



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년08월08일

(11) 등록번호 10-2008809

(24) 등록일자 2019년08월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C08G 69/04 (2006.01) A61K 9/50 (2006.01)

C08G 69/46 (2006.01) C08G 73/14 (2006.01)

C08J 3/075 (2006.01) C08L 33/14 (2006.01)

C08L 5/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C08G 69/04 (2013.01)

A61K 9/5031 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0019547

(22) 출원일자 2018년02월19일

심사청구일자 2018년02월19일

(56) 선행기술조사문헌

Biomacromolecules 2018, Vol.19, pp.691-700*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 김동원

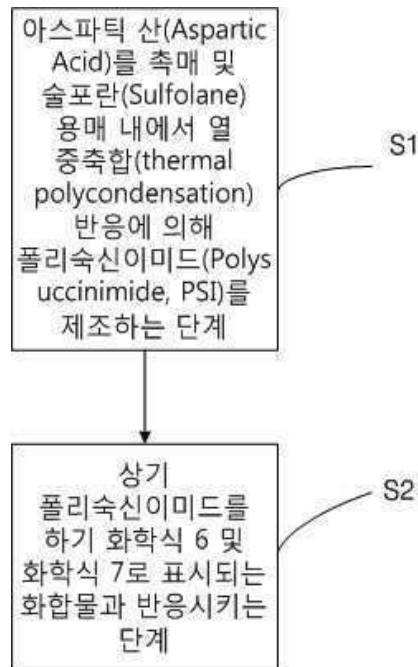
(54) 발명의 명칭 폴리아스팔트아미드 가교제 및 이의 제조 방법

(57) 요약

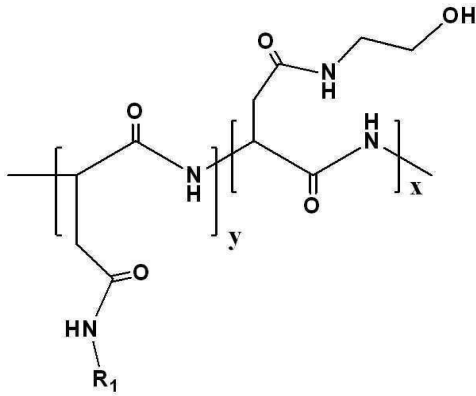
본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 폴리아스팔트아미드(Polyaspartamide) 가교제이다:

(뒷면에 계속)

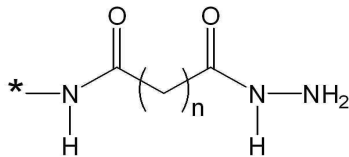
대표도 - 도1



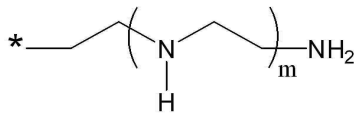
[화학식 1]



[화학식 2]



[화학식 3]



여기서,

x 및 y는 서로 동일하거나 상이하며, x 및 y의 합이 150 내지 700의 정수이며,

*는 결합되는 부분을 의미하며,

R₁은 상기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 치환기이며,

n 은 0 내지 4의 정수이며,

m은 0 내지 6의 정수이다.

본 발명은 상기 폴리아스팔트아미드 가교제를 포함하는 하이드로 겔을 제조할 수 있으며, 상기 하이드로 겔은 기계적 성질 및 분해 속도의 조절 가능하다.

또한, 본 발명은 상기 하이드로 겔을 이용하여, 서방성 약물 조절이 가능한 하이드로 겔을 포함하는 약학 조성물을 제공할 수 있고, 상기 하이드로 겔을 포함하는 생의학 소재용 조성물을 제공할 수 있다.

(52) CPC특허분류

C08G 69/46 (2013.01)

C08G 73/1092 (2013.01)

C08G 73/14 (2013.01)

C08J 3/075 (2013.01)

C08L 33/14 (2013.01)

C08L 5/04 (2013.01)

C08L 2203/02 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020120036623 A

KR1020080097772 A

JP1999255896 A

JP2016516796 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017M3A9C6033875
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 바이오.의료기술개발
 연구과제명 조직 재건용 바이오잉크 기술 개발
 기 여 율 1/2
 주관기관 울산과학기술원
 연구기간 2017.04.01 ~ 2017.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1415156556
 부처명 산업통상자원부
 연구관리전문기관 국방과학연구소
 연구사업명 민군기술협력개발
 연구과제명 니트로 화합물의 생물학적 형광 탐지 기술 및 장치 개발
 기 여 율 1/2
 주관기관 울산과학기술원
 연구기간 2017.06.15 ~ 2018.06.14

공지예외적용 : 있음

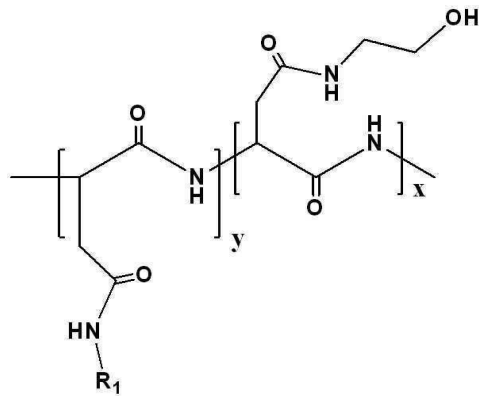
명세서

청구범위

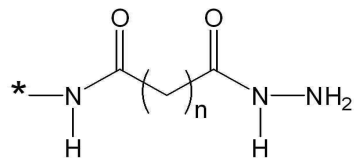
청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 폴리아스팔트아미드(Polyaspartamide) 가교제:

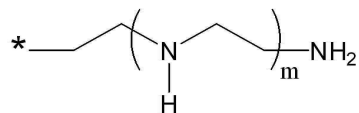
[화학식 1]



[화학식 2]



[화학식 3]



여기서,

x 및 y 는 서로 동일하거나 상이하하며, x 및 y 의 합이 150 내지 700의 정수이며,

$*$ 는 결합되는 부분을 의미하며,

R_1 은 상기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 치환기이며,

n 은 0 내지 4의 정수이며,

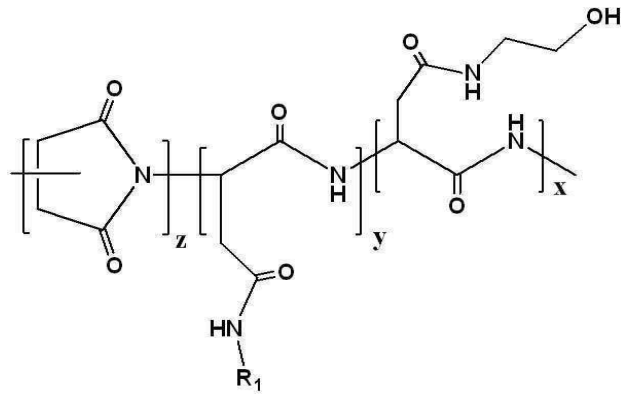
m 은 0 내지 6의 정수이다.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 화학식 1은 하기 화학식 4로 표시되는 화합물을 포함하는 폴리아스팔트아미드 가교제:

[화학식 4]



여기서,

R₁은 상기 제 1항에서 정의한 바와 같으며,

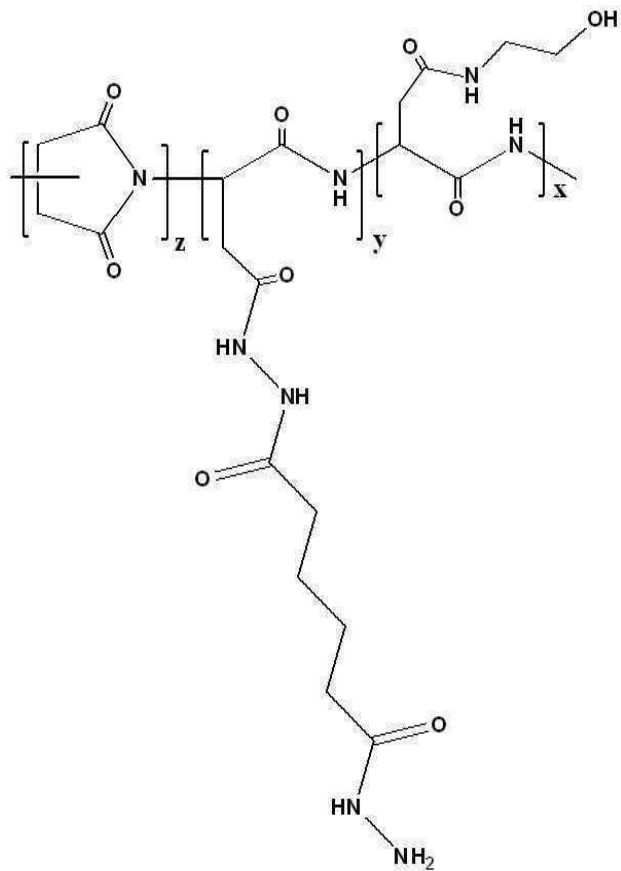
x, y 및 z의 합은 150 내지 700의 정수이다.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 화학식 1은 하기 화학식 5로 표시되는 화합물을 포함하는 폴리아스팔트아미드 가교제:

[화학식 5]



여기서,

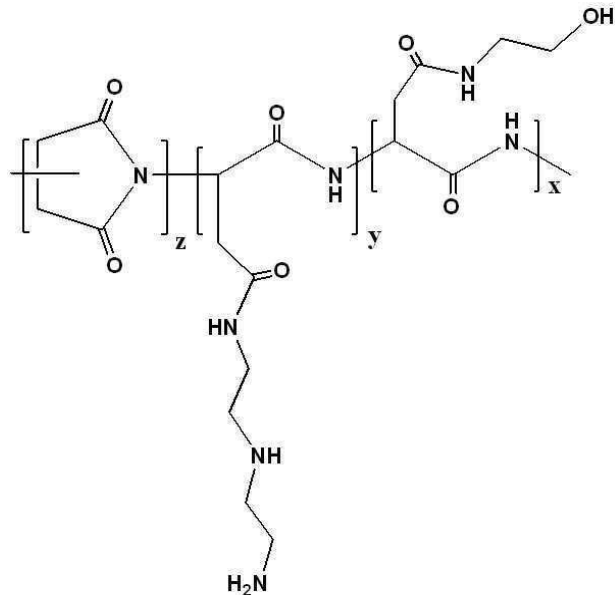
x, y 및 z는 상기 제 2항에서 정의한 바와 같다.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 화학식 1은 하기 화학식 6으로 표시되는 화합물을 포함하는 폴리아스팔트아미드 가교제:

[화학식 6]



여기서,

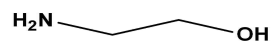
x, y 및 z는 상기 제 2항에서 정의한 바와 같다.

청구항 5

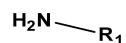
1) 아스파틱 산(Aspartic Acid)를 촉매 및 술폴란(Sulfolane) 용매 내에서 열 중축합(thermal polycondensation) 반응에 의해 폴리숙신이미드(Polysuccinimide, PSI)를 제조하는 단계; 및

2) 상기 1) 단계의 폴리숙신이미드를 하기 화학식 7로 표시되는 화합물 및 화학식 8로 표시되는 화합물과 반응시키는 단계를 포함하는 폴리아스팔트아미드 가교제의 제조 방법:

[화학식 7]



[화학식 8]



여기서, R₁은 상기 제 1항에서 정의한 바와 같다.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 1) 단계는 160 내지 200℃에서 5 내지 10시간 동안 교반하여 반응시키는 폴리아스팔트아미드 가교제의 제조 방법.

청구항 7

제 5항에 있어서,

상기 1) 단계는 반응 후 생성된 화합물을 메탄올에 침전시키고 여과하는 공정 및 세척하고 건조하는 공정을 추

가로 포함하는 폴리아스팔트아미드 가교제의 제조 방법.

청구항 8

제 5항에 있어서,

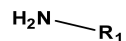
상기 2) 단계는 2-1) 폴리숙신이미드에 하기 화학식 7으로 표시되는 화합물을 첨가하고, 60 내지 80℃에서 교반하는 단계; 및

2-2) 상기 2-1) 단계의 반응이 완료되고, 하기 화학식 8로 표시되는 화합물을 첨가하고, 60 내지 80℃에서 교반하는 단계를 포함하는 폴리아스팔트아미드 가교제의 제조 방법:

[화학식 7]



[화학식 8]



여기서, R₁은 상기 제 1항에서 정의한 바와 같다.

청구항 9

제 1항에 따른 폴리아스팔트아미드(Polyaspartamide) 가교제를 포함하는 하이드로 겔.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 하이드로 겔은 폴리아스팔트아미드(Polyaspartamide) 가교제 및 폴리(에틸렌글리콜)디아크릴레이트(Poly(ethylene glycol) diacrylate, PEGDA)의 마이클 첨가(Michael addition)에 의해 결합된 하이드로 겔.

청구항 11

제 9항에 있어서,

상기 하이드로 겔은 폴리아스팔트아미드(Polyaspartamide) 가교제 및 산화 알지네이트(Oxidized Alginate)의 쉬프 염기 형성(Schiff base formation)에 의해 결합된 하이드로 겔.

청구항 12

삭제

청구항 13

제 9항에 따른 하이드로 겔을 포함하는 생의학 소재용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 폴리아스팔트아미드 가교제 및 이의 제조 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 생의학 소재 등으로 이용 가능한 하이드로 겔을 제조할 수 있으며, 하이드로 겔의 제조 시, 가교 결합 밀도 및 기계적 특성의 조절이 용이한 폴리아스팔트아미드 가교제 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 분자의 물리적 상호작용을 기반으로 하는 초분자 화학 (예를 들어: 수소 결합, 호스트-게스트 상호작용, 금속 배위, 반데르발스 힘, 및 방향족 쌓임)은 여러 가지 장점을 바탕으로 다양한 생체재료 연구 분야에 이용되고 있다. 상기 초분자의 구조체는 복잡한 공정 단계를 필요로 하지 않는 비공유 결합에 의해 간편하게 합성되거나 제조될 수 있다. 또한, 상기 초분자 화합물은 비공유 결합을 포함하고 있기 때문에 외부의 물리적/화학적 자극에

의해 가역적인 성질을 가진다. 따라서 상기 초분자 화합물은 사용 후 쉽게 회수할 수 있으며, 외부의 기계적인 손상에서 자가 치유를 할 수 있는 장점을 가지고 있다.

- [0003] 다양한 초분자 중에서, 천연 및 합성 모두의 생체 적합성 고분자로 만든 하이드로 겔은 조직 공학 및 약물 전달과 같은 다양한 생의학 응용 분야에 강력한 플랫폼으로 활용될 수 있다.
- [0004] 1-3 하이드로 겔은 탄성, 친수성 및 투과성과 같은 흥미로운 물리적 특성이 독특하게 혼합되어 있어, 조직 공학 및 약물 전달과 같은 다양한 생의학 응용 분야에 매우 적합하게 만들 수 있다.
- [0005] 조절 가능한 생물학적 반응을 도출하기 위해 다양한 하이드로 겔의 제조 전략을 이용하였다. 또한, 이러한 물리적 및 생물학적 특성은 특정 요구에 맞게 광범위한 범위에서 조절이 필요하다.
- [0006] 종래, 하이드로 겔의 다양한 특성을 제어하기 위한 방법은 대부분의 겔 형성 폴리머가 본래의 형태로 그 특성을 갖지 않기 때문에 여러 공정 단계를 필요로 한다.
- [0007] 이와 같이, 다양한 특성의 조절이 가능한 성질을 갖는 하이드로 겔을 제조하는 것은 다양한 방식의 제조 방법에 의해 가능하다. 예를 들어, 하이드로 겔의 강성은 조작에 사용되는 가교 분자의 양에 의해 제어 가능하다.
- [0008] 상기 가교 결합 밀도는 두 가지 요소에 역으로 영향을 미치기 때문에, 약물 전달 용도에 대한 하이드로 겔 다공도를 제어하는데 일반적으로 사용되었다.
- [0009] 상기 하이드로 겔을 제조하는 또 다른 방법으로, 증가하는 파괴 인성 및 구조적 내구성과 같은 하이드로 겔의 새로운 기능을 부여하기 위하여, 나노 물질을 충전제로 사용하여 상호 침투 네트워크 또는 복합체 형성을 형성하는 방법이 이용되었다.
- [0010] 또한, 세포 접착 기능을 유도하고, 이러한 세포 접착 기능을 조절하기 위해 ECM 단백질(예를 들어, 콜라겐, 피브로넥틴 등) 또는 세포 반응성 펩타이드(예를 들어 RGD 펩타이드 등)을 별도로 접합시키는 제조 방법이 이용되었다.
- [0011] 상기의 하이드로 겔 제조 방법은 다양한 특성을 가진 하이드로 겔을 제조하는 데 광범위하게 사용되지만, 다양한 기능을 나타내기 위해서는, 여러 구성 성분을 이용함으로써 다중 하이드로 겔의 특성을 제어하는 것이 더욱 바람직하다.
- [0012] 따라서, 기계적 성질의 조절이 가능하며, 생분해 및 세포 부착을 위한 생체 활성 분자의 부착이 가능한 다양한 기능을 나타낼 수 있는 하이드로 겔의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0013] (특허문헌 0001) (특허 문헌 1) KR 10-2010-0096676 A1

발명의 내용

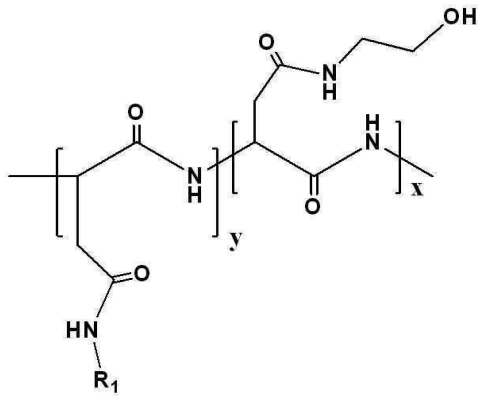
해결하려는 과제

- [0014] 본 발명의 목적은 폴리아스팔트아미드 가교제 및 이의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적은 폴리아스팔트아미드 가교제를 포함하는 하이드로 겔로, 기계적 성질 및 분해 속도의 조절 가능한 하이드로 겔을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 다른 목적은 서방성 약물 조절이 가능한 하이드로 겔을 포함하는 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 다른 목적은 상기 하이드로 겔을 포함하는 생의학 소재용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

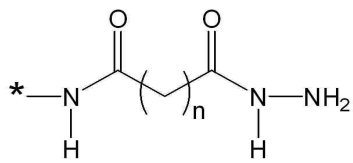
- [0018] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 폴리아스팔트 (Polyaspartamide) 가교제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함한다:

[0019] [화학식 1]



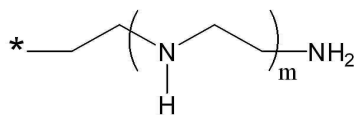
[0020]

[0021] [화학식 2]



[0022]

[0023] [화학식 3]



[0024]

[0025] 여기서,

[0026] x 및 y는 서로 동일하거나 상이하며, x 및 y의 합이 150 내지 700의 정수이며,

[0027] *는 결합되는 부분을 의미하며,

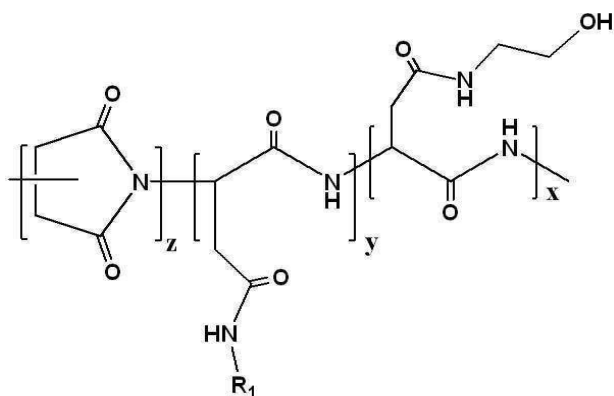
[0028] R₁은 상기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 치환기이며,

[0029] n 은 0 내지 4의 정수이며,

[0030] m은 0 내지 6의 정수이다.

[0031] 상기 화학식 1은 하기 화학식 4로 표시되는 화합물을 포함할 수 있다:

[0032] [화학식 4]



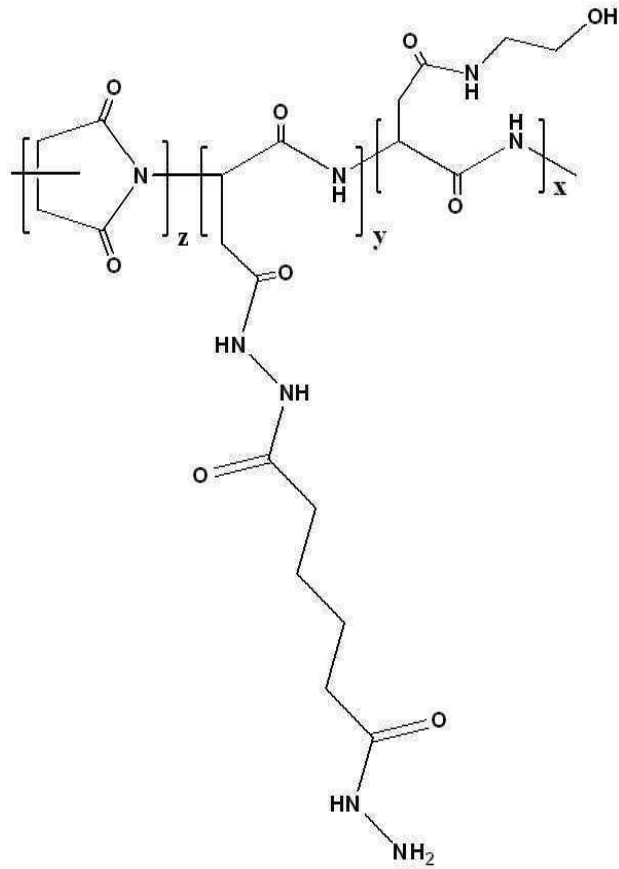
[0033]

[0034] 여기서, R₁은 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같으며,

[0035] x, y 및 z의 합은 150 내지 700의 정수이다.

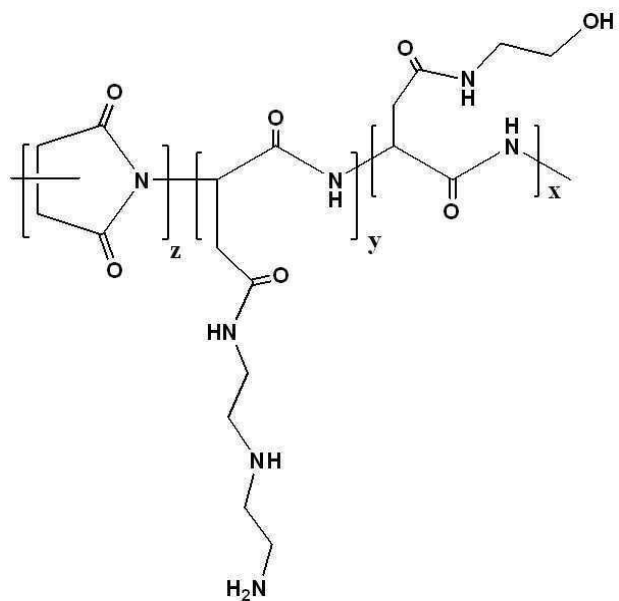
[0036] 상기 화학식 1은 하기 화학식 5로 표시되는 화합물을 포함할 수 있다:

[0037] [화학식 5]

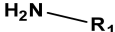
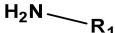


[0038] 여기서,
 [0039] x , y 및 z 는 상기 화학식 4에서 정의한 바와 같다.
 [0040] 상기 화학식 1은 하기 화학식 6으로 표시되는 화합물을 포함할 수 있다:

[0042] [화학식 6]



[0043] 여기서,
 [0044]

- [0045] x, y 및 z는 상기 화학식 4에서 정의한 바와 같다.
- [0046] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 폴리아스팔트아미드 가교제의 제조 방법은 1) 아스파틱 산(Aspartic Acid)를 촉매 및 술폴란(Sulfolane) 용매 내에서 열 중축합(thermal polycondensation) 반응에 의해 폴리숙신이미드(Polysuccinimide, PSI)를 제조하는 단계; 및 2) 상기 1) 단계의 폴리숙신이미드를 하기 화학식 7 및 화학식 8로 표시되는 화합물과 반응시키는 단계를 포함할 수 있다:
- [0047] [화학식 7]
- [0048] 
- [0049] [화학식 8]
- [0050] 
- [0051] 여기서, R₁은 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같다.
- [0052] 상기 1) 단계는 160 내지 200℃에서 5 내지 10시간 동안 교반하여 반응시키는 것일 수 있다.
- [0053] 상기 1) 단계는 반응 후 생성된 화합물을 메탄올에 침전시키고 여과하는 공정 및 세척하고 건조하는 공정을 추가로 포함할 수 있다.
- [0054] 상기 2) 단계는 2-1) 폴리숙신이미드에 하기 화학식 7으로 표시되는 화합물을 첨가하고, 60 내지 80℃에서 교반하는 단계; 및 2-2) 상기 2-1) 단계의 반응이 완료되고, 하기 화학식 8로 표시되는 화합물을 첨가하고, 60 내지 80℃에서 교반하는 단계를 포함할 수 있다:
- [0055] [화학식 7]
- [0056] 
- [0057] [화학식 8]
- [0058] 
- [0059] 여기서, R₁은 상기 제 1항에서 정의한 바와 같다.
- [0060] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 하이드로 겔은 폴리아스팔트아미드(Polyaspartamide) 가교제를 포함할 수 있다.
- [0061] 상기 하이드로 겔은 폴리아스팔트아미드(Polyaspartamide) 가교제 및 폴리(에틸렌글리콜)디아크릴레이트(Poly(ethylene glycol) diacrylate, PEGDA)의 마이클 첨가(Michael addition)에 의해 결합될 수 있다.
- [0062] 상기 하이드로 겔은 폴리아스팔트아미드(Polyaspartamide) 가교제 및 산화 알지네이트(Oxidized Alginate)의 슈프 염기 형성(Schiff base formation)에 의해 결합될 수 있다.
- [0063] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 약학 조성물은 상기 하이드로 겔 및 약물을 포함하며, 상기 하이드로 겔은 약물을 캡슐화하여 포함하고, 상기 약물의 방출 속도 및 방출 패턴을 조절할 수 있다.
- [0064] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 생의학 소재용 조성물은 상기 하이드로 겔을 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0065] 본 발명은 폴리아스팔트아미드 가교제 및 이의 제조 방법에 관한 것으로, 상기 폴리아스팔트아미드 가교제를 포함하는 하이드로 겔을 제조할 수 있으며, 상기 하이드로 겔은 기계적 성질 및 분해 속도의 조절 가능하다.
- [0066] 또한, 본 발명은 상기 하이드로 겔을 이용하여, 서방성 약물 조절이 가능한 하이드로 겔을 포함하는 약학 조성물을 제공할 수 있고, 상기 하이드로 겔을 포함하는 생의학 소재용 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

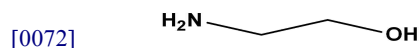
- [0067] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 폴리아스팔트아미드 가교제의 제조 방법에 대한 순서도이다.

- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 합성된 폴리숙신이미드에 관한 $^1\text{H-NMR}$ 결과이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 PHHZA 및 PHEDA의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼 결과이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 DS 값에 따른 PHHZA 및 PHEDA의 FT-IR 스펙트럼 결과이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 TNBS 분석에 따른 PHHZA 및 PHEDA의 DS 변화 결과이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 RGD 펩타이드가 결합된 PHHZA의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼 결과이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 폴리아스팔트가교제의 제조 방법에 관한 것이다.
- 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 다양한 DS 작용기를 갖는 폴리아스팔트아미드-결합 하이드로 겔의 제조에 대한 것이다.
- 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 PHEDA 및 PHHZA의 폴리아스팔트아미드 가교제의 제조 방법에 대한 것이다.
- 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 알지네이트-PHHZA 하이드로 겔의 탄성 계수에 관한 것이다.
- 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 쉬프 염기 형성을 통한 알지네이트-PHEDA 및 알지네이트-PHHZA 하이드로 겔의 제조에 관한 것이다.
- 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 알지네이트-PHEDA 하이드로 겔의 탄성 계수에 관한 것이다.
- 도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이클 첨가를 통한 PEG-PHEDA 및 PEG-PHHZA 하이드로 겔의 제조에 관한 것이다.
- 도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 PEG-PHEDA 하이드로 겔의 탄성 계수에 관한 것이다.
- 도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 PEG-PHEDA 하이드로 겔의 팽윤비에 관한 것이다.
- 도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 알지네이트-PHHZA 하이드로 겔의 시간 경과에 따른 탄성 계수 변화 및 분해 속도 상수에 관한 것이다.
- 도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 PEG-PHEDA 하이드로 겔의 시간 경과에 따른 탄성 계수 변화 및 분해 속도 상수에 관한 것이다.
- 도 18은 본 발명의 일 실시예에 따른 알지네이트-PHHZA 하이드로 겔의 팽윤비에 관한 것이다.
- 도 19는 본 발명의 일 실시예에 따른 알지네이트-PHHZA 하이드로 겔의 약물 방출 실험 결과에 관한 것이다.
- 도 20은 발명의 일 실시예에 따른 PEG-PHEDA 하이드로 겔의 약물 방출 실험 결과에 관한 것이다.
- 도 21은 본 발명의 일 실시예에 따른 RGD-연결된 폴리아스팔트아미드 가교제의 제조에 관한 것이다.
- 도 22는 본 발명의 일 실시예에 따른 하이드로 겔의 세포 배양 결과에 대한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0068] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예에 대하여 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.
- [0070] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 폴리아스팔트아미드 가교제의 제조 방법에 대한 순서도로, 1) 아스파틱 산(Aspartic Acid)를 촉매 및 술폴란(Sulfolane) 용매 내에서 열 중축합(thermal polycondensation) 반응에 의해 폴리숙신이미드(Polysuccinimide, PSI)를 제조하는 단계(S1); 및 2) 상기 1) 단계의 폴리숙신이미드를 하기 화학식 6 및 화학식 7로 표시되는 화합물과 반응시키는 단계(S2)를 포함할 수 있다:

[0071] [화학식 7]

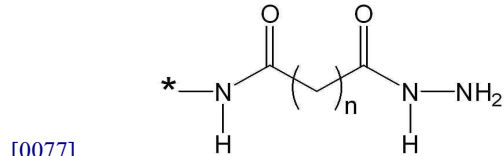


[0073] [화학식 8]

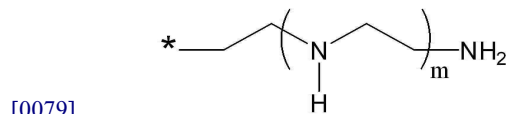


[0075] 여기서, R₁은 하기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 치환기이며,

[0076] [화학식 2]



[0078] [화학식 3]



[0080] *는 결합되는 부분을 의미하며,

[0081] n은 0 내지 4의 정수이며,

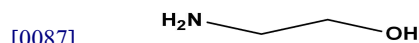
[0082] m은 0 내지 6의 정수이다.

[0083] 상기 S1 단계는 폴리숙신이미드를 제조하는 단계로, 술포란, 아스파틱 산 및 인산(orthophosphoric acid)을 혼합하고, 기계적 교반으로 제조하는 것이다. 상기 교반 공정은 160 내지 200℃에서 5 내지 10시간 동안 교반하여 반응시키는 것으로, 보다 구체적으로 180℃, 7시간 동안 건조 N₂ 하에서 환류시키며 교반하는 것이다. 교반 공정 이후, 생성된 화합물을 메탄올에 침전시키고 여과하는 공정 및 세척하고 건조하는 공정을 진행하여, 폴리숙신이미드(PSI)를 제조할 수 있다.

[0084] 상기 제조된 폴리숙신이미드의 수 평균 분자량(Mn)은 15,000 내지 70,000g/mol이며, 바람직하게는 22,000g/mol이지만, 상기 예시에 국한되지 않는다.

[0085] 상기 S2 단계는 화학식 7 및 화학식 8로 표시되는 화합물과 반응시키는 단계로, 보다 구체적으로, 2-1) 폴리숙신이미드에 하기 화학식 7으로 표시되는 화합물을 첨가하고, 60 내지 80℃에서 교반하는 단계; 및 2-2) 상기 2-1) 단계의 반응이 완료되고, 하기 화학식 8로 표시되는 화합물을 첨가하고, 60 내지 80℃에서 교반하는 단계를 포함할 수 있다:

[0086] [화학식 7]



[0088] [화학식 8]

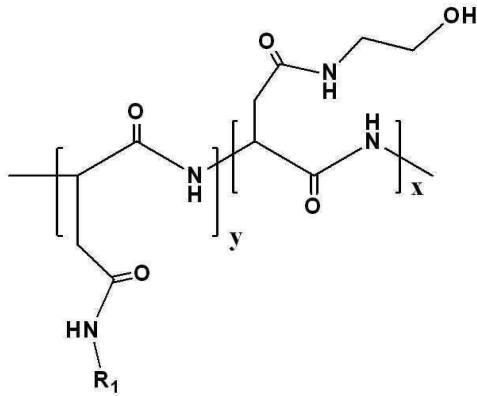


[0090] 즉, 2-1) 단계는 폴리숙신이미드에 화학식 7으로 표시되는 화합물인 에탄올 아민을 첨가하고, 교반하여 하이드록실기를 갖는 폴리아스팔트아미드를 제조한 이후, 화학식 8로 표시되는 화합물인 아디픽 산 디하이드라자이드를 첨가 후 반응시켜 폴리아스팔트아미드 가교제를 제조할 수 있다.

[0091] 상기 화학식 8로 표시되는 화합물은 보다 구체적으로, 에틸렌디아민(ethylenediamine), 디에틸렌트리아민(diethylenetriamine), 트리에틸렌테트라아민(triethylenetetraamine), 테트라에틸렌펜타아민(tetraethylenepentamine), 펜타에틸렌헥사아민(pentaethylenehexamine), 옥살릴 디하이드라지드(Oxalyl Dihydrazide), 말로닉 디하이드라지드(Malonic Dihydrazide), 숙시닉 디하이드라지드(Succinic Dihydrazide), 글루타릭 디하이드라지드(Glutaric Dihydrazide), 아디픽 디하이드라지드(Adipic Dihydrazide), 피멜릭 디하이드라지드(Pimelic Dihydrazide) 및 수베릭 디하이드라지드(Suberic Dihydrazide)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있지만, 상기 예시에 국한되는 것은 아니다.

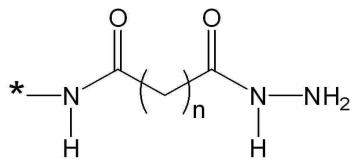
[0092] 상기 제조 방법에 의해 제조된 폴리아스팔트아미드 가교제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물일 수 있다:

[0093] [화학식 1]



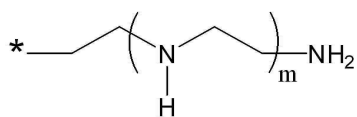
[0094]

[0095] [화학식 2]



[0096]

[0097] [화학식 3]



[0098]

[0099] 여기서,

[0100] x 및 y는 서로 동일하거나 상이하며, x 및 y의 합이 150 내지 700의 정수이며,

[0101] *는 결합되는 부분을 의미하며,

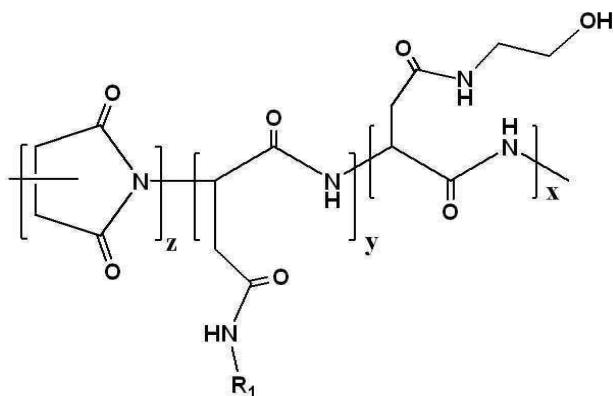
[0102] R1은 상기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 치환기이며,

[0103] n 은 0 내지 4의 정수이며,

[0104] m은 0 내지 6의 정수이다.

[0105] 상기 화학식 1은 하기 화학식 4로 표시되는 화합물을 포함할 수 있다:

[0106] [화학식 4]



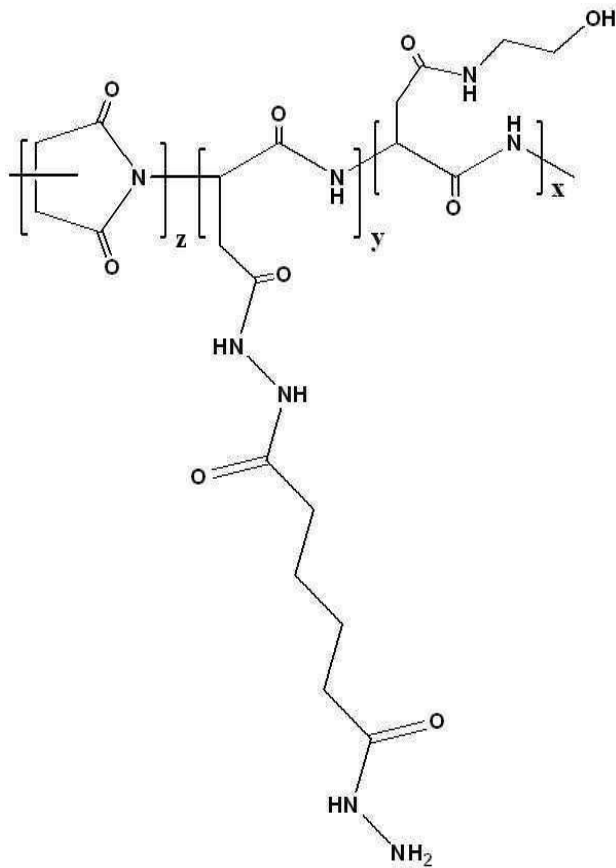
[0107]

[0108] 여기서, R1은 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같으며,

[0109] x , y 및 z 의 합은 150 내지 700의 정수이다.

[0110] 상기 화학식 1은 하기 화학식 5로 표시되는 화합물을 포함할 수 있다:

[0111] [화학식 5]



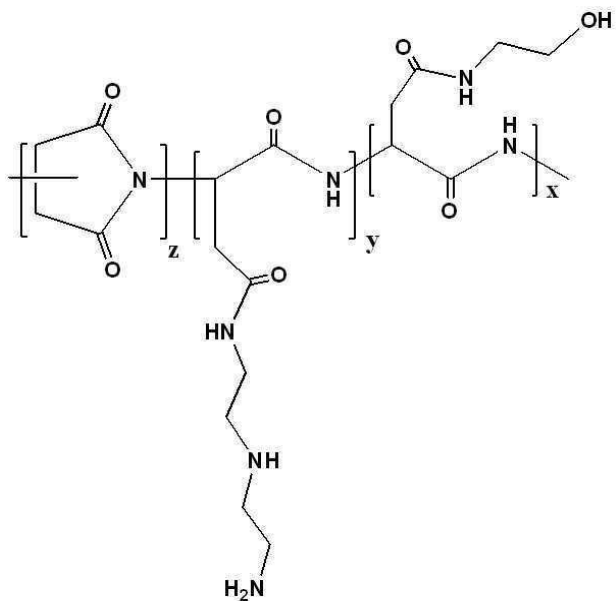
[0112]

[0113] 여기서,

[0114] x , y 및 z 는 상기 화학식 4에서 정의한 바와 같다.

[0115] 상기 화학식 1은 하기 화학식 6으로 표시되는 화합물을 포함할 수 있다:

[0116] [화학식 6]



[0117]

- [0118] 여기서,
- [0119] x , y 및 z 는 상기 화학식 4에서 정의한 바와 같다.
- [0120] 상기 폴리아스팔트아미드 가교제는 폴리에틸렌글리콜 디아크릴레이트(PEGDA) 또는 산화 알지네이트(OAlg)와 반응시켜 하이드로 겔을 제조할 수 있다.
- [0121] 상기 산화 알지네이트는 알긴산 염을 과요오드 산 나트륨으로 부분 산화시켜 알데이트기를 형성시켜 제조할 수 있다.
- [0122] 이렇게 제조된 하이드로 겔은 분해능의 조절이 가능하고, 우수한 기계적 성질을 가짐을 특징으로 한다. 또한, 세포 부착을 위한 생체 활성 분자를 포함할 수 있는 다 기능성 고분자 가교 결합제로 이용될 수 있다.
- [0123] 즉, 폴리숙신이미드로부터 유도체화된 폴리아스팔트아미드는 링-오픈 핵 친핵성 결합(nucleophilic addition)을 통해, 다양한 기능적인 부분을 도입할 수 있다. 상기 폴리아스팔트아미드의 반응성 작용기의 치환도(DS)는 친핵성 반응물의 양을 변화시킴으로써 효율적으로 조절이 가능하다.
- [0124] 본 발명에서는 친핵성 작용기로서 아민 및 하이드라지드를 갖는 2개의 반응물을 통해, PHEDA 및 PHHZA를 제조하였으며, 이들은 생리학적 조건 하에서 가교 결합할 수 있고, 하이드로 겔 형성 중합체에 대해 상이한 반응성을 나타내었다.
- [0125] 본 발명의 하이드로 겔은 전체 중합체의 농도를 유지하면서, DS를 변화시킴에 따라 기계적 성질이 변화되는 것을 통해, 제어가 가능한 것을 특징으로 한다. 또한, PHEDA 및 PHHZA에 의해 가교 결합된 하이드로 겔은 가수 분해에 관여하는 미반응 작용기로 인해 생리적 조건하에서 분해될 수 있다. 이러한 특성을 이용하여, 상기 하이드로 겔의 기계적 성질 저하 거동과 함께 조정하면 캡슐화된 약물 분자의 방출을 제어할 수 있다. 또한, 세포 반응성 펩타이드가 접합된 폴리아스팔트아미드 가교 결합제를 사용함으로써, 세포-배양 지지체로서의 세포-접착성 하이드로 겔을 제조할 수 있다. 이러한 조정 가능한 물리적 및 생물학적 특성의 수집으로 다양한 기능성을 가진 하이드로 겔을 생성할 수 있는 폴리아스팔트아미드계 가교제의 활용 전략은 의약품 전달 및 조직 공학을 포함하지만, 상기의 예시에 국한되지 않고 생체 공학에 성공적으로 적용될 수 있을 것이다.
- [0126] **[실험예 1: 폴리아스팔트아미드 가교제 및 하이드로 겔의 제조]**
- [0127] 폴리숙신이미드의 합성(polysuccinimide, PSI)
- [0128] 술폴란(sulfolane, 80 mL, Junsei Chemical) 내에서 아스파라긴산(aspartic acid, 25g, Sigma Aldrich) 및 인산(orthophosphoric acid, 9.4 mmol, Sigma Aldrich)를 혼합하였고, 기계적 교반과 함께 180 °C에서 7 시간 동안 건조 N_2 하에서 환류시켰다. 반응 중에 형성된 물은 딤-스타크 트랩 (Dean-Stark trap) 을 사용하여 연속적으로 제거하였다. 반응 후, 생성물은 메탄올에 침전시켰다. 조 생성물은 여과하고 탈이온(DI)로, 수회 세척하였고, 진공하에 건조시켜 최종 생성물을 수득하였다.
- [0129] 생성물의 분자 구조를 1H -NMR로 분석 하였다(도 2). 겔투과 크로마토그래피 (gel permeation chromatography, 모델 1200S, 애질런트)에 의해 측정 된 PSI의 수 평균 분자량(M_n)은 22000 g/mol이었다.
- [0130] poly(2-hydroxyethyl-co-hydrazidoadipoyl aspartamide)(PHHZA) 및 poly(2-hydroxyethyl-co-ethylenediaminoethyl aspartamide)(PHEDA)의 합성
- [0131] PSI(0.8 g)를 10 mL의 디메틸포름아미드(DMF)에 용해시켰다. 에탄올아민 (Ethanolamine, 시그마 알드리치)을 먼저 첨가하고 건조 질소 하에서 70 °C에서 밤새 교반하여 히드록실기(폴리(2-하이드록시 에틸아스팔트아미드) (poly(2-hydroxyethyl aspartamide)))를 갖는 폴리아스팔트아미드 (polyaspartamide) 를 처음으로 제조하였다. 그 후, 아디픽 산 디하이드라자이드(adipic acid dihydrazide, Sigma Aldrich)를 혼합물에 첨가하고 70 °C에서 48 시간 동안 계속 반응을 진행시켰다. 아디픽 산 디하이드라지드의 양은 반응하지 않고 남아있는 (remaining unopened) 숙신이미딜고리 (succinimidyl rings) 의 2몰 당량이었다. 혼합물을 탈 이온수로 투석하고 동결 건조하여 생성물을 얻었다. PHHZA의 화학 구조를 ^{13}C -NMR 및 FT-IR로 분석하였다.
- [0132] PHHZA에 대한 하이드라지드(hydrazide)의 치환도(DS)는 반응물의 양을 변화시킴으로써 조절하였다; 에탄올아민 및 아디픽 산 디하이드라지드를 포함한다. PSI 0.8g 당 사용된 에탄올 아민 및 아디픽 산 디하이드라지드의 양은 각각 0.398mL 및 0.575g(DS1); 0.348mL 및 0.862g(DS2); 0.299mL 및 1.149g(DS3); 및 0.248mL 및 1.437g (DS4)이다. PHHZA의 하이드라지드기의 DS는 ^{13}C -NMR 스펙트럼으로부터의 피크 적분 비를 비

교하고 FT-IR 스펙트럼에서 특징적인 피크를 확인함으로써 확인되었다(도 3 및 하기 표 1 참조).

표 1

	Hydroxyl peaks (g, f)	Hydrazidyl peaks (d, e)	DS(%)
DS1	1	0.13	5.5
DS2	1	0.25	10
DS3	1	0.38	14
DS4	1	0.56	18

poly(2-hydroxyethyl-co-ethylenediaminoethyl aspartamide)(PHEDA)의 합성은 PHHZA와 동일한 절차에 따라 수행되었지만, 디에틸렌트리아민(diethylenetriamine, Sigma Aldrich) 및 DMSO가 아디픽 산 디하이드라지드 및 DMF 대신 폴리아스팔트아미드(polyaspartamide)에 아민기를 제공하는 반응물로 사용되었다. PHEDA의 아민기 DS는 ^{13}C -NMR 스펙트럼 및 FT-IR 스펙트럼(도 4 및 표 2)에 의해 유사하게 확인되었다.

표 2

	Hydroxyl peaks (c, f)	Hydrazidyl peaks (h, h, e, e')	DS(%)
DS1	1	0.06	6
DS2	1	0.11	10
DS3	1	0.21	17
DS4	1	0.34	25

PHHZA 및 PHEDA의 DS 변화는 아민 및 관련 작용기의 양을 측정하는 TNBS(colorimetric trinitrobenzene sulfonic acid) 분석을 이용하여 확인하였다(도 5).

0.300 mL의 TNBS 작업 용액(0.1 % TNBS, 4 % NaHCO_3 , pH 8.5)을 PHAZA 또는 PHEDA 시료 0.300 mL에 넣고 2 시간 동안 37°C에서 반응시켰다. 반응 후, 0.3 M의 1M HCl을 첨가하였다. 분광 광도계(Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 335 nm에서 4개의 0.200 mL 샘플까지의 흡광도를 측정하고 평균을 구했다.

펩타이드가 결합된 PHHZA는 먼저 세포 부착을 촉진하기 위해 널리 사용되는 GRGDS 펩타이드('RGD peptide')를 70°C에서 6 시간 동안 PSI와 반응시킨 다음 위에서 설명한대로 아디픽 산 디하이드라지드(adipic acid dihydrazide) 및 에탄올아민과 반응시켰다.

여기서, PSI의 숙신이미딜 고리(succinimidyl rings)에 대한 RGD 펩타이드의 몰 공급비는 0.03이었다. PHHZA 상의 RGD 펩타이드의 존재는 ^{13}C -NMR 스펙트럼에 의해 분석되었다(도 6).

PHHZA- 및 PHEDA-결합된 하이드로 겔의 제조

폴리(에틸렌 글리콜) 디아크릴레이트(Poly(ethylene glycol) diacrylate, PEGDA, 분자량 700, 시그마 알드리치) 또는 산화 알지네이트(oxidized alginate, OAlg)를 PHHZA 또는 PHEDA와 반응시켜 하이드로 겔을 제조하였다. OAlg는 알긴산염(alginate)을 과요오드산 나트륨(sodium periodate, Sigma Aldrich)으로 부분 산화시켜, 알데히드 그룹을 생성하여 제조하였다. PEGDA 또는 OAlg 및 0.1M 인산 나트륨 완충액(pH 8.0)에 용해된 PHAZA 또는 PHEDA의 스톡 용액을 다양한 비율로 혼합하고, 혼합물을 커스텀 금형에 넣고 37 °C에서 2 시간 동안 반응시켜 하이드로 겔을 제조하였다.

하이드로 겔 디스크(직경 5mm, 두께 1mm)를 잘라내어 특징화하기 전에 PBS에서 하루 동안 배양하였다.

폴리아스팔트아미드 가교제의 합성

폴리숙신이미드(PSI)는 촉매제인 인산 및 용매인 술포란을 사용하여 아스팔트 산의 열 중축합(thermal polycondensation)에 의해 합성하였다(도 2 및 도 7).

PSI 주사슬은 아민 기질 분자와 친핵성 치환 반응을 일으킬 수 있는 숙신이미딜 고리 구조로 이루어져 폴리아스팔트아미드(polyaspartamide)를 형성하였다.

[0148] 따라서, 특정 겔 형성 단량체 또는 거대 단량체와 반응 할 수있는 관능기를 함유하는 아민계 친핵체와 컨쥬게이트된 폴리아스팔트아미드 주사슬은 하이드로 겔을 제조하기 위한 중합체 가교제로서 이용 될 수 있다.

[0149] 또한, 폴리아스팔트아미드 주사슬상의 반응성 작용기 수는 PSI에 대한 친핵체의 몰 공급 비율을 조정함으로써 간단히 제어될 수 있다. 폴리아스팔트아미드 가교제의 조절 가능한 다가 결합으로 농도를 변화시키지 않고 고분자 네트워크의 가교 결합 밀도를 조절할 수 있다(도 8).

[0150] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 두 가지 유형의 폴리아스팔트아미드 가교제를 포함한다; poly(2-hydroxyethyl-co-hydrazidoadipoyl aspartamide)(PHHZA) 및 아민 함유 poly(2-hydroxyethyl-co-ethylenediaminoethyl aspartamide)(PHEDA)이다. 두 작용기 모두 생리학적 조건에서 슈프트 염기 형성 (Schiff base formation) 및 마이클 첨가 (Michael addition) 와 같은 친핵성 반응으로 하이드로 겔을 형성 할 수 있다. PHHZA를 합성하기 위해, PSI를 2-에탄올아민과 반응시켜 수 용해성을 위한 하이드록실 기를 생성하고, 이어, 아디픽산 디하이드라지드를 사용하여, 하이드라지드기를 생성하였다(도 9).

[0151] 숙신이미딜 고리와 하이드라지드에 대한 관능기의 결합을 백분율로서 정의한 치환도(DS)는 ¹³C-NMR 스펙트럼에서 하이드록실 대 히드라지드의 피크 적분 비로 확인된 5.5 내지 18 %로 조절하였다(도 3).

[0152] 유사하게 PHEDA는 폴리아스팔트아미드(도 9)에 아민 그룹을 나타내기 위해 친 핵체로서 디에틸렌트리아민을 갖는 PSI로부터 합성되었다. ¹³C-NMR 스펙트럼으로부터 얻은 PHEDA 아민기의 DS는 6에서 25 %로 조절되었다(도 3).

[실험예 2: 하이드로겔의 물리적 특성 등의 평가 실험]

하이드로겔의 기계적 및 팽창 특성의 평가

[0155] 하이드로 겔의 기계적 성질은 단축 압축 실험 (uniaxial compression experiments) 으로부터 얻은 응력-변형률 관계로부터 탄성 계수를 계산하여 평가하였다. 하이드로 겔 디스크는 1 mm min⁻¹(모델 3343, Instron®)에서 단축 압축시켰으며, 응력-변형률 곡선을 얻었다. 탄성 계수는 곡선이 선형(탄성 영역)으로 남아있는 처음 10% 변형에서의 응력-변형률 곡선의 기울기로서 계산하였다.

[0156] 하이드로 겔 분해는 시간 경과에 따른 탄성 계수의 변화를 측정함으로써 모니터링하였다.

[0157] 하이드로 겔 디스크를 37 °C에서 PBS로 배양하고, 다양한 시점에서 상기 하이드로 겔의 탄성 계수를 상기 한 바와 같이 완전 용해 될 때까지 단축 압축에 의해 측정하였다. 하이드로 겔의 분해 속도(kd)는 탄성 계수 대 시간 프로파일의 분율 변화를 다음의 지수 감소 모델과 일치시킴으로써 결정하였으며,

$$\frac{E_t}{E_0} = e^{-k_d t} \quad (1)$$

[0158]

[0159] 여기서 E_t는 시간 t에서 측정 된 계수이고, E₀는 초기 탄성 계수이다. 슈프 염기 (Schiff base) 를 통해 연결된 하이드로 겔의 경우, 대조군으로써 시프 염기를 비가수 분해성 형태로 환원시키기 위해 0.1M 소듐 시아노보로 하이드라이드(sodium cyanoborohydride, 시그마 알드리치)로 처리한 하이드로 겔을 사용하였다.

[0160] 하이드로 겔의 팽윤비는 동결 건조에 의해 얻어진 팽창된 하이드로 겔 (WS) 및 건조된 중합체 메쉬(WD)의 질량비로서 계산하였다. 실온에서 24시간 동안 비드를 PBS에서 배양한 후 WS를 측정하고 동결 건조에 의해 비드를 건조시킨 후 WD를 측정하였다.

하이드로겔의 약물 방출에 대한 평가

[0162] 다양한 하이드로 겔의 약물 방출 프로파일을 측정하여 그 투과성을 평가 하였다. 하이드로 겔 제조 전에 전구체 용액에 5mg mL⁻¹의 FITC-BSA (fluorescein isothiocyanate-conjugated bovine serum albumin, Thermo Fisher) 을 용해시켜 하이드로 겔에 캡슐화하였다. 하이드로 겔(직경 8mm, 두께 1mm)을 37 °C에서 PBS로 배양하고, 마이크로 플레이트 분광 형광 측정기(Synergy HTX, BioTek)를 사용하여 형광 강도를 검출함으로써 다양한 시간에 FITC-BSA의 방출량을 측정하였다. 누적 된 약물 방출 프로파일은 다음의 두 모델로 결정하였다.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 \cdot t^n \quad (2)$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - e^{-k_2(t-T)^b} \quad (3)$$

[0163]

[0164]

[0165] 여기서 M_t 는 시간 t 일때까지 방출되는 약물의 양이고, M_∞ 는 하이드로 겔에서 약물의 총량, k_1 및 k_2 는 운동 속도 상수, T 는 지연 시간 상수, n 과 b 는 방출 메커니즘과 관련된 지수이다.

[0166] Ritger-Peppas모델(식 (2))은 power-law 시간 의존성일 때 사용하였고, Weibull 모델(식 (3))은 sigmoidal 시간 의존성일 때 사용하였다.

[0167] 하이드로 겔의 세포 배양에 대한 평가

[0168] RGD-결합된 PHHZA 및 PHEDA를 각각 알지네이트 하이드로 겔 및 PEGDA 하이드로 겔에 접합시키고, 3T3 섬유 아세포(fibroblast)를 하이드로 겔상에서 배양하여 폴리아스파르타미드(polyaspartamide) 링커를 통해 RGD 펩타이드의 접합을 확인하였다.

[0169] $200\mu\text{L}$ 의 RGD-PHHZA 수용액(3 중량 %)을 유리 슬라이드 상에 코팅하고 밤새 건조시켰다. 산화 알지네이트(10 %)와 아디픽 디하이드라지드(10 %)를 2:1의 비율로 혼합한 후 RGD-PHHZA 코팅 유리 위에 놓고 하이드로 겔 형성을 위해 37°C 에서 밤새 반응시켰다.

[0170] 하이드로 겔(직경 8mm, 두께 1mm)을 PBS로 수회 세척하고, 배양 배지 (Thermo Fisher에서 구입 한 10 % 소 태아 혈청 (fetal bovine serum) 및 1 % 페니실린/스트렙토마이신 (penicillin/streptomycin) 이 첨가된 Dulbecco 's Modified Eagle Medium)을 하이드로 겔에 넣고 37°C 에서 5% CO_2 하에서 1 일간 배양하여 세포를 부착하였다. PBS로 세척한 후, 신선한 배지를 공급하고 세포 배양을 계속 하였다. 세포를 시각화하고 그 생존력을 평가하기 위해, 세포를 calcein-AM 및 ethidium homodimer-1로 처리하여 각각 살아있는(녹색 형광) 및 죽은(적색 형광) 세포(LIVE / DEAD® 생존 능력 / 세포 독성 키트, Thermo Fisher)로 나타내었다. 그런 다음 형광 현미경을 사용하여 세포 (XDS-3FL, Optika)를 시각화하였다.

[0171] [실험예 3: 폴리아스파르타미드-결합된 하이드로겔의 기계적 물성 등의 평가 결과]

[0172] 쉬프 염기 형성

[0173] 폴리머 주사슬에 여러 개의 알데히드 그룹을 포함하고 있는 산화 알지네이트는 쉬프염기(Schiff base) 형성을 통해 하이드로 겔 제조를 위한 고분자 단량체(macromers 혹은 macromonomers)로 사용하였다(도 11). 산화된 알긴산 염의 농도는 5 % (w / v)로 일정하게 유지하고, PHHZA의 농도는 5 내지 10 %로 변화시켜 하이드로 겔을 제조 하였다.

[0174] 겔화는 2 개의 스톡 용액(stock solutions)의 혼합 후 약 5 분 후에 일어났으며 이는 주어진 농도 범위에서 쉬프 염기 형성의 정도가 하이드로 겔 제조에 충분하다는 것을 나타냈다.

[0175] 알지네이트-PHHZA 하이드로 겔의 모듈러스는 PHHZA의 DS로 증가하였고, 모듈러스의 범위는 예상대로 PHHZA 농도에 따라 더 커졌다. 10 % PHHZA의 경우 0.5 내지 72 kPa; 7.5 % PHHZA의 경우 0.3 내지 24 kPa; 5 % PHHZA의 경우 2 내지 12 kPa이다(도 10).

[0176] 반면에 팽윤비는 DS와 PHHZA의 농도에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 가교 밀도를 증가시키면 고무-탄성 이론(rubber-elasticity theory)에 의해 요약된 바와 같이 하이드로 겔의 투과율이 제한된다.

[0177] 이 결과는 PHHZA에서 증가된 수의 반응성 작용기가 산화 알기네이트의 가교 결합에 충분히 참여하여 증가된 하이드로 겔 강성을 유도한다는 것을 명확하게 입증하였다.

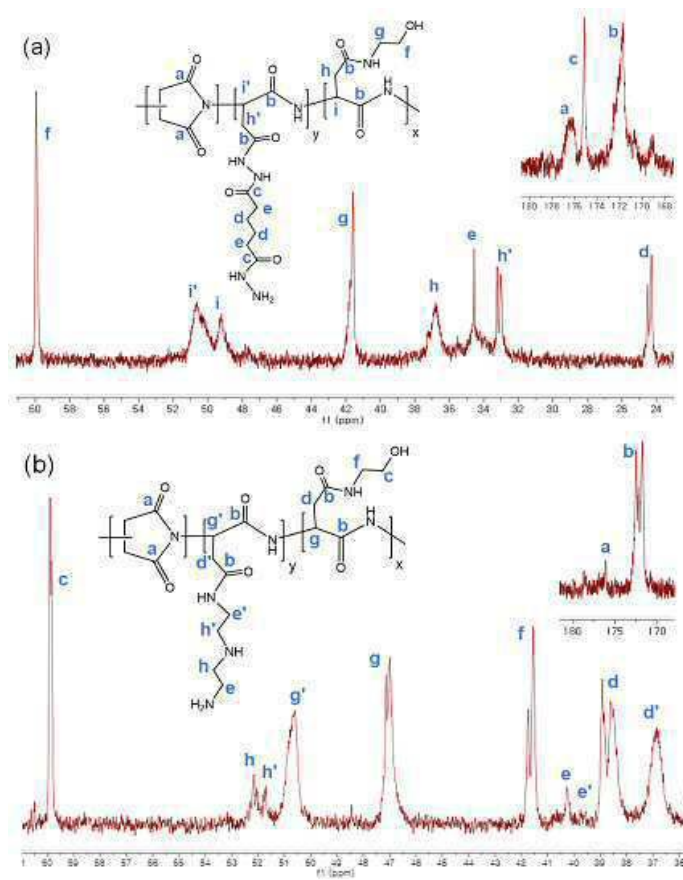
[0178] 또한 가교 결합 반응을 통해 하이드로겔 제작에 필요한 반응성 작용기의 최저 임계수에 해당하는 PHHZA의 DS는 PHHZA 농도가 감소함에 따라 더 높아졌다(PHHZA 10 %에 대한 DS1, PHHZA 7.5 %에 대한 DS2, 5 % PHHZA에 대한 DS3).

- [0179] PHEDA는 또한 산화 알지네이트를 가교 결합시켜 하이드로 겔을 형성하는 데 사용되었다(도 11). PHHZA 결합 하이드로 겔과는 몇 가지 주목할만한 차이가 있다.
- [0180] 첫째, 알지네이트-PEDA 하이드로 겔에 대한 겔화 속도는 알긴산 염-PHHZ 하이드로 겔보다 훨씬 높았다 (실온에서 5 초 이내).
- [0181] 둘째, 이들의 탄성 계수는 농도와 DS의 동일한 범위에서 더 컸다(도 12).
- [0182] 셋째, 가장 낮은 DS (DS1)를 갖는 PHEDA는 동일한 농도 범위에서 하이드로 겔을 형성 할 수 있었지만, PHHZA에 대한 농도가 감소함에 따라 겔화를 위한 가장 중요한 임계 DS는 더 높아졌다.
- [0183] 이러한 결과는 높은 친핵성으로 인해 PHEDA의 1 차 아민 그룹에 의한 슈프 염기(Schiff base) 반응이 PHEDA의 하이드라지드 그룹보다 더 쉽다는 것을 의미한다.
- [0184] 결과적으로, 동일한 DS 및 농도에서보다 단단한 하이드로 겔이 형성된다. 종합하여 볼 때, 이러한 결과는 슈프 염기 형성을 통해 폴리아스팔트아미드 가교제에 의해 가교 결합된 하이드로 겔의 기계적 성질이 넓은 범위에서 조절될 수 있음을 의미한다고 할 것이다.
- [0185] 마이클 첨가
- [0186] 하이드로 겔 제조를 위해 널리 사용되는 PEGDA(poly(ethylene glycol) diacrylate)를 사용하여 Michael 첨가를 통해 하이드로 겔의 가교제로 PHHZA 또는 PHEDA의 실현 가능성을 확인하였다(도 13).
- [0187] PEGDA 농도는 PHEDA 및 PHHZA의 농도를 변화시키면서 20%(w/v)로 일정하게 유지하였다.
- [0188] 슈프 염기 형성을 통한 알지네이트 하이드로 겔과 유사하게, PEGDA는 또한 PHEDA에 의해 쉽게 가교 결합하였다. 반응은 5 분 이내에 겔화가 발생하면서 쉽게 일어났다. 계수는 또한 DS와 PHEDA의 농도에 따라 증가하였다; 10 % PHEDA의 경우 2-565 kPa, 7.5 % PHEDA의 경우 0.3-70 kPa, 5 % PHEDA의 경우 2 kPa (도 14)이다. 팽윤비는 또한 DS와 PHEDA의 농도에 따라 감소하였다(도 15). PHEDA 농도가 감소하는 PEG-PHEDA 하이드로 겔의 탄성 계수 감소는 알지네이트-PHEDA 하이드로 겔보다 훨씬 가파르다는 것을 확인하였다. 산화 알긴산 염과 PEGDA 사이의 반응 동역학 및 물리적 성질의 명백한 차이 외에도, 두 개의 작용기만 갖는 PEGDA의 가교 결합은 산화 알긴산 염과 비교하여 PHEDA의 농도 변화에 보다 민감 할 수 있다. 다수의 작용기를 갖는 화합물은 보다 낮은 농도에서 가교 반응이 일어날 수 있다. PEGDA와의 PHEDA 반응과 달리, PHHZA와 PEGDA 사이의 반응은 동일한 농도 범위(5-10%)에서 하이드로 겔 형성을 초래하지 않았다.
- [0189] 농도를 20%까지 증가시키면 점도는 약간 증가하지만 하이드로 겔 형성을 유발하지는 않는다. 1차 아민에 비해 하이드라지드의 낮은 친핵성을 고려할 때 PHHZA의 하이드라지드와 PEGDA의 아크릴레이트 사이의 마이클 첨가 반응 정도는 주어진 조건에서 하이드로 겔 형성에 충분하지 않다.
- [0190] 폴리아스팔트아미드-결합된 하이드로 겔의 분해
- [0191] 가수 분해 가능한 그룹을 함유하는 폴리아민-기반 하이드로 겔은 아민 그룹의 양성자화 및/또는 에스테르기의 미반응 아민 그룹의 친핵성 공격으로 인해 증가된 국부 하이드록사이드(hydroxide) 이온으로 인해 가속 분해 프로세스를 거칠 수 있다. PHEDA 및 PHHZA는 하이드로 겔 형성 후 미반응인 상태의 여러 친핵성 아민 및 하이드라지드기 및 가수 분해성 그룹을 함유하는 하이드로 겔을 포함하므로 하이드로 겔이 가수 분해를 통해 분해 될 수 있다고 가정하였다.
- [0192] 하이드로 겔을 37°C PBS(pH 7.4)에서 배양한 다음, 분해가 완전히 될 때까지 시간의 경과에 따른 탄성 계수의 변화를 측정함으로써 모니터링 하였다. 분해 속도 상수(k_d)는 식 (1)을 사용하여 프로파일을 맞춰 계산하였다.
- $$\frac{E_t}{E_0} = e^{-k_d t} \quad (1)$$
- [0193]
- [0194] PHHZA 또는 PHEDA에 의해 연결된 알지네이트 하이드로 겔은 미반응 하이드라지드 또는 아민에 의해 염기성 환경에서 가수 분해 될 수 있는 슈프(Schiff) 염기 연결을 포함한다. 알지네이트-PHHZA 하이드로 겔의 경우, 더 높은 DS 및 PHHZA 농도를 갖는 것들은 더 낮은 분해 속도 및 지연된 용해를 나타내었고, 더 큰 기계적 강도를 갖는 하이드로 겔이 분해에 대한 보다 큰 내구성을 나타냈다(도 16).

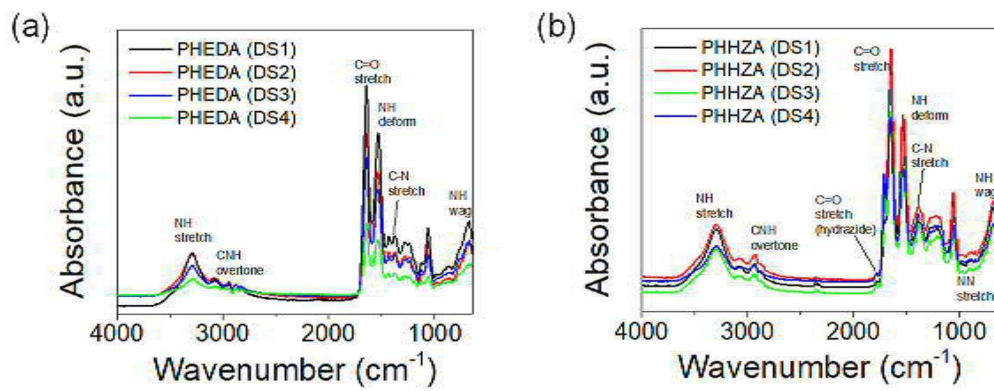
- [0195] 유사한 초기 탄성 계수를 가진 10% (DS3) 및 7.5% (DS4)의 두 조건 사이에서, 분해 속도는 10% (DS3)보다 높았다. 유사하게, 7.5% (DS3)의 분해율은 5% (DS4)의 분해율보다 높았다. 이러한 결과는보다 높은 PHHZA 농도에서 반응하지 않은 하이드라지드가 더 많이 존재함을 의미하며, 증가된 가수 분해를 통해 하이드로 겔 분해를 촉진할 가능성이 높다.
- [0196] 한편으로, 알지네이트-PEDA 하이드로 겔의 분해는 조건에 관계없이 매우 빠르며, 1 시간 이내에 완전히 용해되었다. PHEDA에서 반응하지 않은 1차 아민 그룹은 PHEDA에서 하이드라지드보다 훨씬 더 빨리 쉬프 염기의 가수 분해 과정을 유도하였다.
- [0197] 대조군으로서, 하이드로 겔을 소듐 시아노보로하이드라이드(sodium cyanoborohydride)로 처리하여 쉬프 염기를 비가수성 2차 아민 그룹으로 감소시키고 분해를 모니터링 하였다. 예상 한 바와 같이, 모든 하이드로 겔은 동일한 수성 매질에서 안정한 상태를 유지하며, 쉬프 염기 연결기의 가수 분해를 통해 분해가 일어났다는 것을 입증하였다.
- [0198] PEG-PHEDA 하이드로 겔의 분해는 알긴산 염-PHHZ 하이드로 겔과 유사한 추세를 따랐다. 주어진 DS에서 더 높은 PHEDA 농도에서 더 낮은 분해율을 나타내었다. 알지네이트-PHHZA 하이드로 겔과는 달리, 초기 탄성 계수의 범위가 광범위함에도 불구하고, DS의 차이만큼 저하 속도는 크게 영향을 받지 않았다. 또한 PEG-PHEDA 하이드로 겔의 분해 속도는 초기 탄성 계수가 훨씬 더 컸지만 일반적으로 각각의 DS 및 농도에서 알긴산 염-PHHZ 하이드로 겔의 분해 속도보다 높았다. PEG-PHEDA 하이드로 겔의 극도로 빠른 분해와 함께, PHEDA의 미반응 1차 아민 그룹이 PHHZA의 하이드라지드보다 쉬프 염기 또는 에스테르 그룹의 가수 분해를 더 빨리 촉진 할 수 있다.
- [0199] 폴리아스팔트아미드-결합된 하이드로겔의 약물 방출 효과
- [0200] 기계적 성질 및 확산 특성을 제어 할 뿐만 아니라 분해를 유도하는 능력으로, 폴리아스팔트아미드-연결된 하이드로 겔을 제어된 약물 전달 용도에 대해 평가하였다. 모델 단백질 약물인 소 혈청 알부민(Bovine serum albumin, BSA)을 다양한 DS와 농도로 PHHZA 또는 PHEDA 결합 하이드로 겔에 캡슐화하고 시간에 따른 방출 프로파일을 확인하였다.
- [0201] 알지네이트-PHHZA 하이드로 겔의 방출 프로파일은 시간에 대한 지수 함수 의존성을 갖는 전형적인 확산 제어 방출을 보였다(그림 5a).
- [0202] Ritger-Peppas 모델로 프로파일을 맞추어 얻은 운동 속도 상수(k_1) (식 (2)), 도 17에서 보인 팽창 비율의 추세에 밀접하게 뒤따랐는데, 예상대로, 이 값은 DS 및 PHHZA의 농도에 의해 작아진다(도 18(b)).
- $$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 \cdot t^n \quad (4)$$
- [0203]
- [0204] 이 결과는 보다 팽윤성인 하이드로 겔에서 약물 방출이 더욱 촉진된다는 것을 의미한다. 또한, 지수 값(n)은 모든 조건에서 0.3 내지 0.4 사이에 있었고, 방출은 Fickian 확산 메커니즘을 따랐음을 확인하였다(도 18(c)).
- [0205] 알지네이트-PHHZA 하이드로 겔과는 달리, PEG-PHEDA 하이드로 겔로부터의 약물 방출은 시그모이달(sigmoidal) 방출 프로파일을 나타내며, 확산 제어 시스템에서 통상적으로 발견되는 전형적인 초기 방출 방출보다 약물 방출 속도가 점진적으로 증가 하였다(도 5d). PEG-PHEDA 하이드로 겔은 알지네이트-PHHZA 하이드로 겔보다 더 빠른 분해 속도를 나타내기 때문에, PEG-PHEDA 하이드로 겔의 약물 방출에 대한 분해가 알긴산-PHHZA 하이드로 겔보다 더 중요한 요인으로 작용하였다. 따라서 시그모이달 프로파일을 맞추는데 더 적합한 Weibull 모델(식 (3))을 사용하여 방출 속도 상수(k_2)와 지연 시간 상수(T)를 생성하는 PEG-PHEDA 하이드로 겔의 방출 프로파일을 맞추었다.
- [0206] 알지네이트-PHHZA 하이드로 겔에 대한 k_1 값과 유사한 k_2 값은 DS 및 PHEDA 농도에 따라 더 작아졌다(도 19(e)). 50 % 방출에 필요한 시간의 양을 나타내는 T 값의 추세는 방출 지연을 의미하며, 상기 예상되는 T 값은 k_2 값과 반대이며 DS 및 PHEDA 농도가 클수록 커지게 되었다(도 19(f)).
- [0207] 결과적으로, 약물 방출 속도 및 방출 패턴은 가교 결합 밀도가 상이한 폴리아스팔트아미드-결합 하이드로 겔을 사용하여 조절할 수 있다.

- [0208] 세포-부착 펩타이드 결합된 폴리아스팔트아미드 하이드로겔의 체외(In vitro) 세포 배양 평가
- [0209] 용이한 개환 친핵성 첨가를 통해 중합체 주사슬에 다양한 아민계 분자를 도입 할 수있는 능력은 폴리아스팔트아미드 가교제의 특징이다. 이러한 측면은 가교 결합 반응과 관련된 부분 이외의 부분에서 반응이 일어날 수 있음을 의미한다. 폴리아스팔트아미드 가교제의 이러한 다양성은 PHHZA 또는 PHEDA 상에 세포 부착 펩타이드(즉, RGD 펩타이드)를 접합시킴으로써 추가로 확인하였다. 이 링커를 사용하여, 생성된 펩타이드-접합된 하이드로 겔을 세포 배양 플랫폼으로 사용할 수 있다.
- [0210] 상기 RGD 펩타이드-접합된 폴리아스팔트아미드는 히드록실 및 반응성 작용기의 접합 전에 PSI와 펩타이드를 우선 반응시킴으로써 편리하게 합성되었다(도 20).
- [0211] RGD 펩타이드 결합 PHHZA('RGD-PHHZA')를 알지네이트 하이드로 겔에 접합시켜 하이드로 겔에 세포 접착을 허용하는 능력을 평가하였다 (도 20).
- [0212] RGD-PHHZA를 하이드로 겔 표면에 결합시키기 위해 알긴산 염 하이드로 겔을 RGD-PHHZA 코팅 표면 위에 제조하였다. 그 다음, 3T3 섬유 모세포를 하이드로 겔 상단에 놓고 하이드로 겔 제조 후에 접착시켰다. 순수한 알지네이트 하이드로 겔 및 PHHZA-연결된 알지네이트 하이드로 겔(펩타이드 없이)을 대조군으로 사용하였다. 오직 순수한 알지네이트가 세포 특이적인 부분(도 21)을 포함하지 않기 때문에 예상되는 원형 형태로 판단할 때 비특이적인 상호 작용을 통해 알지네이트 하이드로 겔에 소수의 세포만이 부착되었다. PHHZA-알지네이트 하이드로 겔에는 PHHZA 하이드로 겔보다 더 많은 세포 접착 및 퍼짐이 있었는데, 이는 PHHZA에서 정전기 상호 작용에 의한 미반응 아민 그룹의 일부 세포 때문일 가능성이 높다. 이는 세포 접착 물질로서 폴리(L- 라이신)과 유사한 메커니즘이다.
- [0213] 그러나 이 두 조건에 비해 RGD-PHHZA-알지네이트 하이드로 겔의 생존 세포 수는 훨씬 높았으며 RGD 특이적 세포 부착이 세포 생존력을 더욱 촉진한다는 것을 알 수 있다. 또한, 배양 3일 후에 다른 조건보다 RGD-PHHZA-알지네이트 하이드로 겔에 훨씬 많은 세포가 존재했으며, 이는 특정 세포 부착이 더 큰 세포 증식을 일으킨다는 것을 보여 주었다(도 21). RGD-PHEDA 대신에 RGD-PHEDA와 연결된 알지네이트 하이드로 겔에서 동일한 시험 관내 실험을 수행하였다. 예상대로 순수한 알지 네이트 하이드로 겔 및 PHEDA-알지네이트 하이드로 겔보다 RGD-PHEDA-알지네이트 하이드로 겔에 더 많은 세포가 부착된 결과를 확인하였다.
- [0214] 이러한 결과는 하이드로 겔의 기계적 성질을 조절하는 것과 함께 세포 반응성 부분을 제공함으로써 폴리아스팔트아미드 가교제의 다양성을 의미한다.
- [0215] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.

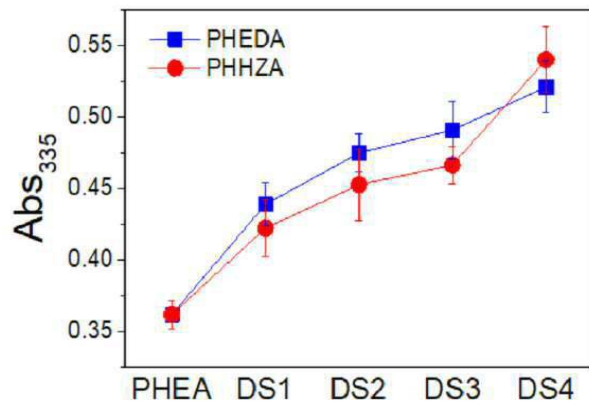
도면3



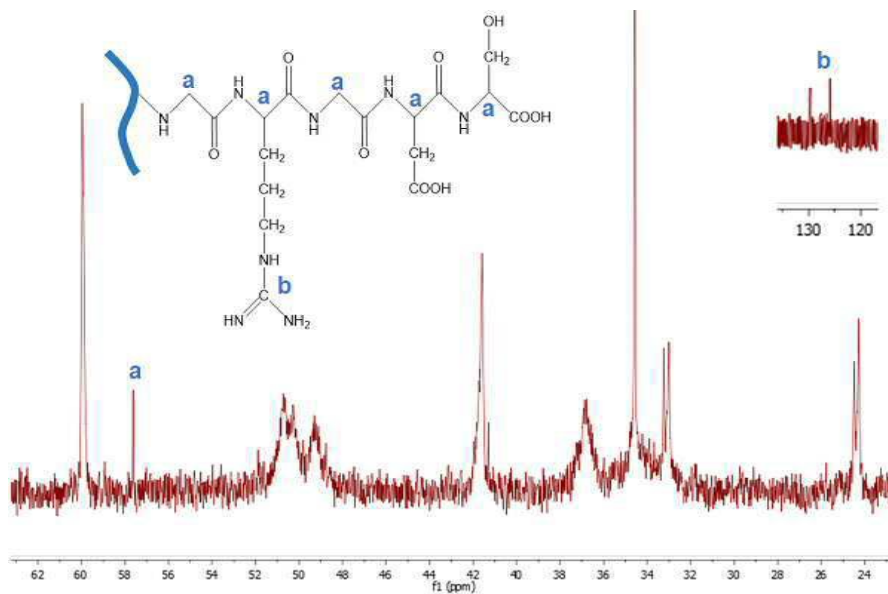
도면4



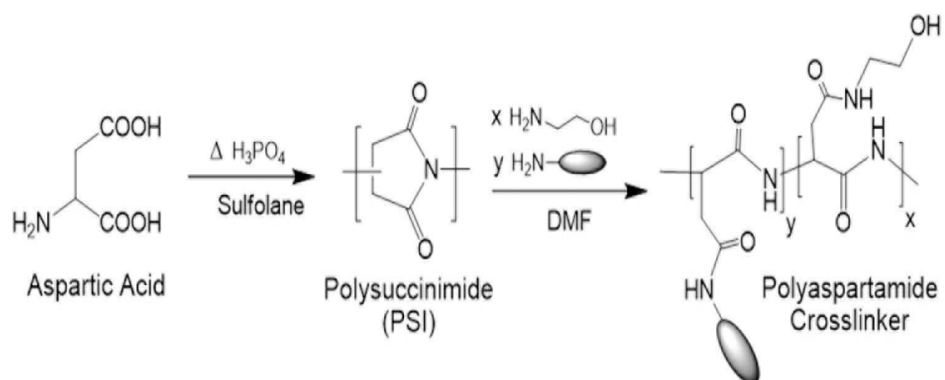
도면5



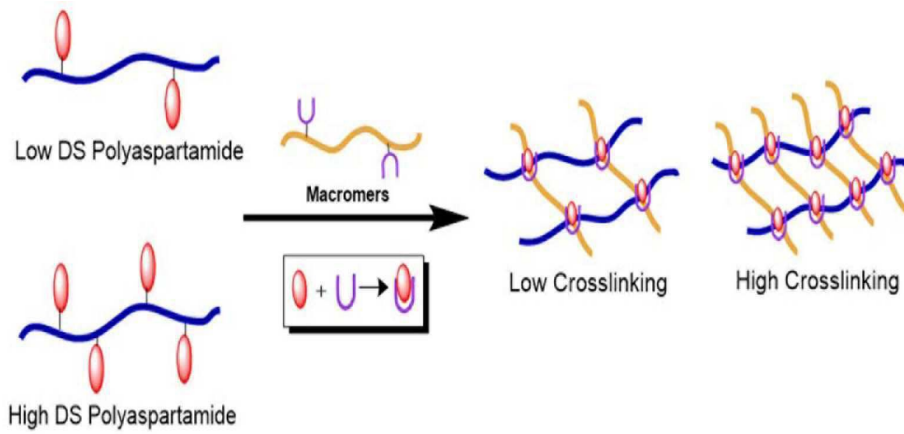
도면6



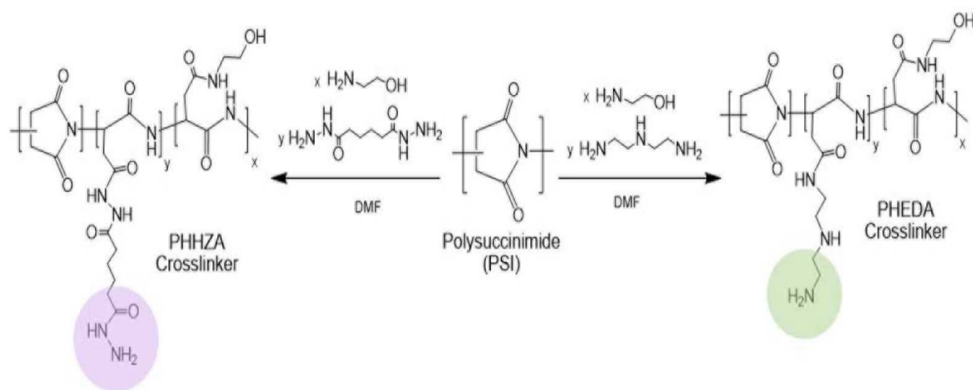
도면7



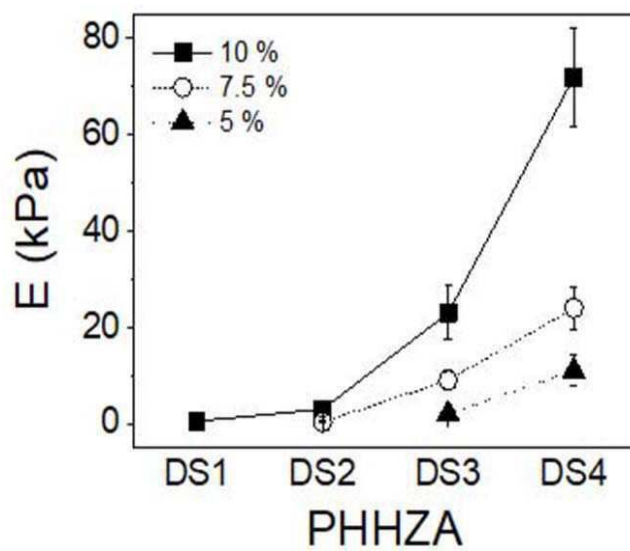
도면8



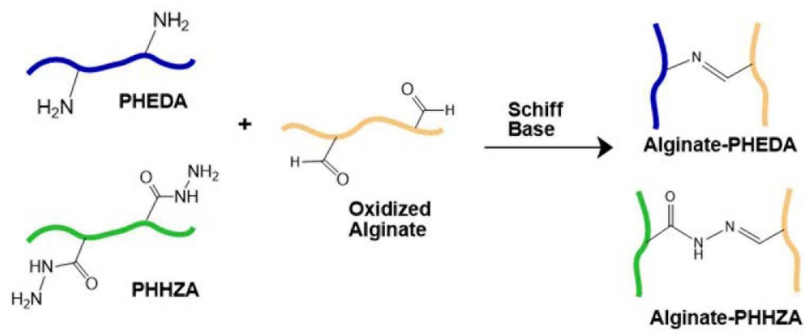
도면9



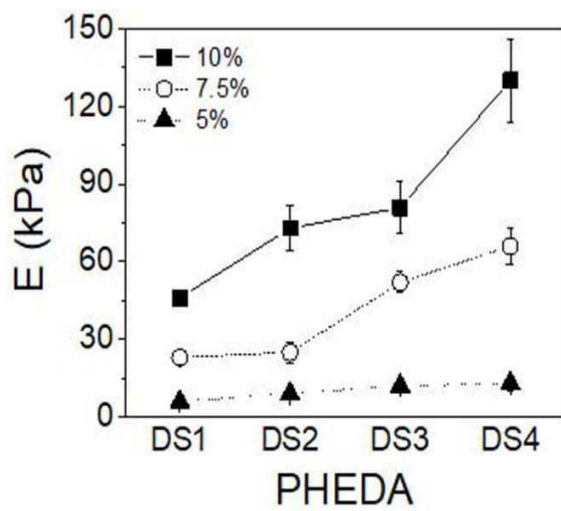
도면10



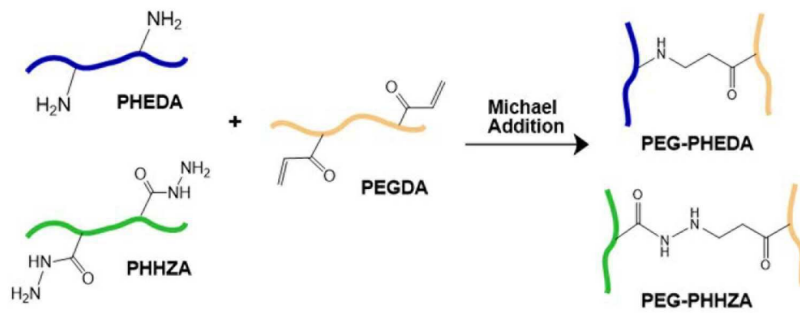
도면11



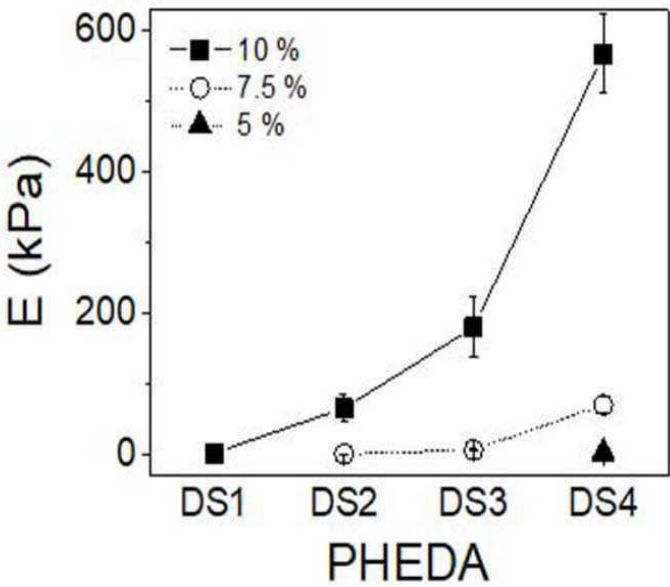
도면12



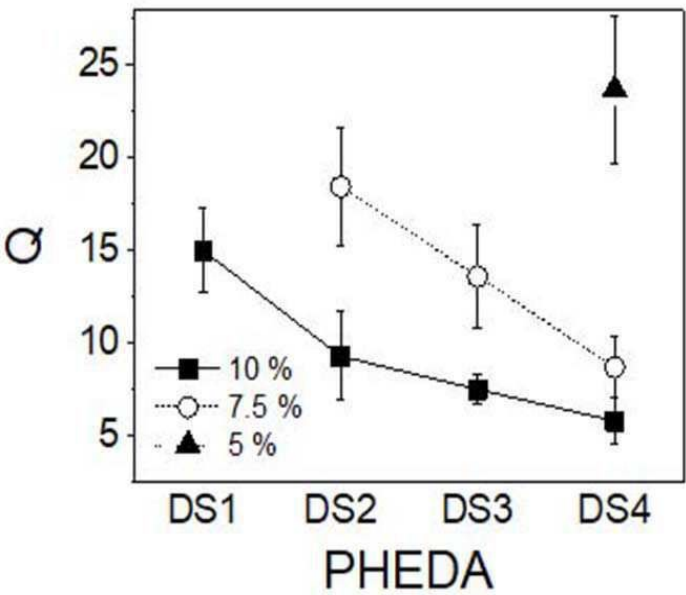
도면13



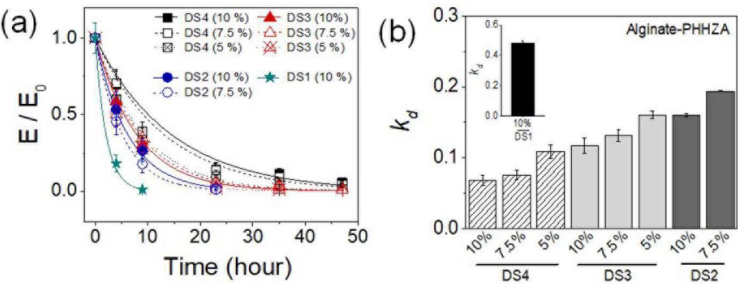
도면14



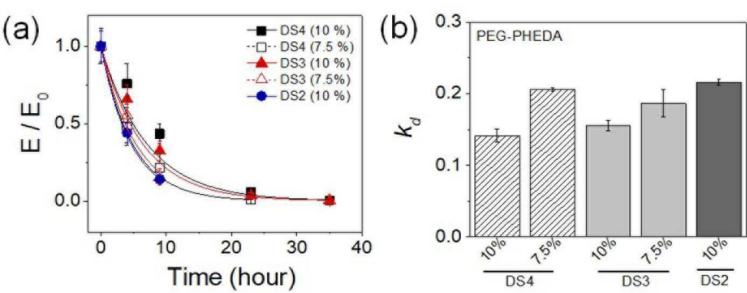
도면15



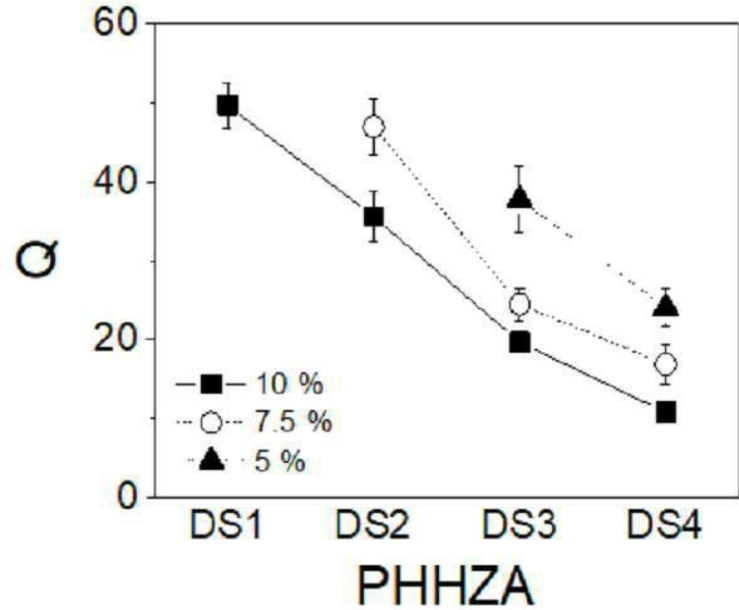
도면16



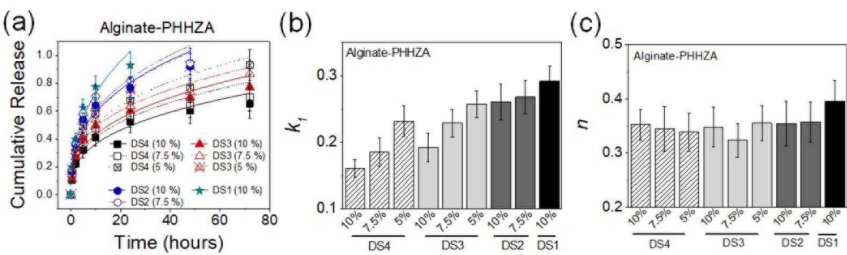
도면17



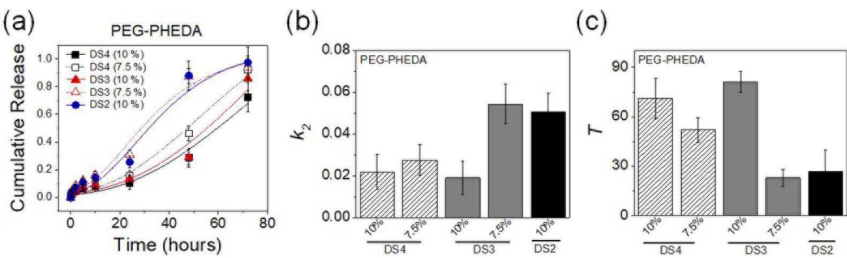
도면18



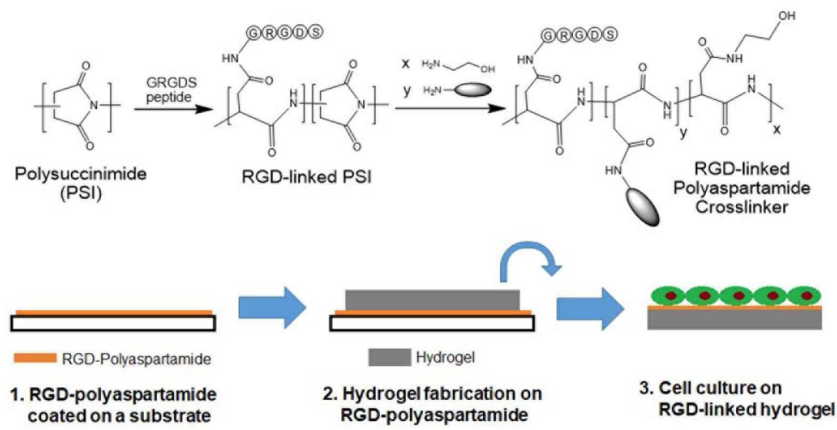
도면19



도면20



도면21



도면22

