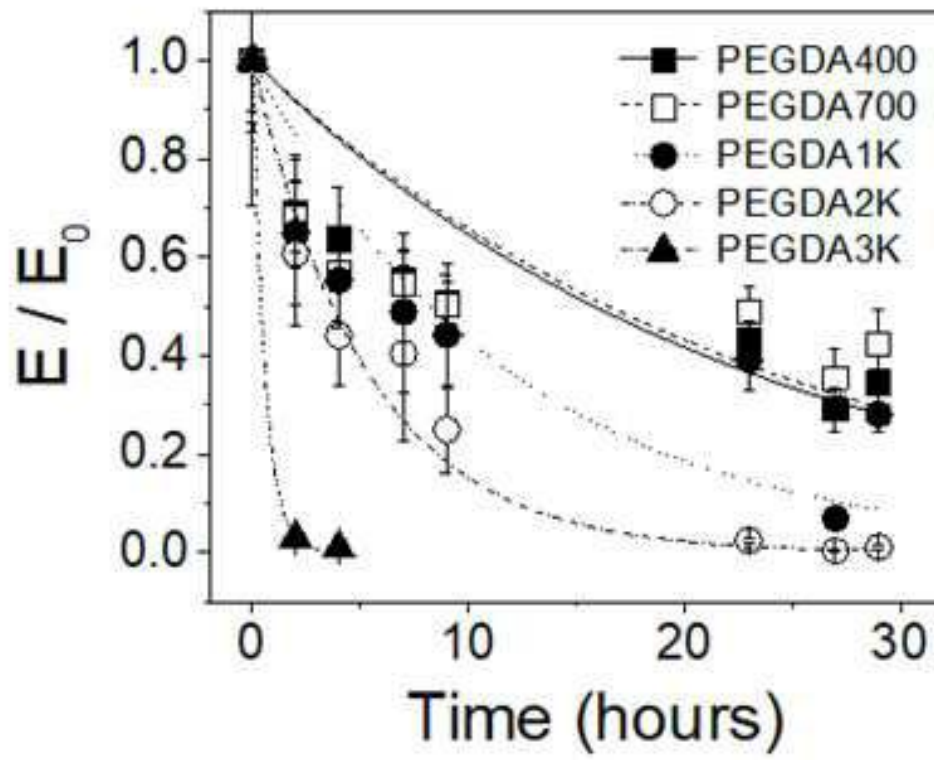
도면10



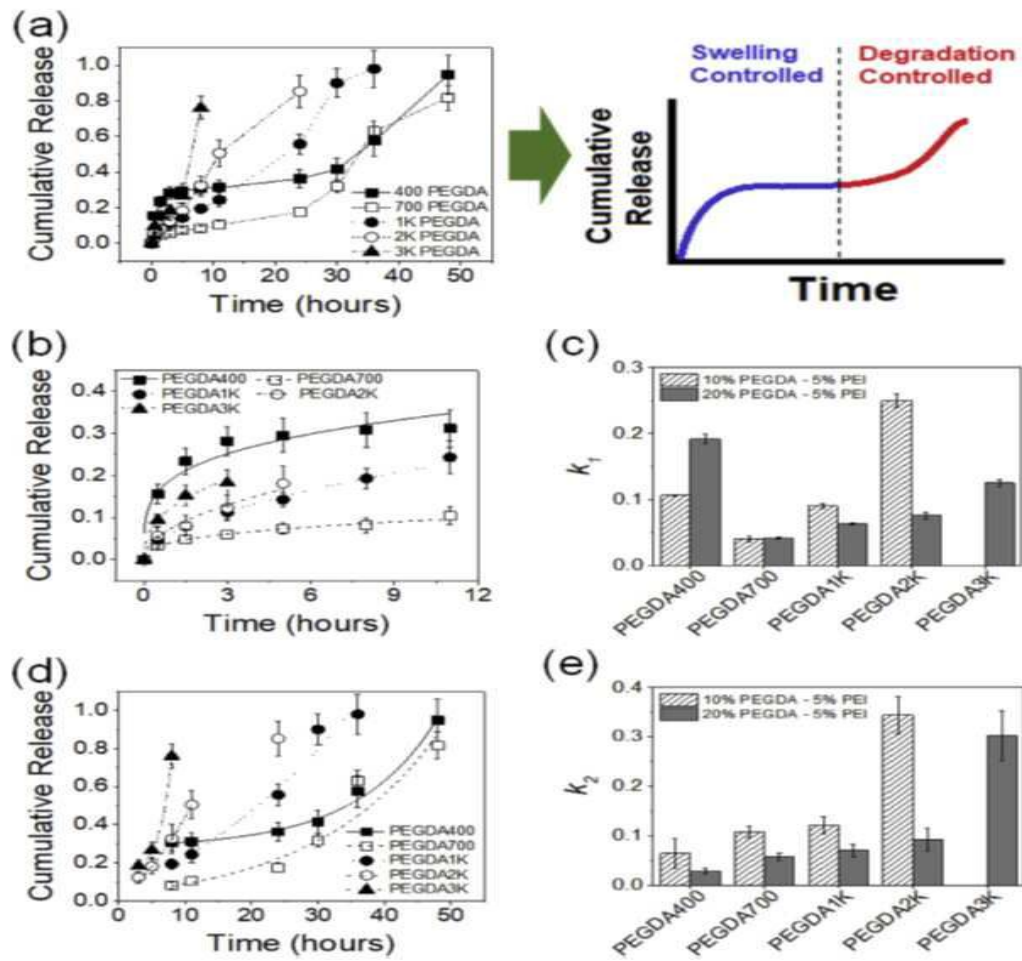
도면11



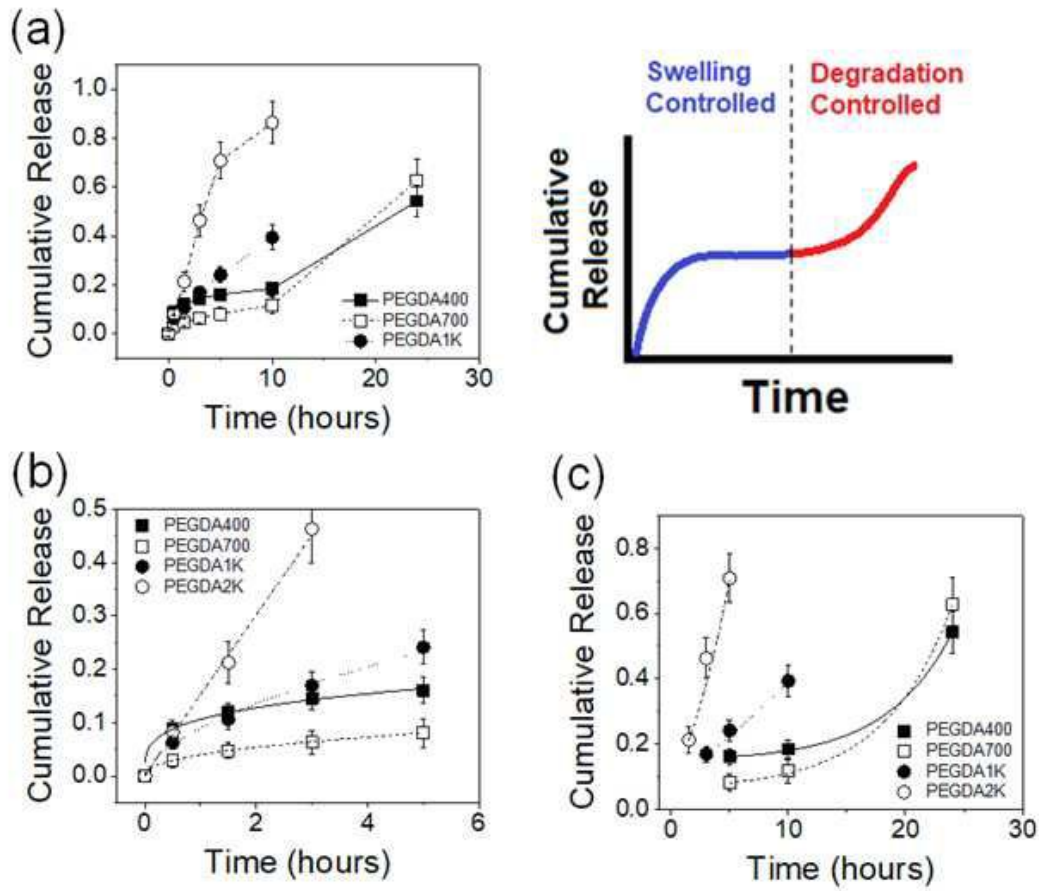
도면12



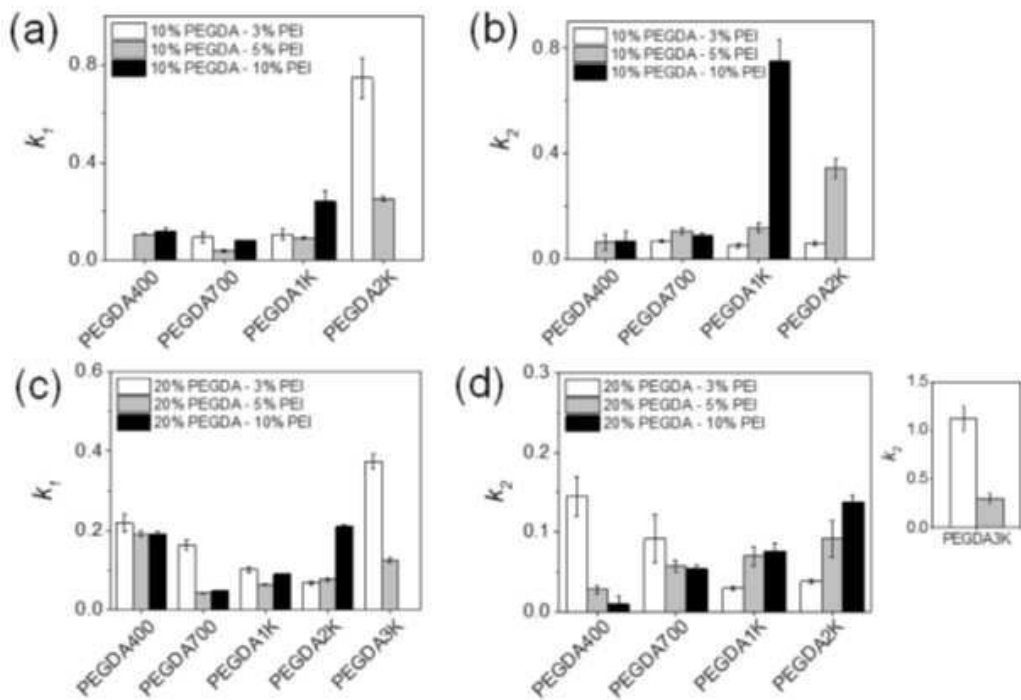
도면13



도면14



도면15



도면16

