

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0007488

(43) 공개일자 2022년01월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C08J 3/075 (2006.01) A61K 41/00 (2020.01)

A61K 47/42 (2017.01) A61K 8/04 (2006.01)

A61K 8/65 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/06 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)

C08J 3/24 (2006.01) C08K 5/00 (2006.01)

C08K 5/48 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C08J 3/075 (2013.01)

A61K 41/0057 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0134498

(22) 출원일자 2020년10월16일

심사청구일자 2020년10월16일

(30) 우선권주장

1020200085665 2020년07월10일 대한민국(KR)

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)

(72) 발명자

임권택

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

박상혁

경기도 수원시 영통구 웰빙타운로 50, 8503동 1002호(이의동, 광고2차 e편한세상)

(74) 대리인

위병갑

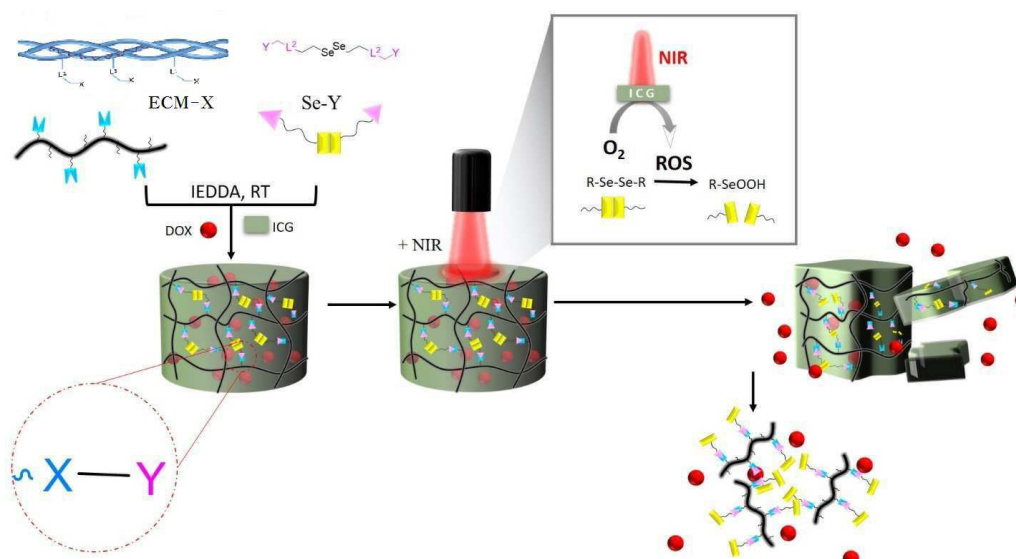
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔, 이의 제조방법 및 이를 이용한 필터 시술용 조성물

(57) 요약

본 발명은 근적외선 감응형 세포외기질(extracellular matrix, ECM) 유래 하이드로겔, 이의 제조방법, 이를 이용한 필터 시술용 조성물, 이를 이용한 약물 전달체에 관한 것으로, 디셀레나이드를 포함한 가교결합을 기반으로 근적외선 빛에 반응하는 세포외기질(ECM) 유래 하이드로겔의 분해 및 약물 방출에 관한 것으로, 본 발명에 따른 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔은 외부에서 근적외선을 조사하여 가교제 내의 디셀레나이드 결합의 분해를 유도하여 겔-졸 전이를 유도할 수 있어, 미용 필러로 사용시에 제거가 필요할 경우 근적외선 조사를 통해 간단히 제거할 수 있는 효과가 있고, 또한 근적외선 조사로 약물 방출을 유도할 수 있는 효과가 있으며, 클릭반응에 의하여 간편하게 제조될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/42 (2013.01)
A61K 8/042 (2013.01)
A61K 8/65 (2013.01)
A61K 9/0009 (2013.01)
A61K 9/06 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
C08J 3/24 (2021.05)
C08K 5/0025 (2013.01)
C08K 5/48 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345313658
과제번호	2018R1D1A3B07041437
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	지역대학우수과학자지원사업(1년~5년)
연구과제명	클릭반응을 이용한 약물전달용 고성능 고분자 임플란트 물질 합성 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	부경대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2023.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

아민기 및 카르복실기 중 1종 이상을 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 세포외기질(Extra Cellular Matrix, ECM) 유도체;

하기 화학식 2로 표시되는 디셀레나이드 결합을 포함하는 가교제; 및

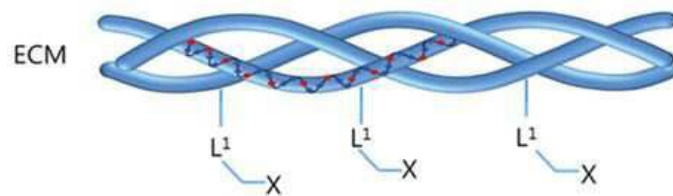
근적외선 조사시 활성산소종을 형성하는 것을 특징으로 하는 근적외선 염료(NIR dye);를 포함하고,

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

근적외선(NIR) 조사시에 디셀레나이드 결합이 분해되어 겔-졸 전이되는 것을 특징으로 하는,

근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔.

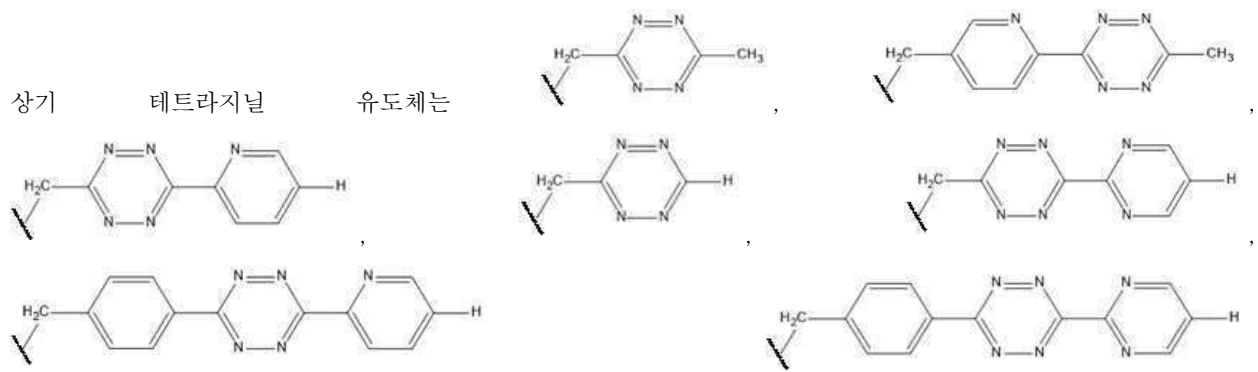
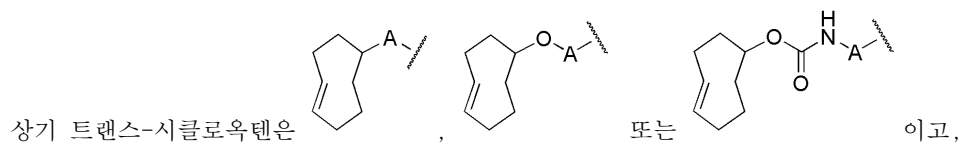
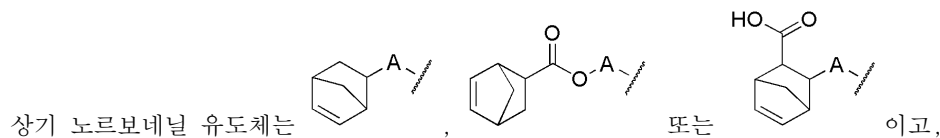
[화학식 1]

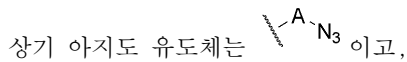
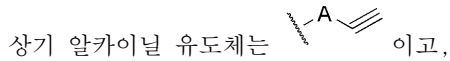
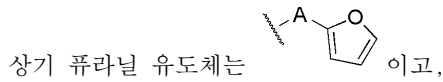
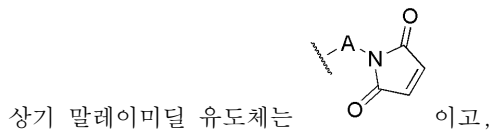
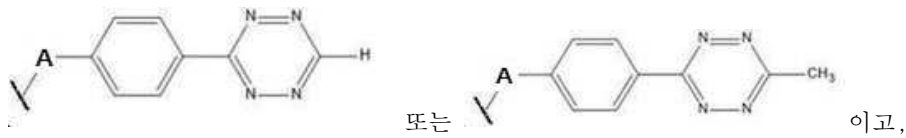


(상기 화학식 1에서,

L^1 은 에스테르(ester) 또는 아마이드(amide) 결합이고;

X는 노르보네닐(norbornenyl) 유도체, 트랜스-시클로옥테닐(trans-cyclooctenyl) 유도체, 테트라지닐(tetrazinyl) 유도체, 말레이미딜(maleimidyl) 유도체, 퓨라닐(furanyl) 유도체, 알카이닐(alkynyl) 유도체, 및 아지도(azido) 유도체 중 1종의 클릭반응 작용기이고,



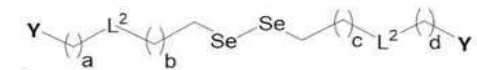


상기 A는 단일결합, C₁₋₅의 알킬레닐 또는 -Z¹-O(CH₂CH₂O)_n-Z²-이고,

상기 Z¹ 및 Z²는 각각 단일결합 또는 C₁₋₅의 알킬레닐이고,

상기 n은 1-20의 정수이다.)

[화학식 2]



(상기 화학식 2에서,

a, b, c 및 d는 각각 0-10의 정수이고, 여기서 0일 경우는 단일결합을 의미하며;

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

Y는 상기 화학식 1에서 X의 정의와 같다.)

청구항 2

제1항에 있어서,

근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔은,

NHS (N-Hydroxysuccinimide), sulfo-NHS (hydroxysulfosuccinimide sodium salt), EDC (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride), DCC (dicyclohexylcarbodiimide), 및 셀레노락톤 (selenolactone) 중 1종 이상의 가교 보조제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 근적외선 염료는 인도시아닌 그린(ICG), 메틸렌 블루(MB), IRDye 800 CW, Cy5.5, Cy7, Cy7.5, protoporphyrin IX, IR-780, IR-783, IR-808 및 MHI-148 중 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔은 약물을 담지할 수 있고,

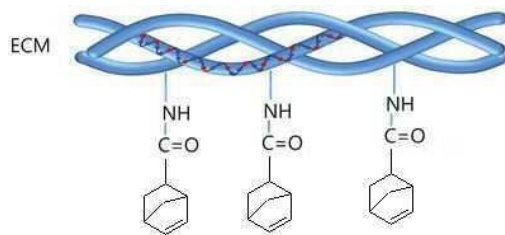
상기 약물은 인슐린, 항 류마티스 제제, 프레드니솔론 21-아세테이트(prednisolone 21-acetate), 파클리탁셀(paclitaxel), 독소루비신(doxorubicin), 레티노익 산(retinoic acid)계열, 시스플라틴(cis-platin), 캄토세신(camptothecin), Fluorouracil(5-FU), 도세탁셀(Docetaxel), 타목시펜(Tamoxifen), 아나스테로졸(anastrozole), 토포테칸(topotecan), 글리벡(gleevec), 빈크리스틴(vincristine), 아스피린(aspirin), 살리실레이트(salicylates), 이부프로펜(ibuprofen), 페노프로펜(fenoprofen), 인도메타신(indomethacin), 페닐부타존(phenyltazone), 메소트렉세이트(methotrexate), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 덱사메타손(dexamethasone), 니메술리드(nimesulide), 코르티손(cortisone), 코르티코스테로이드(corticosteroid), 모자반 추출물, 동물 태반 유래의 단백질, α -리포산(α -lipoic acid), α -토코페롤(α -Tocopherol), 레티노이드(Retinoids) 및 글루타치온(Glutathione) 중 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔.

청구항 5

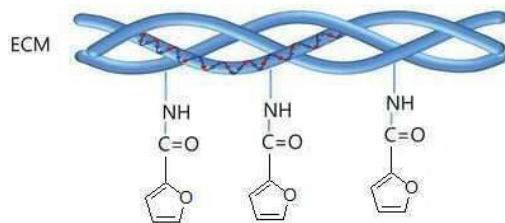
제1항에 있어서,

상기 세포외기질(ECM) 유도체는 하기 화학식 3 내지 화학식 10 중 1종의 화합물인 것을 특징으로 하는, 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔.

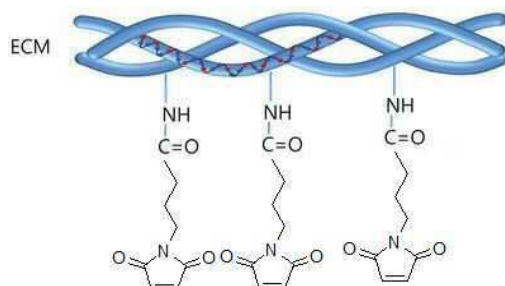
[화학식 3]



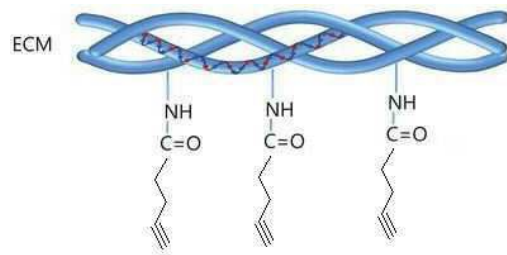
[화학식 4]



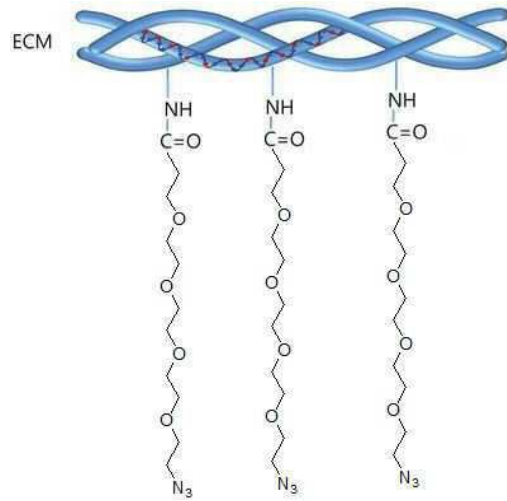
[화학식 5]



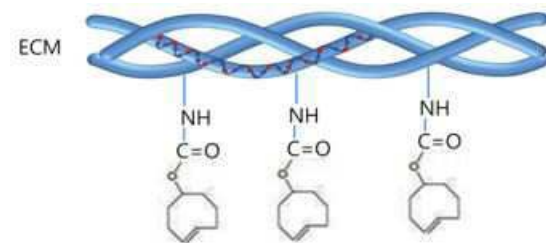
[화학식 6]



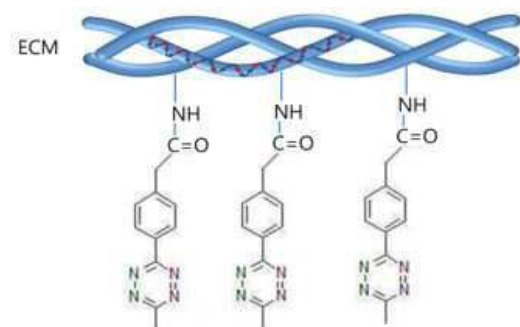
[화학식 7]



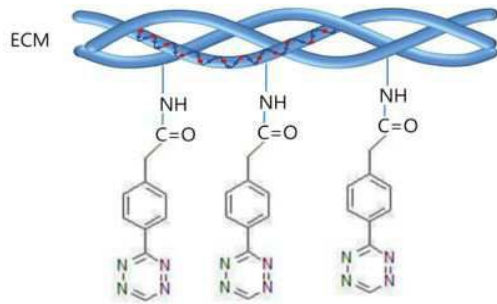
[화학식 8]



[화학식 9]



[화학식 10]

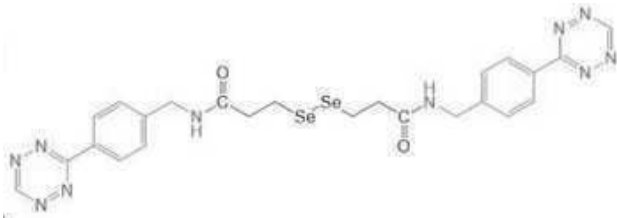


청구항 6

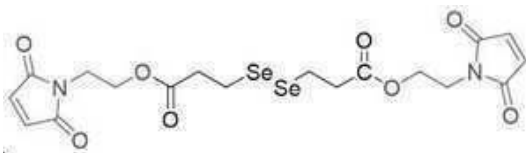
제1항에 있어서,

상기 가교제는 하기 화학식 11 내지 화학식 17 중 1종의 화합물인 것을 특징으로 하는, 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔.

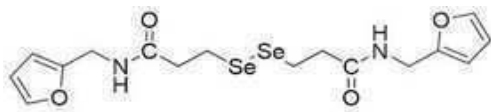
[화학식 11]



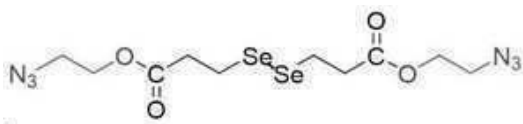
[화학식 12]



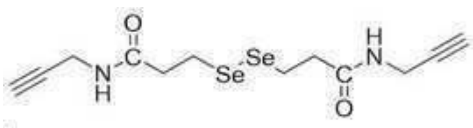
[화학식 13]



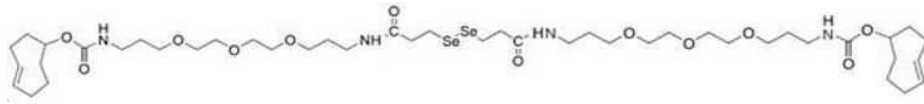
[화학식 14]



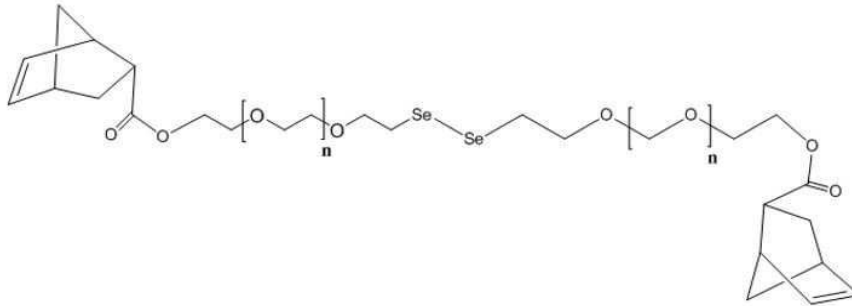
[화학식 15]



[화학식 16]



[화학식 17]



(상기 화학식 17에서,

상기 n은 1-20의 정수이다.)

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 세포외기질(ECM)은 콜라겐, 프로테오글리칸, 인지질, 아미노산, 사카라이드 아이소머레이트, 및 트레멜라 푸시포미스 폴리사카라이드 중 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔.

청구항 8

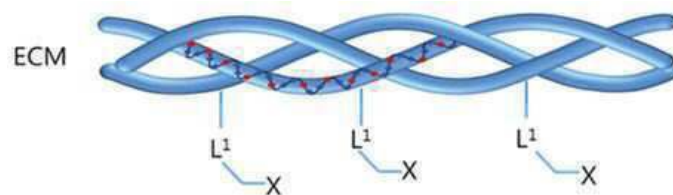
하기 화학식 1로 표시되는 세포외기질(Extra Cellular Matrix, ECM) 유도체,

하기 화학식 2로 표시되는 디셀레나이드 결합을 포함하는 가교제, 및

근적외선 조사시 활성산소종을 형성하는 것을 특징으로 하는 근적외선 염료(NIR dye)를 용매에 첨가하고 반응하는 단계(단계 1);를 포함하는,

근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔의 제조방법.

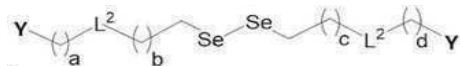
[화학식 1]



(상기 화학식 1에 있어서,

각각의 치환기 정의는 제1항의 화학식 1에서 정의한 바와 같다.)

[화학식 2]



(상기 화학식 2에 있어서,
각각의 치환기 정의는 제1항의 화학식 2에서 정의한 바와 같다.)

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 용매는 증류수, pH 5 수용액, 인산염 버퍼, 디메틸설폭사이드(DMSO), 에탄올, 무수 테트라하이드로퓨란 (THF), 벤젠, KOH/MeOH, MeOH, 톨루엔, CH₂Cl₂, 헥산, 디메틸포름아미드(DMF), 디이소프로필에테르, 디에틸에테르, 디옥산, 디메틸아세트아미드(DMA), 아세톤 및 클로로벤젠 중 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 근적외선 감응형 하이드로겔의 제조방법.

청구항 10

하기 화학식 1로 표시되는 세포외기질(Extra Cellular Matrix, ECM) 유도체,

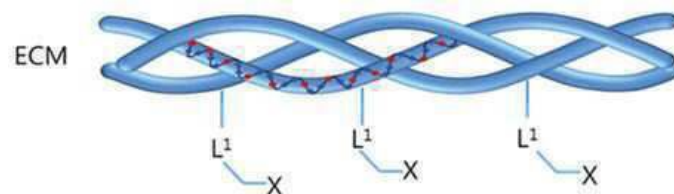
하기 화학식 2로 표시되는 디셀레나이드 결합을 포함하는 가교제,

근적외선 조사시 활성산소종을 형성하는 것을 특징으로 하는 근적외선 염료(NIR dye) 및

약물을 용매에 첨가하고 반응하는 단계(단계 1);를 포함하는,

약물 담지 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔의 제조방법.

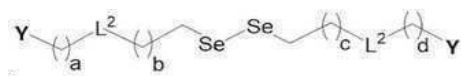
[화학식 1]



(상기 화학식 1에 있어서,

각각의 치환기 정의는 제1항의 화학식 1에서 정의한 바와 같다.)

[화학식 2]



(상기 화학식 2에 있어서,

각각의 치환기 정의는 제1항의 화학식 2에서 정의한 바와 같다.)

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 용매는 증류수, pH 5 수용액, 인산염 버퍼, 디메틸설폭사이드(DMSO), 에탄올, 무수 테트라하이드로퓨란 (THF), 벤젠, KOH/MeOH, MeOH, 톨루엔, CH₂Cl₂, 헥산, 디메틸포름아미드(DMF), 디이소프로필에테르, 디에틸에테르, 디옥산, 디메틸아세트아미드(DMA), 아세톤 및 클로로벤젠 중 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 약물 담지 근적외선 감응형 하이드로겔의 제조방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 약물은 인슐린, 항 류마티스 제제, 프레드니솔론 21-아세테이트(prednisolone 21-acetate), 파클리탁셀(paclitaxel), 독소루비신(doxorubicin), 레티노익 산(retinoic acid)계열, 시스플라틴(cis-platin), 캄토세신(camptothecin), Fluorouracil(5-FU), 도세탁셀(Docetaxel), 타목시펜(Tamoxifen), 아나스테로졸(anastrozole), 토포테칸(topotecan), 글리벡(gleevec), 빈크리스틴(vincristine), 아스피린(aspirin), 살리실레이트(salicylates), 이부프로펜(ibuprofen), 페노프로펜(fenoprofen), 인도메타신(indomethacin), 페닐부타존(phenyltazone), 메소트렉세이트(methotrexate), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 덱사메타손(dexamethasone), 니메술리드(nimesulide), 코르티손(cortisone), 코르티코스테로이드(corticosteroid), 모자반 추출물, 동물 태반 유래의 단백질, α -리포산(α -lipoic acid), α -토코페롤(α -Tocopherol), 레티노이드(Retinoids), 및 글루타치온(Glutathione) 중 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 약물 담지 근적외선 감응형 하이드로겔의 제조방법.

청구항 13

제1항의 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔을 포함하는, 필러 시술용 조성물.

청구항 14

제1항의 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔을 포함하는, 근적외선 감응형 약물 전달체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 근적외선 감응형 세포외기질(extracellular matrix, ECM) 유래 하이드로겔, 이의 제조방법, 이를 이용한 필러 시술용 조성물, 이를 이용한 약물 전달체에 관한 것으로, 디셀레나이드를 포함한 가교결합을 기반으로 근적외선 빛에 반응하는 세포외기질(ECM) 유래 하이드로겔의 분해 및 약물 방출에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 지난 수십 년 동안 하이드로겔(hydrogel)은 풍부한 수분 함량과 천연 생체 조직의 환경과 유사한 부드러운 성질 등으로 인하여 실용적인 바이오 캐리어로 개발되었다.

[0005] ECM은 세포 밖에 존재하지만 세포와 밀접하게 연관된 고분자들(콜라겐, 엘라스틴, 당단백질, 성장 인자 등)로 이루어진 삼차원적 망 구조체(network structure)를 말하며, 생체 적합성(biocompatibility), 생분해성(biodegradability), 고강도 및 유연성으로 인해 우수한 천연 하이드로겔 원료 물질 중의 하나이다. ECM은 단백질, 당, 무기질 그리고 체액으로 이루어진 복잡한 망으로 세포에 안정된 부착 부위를 제공하고, 세포 간 신호를 전달한다. ECM은 섬유, 층 및 판과 같은 구조물로 구성되고, 일부 조직에서는 세포외 기질이 세포층과 직접 접촉을 하는 기저판(바닥판, basal lamina)이라는 복잡한 판으로 이루어진다. 이들 분자는 조직에 엄청난 강도와 유연성을 제공함과 동시에 세포 사이에 특정(용해되지 않은) 물질의 흐름을 조절하는 선택적 여과장치로도 작용한다.

[0007] ECM 하이드로겔의 졸-겔(sol-gel) 전이는 고분자내의 아민과 카르복실 작용기를 상호 반응시키는 방법으로 이루어질 수 있다. 그러나 이러한 하이드로겔은 공유결합의 가교결합에 의하여 만들어져서 겔-졸 전이가 매우 어렵다.

- [0009] 지금까지 생리 조건에서 하이드로겔 가교 결합의 분해를 촉진시키기 위해 pH, 빛 및 초음파와 같은 몇 가지 자극 - 응답성 트리거(stimuli-responsive triggers)가 하이드로겔에 도입되었다. 그 중에 한가지 방법으로 UV 광 반응성 하이드로겔이 개발되어, UV 조사에 의해 내부 염료 물질의 방출을 조절할 수 있었으나 자외선은 조직에 깊숙이 침투할 수 없으며 인체에 손상을 줄 수 있는 단점이 있다. 반면에, 근적외선 (near infrared, NIR) 빛은 큰 부작용 없이 3 ~ 5 밀리미터 정도 생체 조직에 깊숙이 침투할 수 있는 장점이 있다.
- [0011] 그 동안 근적외선 광응답성 하이드로겔을 생산하는 일반적인 방법으로 산화 그래핀 나노 시트(graphene oxide nanosheet), 탄소 나노 튜브(carbon nanotube) 및 금 나노 입자(gold nanoparticle)와 같은 근적외선 흡수 물질을 사용하는 것이 알려졌다. 그러나, 이러한 종류의 방법들은 열 감응성 중합체(thermosensitive polymer)에 대해서만 가능하여 생체 유래 고분자에 적용하기가 어렵고 또한 근적외선 빛이 꺼지면 분해반응이 멈추게 된다.
- [0013] 한편 근적외선 염료인 인도시안 그린(Indocyanine green, ICG)은 근적외선을 흡수하고 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성할 수 있는, 미국 식품의약국 (FDA)에서 승인된 안전한 첨가제이다. ROS는 약한 공유 결합, 특히 낮은 결합 에너지의 산화 환원 민감성 디셀레나이드(diselenide) 결합을 쉽게 분해시키는 성질이 있다. 따라서, Se-Se 결합을 가교구조에 도입하는 것은 근적외선 반응성 하이드로 겔을 만드는 유망한 전략이 될 수 있다.
- [0015] 한편, 성형기술 의사 수 증가, 최소 침습적 시술에 대한 인식 개선, 짧은 효능 지속기간(3 ~ 12개월)에 따른 반복적인 수요 발생, 심미적 요구 확대, 남성 소비자 증가 등으로 주름개선 필러를 포함한 각종 조직 수복형 필러 시장이 성 장하고 있다. 그러나, 고객의 변심, 시술자의 부주의, 염증과 같은 부작용 발생 등의 상황에서는 시술이 완료된 필러의 제거가 필요하다. 기존 제품의 경우 시술이 완료된 필러를 제거하기 위해서는 추가적인 약물 (대표적으로 히알루로니다아제)을 주입하여 필러를 분해시켜야 하나, 추가적인 약물은 또 다른 부작용을 초래하여, 사용자의 위험 부담이 커진다. 약물을 사용하더라도 시술 부위에 약물을 고르게 주입하기 어려워 체내의 필러를 완벽하게 분해하여 제거하는데 어려움이 존재하며, 인체 내부의 잔존 필러는 잠재적인 부작용 발생한다.
- [0017] 필러 시장에서 필러의 부작용 감소 요구는 꾸준히 증가하고 있는 추세이다. 본 발명의 근적외선을 통해 제거하거나 분해 가능한 필러 제품은 기존의 추가적인 약물 사용이 필요하지 않아 약물 사용으로 인한 부작용의 발생을 감소시킨다. 근적외선을 활용할 때 필러의 제거와 분해 효율이 향상될 수 있어 잔여 필러에 기인하는 부작용을 최소화시킬 수 있다. 또한, 간단히 광학 장치를 시술부위에 조사하여 필러를 제거하고 분해하는 기술이 가능하기 때문에 시술자의 편의성과 접근이 높은 방법을 제공할 수 있다. 다시 말하면 근적외선 감응 분해 조절 ECM 하이드로겔 조직 수복 필러 기술은 환자의 상태, 시술자의 부주의, 염증과 같은 부작용 발생 등의 조직 필러 시술이 완료된 조직 수복 필러의 경우 다시 제거를 할 수 있는 임상현장에서의 안정적인 시술을 제공할 수 있다.
- [0019] 본 발명에서는 ECM과 디셀레나이드 가교제 사이의 가교 반응을 이용하여 ECM을 기반으로 한 새로운 NIR 반응성 하이드로겔에 대한 방법을 제공한다. 본 발명에 의하면 온화한 환경 조건 하에서 신속하게 하이드로겔 형성 및 ICG 및 약물을 동시에 하이드로겔 매트릭스에 로딩할 수 있다. 그리고, 근적외선을 하이드로겔에 조사하면 내부에 생성된 ROS는 하이드로겔 네트워크의 디셀레나이드 가교 결합을 파괴하여 하이드로겔의 분해 및 포획된 약물의 조절된 방출을 효과적으로 유도한다. 이에 더하여, 필요 시 언제든지 생체내에 주입된 하이드로겔 구조를 근적외선 조사로서 붕괴하여 제거할 수 있는 기능을 제공한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0021] (특허문헌 0001) 공개특허공보 제10-2014-0013330호

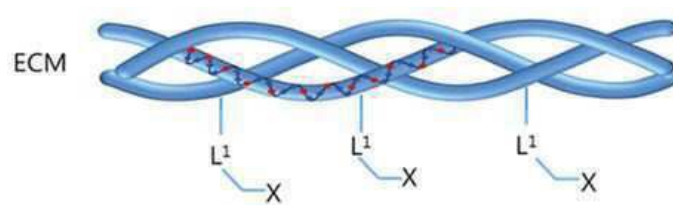
발명의 내용

해결하려는 과제

- [0022] 본 발명의 목적은 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔을 제공하는 것이다.
- [0023] 본 발명의 다른 목적은 상기 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 목적은 약물 담지 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0025] 본 발명의 다른 목적은 상기 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔을 포함하는, 필터 시술용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔을 포함하는, 근적외선 감응형 약물 전달체를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0028] 상기 목적을 달성하기 위하여,
- [0029] 본 발명은 아민기 및 카르복실기 중 1종 이상을 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 세포외기질(Extra Cellular Matrix, ECM) 유도체;
- [0030] 하기 화학식 2로 표시되는 디셀레나이드 결합을 포함하는 가교제; 및
- [0031] 근적외선 조사시 활성산소종을 형성하는 것을 특징으로 하는 근적외선 염료(NIR dye);를 포함하고,
- [0032] 하기 화학식 1의 치환기 X와 하기 화학식 2의 치환기 Y는 서로 클릭반응 가능한 조합인 것을 특징으로 하고,
- [0033] 근적외선(NIR) 조사시에 디셀레나이드 결합이 분해되어 겔-졸 전이되는 것을 특징으로 하는,
- [0034] 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔을 제공한다.
- [0035] [화학식 1]

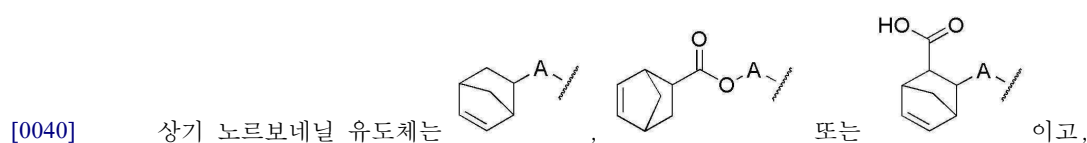


[0036]

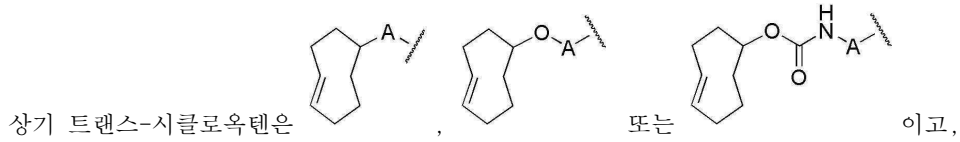
[0037] (상기 화학식 1에서,

[0038] L^1 은 에스테르(ester) 또는 아마이드(amide) 결합이고;

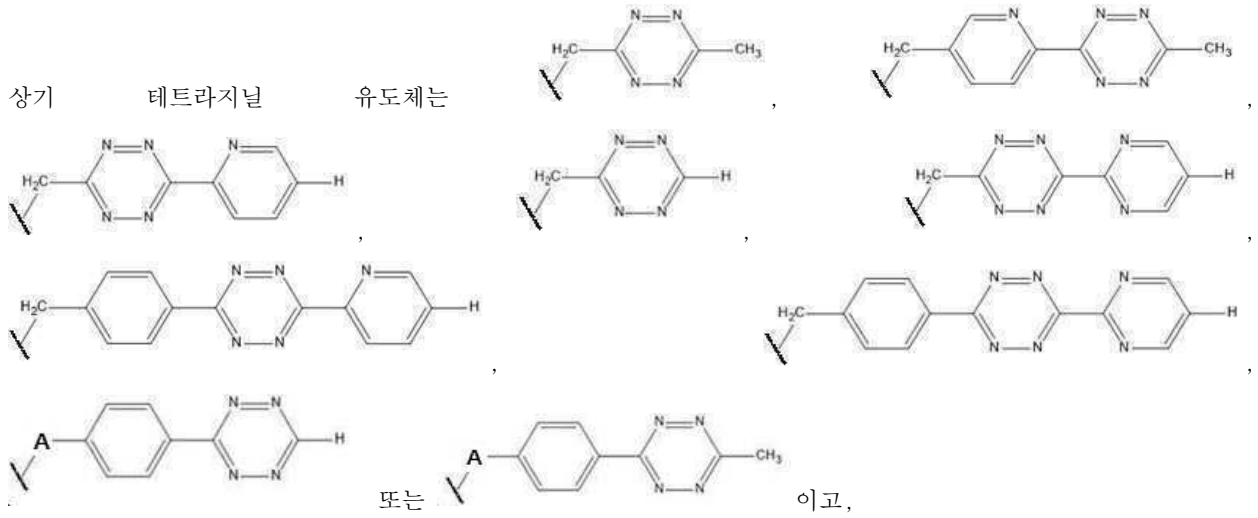
[0039] X는 노르보네닐(norbornenyl) 유도체, 트랜스-시클로옥테닐(trans-cyclooctenyl) 유도체, 테트라지닐(tetrazinyl) 유도체, 말레이미딜(maleimidyl) 유도체, 퓨라닐(furanyl) 유도체, 알카이닐(alkynyl) 유도체, 및 아지도(azido) 유도체 중 1종의 클릭반응 작용기이고,



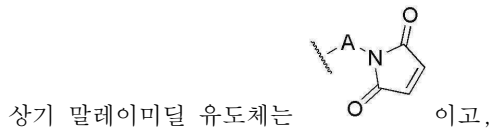
[0041]



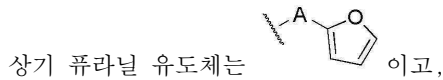
[0042]



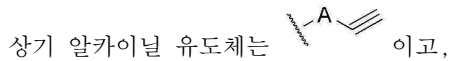
[0043]



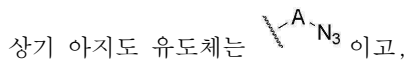
[0044]



[0045]



[0046]



[0047]

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

[0048]

상기 Z¹ 및 Z²는 각각 단일결합 또는 C₁₋₅의 알킬레닐이고,

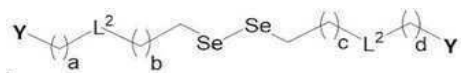
[0049]

상기 n은 1-20의 정수이다.)

[0051]

[화학식 2]

[0052]



[0053]

(상기 화학식 2에서,

[0054]

a, b, c 및 d는 각각 0-10의 정수이고, 여기서 0일 경우는 단일결합을 의미하며;

[0055]

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

[0056]

Y는 상기 화학식 1에서 X의 정의와 같다.)

[0058]

또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 세포외기질(Extra Cellular Matrix, ECM) 유도체,

- [0059] 상기 화학식 2로 표시되는 디셀레나이드 결합을 포함하는 가교제, 및
- [0060] 근적외선 조사시 활성산소종을 형성하는 것을 특징으로 하는 근적외선 염료(NIR dye)를 용매에 첨가하고 반응하는 단계(단계 1);를 포함하는,
- [0061] 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔의 제조방법을 제공한다.
- [0063] 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 세포외기질(Extra Cellular Matrix, ECM) 유도체,
- [0064] 상기 화학식 2로 표시되는 디셀레나이드 결합을 포함하는 가교제,
- [0065] 근적외선 조사시 활성산소종을 형성하는 것을 특징으로 하는 근적외선 염료(NIR dye) 및
- [0066] 약물을 용매에 첨가하고 반응하는 단계(단계 1);를 포함하는,
- [0067] 약물 담지 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔의 제조방법을 제공한다.
- [0069] 또한, 본 발명은 상기 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔을 포함하는, 필터 시술용 조성물을 제공한다.
- [0071] 나아가, 본 발명은 상기 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔을 포함하는, 근적외선 감응형 약물 전달체를 제공한다.

발명의 효과

- [0073] 본 발명에 따른 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔은 외부에서 근적외선을 조사하여 가교제 내의 디셀레나이드 결합의 분해를 유도하여 겔-줄 전이를 유도할 수 있어, 미용 필러로 사용시에 제거가 필요할 경우 근적외선 조사를 통해 간단히 제거할 수 있는 효과가 있고, 또한 근적외선 조사로 약물 방출을 유도할 수 있는 효과가 있으며, 클릭반응에 의하여 간편하게 제조될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0075] 도 1은 ECM 유도체(화학식 1)과 디셀레나이드 결합을 포함하는 가교제(화학식 2)가 클릭반응하여 약물과 근적외선 염료를 함유한 하이드로겔을 형성하고, 근적외선 조사에 의하여 하이드로겔 구조가 붕괴하면서 내부 약물을 방출하는 방법을 나타낸 도이다.
- 도 2은 ECM-Nb의 ^1H NMR스펙트럼을 나타낸 도이다.
- 도 3은 역관법으로 ECM 하이드로겔이 형성되는 과정의 사진을 나타낸 도이다.
- 도 4는 실시예에서 제조한 하이드로겔의 팽윤 비율을 측정한 그래프이다.
- 도 5는 순수 ECM 및 실시예에서 제조한 ECM 하이드로겔의 형성 과정에서 반응 시간에 따른 유동학적 전단탄성계수(shear modulus) 측정 결과, 주파수 스위프 시험(frequency sweep test, 0.1-10 rad/s)에서 하이드로겔의 저장계수(storage modulus)를 측정한 그래프이다.
- 도 6은 실시예 1-1(a) 및 실시예 1-3(b)에서 제조한 ECM 하이드로겔을 SEM으로 관찰한 이미지이다.
- 도 7은 ICG가 적재된 ECMH1/ICG 하이드로겔에 NIR을 5분간 조사한 다음, 겔-줄 전이가 일어남을 확인한 사진이다.
- 도 8은 실시예에서 제조한 DOX 담지 ECM 하이드로겔을 신선한 용액에 보관한 다음, 2일차에 NIR 조사한 후 DOX 방출 속도를 측정한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0076] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0078] **근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔**

[0079] 본 발명은 아민기 및 카르복실기 중 1종 이상을 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 세포외기질(Extra Cellular Matrix, ECM) 유도체;

[0080] 하기 화학식 2로 표시되는 디셀레나이드 결합을 포함하는 가교제; 및

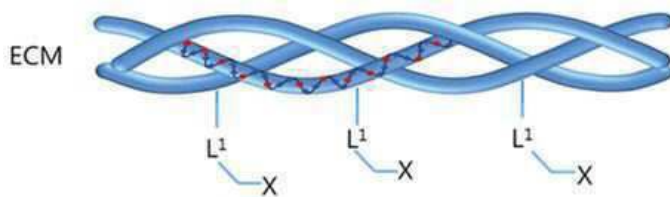
[0081] 근적외선 조사시 활성산소종을 형성하는 것을 특징으로 하는 근적외선 염료(NIR dye);를 포함하고,

[0082] 하기 화학식 1의 치환기 X와 하기 화학식 2의 치환기 Y는 서로 클릭반응 가능한 조합인 것을 특징으로 하고,

[0083] 근적외선(NIR) 조사시에 디셀레나이드 결합이 분해되어 젤-졸 전이되는 것을 특징으로 하는,

[0084] 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔을 제공한다.

[0085] [화학식 1]

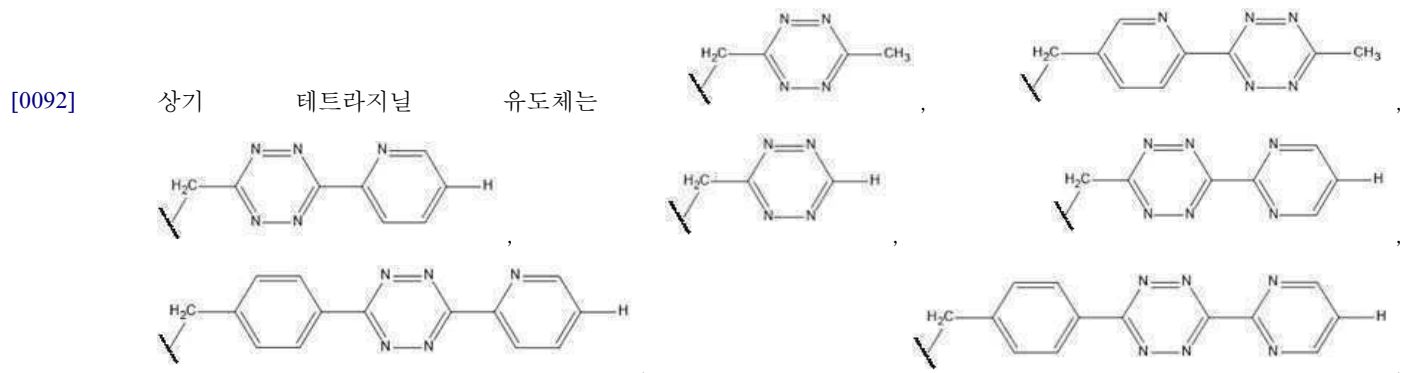
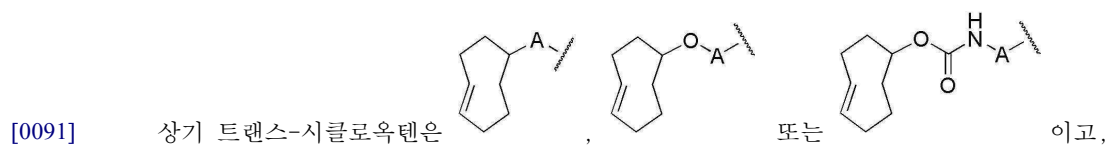
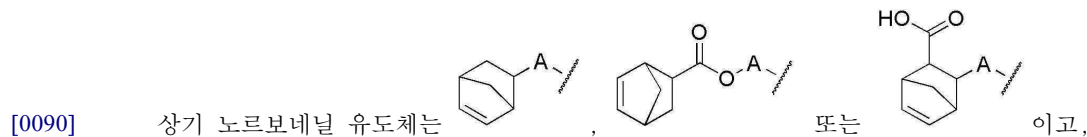


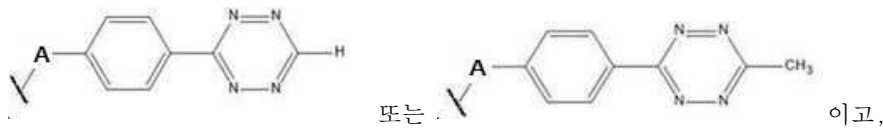
[0086]

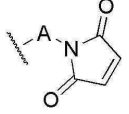
[0087] (상기 화학식 1에서,

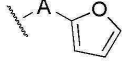
[0088] L^1 은 에스테르(ester) 또는 아마이드(amide) 결합이고;

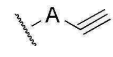
[0089] X는 노르보네닐(norbornenyl) 유도체, 트랜스-시클로옥테닐(trans-cyclooctenyl) 유도체, 테트라지닐(tetrazinyl) 유도체, 말레이미딜(maleimidyl) 유도체, 퓨라닐(furanyl) 유도체, 알카이닐(alkynyl) 유도체, 및 아지도(azido) 유도체 중 1종의 클릭반응 작용기이고,





[0093] 상기 말레이미딜 유도체는  이고,

[0094] 상기 퓨라닐 유도체는  이고,

[0095] 상기 알카이닐 유도체는  이고,

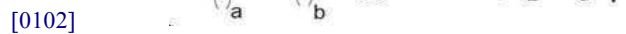
[0096] 상기 아지도 유도체는  이고,

[0097] 상기 A는 단일결합, C₁₋₅의 알킬레닐 또는 -Z¹-O(CH₂CH₂O)_n-Z²-이고,

[0098] 상기 Z¹ 및 Z²는 각각 단일결합 또는 C₁₋₅의 알킬레닐이고,

[0099] 상기 n은 1-20의 정수이다.)

[0101] [화학식 2]



[0102] (상기 화학식 2에서,

[0103] a, b, c 및 d는 각각 0-10의 정수이고, 여기서 0일 경우는 단일결합을 의미하며;

[0104] L²는 아마이드(amide), 아민(amine), 에스테르(ester), 에테르(ether) 또는 C₁₋₁₀의 알킬레닐 결합이고;

[0105] Y는 상기 화학식 1에서 X의 정의와 같다.)

[0106] 본 발명에 따른 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔은 필요에 따라서 가교 보조제를 더 포함할 수 있다. 가교 보조제는 하이드로겔의 물성 조절, 가교 반응시간 단축 등을 고려하여, 임의 적절하게 선택적으로 사용할 수 있다.

[0107] 상기 가교 보조제의 예시로는 NHS (N-Hydroxysuccinimide), sulfo-NHS (hydroxysulfosuccinimide sodium salt), EDC (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride), DCC (dicyclohexylcarbodiimide), 셀레노락톤 (selenolactone) 등을 단독으로 또는 2종 이상 혼합하여 사용할 수 있다.

[0108] 상기 근적외선 염료는 인도시아닌 그린(ICG), 메틸렌 블루(MB), IRDye 800 CW, Cy5.5, Cy7, Cy7.5, protoporphyrin IX, IR-780, IR-783, IR-808, MHI-148 등을 단독으로 또는 혼합하여 사용할 수 있으며, 근적외선 조사시에 활성산소종(ROS)을 생성하는 염료라면 모두 사용할 수 있다.

[0109] 본 발명에 따른 근적외선 감응형 하이드로겔은 근적외선에 반응하여 가교제에 포함된 디셀레나이드 결합(diselenide bond)이 분해되는 것을 특징으로 한다. 구체적으로, 근적외선이 조사되면 근적외선 염료로부터 활

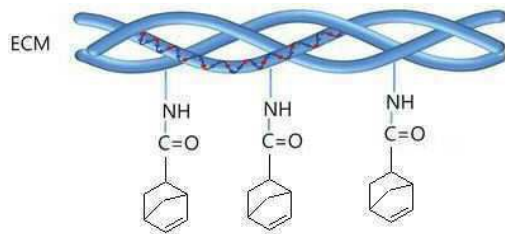
성 산소종이 생성되고, 생성된 활성 산소종은 디셀레나이드 결합을 분해하는 역할을 한다.

[0115] 상기 근적외선 감응형 하이드로겔은 약물을 담지할 수 있고,

[0116] 상기 약물은 일례로 인슐린, 항 류마티스 제제, 프레드니솔론 21-아세테이트(prednisolone 21-acetate), 파클리탁셀(paclitaxel), 독소루비신(doxorubicin), 레티노익 산(retinoic acid)계열, 시스플라틴(cis-platin), 캄토세신(camptothecin), Fluorouracil(5-FU), 도세탁셀(Docetaxel), 타목시펜(Tamoxifen), 아나스테로졸(anastrozole), 토포테칸(topotecan), 글리벡(gleevec), 빈크리스틴(vincristine), 아스피린(aspirin), 살리실레이트(salicylates), 이부프로펜(ibuprofen), 페노프로펜(fenoprofen), 인도메타신(indomethacin), 페닐부타존(phenyltazone), 메소트렉세이트(methotrexate), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 덱사메타손(dexamethasone), 니메술리드(nimesulide), 코르티손(cortisone), 코르티코스테로이드(corticosteroid), 모자반 추출물, 동물 태반 유래의 단백질, α -리포산(α -lipoic acid), α -토코페롤(α -Tocopherol), 레티노이트(Retinoids), 글루타치온(Glutathione) 등을 사용할 수 있고, 시판 중인 약물은 모두 사용할 수 있다.

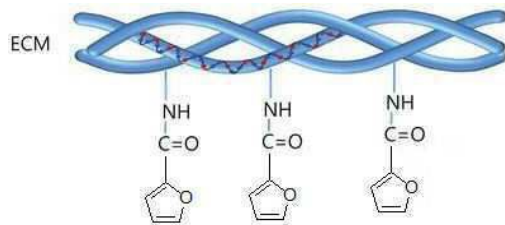
[0118] 바람직한 일례로, 상기 세포외기질(ECM) 유도체는 하기 화학식 3 내지 화학식 10 중 1종의 화합물일 수 있다.

[0119] [화학식 3]



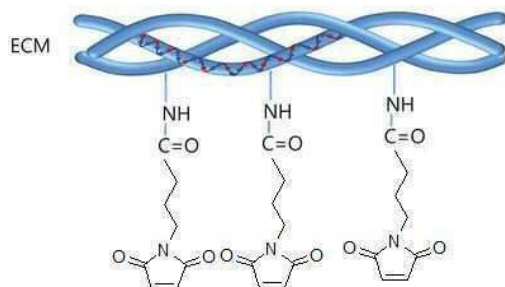
[0120]

[0122] [화학식 4]



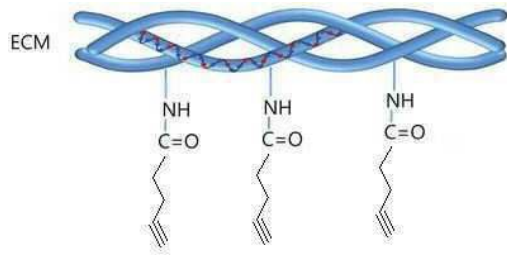
[0123]

[0125] [화학식 5]



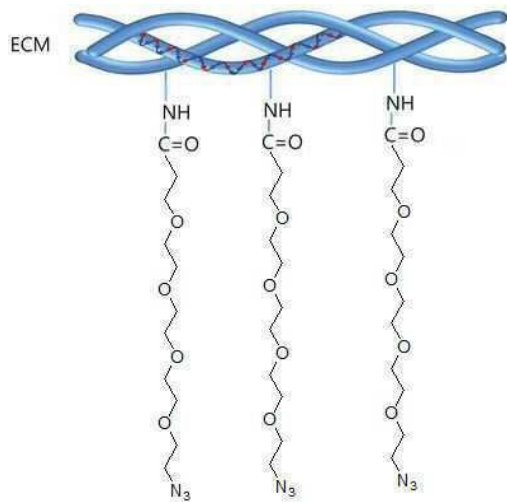
[0126]

[0128] [화학식 6]



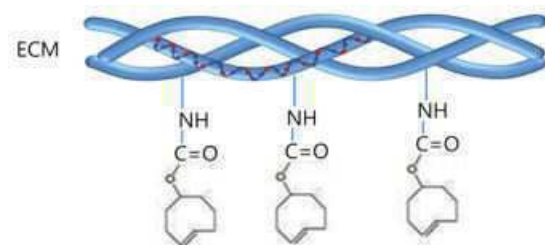
[0129]

[0131] [화학식 7]



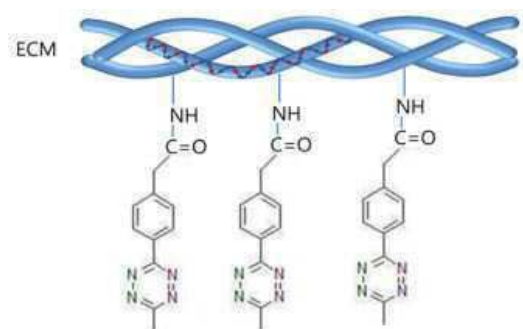
[0132]

[0134] [화학식 8]



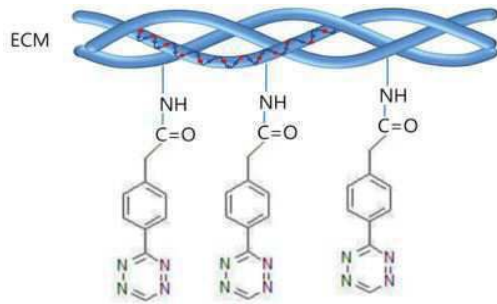
[0135]

[0137] [화학식 9]



[0138]

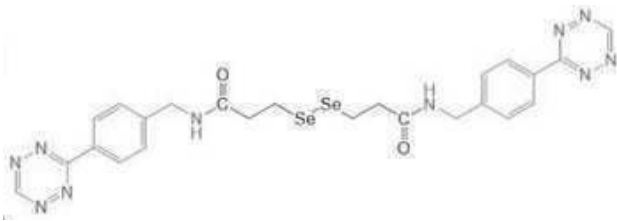
[0140] [화학식 10]



[0141]

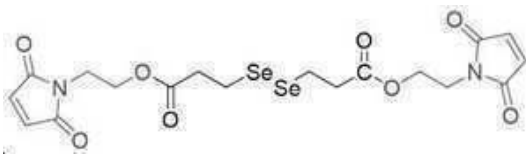
[0143] 바람직한 일례로, 상기 가교제는 하기 화학식 11 내지 화학식 17 중 1종의 화합물일 수 있다.

[0144] [화학식 11]



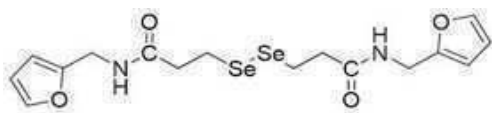
[0145]

[0147] [화학식 12]



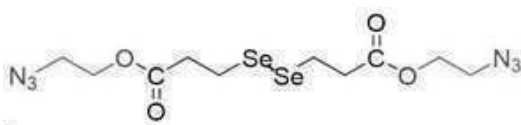
[0148]

[0150] [화학식 13]



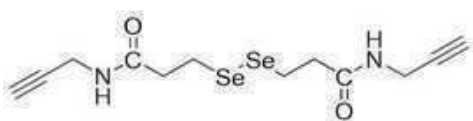
[0151]

[0153] [화학식 14]



[0154]

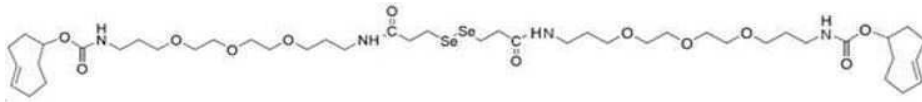
[0156] [화학식 15]



[0157]

[0159] [화학식 16]

[0160]

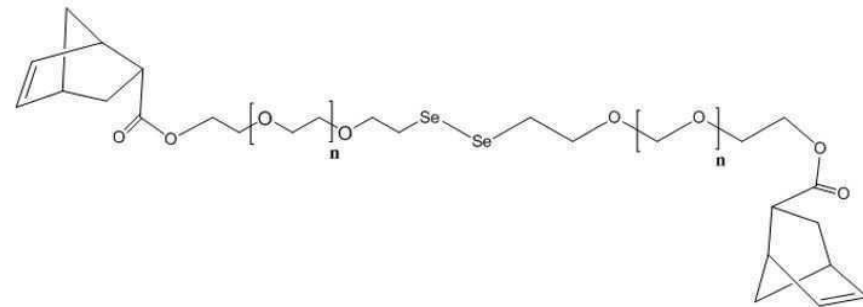


[0162] [화학식 17]

[0163]

[0164] (상기 화학식 17에서,

[0165] 상기 n은 1-20의 정수이다.)



[0167] 상기 세포외기질(ECM)은 콜라겐, 프로테오글리칸, 인지질, 아미노산, 사카라이드 아이소머레이트, 트레멜라 푸 시포미스 폴리사카라이드 중 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 콜라겐일 수 있다.

[0169] **근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔의 제조방법**

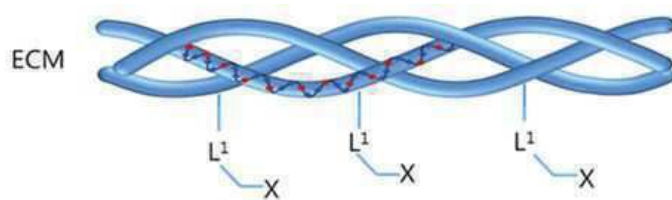
[0170] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 세포외기질(Extra Cellular Matrix, ECM) 유도체,

[0171] 하기 화학식 2로 표시되는 디셀레나이드 결합을 포함하는 가교제, 및

[0172] 근적외선 조사시 활성산소종을 형성하는 것을 특징으로 하는 근적외선 염료(NIR dye)를 용매에 첨가하고 반응하는 단계(단계 1);를 포함하는,

[0173] 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔의 제조방법을 제공한다.

[0174] [화학식 1]



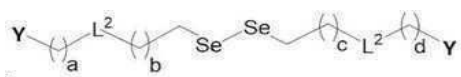
[0175]

[0176] (상기 화학식 1에 있어서,

[0177] 각각의 치환기 정의는 상술한 바와 같다.)

[0179] [화학식 2]

[0180]



[0181] (상기 화학식 2에 있어서,

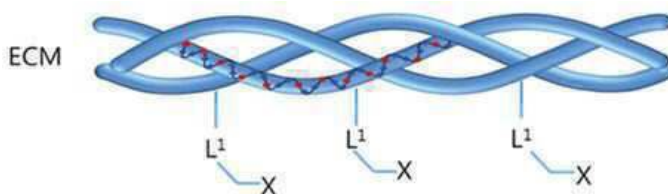
[0182] 각각의 치환기 정의는 상술한 바와 같다.)

[0184] 상기 용매는 증류수, pH 5 수용액, 인산염 버퍼, 디메틸설폭사이드(DMSO), 에탄올, 무수 테트라하이드로퓨란(THF), 벤젠, KOH/MeOH, MeOH, 톨루엔, CH₂Cl₂, 헥산, 디메틸포름아미드(DMF), 디이소프로필에테르, 디에틸에테르, 디옥산, 디메틸아세트아미드(DMA), 아세톤, 클로로벤젠 등을 단독 또는 혼합하여 사용할 수 있다.

[0186] 또한, 상기 단계 1에서는 필요에 따라서 가교 보조제를 더 포함할 수 있다. 상기 가교 보조제의 예시로는 NHS (N-Hydroxysuccinimide), sulfo-NHS (hydroxysulfosuccinimide sodium salt), EDC (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride), DCC (dicyclohexylcarbodiimide), 셀레노락톤(selenolactone) 등을 단독으로 또는 2종 이상 혼합하여 사용할 수 있다.

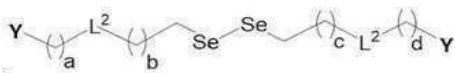
[0188] 약물 담지 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔의 제조방법

[0189] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 세포외기질(Extra Cellular Matrix, ECM) 유도체,
 [0190] 하기 화학식 2로 표시되는 디셀레나이드 결합을 포함하는 가교제,
 [0191] 근적외선 조사시 활성산소종을 형성하는 것을 특징으로 하는 근적외선 염료(NIR dye) 및
 [0192] 약물을 용매에 첨가하고 반응하는 단계(단계 1);를 포함하는,
 [0193] 약물 담지 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔의 제조방법을 제공한다.
 [0194] [화학식 1]



[0195]
 [0196] (상기 화학식 1에 있어서,
 [0197] 각각의 치환기 정의는 상술한 바와 같다.)

[0199] [화학식 2]



[0200]
 [0201] (상기 화학식 2에 있어서,
 [0202] 각각의 치환기 정의는 상술한 바와 같다.)

[0204] 상기 용매는 증류수, pH 5 수용액, 인산염 버퍼, 디메틸설폭사이드(DMSO), 에탄올, 무수 테트라하이드로퓨란(THF), 벤젠, KOH/MeOH, MeOH, 톨루엔, CH₂Cl₂, 헥산, 디메틸포름아미드(DMF), 디이소프로필에테르, 디에틸에테르, 디옥산, 디메틸아세트아미드(DMA), 아세톤, 클로로벤젠 등을 단독 또는 혼합하여 사용할 수 있다.

[0206] 상기 약물은 일레로 인술린, 항 류마티스 제제, 프레드니솔론 21-아세테이트(prednisolone 21-acetate), 파클리탁셀(paclitaxel), 독소루비신(doxorubicin), 레티노익 산(retinoic acid)계열, 시스플라틴(cis-platin), 캄토세신(camptothecin), Fluorouracil(5-FU), 도세탁셀(Docetaxel), 타목시펜(Tamoxifen), 아나스테로졸

(anasterozole), 토포테칸(topotecan), 글리벡(gleevec), 빈크리스틴(vincristine), 아스피린(aspirin), 살리실레이트(salicylates), 이부프로펜(ibuprofen), 페노프로펜(fenoprofen), 인도메타신(indomethacin), 페닐부타존(phenyltazone), 메소트렉세이트(methotrexate), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 텍사메타손(dexamethasone), 니메술리드(nimesulide), 코르티손(cortisone), 코르티코스테로이드(corticosteroid), 모자반 추출물, 동물 태반 유래의 단백질, α -리포산(α -lipoic acid), α -토코페롤(α -Tocopherol), 레티노이드(Retinoids), 글루타치온(Glutathione) 등을 사용할 수 있고, 시판 중인 약물은 모두 사용할 수 있다.

[0208] 또한, 상기 단계 1에서는 필요에 따라서 가교 보조제를 더 포함할 수 있다. 상기 가교 보조제의 예시로는 NHS (N-Hydroxysuccinimide), sulfo-NHS (hydroxysulfosuccinimide sodium salt), EDC (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride), DCC (dicyclohexylcarbodiimide), 셀레노락톤(selenolactone) 등을 단독으로 또는 2종 이상 혼합하여 사용할 수 있다.

[0210] 필러 시술용 조성물

[0211] 본 발명은 상기 근적외선 감응형 ECM 유래 다공성 하이드로겔을 포함하는, 필러 시술용 조성물을 제공한다.

[0212] 본 발명에 따른 필러 시술용 조성물은, 필러 시술 후 부작용, 환자의 제거요구 등 제거가 필요할 경우에 피부 바깥에서 근적외선을 조사하여 필러를 간단히 제거할 수 있는 효과가 있다.

[0214] 근적외선 감응형 약물 전달체

[0215] 본 발명은 상기 근적외선 감응형 ECM 유래 하이드로겔을 포함하는, 근적외선 감응형 약물 전달체를 제공한다.

[0217] 본 발명에 따른 근적외선 감응형 약물 전달체는 근적외선에 반응하여 가교제에 포함된 디셀레나이드 결합(diselenide bond)이 분해되는 것을 특징으로 한다. 구체적으로, 근적외선이 조사되면 근적외선 염료로부터 활성 산소종이 생성되고, 생성된 활성 산소종은 디셀레나이드 결합을 분해하는 역할을 한다.

[0219] 본 발명의 약물 전달체에 있어서, 상기 약물의 예로는 인슐린, 항 류마티스 제제, 프레드니솔론 21-아세테이트(prednisolone 21-acetate), 파클리탁셀(paclitaxel), 독소루비신(doxorubicin), 레티노익 산(retinoic acid) 계열, 시스플라틴(cis-platin), 캄토세신(camptothecin), Fluorouracil(5-FU), 도세탁셀(Docetaxel), 타목시펜(Tamoxifen), 아나스테로졸(anasterozole), 토포테칸(topotecan), 글리벡(gleevec), 빈크리스틴(vincristine), 아스피린(aspirin), 살리실레이트(salicylates), 이부프로펜(ibuprofen), 페노프로펜(fenoprofen), 인도메타신(indomethacin), 페닐부타존(phenyltazone), 메소트렉세이트(methotrexate), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 텍사메타손(dexamethasone), 니메술리드(nimesulide), 코르티손(cortisone), 코르티코스테로이드(corticosteroid), 모자반 추출물, 동물 태반 유래의 단백질, α -리포산(α -lipoic acid), α -토코페롤(α -Tocopherol), 레티노이드(Retinoids), 글루타치온(Glutathione) 등을 단독으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다.

[0221] 고분자 매트릭스 재료 및 가교제에 각각 도입되어 있는 서로 클릭반응 가능한 작용기에서 클릭반응시 N_2 가스가 발생함에 따라 하이드로겔에 다공성을 부여함을 특징으로 하고, 이에 따른 다공성은 약물 방출을 유도하는 약물 전달체로서 초기의 급격한 약물방출이 억제되고 서방형 약물 방출 특징을 가져 제약분야와 화장품 분야에 유용하게 사용할 수 있다.

[0223] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0225] <준비에> 세포외기질(ECM)의 준비

[0226] 8~10주령 돼지에서 연골조직을 분리 한 후 증류수로 3 ~ 4 회 세척 후 24시간 동결한다. 동결 연골 조직을 동결 분쇄한 후 파우더를 저장액에 700 ml/g, SDS 50ml/g, Dnase 100 μm/g을 처리하여 탈세포 과정을 진행한 후에 원심분리기(10000rpm, 20min)를 이용하여 3차수로 세척한다. 그 후에 동결건조(- 50 ℃, 2일)후에 동결 파쇄하여 연골조직 유래 ECM을 백색 파우더 형태로 제조한다. 동결 분쇄한 ECM 파우더에 pepsin solution(0.1~0.5%(w/v))을 첨가하여 교반 과정을 거쳐 녹인 후 투석막을 사용하여 중화 단계를 4일 간 진행한다. 투석 된 용액을 원심분리를 거쳐 불순물을 제거하고 조직 ECM 용액을 얻는다.

[0227] 본 준비예에서 준비한 ECM을 하기 제조예에서 사용하였다.

[0229] <제조예 1> ECM-노르보넨(ECM-Nb, 화학식 3)의 합성

[0230] 우선, norbornene-NHS ester를 5-norbornene-2-acetic acid와 N-hydroxysuccinimide (NHS)의 반응에 의하여 다음과 같이 합성하였다. 둥근 플라스크 내에 5-norbornene-2-carboxylic acid 1.0g (6.6 mmol)과 dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 1.5 g (7.2 mmol)과 NHS 0.8 g (7.2 mmol)을 THF 50 mL 에 녹인 후 상온에서 질소분위기로 24시간 반응하였다. 반응 종결 후 고체 부산물을 걸러서 제거하고 용액을 증발하였다. 그 다음 농축액을 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 5-norbornene-2-acetic acid NHS (norbornene-NHS ester)을 1.4 g (85% 수율)을 수득하였다.

[0231] 그 다음, ECM-Nb합성을 위하여 ECM 1g (NH₂ 작용기 대비 5.32mmol)을 0.5% w/v의 농도로 증류수에 용해하였다. 그리고 상기 norbornene-NHS ester 0.65 g (2.63mmol)을 상기 용액에 추가하였다. 상온에서 24시간 동안 교반한 다음 혼합물은 과잉의 아세톤 용액에 침전시키고, 여과된 고체는 진공 오븐에서 건조한 후 증류수로 1% w/v 용액으로 다시 수화한 다음, 증류수로 4일 동안 13 kDa MWCO 투석백에서 투석하였다. 마지막으로 동결 건조하여 기능화 22.46%의 정제된 ECM-Nb를 76% 수율로 수득하였다.

[0232] 상기 제조예 1의 ECM-Nb의 ¹H NMR을 도 2에 나타내었다

[0234] <제조예 2> ECM-퓨란(ECM-Fu, 화학식 4)의 합성

[0235] 우선, furan-NHS ester를 2-furanacetic acid와 NHS의 반응에 의하여 다음과 같이 합성하였다. 둥근 플라스크 내에 2-furanacetic acid 0.8 g (6.3 mmol)과 DCC 1.4 g (6.8 mmol)과 NHS 0.8 g (6.8 mmol)을 THF 50 mL 에 녹인 후 상온에서 질소분위기로 24시간 반응하였다. 반응 종결 후 고체 부산물을 걸러서 제거하고 용액을 증발하였다. 그 다음 농축액을 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 2-furanacetic acid NHS (furan-NHS ester)을 1.2 g (87% 수율) 수득하였다.

[0236] 그 다음, ECM-Fu합성을 위하여 ECM 1g (NH₂ 작용기 대비 5.32mmol)을 0.5% w/v의 농도로 증류수에 용해하였다. 그리고 상기 furan-NHS ester 0.59 g (2.63mmol)을 상기 용액에 추가하였다. 상온에서 24시간 동안 교반한 다음 혼합물은 과잉의 아세톤 용액에 침전시키고, 여과된 고체는 진공 오븐에서 건조한 후 증류수로 1% w/v 용액으로 다시 수화한 다음, 증류수로 4일 동안 13 kDa MWCO 투석백에서 투석하였다. 마지막으로 동결 건조하여 기능화 20.77%의 정제된 ECM-Fu를 72% 수율로 수득하였다.

[0238] <제조예 3> ECM-말레이미드(ECM-Mi, 화학식 5)의 합성

[0239] 우선, maleimide-NHS ester를 4-maleimidobutyric acid와 NHS의 반응에 의하여 다음과 같이 합성하였다. 둥근 플라스크 내에 4-maleimidobutyric acid 1.2 g (6.5 mmol)과 DCC 1.5 g (7.3 mmol)과 NHS 0.84 g (7.3 mmol)을 THF 50 mL 에 녹인 후 상온에서 질소분위기로 24시간 반응하였다. 반응 종결 후 고체 부산물을 걸러서 제거하고 용액을 증발하였다. 그 다음 농축액을 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 4-maleimidobutyric acid NHS (maleimide-NHS ester)을 1.45 g (80% 수율) 수득하였다.

[0240] 그 다음, ECM-Mi합성을 위하여 ECM 1g (NH₂ 작용기 대비 5.32mmol)을 0.5% w/v의 농도로 증류수에 용해하였다. 그리고 상기 maleimide-NHS ester 0.73 g (2.63mmol)을 상기 용액에 추가하였다. 상온에서 24시간 동안 교반한

다음 혼합물은 과잉의 아세톤 용액에 침전시키고, 여과된 고체는 진공 오븐에서 건조한 후 증류수로 1% w/v 용액으로 다시 수화한 다음, 증류수로 4일 동안 13 kDa MWCO 투석백에서 투석하였다. 마지막으로 동결 건조하여 기능화 18.5%의 정제된 ECM-Mi를 75% 수율로 수득하였다.

[0242] <제조예 4> ECM-알카인(ECM-Aky, 화학식 6)의 합성

[0243] 우선, alkyne-NHS ester를 4-pentynoic acid와 NHS의 반응에 의하여 다음과 같이 합성하였다. 둥근 플라스크 내에 4-pentynoic acid 0.6 g (6.3 mmol)과 DCC 1.4 g (6.8 mmol)과 NHS 0.8 g (6.8 mmol)을 THF 50 mL에 녹인 후 상온에서 질소분위기로 24시간 반응하였다. 반응 종결 후 고체 부산물을 걸러서 제거하고 용액을 증발하였다. 그 다음 농축액을 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 4-pentynoic acid NHS (alkyne-NHS ester)을 1.03 g (84% 수율) 수득하였다.

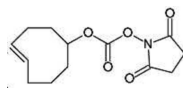
[0244] 그 다음, ECM-Aky합성을 위하여 ECM 1g (NH₂ 작용기 대비 5.32mmol)을 0.5% w/v의 농도로 증류수에 용해하였다. 그리고 상기 alkyne-NHS ester 0.51 g (2.63mmol)을 상기 용액에 추가하였다. 상온에서 24시간 동안 교반한 다음 혼합물은 과잉의 아세톤 용액에 침전시키고, 여과된 고체는 진공 오븐에서 건조한 후 증류수로 1% w/v 용액으로 다시 수화한 다음, 증류수로 4일 동안 13 kDa MWCO 투석백에서 투석하였다. 마지막으로 동결 건조하여 기능화 24.1%의 정제된 ECM-Aky를 82% 수율로 수득하였다.

[0246] <제조예 5> ECM-나이트라이드(ECM-N₃, 화학식 7)의 합성

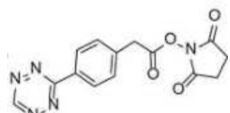
[0247] 우선, azido-NHS ester를 azido-PEG4-acid와 NHS의 반응에 의하여 다음과 같이 합성하였다. 둥근 플라스크 내에 azido-PEG4-acid 1.8 g (6.3 mmol)과 DCC 1.4 g (6.8 mmol)과 NHS 0.8 g (6.8 mmol)을 THF 50 mL에 녹인 후 상온에서 질소분위기로 24시간 반응하였다. 반응 종결 후 고체 부산물을 걸러서 제거하고 용액을 증발하였다. 그 다음 농축액을 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 azido-PEG4-acid NHS (azido-NHS ester)을 1.88 g (77% 수율) 수득하였다.

[0248] 그 다음, ECM-N₃합성을 위하여 ECM 1g (NH₂ 작용기 대비 5.32mmol)을 0.5% w/v의 농도로 증류수에 용해하였다. 그리고 상기 azido-NHS ester 1.02 g (2.63mmol)을 상기 용액에 추가하였다. 상온에서 24시간 동안 교반한 다음 혼합물은 과잉의 아세톤 용액에 침전시키고, 여과된 고체는 진공 오븐에서 건조한 후 증류수로 1% w/v 용액으로 다시 수화한 다음, 증류수로 4일 동안 13 kDa MWCO 투석백에서 투석하였다. 마지막으로 동결 건조하여 기능화 23.2%의 정제된 ECM-N₃를 79% 수율로 수득하였다.

[0250] <제조예 6> ECM-트랜스시클로옥텐 (ECM-TCO, 화학식 8)의 합성

[0251] ECM 분자의 -NH₂ 작용기와 trans-Cyclooctene-NHS ester (이하 'TCO-NHS Ester', )의 축합반응을 통해 ECM에 트랜스시클로옥텐 그룹을 기능화하였다. 합성과정을 자세히 설명하면, 둥근 플라스크 내에 ECM 1g (NH₂ 작용기 대비 5.32mmol)을 상온에서 3시간 동안 2% (v/v) 증류수에 용해하였다. 그 후 TCO-NHS Ester 0.67g (2.5 mmol)을 DMSO 10 mL에 균일하게 녹여 상기 ECM 수용액에 첨가하여 교반하였다. 반응을 50℃에서 2일 동안 진행한 다음, 이 용액을 과량의 아세톤 용액에 부어서 침전시켰다. 백색 고체 물질을 여과한 후 여과된 고체는 진공 오븐에서 건조한 후 증류수로 1% w/v 용액으로 다시 수화한 다음, 증류수로 4일 동안 13 kDa MWCO 투석백에서 투석하였다. 마지막으로 동결 건조하여 기능화 21.7%의 정제된 ECM-TCO를 76% 수율로 수득하였다.

[0253] <제조예 7> ECM-테트라진 (ECM-Tz, 화학식 10)의 합성

[0254] ECM 분자의 -NH₂ 작용기와 Tetrazine-NHS Ester (이하, 'Tz-NHS Ester', )의 축합반응을 통

해 ECM에 테트라진 그룹을 기능화하였다. 합성과정을 자세히 설명하면, 둥근 플라스크 내에 ECM 1g (NH₂ 작용기 대비 5.32mmol)을 상온에서 3시간 동안 2% (v/v) 증류수에 용해하였다. 그 후 Tz-NHS Ester 0.78g (2.5 mmol)을 DMSO 10 mL에 균일하게 녹여 상기 ECM 수용액에 첨가하여 교반하였다. 반응을 50℃에서 2일 동안 진행한 다음, 이 용액을 과량의 아세톤 용액에 부어서 침전시켰다. 백색 고체 물질을 여과한 후 여과된 고체는 진공 오븐에서 건조한 후 증류수로 1% w/v 용액으로 다시 수화한 다음, 증류수로 4일 동안 13 kDa MWCO 투석백에서 투석하였다. 마지막으로 동결 건조하여 기능화 21.7%의 정제된 ECM-Tz를 76% 수율로 수득하였다.

[0256] <제조예 8> 디셀레나이드-테트라진 가교제(Se-Tz, 화학식 11, 3,3'-diselanediyldis(N-(4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)propanamide)) 합성

[0257] 둥근 플라스크 내에 3,3'-디셀라네디일디프로피오닉산 (3,3'-diselanediyldipropionic acid, DSeDPA) 1g (3.2mmol)을 DCM(30mL)과 THF(3mL)의 혼합 용매에 용해하였다. 그리고 DCM에 녹인 4-(아미노메틸)벤조니트릴 염산염(4-(aminomethyl)benzonitrile hydrochloride) 1.22g (7.23mmol)과 TEA 0.268g (2.64mmol)을 상기 DSeDPA 용액에 첨가하였다. 그 다음, DCM에 녹인 DCC 0.81 g (3.93 mmol)를 0 ℃에서 30분간 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물은 실온으로 가져와 N₂에서 12시간 동안 교반하였다. 하얀 침전물을 걸러내고 여과액을 농축한 후, 생성물은 증류수에 용해하여 1N HCl 수용액으로 pH ~3까지 산성화하였다. 그 다음 에틸 아세테이트로 용액을 추출하고 유기층을 증발하였다. 이것을 플래시 크로마토그래피(Acetone:DCM = 10:90)로 분리하여 백황색의 3,3'-디셀라네디일비스(N-(4-시아노벤질)프로파마이드 (3,3'-diselanediyldis(N-(4-cyanobenzyl)propanamide, DSeDPA-4AM)을 얻었다 (수율 52%).

[0258] DSeDPA-4AM의 ¹H NMR(600MHz, DMSO-d₆); δ = 8.56(s, 1H), 7.77(d, 2H), 7.43(s, 2H), 4.35(s, 1H), 3.12(t, 2H), 13MHz(600MHz)

[0260] 얻어진 DSeDPA-4AM과 0.02 당량의 니켈 트리플레이트 (nickel triflate)와 8 당량의 포름아미딘 아세테이트 염(formamidine acetate salt)을 둥근 플라스크에 섞었다. 그리고 나서 무수 히드라진 36 당량을 상기 플라스크에 떨어뜨려 넣고, 혼합물을 실온에서 약 20시간 동안 교반하였다. 1 M HCl 수용액을 상기 혼합물에 떨어뜨리고 30분간 교반한 후, 혼합물을 0℃로 냉각하고 증류수에 용해된 질산나트륨 10 당량을 교반 중인 용액에 첨가하였다. 그 다음 DCM으로 용액을 추출한 뒤 증발시켜 생성물을 얻었다. 생성물을 실리카겔에 흡착하고 플래시 크로마토그래피(95:5 디클로로메탄:methanol)로 정제하여 분홍색 분말을 수득하였다. Se-Tz 가교제의 화학 구조는 화학식 8에 나타난 바와 같다.

[0261] Se-Tz (제조예 6)의 ¹H NMR(600 MHz, DMSO-d₆): δ = 10.57(s, 1H), 8.62(t, 1H), 8.45(d, 2H), 7.56(d, 2H), 4.42(H), 2.42(H)

[0263] <제조예 9> 디셀레나이드-말레이미드 가교제(Se-Mi, 화학식 12, bis(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl) 3,3'-diselanediyldipropionate) 합성

[0264] 먼저 둥근 플라스크 내에 히드록시에틸 말레이미드 5g (0.035 mol), DCC 8.04 g (0.039 mol) 및 DMAP 47.61 mg (0.0039 mol)을 디클로로메탄 10 mL에 용해하고 얼음탕에서 30분 간 냉각시켰다. DSeDPA 5.17 g (0.017 mol)을 디클로로메탄 5 mL에 녹여 상기 용액에 적하하고, 혼합물을 얼음탕에서 30분 더 교반하였다. 그 후 반응물은 상온에서 24시간 동안 교반하였다. 흰색 침전물의 부산물은 걸러내고 생성물 용액을 농축했다. 생성물 용액은 증류수로 수세하고 MgSO₄에서 건조한 다음 회전 증발기에 농축하였다. SiO₂ 플래시 칼럼 크로마토그래피 (용출액 EtOAc:CHCl₃ = 8:2)로 순수한 생성물을 분리하였다. (수율 63%)

[0266] <제조예 10> 디셀레나이드-퓨란 가교제(Se-Fu, 화학식 13, 3,3'-diselanediyldis(N-(furan-2-ylmethyl)propanamide)) 합성

[0267] 피퓨릴 아민 3.39g (0.035mol)과 DCC 8.04g (0.039mol)을 디클로로메탄 10 mL에 용해하여 얼음탕에서 30분 간

냉각시켰다. DSeDPA 5.17 g (0.017 mol)을 디클로로메탄 5 mL에 녹여 상기 용액에 떨어뜨려 넣은 다음, 혼합물을 얼음탕에서 30분 더 교반하였다. 그 후 반응물은 상온에서 24시간 동안 교반하였다. 흰색 침전물의 부산물은 걸러내고 생성물 용액을 농축했다. 생성물 용액은 증류수로 수세하고 MgSO₄에서 건조한 다음 회전 증발기에 농축하였다. SiO₂ 플래시 칼럼 크로마토그래피 (용출액 EtOAc:CHCl₃ = 8:2)로 순수한 생성물을 분리하였다. (수율 67%)

[0269] <제조예 11> 디셀레나이드-아자이드 가교제(Se-N₃, 화학식 14, bis(2-azidoethyl) 3,3'-diselanediyldipropionate) 합성

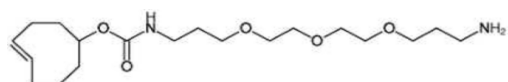
[0270] 둥근 플라스크 내에 3-아지도-1-프로판올 3.53g (0.035mol), DCC 8.04g (0.039mol) 및 DMAP 47.61mg (0.0039mol)을 디클로로메탄 10 mL에 용해하여 얼음탕에서 30분 간 냉각시켰다. DSeDPA 5.17 g (0.017 mol)을 디클로로메탄 5 mL에 녹여 상기 용액에 떨어뜨려 넣은 다음, 혼합물을 얼음탕에서 30분 더 교반하였다. 그 후 반응물은 상온에서 24시간 동안 교반하였다. 흰색 침전물의 부산물은 걸러내고 생성물 용액을 농축했다. 생성물 용액은 증류수로 수세하고 MgSO₄에서 건조한 다음 회전 증발기에 농축하였다. SiO₂ 플래시 칼럼 크로마토그래피 (용출액 EtOAc:CHCl₃ = 8:2)로 순수한 생성물을 분리하였다. (수율 60%)

[0272] <제조예 12> 디셀레나이드-알카인 가교제(Se-Aky, 화학식 15, 3,3'-diselanediybis(N-(prop-2-ynyl)propanamide)) 합성

[0273] 둥근 플라스크 내에 프로파길 아민 1.93g (0.035mol)과 DCC 8.04g (0.039mol)을 디클로로메탄 10 mL에 용해하여 얼음탕에서 30분 간 냉각시켰다. DSeDPA 5.17 g (0.017 mol)을 디클로로메탄 5 mL에 녹여 상기 용액에 떨어뜨려 넣은 다음, 혼합물을 얼음탕에서 30분 더 교반하였다. 그 후 반응물은 상온에서 24시간 동안 교반하였다. 흰색 침전물의 부산물은 걸러내고 생성물 용액을 농축했다. 생성물 용액은 증류수로 수세하고 MgSO₄에서 건조한 다음 회전 증발기에 농축하였다. SiO₂ 플래시 칼럼 크로마토그래피 (용출액 EtOAc:CHCl₃ = 8:2)로 순수한 생성물을 분리하였다. (수율 65%)

[0275] <제조예 13> 디셀레나이드-트랜스시클로옥텐 가교제(Se-TCO, 화학식 16) 합성

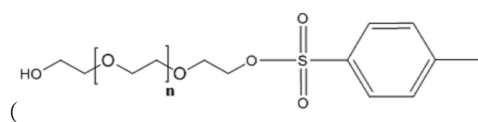
[0276] 둥근 플라스크 내에 트랜스시클로옥텐-PEG3-아민(trans-cyclooctene-PEG3-Amine,



) 1.3g (0.0035mol)과 DCC 0.8g (0.0039mol)을 디클로로메탄 10 mL에 용해하여 얼음탕에서 30분 간 냉각시켰다. DSeDPA 0.5g (0.0017 mol)을 디클로로메탄 5 mL에 녹여 상기 용액에 떨어뜨려 넣은 다음, 혼합물을 얼음탕에서 30분 더 교반하였다. 그 후 반응물은 상온에서 24시간 동안 교반하였다. 흰색 침전물의 부산물은 걸러내고 생성물 용액을 농축했다. 생성물 용액은 증류수로 수세하고 MgSO₄에서 건조한 다음 회전 증발기에 농축하였다. SiO₂ 플래시 칼럼 크로마토그래피 (용출액 EtOAc:CHCl₃ = 8:2)로 순수한 생성물을 분리하였다. (수율 71%)

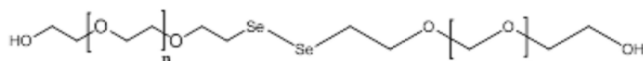
[0278] <제조예 14> 디셀레나이드 노르보넨 (Se-Nb, 화학식 17)가교제 합성

[0279] 둥근 플라스크 내에 PEG (분자량 400) 10 g (0.025 mol) 과 트리에틸아민 3.28 g (0.033 mol)을 디클로로메탄 100 mL에 용해하였다. 상기 용액에 디클로로 메탄 10 mL에 녹인 p-톨루엔염화설포닐 2.38 g (0.0013 mol)을 5분 동안 첨가하고 뒤이어 상온에서 12시간 동안 교반하였다. 반응 후, 1M HCl로 반응용액을 중화하여 혼합물을 여과하고 다시 포화 중탄산나트륨 수용액을 첨가하여 여과한 다음 유기 반응용액을 증류수로 3번 세척하였다. 그 다음 무수 마그네슘 황산염으로 건조한 뒤 여과하고 유기용액을 회전증발기로 농축하였다. 농축물은 SiO₂ 플래시 칼럼 크로마토그래피 (용출액 EtOAc:MeOH = 1:1)로 분리하여 순수한 생성물, mono-tosylated PEG



() 을 54% 수율로 수득하였다.

[0280] 한편, selenium 분말 0.375 g (0.005 mol)을 증류수 20 mL 에 분산하였다. 그 다음 10 mL 증류수에 용해한 붕산나트륨(0.359 g, 0.0095 mol)을 상기 분산액에 천천히 첨가하고 0 ° C에서 30분 동안 교반하였다. 반응 혼합물에 셀레늄 분말(0.375g, 0.005 mol)을 추가하고 100 ° C에서 2 시간 동안 교반하여 Na₂Se₂ 반응액을 제조하였다. 이후 증류수 20 mL에 용해하고 pH를 8로 조정된 mono-tosylated PEG (5.805 g, 0.01 mol) 수용액을 상기 Na₂Se₂ 반응액에 주입하였다. 반응 혼합물을 12 시간 불활성 대기 아래에서 교반한 다음, 1시간 동안 공기에 노출시키고 100 mL의 디클로로메탄으로 2회 추출했다. 디클로로메탄 추출층을 100 mL의 증류수로 2회 세척한 다음 무수 마그네슘 황산염으로 건조하고, 용매는 진공증발기로 제거하였다. 농축물을 플래시 칼럼 크로마토그래피(용



출액 EtOAc:MeOH = 1:2)로 분리하여 Se-PEG () 을 57 % 수율로 수득하였다.

[0281] 최종적으로 Se-Nb 가교제를 아래와 같이 합성하였다. 5-노르보넨-2 카르복실산(0.405 mL, 0.003 mol)을 둥근 플라스크에 10 mL의 디클로로메탄과 함께 녹인 후, 트리에틸아민(0.754 mL, 0.005 mol)을 첨가하였다. 상기 반응물에 염화 옥살릴(oxalyl chloride, 0.274 mL, 0.003 mol)을 주입하고 0 ° C에서 1시간 동안 교반하였다. 그 후 Se-PEG (1g, 0.001 mol)을 반응물에 첨가하고 혼합물을 12시간 동안 상온에서 교반하였다. 반응 종료 후, 생성물을 100 mL의 디클로로메탄으로 추출하고 100 mL 증류수로 2회 세척하였다. 디클로로메탄 층을 무수 마그네슘 황산염으로 건조하고, 진공증발기로 용매를 제거하였다. 얻어진 생성물을 헥산 용액에서 재결정하여 순수한 Se-Nb를 90% 수율로 수득하였다.

[0283] <실시예 1> 외부자극 감응형 하이드로겔의 제조 1 (가교 보조제 미포함)

[0284] ECM-Nb와 Se-Tz 가교제를 이용하여 역-전자-요구 디엘스 알더 클릭 반응(Inverse-electron demand Diels Alder click reaction; IEDDA click reaction)에 의해 가교 결합된 ECM 유래 하이드로 겔을 제조하였다. 도 3에 ECM 유래 하이드로겔의 합성 과정을 역관 시험법으로 나타내었다.

[0285] 구체적으로, 상기 제조예 1의 ECM-Nb(화학식 3)와 상기 제조예 8의 Se-Tz(화학식 11)을 생리적 온도에서 혼합하면 빠른 겔화 속도로 하이드로겔을 형성한다. 하이드로겔의 물리화학적 특성을 비교 평가하기 위하여 서로 다른 조성으로 7개의 하이드로겔 샘플을 제조하였다. 즉 pH 7.4 인산염 버퍼(PBS, 0.01M)에 2 또는 5 w/v%로 용해한 400 마이크로 리터의 ECM-Nb, 그리고 DMSO : PBS (0 : 10, 1 : 10, 2 : 10 v/v)에 용해한 Se-Tz를, 각각 Nb/Tz (10/4, 10/7, 10/10) 몰비에 해당하도록 혼합하여 하이드로겔을 각각 생성하였다. 7 가지 하이드로겔의 구성과 약칭을 하기 표 1에 나타내었다.

[0286] 하기 표 1에서 'Nb/Tz'는 노르보넨 작용기 개수/테트라진 작용기 개수의 비율을 나타낸다.

표 1

Hydrogel	Feed ratio Nb/Tz ^a	ECM-Nb conc. (wt%)	PBS/DMSO (v/v)	Gelation time (min) ^b	Hydrogel Content (%) ^c
ECMH1 (실시예1-1)	10/4	2	10/1	7.63 ± 0.50	91
ECMH2 (실시예1-2)	10/7	2	10/1	4.84 ± 0.41	94
ECMH3 (실시예1-3)	10/10	2	10/1	4.17 ± 0.36	95
ECMH4 (실시예1-4)	10/10	2	10/2	3.68 ± 0.29	96
ECMH5 (실시예1-5)	10/10	2	10/0	9.83 ± 0.68	92

ECMH6 (실시예1-6)	10/4	5	10/1	2.91 ± 0.19	94
ECMH7 (실시예1-7)	10/10	5	10/1	1.72 ± 0.08	98

[0288] ^a노르보넨과 테트라진 작용기의 이온적 당량비

[0289] ^b 37℃ 에서 측정된 겔화 시간

[0290] ^c중량법으로 측정

[0292] <실시예 2> 하이드로겔에 ICG/DOX 담지

[0293] PBS에 용해한 제조예 1의 ECM-Nb(화학식 3) 용액에 PBS에 용해한 DOX(doxorubicin) 1mg/mL와 ICG(indocyanine green) 1mg/mL을 추가로 혼합한 다음, PBS에 용해한 제조예 8의 Se-Tz(화학식 11)을 추가로 혼합하여 ECMH1/DOX/ICG, ECMH2/DOX/ICG와 ECMH3/DOX/ICG 하이드로겔을 각각 제조하였다.

[0295] <실시예 3> 외부자극 감응형 하이드로겔의 제조 2 (가교 보조제 포함)

[0296] ECM-Nb(제조예 1)와 Se-Tz 가교제(제조예 8) 및 가교보조제 sulfo-NHS 를 이용하여 가교 결합된 ECM 유래 하이드로 겔을 제조하였다.

[0297] 구체적으로, pH 7.4 인산염 버퍼(PBS, 0.01M)에 2 w/v%로 용해한 400 마이크로 리터의 ECM-Nb, 그리고 DMSO : PBS (1 : 10 v/v)에 용해한 Se-Tz와 sulfo-NHS를 Nb/Tz/sulfo-NHS (10/10/1) 몰비에 해당하도록 혼합하여 하이드로겔을 제조하였다. 얻어진 ECM 하이드로겔은 겔화 시간 1분 이내의 빠른 가교 속도를 보였으며 하이드로겔의 강도도 실시예 1의 하이드로겔과 비교하여 높게 나타났다.

[0299] <실험예 1> 겔화 시간 및 하이드로겔 함량 (hydrogel content)

[0300] 겔화 시간은, 역관 시험과 디지털 시간 측정기를 사용하여 결정하였고, 그 결과를 상기 표 1에 나타내었다.

[0301] 구체적으로, 하이드로겔 함량은 하이드로겔을 동결건조한 후 건조된 하이드로겔을 pH 5의 증류수로 씻어 미반응 반응물을 제거한다. 그리고 나서, 하이드로겔을 말려서 무게를 잴고, 그 결과를 상기 표 1에 나타내었다.

[0302] 하이드로겔 함량은 하기 (1) 식으로 계산한다.

[0303] 하이드로겔 함량(%) = $W_1/W_0 \times 100$ (1)

[0304] 여기서 W_0 은 건성 하이드로겔의 1차 중량이고, W_1 은 팽윤과 세척 후 하이드로겔의 건조 중량이다.

[0306] <실험예 2> 하이드로겔의 팽윤 비율

[0307] 하이드로겔의 팽윤 성질은 간단한 중력법으로 측정하였다. 건조된 하이드로겔 원반을 생리학적 온도에서 pH 7.4 의 PBS(0.01 M)에 담근다. 팽윤된 하이드로겔은 주어진 시간에 무게를 재고, 하이드로겔 무게의 증가가 관찰되지 않을 때까지 계속 측정한다. 팽윤 비율(SR, Swelling Ratio)은 (2) 식으로 계산하였다.

[0308] $SR(100\%) = (W_s - W_d)/W_d$ (2)

[0309] 여기서 W_s 는 팽윤된 하이드로겔의 무게이고 W_d 는 최종 건조된 하이드로겔의 무게다.

[0310] 하이드로겔의 팽윤 비율은 5일 동안 PBS 용액에 담근 후 하이드로겔의 무게 증가를 측정하여 결정했다.

- [0312] 도 4는 실시예에서 제조한 하이드로겔의 팽윤 비율을 측정한 그래프이다.
- [0314] 도 4에 따르면, 가교제의 양이 감소하면 ECM 하이드로겔의 팽윤 비율이 높아지는 것으로 나타났다. 모든 하이드로겔에서 팽윤 비율은 초기 2시간 동안 높게 나타났고, 그 후 24시간 동안 서서히 평형에 도달했다.
- [0316] <실험예 3> 하이드로겔의 유동학적 전단계수
- [0317] 도 5는 순수 ECM 및 실시예에서 제조한 ECM 하이드로겔의 형성 과정에서 반응 시간에 따른 유동학적 전단탄성계수(shear modulus) 측정 결과, 주파수 스위프 시험(frequency sweep test, 0.1-10 rad/s)에서 하이드로겔의 저장계수(storage modulus)를 측정한 그래프이다.
- [0319] 도 5에 따르면, 순수한 ECM의 농도가 5wt% 일 때가 2wt% 보다 높았다. Se-Tz 가교제의 혼합비율이 높을수록 저장계수가 증가하며, 3분 동안의 측정시간에서는 ECM-Nb 2wt%를 Se-Tz가교제와 반응할 때 Nb/Tz 비가 1 (ECMH7) 일 때 가장 높게 나타났다.
- [0321] <실험예 4> 하이드로겔의 형태학적 미세구조 관찰
- [0322] ECM 하이드로겔의 내부 형태학적 미세구조를 조사하기 위해 SEM을 이용하여 하이드로겔의 단면을 관찰하였다.
- [0323] 구체적으로, 팽윤 상태가 평형 조건에 도달한 후, 모든 물이 제거될 때까지 하이드로겔을 진공 상태에서 동결 건조하고 동결 건조된 하이드로겔을 수직으로 절단한 뒤 시편을 금으로 코팅하여 SEM 기기로 관찰하였다.
- [0325] 도 6은 실시예 1-1 및 실시예 1-3에서 제조한 ECM 하이드로겔을 SEM으로 관찰한 이미지이다.
- [0327] 도 6에 따르면, Nb/Tz의 비가 높을수록 기공이 작은 구조를 형성하였고, 반대로 Nb/Tz의 비가 낮을수록 더 큰 기공의 다공성 구조를 나타내었다. 즉, 제조된 ECMH1(도 6a, 실시예 1-1)하이드로겔의 SEM 이미지는 ECMH3(도 6b, 실시예 1-3) 보다 기공이 큰 다공성 구조를 보여주었다.
- [0329] <실험예 5> NIR 조사에 의한 하이드로겔의 분해반응 조사
- [0330] ICG가 적재된 ECMH1/ICG 하이드로겔에 NIR (808 nm, 2 W/cm²)로 5분동안 조사했다. 그 다음 NIR을 제거하고 37℃에서 30분 동안 100 rpm 수평 셰이커를 사용하여 흔들어 주었다. 디셀레나이드 결합은 활성 산소류(reactive oxygen species, ROS) 또는 H₂O₂와의 반응에 의해 분해될 수 있는 것으로 알려져 있다.
- [0332] 도 7은 ICG가 적재된 ECMH1/ICG 하이드로겔에 NIR을 5분간 조사한 다음, 겔-줄 전이가 일어남을 확인한 사진이다.
- [0334] 도 7에 따르면, ECMH1/ICG 하이드로겔은 NIR 조사 후 30분 이내에 완전히 용해되었다. 상기 결과는 하이드로겔 구조에서 디셀레나이드 결합이 분해되면서 가교된 하이드로겔이 선형 ECM 사슬로 분해되는 것을 나타낸다. 반면에 아무런 처리도 하지 않은 순수한 하이드로겔의 경우 10일이 지나도록 분해되지 않았다.
- [0336] <실험예 6> NIR 조사에 의한 약물 방출 (시험관내 실험)
- [0337] 하이드로겔의 약물 방출 실험은 PBS에서 수행하였다. NIR 조사에 의한 약물 방출 실험의 경우, ECMH1/DOX/ICG,

ECMH2/DOX/ICG와 ECMH3/DOX/ICG (실시예 2) 하이드로겔을 37℃에서 pH 7.4 PBS 15 mL에 담긴 다음 흔들어 주었다. 주어진 시간 간격에 따라 3mL의 샘플 용액을 취하여 485nm와 780nm의 파장에서 UV-vis 분석을 진행하였다.

[0338] DOX의 양은 표준 검량선을 사용하여 측정하였다. 샘플링할 때마다 총 부피를 일정하게 유지하기 위해 신선한 용액 3 mL를 보충하였다. DOX 배출 비율은 누적치로 계산하였다. 그리고 2일 후에 808 nm NIR을 1 W/cm²의 세기로 각 하이드로겔에 1분 동안 조사한 후 약물 방출을 측정한 다음, NIR 없이 37℃에서 유지하였으며 이런 과정을 2일 마다 반복하였다.

[0339] NIR 응답성 특성 때문에, 디셀레나이드 가교 연결로 구성된 ECM 하이드로겔은 약물이나 생체활성분자의 캡슐화 및 지속적인 방출에 사용될 수 있다. DOX를 하이드로겔의 방출 양상을 조사하기 위한 모델 약물로 선택하고, 서로 다른 가교 밀도의 ECM 하이드로겔을 샘플로 선택하여 방출 성질을 관찰하였다. DOX와 ICG는 하이드로겔 형성 중에 ECM 하이드로겔 구조 내에 적재하였다.

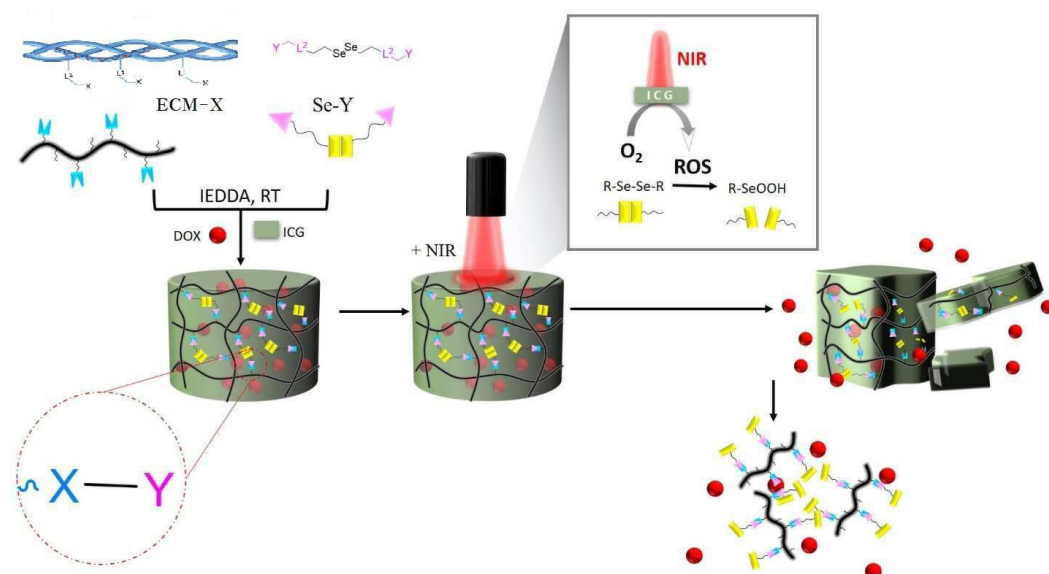
[0341] 도 8은 실시예에서 제조한 DOX 담지 ECM 하이드로겔을 신선한 용액에 보관한 다음, 2일차에 NIR 조사한 후 DOX 방출 속도를 측정한 그래프이다.

[0343] 도 8에 따르면, ECM 하이드로겔은 외부 자극이 없으면 낮은 DOX 방출 속도를 나타내었다. 반면에, NIR 레이저 조사를 통하여 DOX의 누적 방출량이 상당히 증가함을 알 수 있다. 즉, 약물방출 실험 시작 후 2일 째에 NIR 방사선을 조사하였을 때 하이드로겔 가교 밀도 증가 순인 ECMH1/DOX/ICG, ECMH2/DOX/ICG와 ECMH3/DOX/ICG의 약물의 누적 방출량은 각각 43, 40, 및 35%로 나타났다. 그리고, NIR 조사 후 10일 째에는 각각 90, 75, 67%에 달했는데, 이것은 NIR 노출 없이 동일한 샘플에서 20%만 방출한 것과 뚜렷한 대조를 보였다. NIR 광선 조사에 의해 ICG가 ROS를 생성하게 하고, 이 ROS는 디셀레나이드 결합 및 젤 네트워크를 분해하여 하이드로겔 구조로부터 약물 방출을 가속화하는 것으로 판단된다.

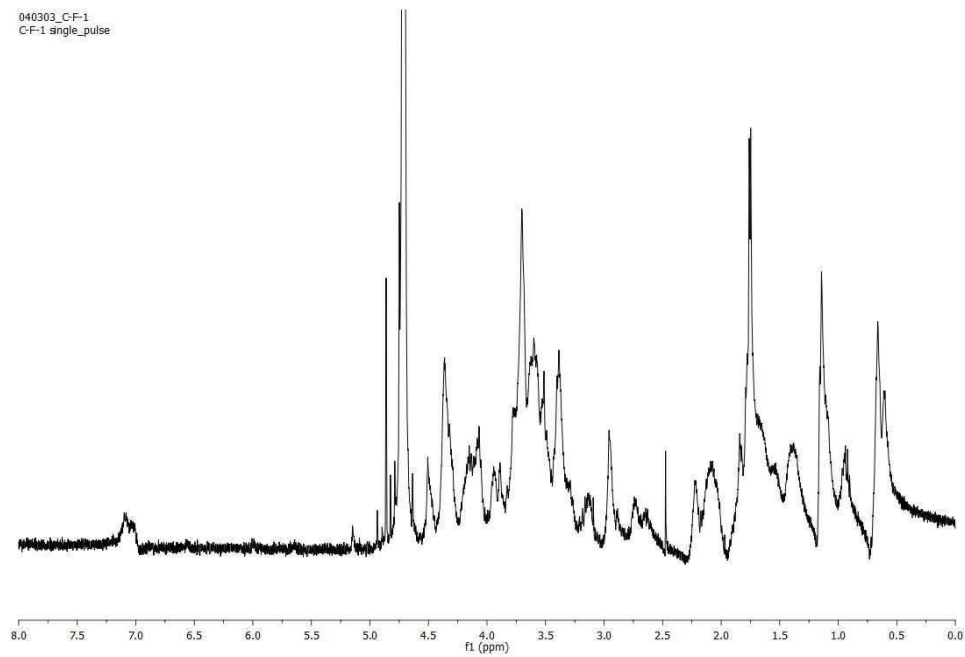
[0345] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

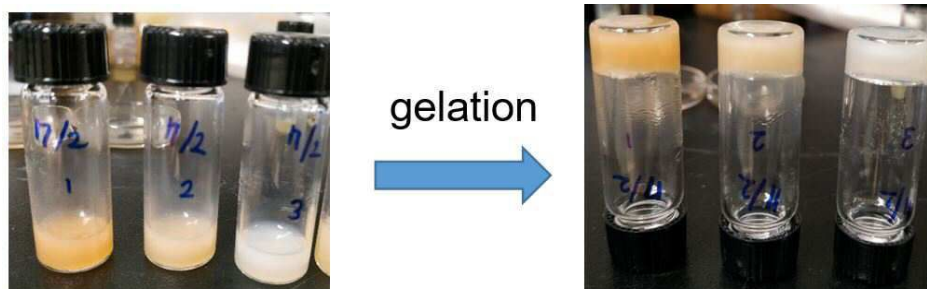
도면1



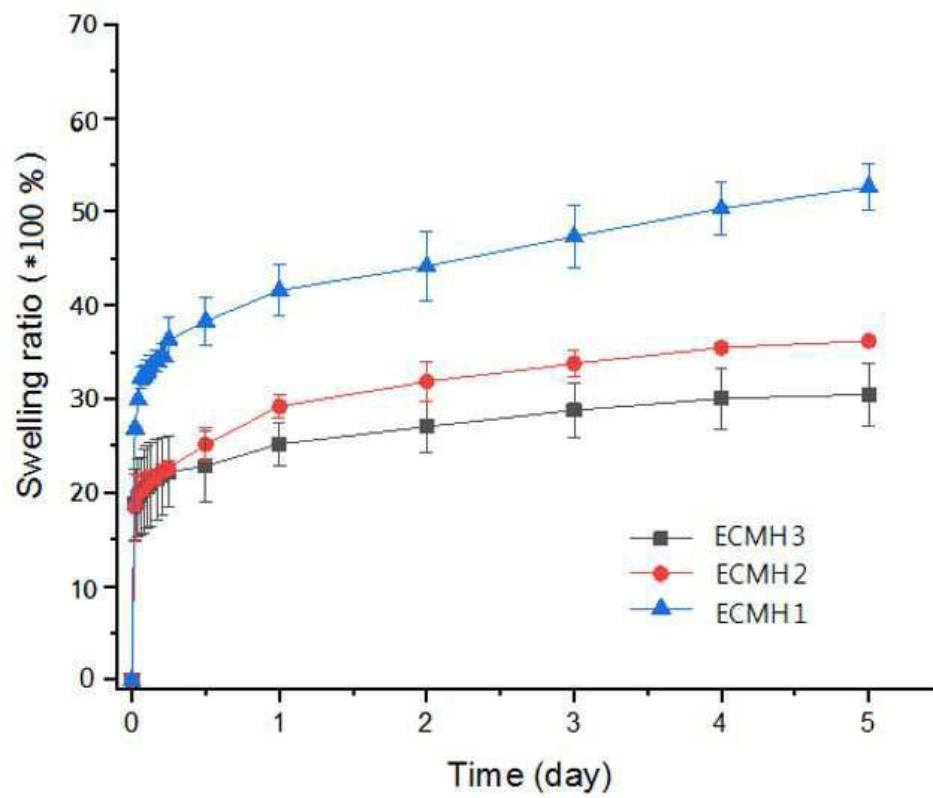
도면2



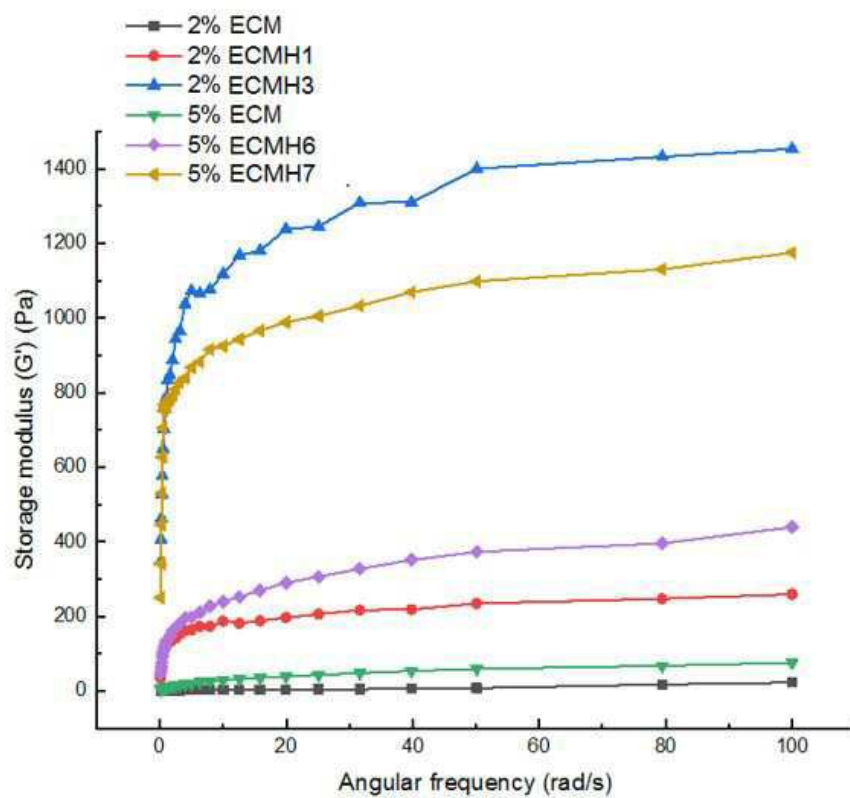
도면3



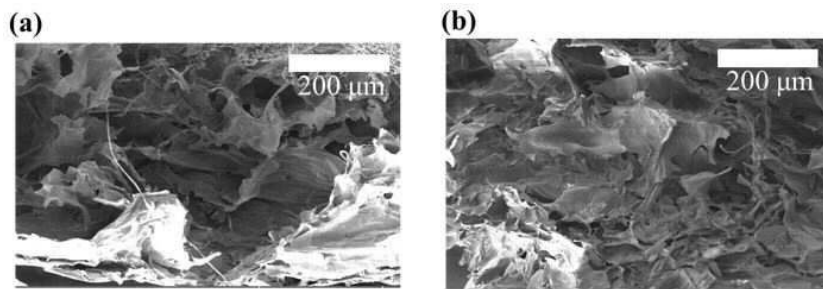
도면4



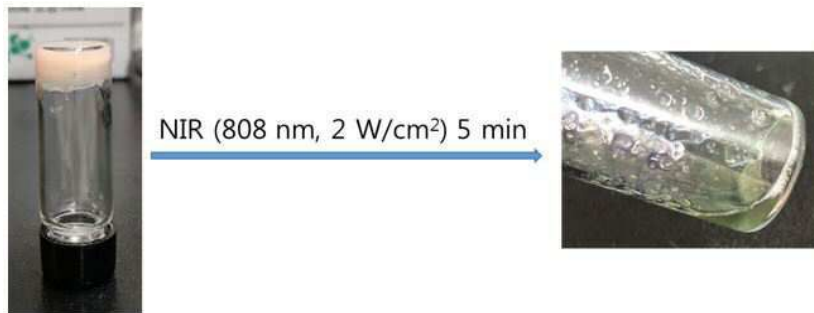
도면5



도면6



도면7



도면8

