(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0055645
(43) 공개일자 2020년05월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08B 37/08 (2006.01) *A61K 31/728* (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C08B 37/0072 (2013.01)
A61K 31/728 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0096729(분할)
(22) 출원일자 2019년08월08일
심사청구일자 2019년08월08일
(62) 원출원 특허 10-2018-0138882
원출원일자 2018년11월13일
심사청구일자 2018년11월13일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
의료법인 성광의료재단
서울특별시 강남구 논현로 566 (역삼동)
(72) 발명자
임동권
서울특별시 강남구 도곡로78길 22, 108동 2406호
정상윤
경기도 화성시 동탄순환대로29길 57, 511동 1001호
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 8 항

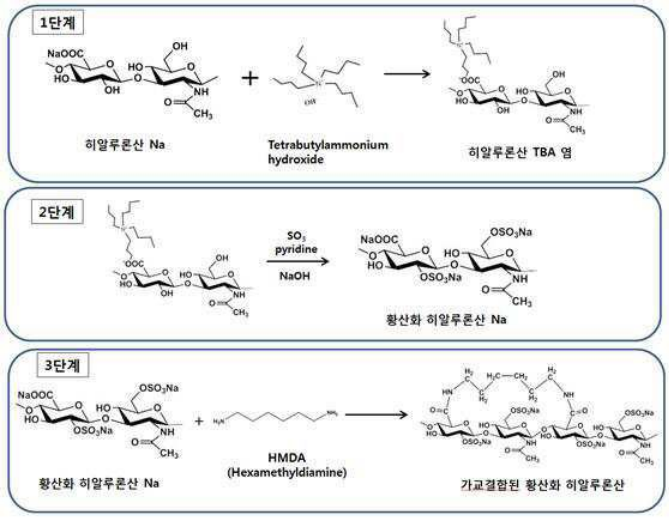
(54) 발명의 명칭 **황산화된 히알루론산 유도체, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 근골격계 관절질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 황산화된 히알루론산 유도체, 이의 제조방법 및 상기 황산화된 히알루론산 유도체를 포함하는 근골격계 관절질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 황산화 히알루론산 유도체 및 이를 포함하는 골격계 관절질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 완충효과 뿐만 아니라 염증완화, 신생혈관 형성의 억제를 통해 통증을 조절함으로써 실제 임상에서 환자의 관절염 치료효과를 크게 높여 줄 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 19/02 (2018.01)
A61P 29/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI16C1559
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 연구중심병원 육성 R&D
연구과제명 첨단 융합형 세포치료제 개발을 위한 개방형 R&BD 비즈니스 플랫폼 구축 및 확산
기 여 율 50/100
주관기관 분당차병원
연구기간 2016.04.01 ~ 2024.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016R1A2B3013825
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국과학재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 심혈관 질환 조기진단을 위한 분자표적 나노조영제 개발
기 여 율 50/100
주관기관 고려대학교
연구기간 2018.04.01 ~ 2019.02.28

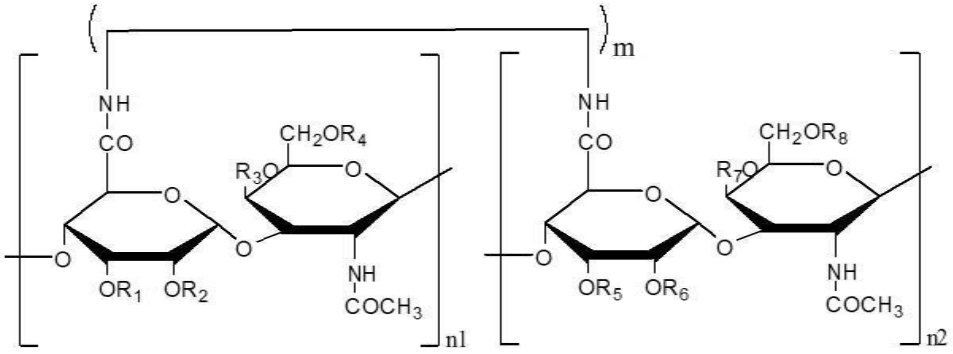
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 [화학식 1]로 표시되며, 황산화 히알루론산 단량체간 가교결합에 의해 하이드로겔을 형성하는 것을 특징으로 하는 황산화 히알루론산 유도체:

[화학식 1]



상기 [화학식 1]에서,

R_4 및 R_8는 $SO_3^-X^+$이고, R_1 또는 R_5는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소 또는 $SO_3^-X^+$이며,

R_2 내지 R_3 또는 R_6 내지 R_7은 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소 또는 $SO_3^-X^+$이며, 상기 R_2 내지 R_3 중 적어도 하나 이상은 $SO_3^-X^+$이고, 상기 R_6 내지 R_7 중 적어도 하나 이상은 $SO_3^-X^+$이며,

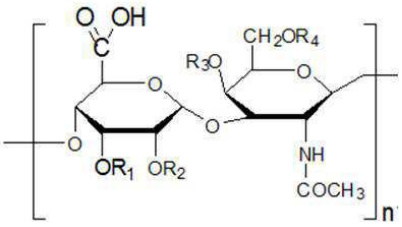
상기 X는 양이온이고, n1 및 n2는 각각 1 이상이며,

상기 황산화 히알루론산 단량체간의 가교결합은 아마이드 결합을 통해 연결된 적어도 하나 이상의 $(CH_2CH_2)m(m\geq 1)$기를 포함하는 고리 또는 비고리화 물질의 공유결합을 통해 연결된 것이다.

청구항 2

하기 [화학식 2]로 표시되는 황산화 히알루론산 단량체에 활성 에스터 형성 시약 및 가교결합제를 첨가 및 반응시켜 하기 [화학식 2]로 표시되는 황산화 히알루론산 단량체의 카르복실기를 활성화시키고, 단량체간 가교 결합을 유도하여 제1항의 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 황산화 히알루론산 유도체의 제조방법:

[화학식 2]



상기 [화학식 2]에서,

R_4는 $SO_3^-X^+$이고, R_1은 수소 또는 $SO_3^-X^+$이며,

R_2 내지 R_3는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소 또는 $SO_3^-X^+$이며, 상기 R_2 내지 R_3 중 적어도 하나 이상은 $SO_3^-X^+$이고, 상기 X는 양이온이며, n은 1 이상의 정수이다.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 활성 에스터 형성 시약은 N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride(EDC), N-hydroxysuccinimide(NHS) 및 1-Hydroxybenzotriazole(HOBT) 중 1종 이상인 것을 특징으로 하는 황산화 히알루론산 유도체의 제조방법.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 가교결합제는 hexamethyldiamine(HMDA), adipic dihydrizide, amine polyethylene glycol 또는 이들의 혼합물인 것을 특징으로 하는 황산화 히알루론산 유도체의 제조방법.

청구항 5

제1항에 따른 황산화 히알루론산 유도체를 포함하는 근골격계 관절질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 조성물 내에 포함된 황산화 히알루론산 유도체가 신생혈관생성인자를 저해하여 혈관 생성을 억제하여 염증을 완화하는 것을 특징으로 하는 근골격계 관절질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 조성물 내에 포함된 황산화 히알루론산 유도체가 활막섬유모세포와 면역세포의 염증성 싸이토카인과 케모카인의 분비 및 세포증식을 억제하여 염증을 완화하는 것을 특징으로 하는 근골격계 관절질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 근골격계 관절질환은 퇴행성 관절염(Osteoarthritis), 류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis), 반월상연골 손상(Meniscus Injury), 유착성관절낭염(Adhesive capsulitis), 힘줄에 염증이 생기는 건병증(Tendinopathy), 통풍성관절염(Gouty arthritis) 및 기타 염증성 관절염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 근골격계 관절질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 황산화된 히알루론산 유도체, 이의 제조방법 및 상기 황산화된 히알루론산 유도체를 포함하는 근골격계 관절질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 히알루론산(hyaluronic acid)은 글루크로닉산 (glucuronic acid)와 아세틸글루코스아민(acetylglucosamine)으로 구성된 선형 다당류(polysaccharide)로서 세포외기질(extracellular matrix, ECM), 관절 윤활액(synovial fluid), 연골을 구성하는 지지체에 존재하는 글리코스아미노-글리칸(glycosamino-glycan, GAG)중의 하나이다. 히알루론산은 또한 세포의 운동성, 세포분화, 상처치유 및 암 전이에 있어서 시그널 분자(signaling molecule)

로서 중요한 역할을 하고 있다. 면역적인 측면에 있어서도 히알루론산은 생체에서 유래된 물질이므로 이상면역 반응의 문제가 없기 때문에 미용 및 조직공학과 약물전달시스템에 널리 사용되고 있다.

[0003] 히알루론산은 용액상에서 3차원적인 구조를 가지고 있으며 이로 인해 광범위한 내부 수소결합, 고분자 사슬의 제한적인 유동성, 독특한 2차(helical), 3차(coiled coil) 구조를 가지고 있다. 특히 가교 결합을 통해 친수성 중합체를 형성하고 건조중량의 수백배 범위의 양으로 물을 흡수할 수 있다. 하이드로젤은 우수한 생체적합성과 친수성 특성 등으로 인해 의·약학 분야에서 다양한 형태로 적용 가능하다. 따라서, 퇴행성 관절염 또는 류마티스성 관절염 등의 치료제로서 분자량이 큰 히알루론산 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염이 관절강 내 주사제의 형태로 임상적으로 사용되고 있다. 히알루론산 또는 그의 염은 통상 액상주사제의 형태로서, 환부인 무릎, 어깨 등의 관절에 직접 투여되며, 관절강 내부로 직접 주입된 점탄성(Visco-elasticity)의 히알루론산은 관절염 환자의 소실된 연골조직을 대신하여 관절 운동시 충격을 완화시켜주고 윤활작용을 도와 관절의 통증경감과 기능의 정상화는 물론 관절염에 의한 기능 장애의 개선 및 통증 억제 기능을 가지는 것으로 보고되고 있다. 현재 관절의 염증과 통증을 더욱 개선하기 위하여 완충효과가 더욱 뛰어난 히알루론산의 하이드로겔을 이용한 연골주사가 개발되어 환자의 관절 내 주입함으로써 관절질환의 치료를 위해 시판되고 있다 (시노비안주사제, LG생명과학). 이러한 연골주사는 히알루론산의 가교결합을 통해 젤타입으로 제조되어 높은 점성을 가지고 있으므로 완충효과를 나타내며 퇴행성 관절염을 완화하는 효과를 나타낸다. 그러나 퇴행성 관절염에 수반되는 염증을 조절하는 효과는 거의 미약하여 관절염증과 이에 의해 발생하는 통증조절에는 치료 효과는 없는 단점이 있다. 또한, 히알루론산 하이드로겔 연골주사는 염증이 심한 관절에 주입 시에는 관절강 내 기질단백분해효소(matrix metalloproteinase)에 의해 바로 분해되어 버리는 단점이 있다.

[0004] 또한, 또 다른 형태로 히알루론산를 이용하는 방법으로서, 히알루론산 단량체에 존재하는 카르복실산에 소수성 치환기를 도입하는 경우, 히알루론산의 친수성 특성에 소수성 성질의 부여가 가능하여 양친성 분자구조가 형성된다. 소수성기가 결합된 양친성 히알루론산은 소수성 또는 난용성 약물을 봉입하는 과정을 거쳐 나노입자(수십nm ~ 수백nm)의 형태로 제조가 가능하기 때문에 항암제등의 부작용을 경감시키고, 치료효과를 극대화 하는 재료로 사용하는 것이 보고된 바 있다.

[0005] 반면, 미국 특허 공개 (US 2004/0053885)에서는 히알루론산에 존재하는 수산화기(-OH)를 황산기(SO_3^-)로 변형하여 제조된 황산화 히알루론산를 사용하여 염증성 류마티스 관절염에 적용해본 결과, 황산화되지 않은 히알루론산에 비교하여 현저한 염증의 완화 효과를 관찰하여 보고한 바 있다. 유럽 공개특허 (WO 96/24362)에서도 40 kDa 내지 1,300 kDa의 황산화 히알루론산이 다양한 원인으로부터 발생한 염증에 대한 항염증 효과를 보고한 바 있으며, 최소 분자량은 40 kDa, 최대 분자량은 1,300 kDa임을 보고한 바 있으며, 황산화가 되지 않은 히알루론산에 비교하여 현저한 항염증 효과의 개선이 보고된 바 있다. 대한민국 등록특허 0591960호에서는 천연물 유래 다당류의 황산화에 따른 신생혈관형성 억제 효과, 항염증제로서의 용도를 보고한 바 있다. 대한민국 공개 특허 (10-2009-0014359)에서는 퇴행성 골관절염 치료에 효과적인 황산화 히알루론산에 기초한 경구 및 관절내 제제를 보고한 바 있다. 그러나 이러한 종래기술에서는 히알루론산의 단량체에 포함된 4개의 수산기(-OH)의 황산화 정도에 따른 항염증효과, 신생혈관 형성 억제효과등에 대해서는 전혀 보고된 바가 없다. 최근 Biomaterials지 (2016. 77, 130-138)에 발표된 보고에 따르면 히알루론산의 4개 수산기의 황산화 정도를 조절하는 경우 혈관신생인자들 중에 특히 혈관신생에 관여하는 신생혈관성장인자(VEGF165a)만을 선택적으로 저해하는 방법등이 보고된 바 있다.

[0006] 따라서 히알루론산에 존재하는 수산기를 황산기로 변형한 다음 하이드겔 또는 나노입자의 형태로 제조하는 경우 상기 열거된 바와 같이 관절염의 치료를 위한 완충효과와 함께 관절염에 수반되는 염증을 동시에 완화시키는 효과를 기대할 수 있다.

[0007] 그러나, 히알루론산을 황산화 히알루론산으로 제조하기 위해서는 강한 산성을 가진 SO_3^- 이온이 포함된 염을 다량 가하여 히알루론산의 수산기가 황산화되는 과정을 거치게 되므로, 히알루론산이 분해되어 분자량이 약 1/10로 감소하고, 수산화기보다 황산기는 극성이 높은 기능기 이므로 히알루론산의 물리적 성질도 급격하게 변하게 된다. 특히 물에 대한 용해도의 급격한 증가, 음전하의 형성, 점성도의 급격한 감소등의 변화가 예상된다.

[0008] 따라서, 황산화 히알루론산은 물리적 성질이 황산화 되지 않은 히알루론산과 크게 다르다. 특히 친수성이 급격히 증가하고, 점성도가 급격하게 낮아져서 황산화된 히알루론산의 하이드로젤의 제조가 어렵기 때문에 아직 황산화된 히알루론산의 하이드젤 형태의 유도체는 보고된 바 없다. 나아가 화학적 구조 변형으로 인하여 황산화 히알루론산에서 관찰된 신생혈관 억제효과, 항염증 효과가 유지될 것인지도 전혀 예상할 수가 없다.

[0009] 또한 황산화 히알루론산에 소수성 치환기를 부가하여 나노입자(수십 ~ 수백 나노미터)를 제조하고자 하는 경우에도 황산화 히알루론산의 물리적 성질의 변화로 인하여 소수성기가 도입된 황산화 히알루론산이 나노입자 형태로 제조 가능성을 예상할 수가 없다.

[0010] 이에 본 발명자들은 상기 열거한 문제점을 극복하고자 다양한 가교결합 방법을 시도한 결과 황산화 히알루론산에 존재하는 카르복실산을 이용한 amide 결합을 통한 가교결합과 반응 당량을 조절하는 경우에 황산화 히알루론산 하이드로젤의 점성도가 황산화 하지 않은 히알루론산 하이드로젤과 동등한 수준의 점성도가 나타남을 확인하여 본 발명을 완성하였다. 또한 황산화 히알루론산 하이드로젤의 관절염 치료효과를 동물실험에서 확인해 본 결과 황산화 하지 않은 히알루론산 하이드로겔에 비교하여 현저한 관절염 치료효과가 있음을 확인하였다.

[0011] 또한 황산화 히알루론산에 콜란산(5베타-cholanic acid)으로 명명되는 소수성 치환기를 부가한 경우 수십-수백 나노미터에 해당하는 구형의 나노입자의 형성이 가능함을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 황산화 히알루론산의 낮은 점도를 극복할 수 있는 하이드로젤 및 나노입자의 형태로 제조 가능한 황산화 히알루론산 유도체 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

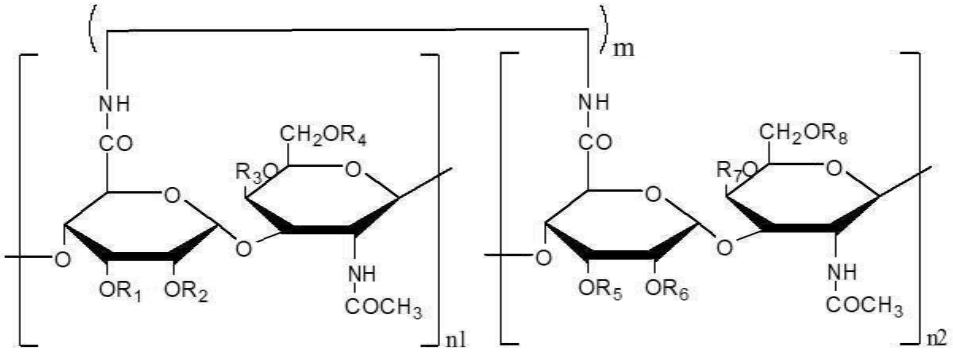
[0013] 또한, 본 발명의 목적은 상기 황산화 히알루론산 유도체를 포함하는 근골격계 관절질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0015] 하기 [화학식 1]로 표시되며, 황산화 히알루론산 단량체간 가교결합에 의해 하이드로겔을 형성하는 것을 특징으로 하는 황산화 히알루론산 유도체를 제공한다:

[0016] [화학식 1]

[0017] 

[0018] 상기 [화학식 1]에서,

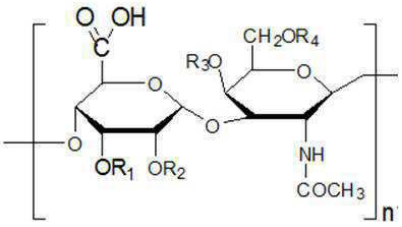
[0019] R_1 내지 R_4 또는 R_5 내지 R_8는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소 또는 $SO_3^-X^+$이며, 상기 R_1 내지 R_4 중 및 R_5 내지 R_8 중 적어도 하나 이상은 $SO_3^-X^+$이고, 상기 X는 양이온이며,

[0020] n1 및 n2는 각각 1 이상이고,

[0021] 상기 황산화 히알루론산 단량체간의 가교결합은 아마이드 결합을 통해 연결된 적어도 하나 이상(m>1)의 $-CH_2$기를 포함하는 고리 또는 비고리화 물질의 공유결합을 통해 연결된 것이다.

[0022] 본 발명은 또한, 하기 [화학식 2]로 표시되는 황산화 히알루론산 단량체에 활성 에스터 형성 시약 및 가교결합제를 첨가 및 반응시켜 하기 [화학식 2]로 표시되는 황산화 히알루론산 단량체의 카르복실기를 활성화시키고, 단량체간 가교 결합을 유도하여 제1항의 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 황산화 히알루론산 유도체의 제조방법을 제공한다:

[0023] [화학식 2]

[0024] 

[0025] 상기 [화학식 2]에서,

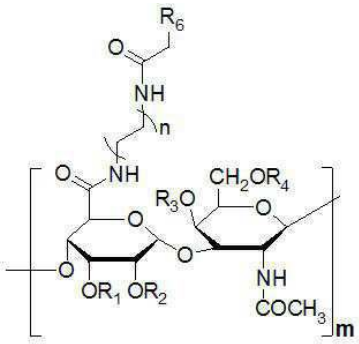
[0026] R_1 내지 R_4는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소 또는 $SO_3^-X^+$이며, 상기 R_1 내지 R_4 중 적어도 하나 이상은 $SO_3^-X^+$이고, 상기 X는 양이온이며, n은 1 이상의 정수이다.

[0027] 이때, 상기 활성 에스터 형성 시약은 N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride(EDC), N-hydroxysuccinimide(NHS) 및 1-Hydroxybenzotriazole(HOBT) 중 1종 이상일 수 있다.

[0028] 또한, 상기 가교결합제는 hexamethyldiamine(HMDA), adipic dihydrizide, amine polyethylene glycol 또는 이들의 혼합물일 수 있다.

[0029] 본 발명은 또한, 하기 [화학식 3]으로 표시되며, 히알루론산 단량체에 소수성 물질이 결합된 황산화 히알루론산 유도체를 제공한다:

[0030] [화학식 3]

[0031] 

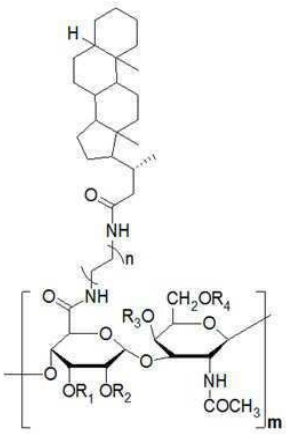
[0032] 상기 [화학식 3]에서,

[0033] R_1 내지 R_4는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소 또는 $SO_3^-X^+$이며, 상기 R_1 내지 R_4 중 적어도 하나 이상은 $SO_3^-X^+$이고, 상기 X는 양이온이며, R_6는 적어도 하나 이상의 $-CH_2$기를 포함하는 고리 또는 비고리화 소수성 물질이고, n 및 m은 1 이상의 정수이다.

[0034] 이때, 상기 소수성 물질은 5-β 콜란산(5-β cholanic acid), 콜산(cholic acid), 케노데옥시콜산(chenodeoxycholic acid), 글리코콜산 (glycocholic acid), 타우로콜산(taurocholic acid), 데옥시콜산(deoxycholic acid), 리소콜산(lithocholic acid) 및 7-옥소-리소콜산(7-oxo-lithocholic acid)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0035] 또한, 상기 [화학식 3]으로 표시되는 황산화 히알루론산 유도체는 하기 [화학식 4]로 표시되는 것일 수 있다:

[0036] [화학식 4]



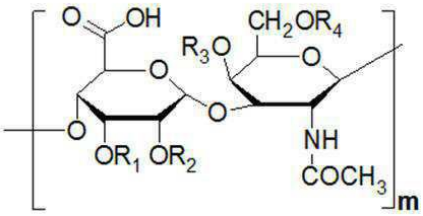
[0037]

[0038] 상기 [화학식 4]에서,

[0039] R_1 내지 R_4는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소 또는 $SO_3^-X^+$이며, 상기 R_1 내지 R_4 중 적어도 하나 이상은 $SO_3^-X^+$이고, 상기 X는 양이온이며, n 및 m은 1 이상의 정수이다.

[0040] 본 발명은 또한, 하기 [화학식 5]로 표시되는 황산화 히알루론산 단량체에 활성 에스터 형성 시약 및 적어도 하나 이상의 $-CH_2$기를 포함하는 고리 또는 비고리화 소수성기를 포함하는 화합물을 첨가 및 반응시켜, 황산화 히알루론산 단량체의 카르복실기를 활성화시키고, 상기 단량체와 소수성기의 결합을 유도하여 제4항의 [화학식 3]으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 황산화 히알루론산 유도체의 제조방법을 제공한다:

[0041] [화학식 5]



[0042]

[0043] 상기 [화학식 5]에서,

[0044] R_1 내지 R_4는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소 또는 $SO_3^-X^+$이며, 상기 R_1 내지 R_4 중 적어도 하나 이상은 $SO_3^-X^+$이고, 상기 X는 양이온이며, m은 1 이상의 정수이다.

[0045] 이때, 상기 활성 에스터 형성 시약은 N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride(EDC), N-hydroxysuccinimide(NHS) 및 1-Hydroxybenzotriazole(HOBT) 중 1종 이상일 수 있다.

[0046] 또한, 상기 소수성기는 5-β 콜란산(5-β cholanic acid), 콜산(cholic acid), 케노데옥시콜산(chenodeoxycholic acid), 글리코콜산 (glycocholic acid), 타우로콜산(taurocholic acid), 데옥시콜산(deoxycholic acid), 리소콜산(lithocholic acid) 및 7-옥소-리소콜산(7-oxo-lithocholic acid)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상이며, 상기 소수성기를 포함하는 화합물은 아민기가 추가적으로 도입된 것일 수 있다.

[0047] 본 발명은 또한, 상기 황산화 히알루론산 유도체를 포함하는 근골격계 관절질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0048] 본 발명에 따르면, 상기 조성물 내에 상기 조성물 내에 포함된 황산화 히알루론산 유도체가 신생혈관생성인자를 저해하여 혈관 생성을 억제하여 염증을 완화할 수 있다.

[0049] 또한, 본 발명에 따르면, 상기 조성물 내에 포함된 황산화 히알루론산 유도체가 활막섬유모세포와 면역세포의

염증성 싸이토카인과 케모카인의 분비 및 세포증식을 억제하여 염증을 완화할 수 있다.

[0050] 본 발명에 따르면, 상기 근골격계 관절질환은 퇴행성 관절염(Osteoarthritis), 류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis), 반월상 연골 손상(Meniscus Injury), 유착성관절낭염(Adhesive capsulitis), 힘줄에 염증이 생기는 건병증(Tendinopathy), 통풍성관절염(Gouty arthritis) 및 기타 염증성 관절염으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

발명의 효과

[0051] 본 발명은 황산화 히알루론산의 친수성과 낮은 점도를 극복하여 하이드로겔 및 나노입자의 형태로 제조가 가능한 유도체 및 그 제조방법을 제공할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 황산화 히알루론산 유도체 및 이를 포함하는 골격계 관절질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 완충효과 뿐만 아니라 염증완화, 신생혈관 형성의 억제를 통해 통증을 조절함으로써 실제 임상에서 환자의 관절염 치료효과를 크게 높여 줄 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1은 본 발명에 따른 하이드로겔 형태의 황산화 히알루론산 유도체를 합성하는 방법을 개략적으로 나타낸 것으로, 도 1의 1, 2 단계는 히알루론산으로부터 황산화 히알루론산을 합성하는 과정을 나타내며, 3 단계는 황산화 히알루론산 하이드로겔(본 발명에 따른 황산화 히알루론산 유도체)을 합성하는 방법을 나타낸다.

도 2는 본 발명에 따라 합성된 하이드로겔 형태의 황산화 히알루론산 유도체의 분자 구조 확인을 위해 푸리에 트랜스폼 적외선 분광 분석을 실시한 결과를 나타낸다.

도 3은 히알루론산 하이드로겔과, 본 발명에 따른 황산화 히알루론산 하이드로겔의 제조 과정을 나타낸 사진이다.

도 4는 히알루론산 하이드로겔과, 본 발명에 따른 황산화 히알루론산 하이드로겔의 항염증 효과를 나타낸 동물실험 결과이다.

도 5는 히알루론산 하이드로겔과, 본 발명에 따른 황산화 히알루론산 하이드로겔의 류마티스 관절염 활막 섬유모세포의 항염 효과를 확인한 실험 결과이다.

도 6은 본 발명에 따라 소수성 기능기가 도입된 황산화 히알루론산 유도체로부터 제조된 나노입자의 전자현미경 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0054] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0056] 본 발명에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.

[0057] 본 발명에서 사용된 용어 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 관절염의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 관절염의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0058] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 함유하는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 담체는 이온 교환 수지, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질, 완충 물질, 물, 염, 전해질, 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.

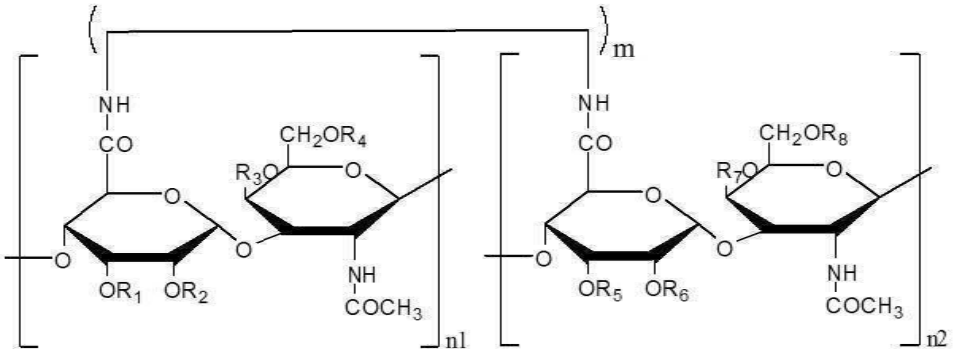
[0059] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물은 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 구강, 심장내, 골수내, 경막내, 경피, 장관, 피하, 설하 또는 국부 투여용으로 제형화하는 것을 특징으로 할 수 있고, 완충제, 항균성 보존제, 계면활성

제, 산화방지제, 긴장성 조정제, 방부제, 증점제 및 점도 개질제로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 보조제를 추가로 함유하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 용액, 현탁액, 에멀젼, 겔 및 분말로 구성된 군에서 선택되는 제형을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0060] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 증상의 경중도, 환자의 체중, 연령, 성, 투여 방식 및 투여시간 등과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정할 수 있다.

[0062] 본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되며, 황산화 히알루론산 단량체간 가교결합에 의해 하이드로겔을 형성하는 것을 특징으로 하는 황산화 히알루론산 유도체를 제공한다:

[0063] [화학식 1]

[0064] 

[0065] 상기 [화학식 1]에서,

[0066] R_1 내지 R_4 또는 R_5 내지 R_8는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소 또는 $SO_3^-X^+$이며, 상기 R_1 내지 R_4 중 및 R_5 내지 R_8 중 적어도 하나 이상은 $SO_3^-X^+$이고, 상기 X는 양이온이며,

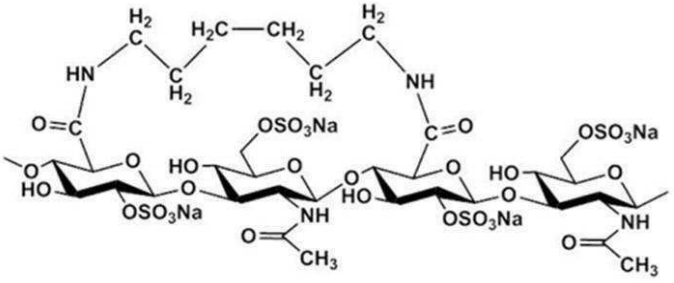
[0067] n1 및 n2는 각각 1 이상이고,

[0068] 상기 황산화 히알루론산 단량체간의 가교결합은 아마이드 결합을 통해 연결된 적어도 하나 이상(m>1)의 $-CH_2$기를 포함하는 고리 또는 비고리화 물질의 공유결합을 통해 연결된 것이다.

[0069] 또한, 상기 X는 양이온 상태의 물질이라면 모두 가능하나, 바람직하게는 1가 양이온, 더욱 바람직하게는 Na일 수 있다.

[0070] 상기 황산화 히알루론산 유도체의 구체적인 일예로서, 상기 황산화 히알루론산 유도체는 하기 [화학식 6]으로 표시되는 화합물일 수 있다:

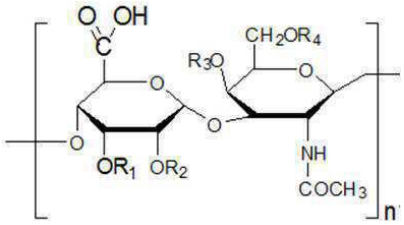
[0071] [화학식 6]

[0072] 

[0074] 본 발명은 또한, 하기 [화학식 2]로 표시되는 황산화 히알루론산 단량체에 활성 에스터 형성 시약 및 가교결합제를 첨가 및 반응시켜 하기 [화학식 2]로 표시되는 황산화 히알루론산 단량체의 카르복실기를 활성화시키고, 단량체간 가교 결합을 유도하여 제1항의 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 황산화 히

알루론산 유도체의 제조방법을 제공한다:

[0075] [화학식 2]



[0076]

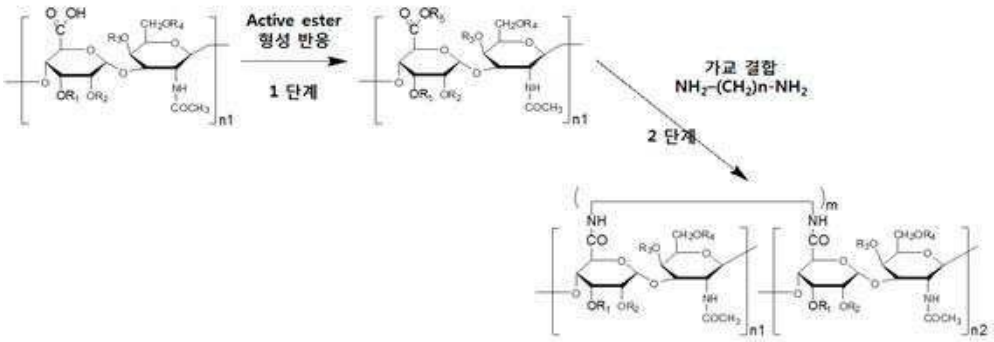
[0077] 상기 [화학식 2]에서,

[0078] R_1 내지 R_4는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소 또는 $SO_3^-X^+$이며, 상기 R_1 내지 R_4 중 적어도 하나 이상은 $SO_3^-X^+$이고, 상기 X는 양이온이며, n은 1 이상의 정수이다.

[0079] 또한, 상기 X는 양이온 상태의 물질이라면 모두 가능하나, 바람직하게는 1가 양이온, 더욱 바람직하게는 Na일 수 있다.

[0080] 상기 [화학식 1]로 표시되는 황산화 히알루론산 유도체의 구체적인 제조 과정은 하기 [반응식 1]에 나타낸 바와 같다.

[0081] [반응식 1]



[0082]

[0083] 상기 [반응식 1]에서 1단계는 황산화된 히알루론산 단량체의 카르복실기를 활성상태(active ester)로 만드는 단계이며, 2단계는 가교결합이 가능하도록 양 말단에 amine기를 가진 시약을 가하여 황산화 히알루론산 하이드로겔을 제조하는 단계이다.

[0084] 이때, 상기 황산화된 히알루론산 단량체의 카르복실기로부터 활성 에스터를 형성하는 데에 사용되는 활성 에스터 형성 시약은 반드시 이에 제한되는 것은 아니지만 N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride(EDC), N-hydroxysuccinimide(NHS) 및 1-Hydroxybenzotriazole(HOBT) 중 1종 이상인 것이 바람직하다.

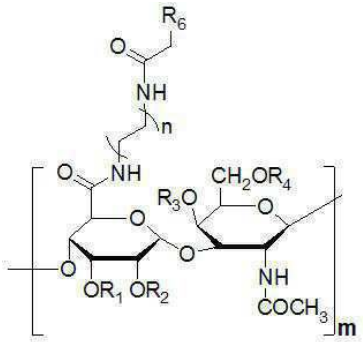
[0085] 또한, 상기 가교결합제는 말단에 아민기를 가진 화합물이라면 모두 적용 가능할 수 있으나, hexamethyldiamine(HMDA), adipic dihydrizide, amine polyethylene glycol 또는 이들의 혼합물인 것이 바람직하다.

[0086] 또한, 상기 [반응식 1]의 단계 반응과 2단계 반응은 각단계를 분리하여 진행할수 있으나, active ester를 형성하는 시약과 가교결합을 일으키는 시약을 동시에 가하여 단계의 구분없이 반응이 진행되는 것이 바람직하다. 예를 들면 HMDA와 EDC, HOBT 시약을 순차적으로 가하여 12시간 이상 교반하는 방법으로 반응이 진행될 수 있다.

[0087] 상기 [반응식 1]에서 반응은 황산화된 히알루론산 단량체의 중량 대비 최소한 1배 이상의 EDC를 가하는 것이 바람직하며, 통상 HOBT는 EDC 중량의 70%에 해당하는 양을 사용하는 것이 바람직하다. HMDA는 황산화 히알루론산 단량체의 중량 대비 10% 내지 20% 범위에서 사용 가능하나, 12 내지 17%의 범위로 사용하는 것이 가장 바람직하다.

[0088] 본 발명은 또한, 하기 [화학식 3]으로 표시되며, 히알루론산 단량체에 소수성 물질이 결합된 황산화 히알루론산 유도체를 제공한다:

[0089] [화학식 3]

[0090] 

[0091] 상기 [화학식 3]에서,

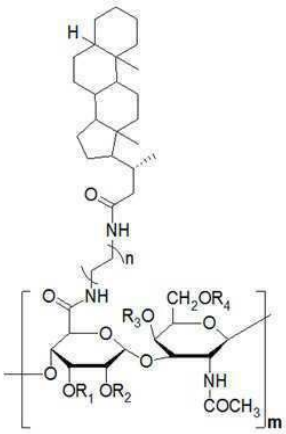
[0092] R_1 내지 R_4는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소 또는 $SO_3^-X^+$이며, 상기 R_1 내지 R_4 중 적어도 하나 이상은 $SO_3^-X^+$이고, 상기 X는 양이온이며, R_6는 적어도 하나 이상의 $-CH_2$기를 포함하는 고리 또는 비고리화 소수성 물질이고, n 및 m은 1 이상의 정수이다.

[0093] 또한, 상기 X는 양이온 상태의 물질이라면 모두 가능하나, 바람직하게는 1가 양이온, 더욱 바람직하게는 Na일 수 있다.

[0094] 이때, 상기 소수성 물질(치환기)은 소수성 콜란산으로서, 콜란산(cholanic acid)을 기본 골격으로 갖는 1차, 2차 및 3차 콜란산 또는 그의 유도체를 포함하며, 예를 들어 5-β 콜란산(5-β cholanic acid), 콜산(cholic acid), 케노데옥시콜산(chenodeoxycholic acid), 글리코콜산 (glycocholic acid), 타우로콜산(taurocholic acid), 데옥시콜산(deoxycholic acid), 리소콜산(lithocholic acid) 및 7-옥소-리소콜산(7-oxo-lithocholic acid)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0095] 또한, 상기 [화학식 3]으로 표시되는 황산화 히알루론산 유도체는 하기 [화학식 4]로 표시되는 것일 수 있다:

[0096] [화학식 4]

[0097] 

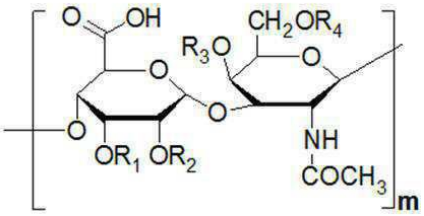
[0098] 상기 [화학식 4]에서,

[0099] R_1 내지 R_4는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소 또는 $SO_3^-X^+$이며, 상기 R_1 내지 R_4 중 적어도 하나 이상은 $SO_3^-X^+$이고, 상기 X는 양이온이며, n 및 m은 1 이상의 정수이다.

[0100] 또한, 상기 X는 양이온 상태의 물질이라면 모두 가능하나, 바람직하게는 1가 양이온, 더욱 바람직하게는 Na일 수 있다.

[0101] 본 발명은 또한, 하기 [화학식 5]로 표시되는 황산화 히알루론산 단량체에 활성 에스터 형성 시약 및 적어도 하나 이상의 $-CH_2$기를 포함하는 고리 또는 비고리화 소수성기를 포함하는 화합물을 첨가 및 반응시켜, 황산화 히알루론산 단량체의 카르복실기를 활성화시키고, 상기 단량체와 소수성기의 결합을 유도하여 제4항의 [화학식 3]으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 황산화 히알루론산 유도체의 제조방법을 제공한다:

[0102] [화학식 5]

[0103] 

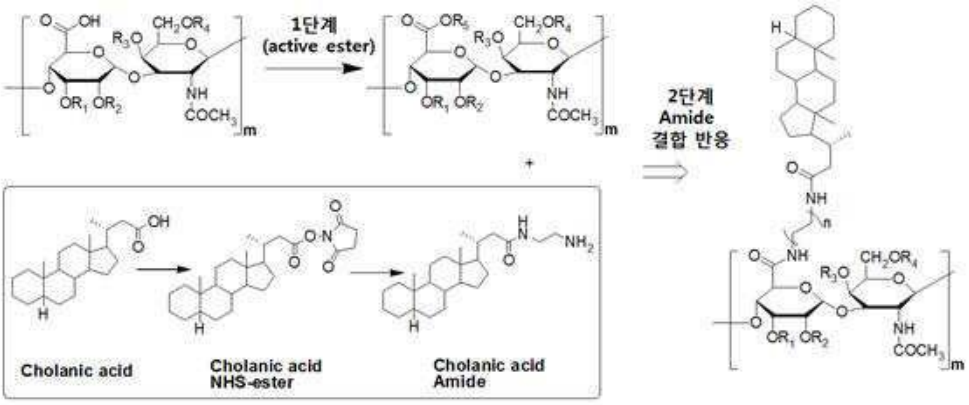
[0104] 상기 [화학식 5]에서,

[0105] R_1 내지 R_4는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소 또는 $SO_3^-X^+$이며, 상기 R_1 내지 R_4 중 적어도 하나 이상은 $SO_3^-X^+$이고, 상기 X는 양이온이며, m은 1 이상의 정수이다.

[0106] 또한, 상기 X는 양이온 상태의 물질이라면 모두 가능하나, 바람직하게는 1가 양이온, 더욱 바람직하게는 Na일 수 있다.

[0107] 상기 [화학식 3]으로 표시되는 황산화 히알루론산 유도체의 구체적인 제조 과정은 하기 [반응식 2]에 나타낸 바와 같다.

[0108] [반응식 2]

[0109] 

[0110] 상기 [반응식 2]에서 1단계는 황산화된 히알루론산 단량체의 카르복실기를 활성상태(active ester)로 만드는 단계이며, 2단계는 소수성기를 포함하는 화합물과 아마이드 결합을 통해 소수성 치환기가 결합된 황산화 히알루론산 유도체를 제조하는 단계이다.

[0111] 이때, 상기 황산화된 히알루론산 단량체의 카르복실기로부터 활성 에스터를 형성하는 데에 사용되는 활성 에스터 형성 시약은 반드시 이에 제한되는 것은 아니지만 N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride(EDC), N-hydroxysuccinimide(NHS) 및 1-Hydroxybenzotriazole(HOBT) 중 1종 이상인 것이 바람직하다.

[0112] 또한, 상기 소수성기는 친수성 히알루론산에 소수성을 부여하여, 수중에서 자가집합체를 형성하여 양친성 복합체를 제공할 수 있도록 소수성 콜란산 화합물인 것이 바람직하며, 상기 소수성 콜란산은 콜란산(cholanic acid)을 기본 골격으로 갖는 1차, 2차 및 3차 콜란산 또는 그의 유도체를 포함할 수 있으며, 예를 들어 5-β 콜란산(5-β cholanic acid), 콜산(cholic acid), 케노데옥시콜산(chenodeoxycholic acid), 글리코콜산(glycocholic acid), 타우로콜산(taurocholic acid), 데옥시콜산(deoxycholic acid), 리소콜산(lithocholic acid) 및 7-옥소-리소콜산(7-oxo-lithocholic acid)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0113] 또한, 상기 [반응식 2]에 나타낸 바와 같이 황산화 히알루론산과 소수성기를 결합시키기 위해, 상기 소수성기를 포함하는 화합물은 아민기가 추가적으로 도입되어 황산화 히알루론산의 카르복실기와 아미드 결합을 형성할 수 있다. 이를 위해 소수성 콜란산의 아미노에틸아미드 유도체가 사용될 수 있으며, 예를 들면 5-β 콜란산에 아민기가 도입된 아미노에틸 5-β 콜라노아미드(cholanoamide)가 사용될 수 있다.

[0115] 본 발명은 또한, 상기 황산화 히알루론산 유도체를 포함하는 근골격계 관절질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0116] 본 발명에 따르면, 상기 조성물 내에 상기 조성물 내에 포함된 황산화 히알루론산 유도체가 신생혈관생성인자를 저해하여 혈관 생성을 억제하여 염증을 완화할 수 있다.

[0117] 이때, 상기 신생혈관생성인자는 반드시 이에 제한되는 것은 아니지만 ㅇ예옐예를 들어 VEGF165a일 수 있다.

[0118] 또한, 본 발명에 따르면, 상기 조성물 내에 포함된 황산화 히알루론산 유도체가 활막섬유모세포와 면역세포의 염증성 싸이토카인과 케모카인의 분비 및 세포증식을 억제하여 염증을 완화할 수 있다.

[0119] 이때, 상기 면역세포는 T세포일 수 있다.

[0120] 본 발명에 따르면, 상기 근골격계 관절질환은 퇴행성 관절염(Osteoarthritis), 류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis), 반월상 연골 손상(Meniscus Injury), 유착성관절낭염(Adhesive capsulitis), 힘줄에 염증이 생기는 건병증(Tendinopathy), 통풍성관절염(Gouty arthritis) 및 기타 염증성 관절염으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0122] [실시예]

[0123] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0125] <u>실시예 1. 황산화된 히알루론산의 제조</u>

[0126] 히알루론산 나트륨 수용액(예, 150 kDa, 100 mℓ 증류수 중 500 mg)을 DOWEX 50WX8-400 이온교환수지(5.0 g, 수지 중의 양이온을 TBA와 교환함)와 혼합하고 3 시간 동안 교반하였다. 혼합물을 거름종이로 여과하여 이온교환수지를 제거하고 동결 건조시켜 회백색 고체 (TBA-HA)를 수득하였다.

[0127] TBA-HA (회백색 분말, 50 mg)를 10 mL의 N,N-dimethylformamide (DMF)에 용해시키고, 2.0 mL 의 DMF에 용해된 다양한 양의 삼산화황 피리딘 착물(0.076 g, 0.15 g, 0.38 g 및 0.61 g)과 반응시킴으로써 s-HA-1 ([화학식 2] 또는 [화학식 4]로 표시되는 황산화 히알루론산 단량체의 R_4-OH가 황산화됨), s-HA-2, s-HA-3 and s-HA-4 (단량체의 OH 모두가 황산화됨)로 지칭되는 4 개의 상이한 황산화도를 가지는 s-HA를 제조하였다. 반응은 질소 분위기하에서 0 내지 5 ℃의 온도를 유지하면서 1 시간 동안 진행하였다. 10 mL의 물을 첨가하여 반응을 중단시키고, 1.0 M NaOH 용액으로 용액의 pH를 8.5-9.0으로 조정하여 황산화된 히알루론산 나트륨염을 생성시켰다. 샘플을 증류수를 이용하여 3 일 동안 투석하였다. 최종적으로 샘플을 동결 건조하여 회백색 고체 (s-HA-1 (36 mg), s-HA-2 (42.8 mg), s-HA-3 (47.8 mg), s-HA-4 (51.5 mg)를 수득하였다.

[0128] 히알루론산의 황산화는 [화학식 2]에 표시된 히알루론산 단량체의 R_1, R_2, R_3, R_4 위치에서 일어나며, 여기서 R은 H 또는 SO_3^-일 수 있다. 황산화 반응는 히알루론산은 가장 반응성이 높은 하이드록실기에 해당하는 R_4 위치에서 먼저 진행된다(도 1의 1, 2단계 반응 참조).

[0130] **실시예 2. 히알루론산 하이드로겔의 제조**

[0131] 본 발명에 따른 황산화된 히알루론산 하이로겔과의 비교를 위하여 황산화되지 않은 히알루론산 단량체로부터 히

알루론산 하이드로겔을 제조하였다. 구체적으로, 히알루론산 50mg (분자량 3000 KDa)을 증류수 2 ml에 녹인 용액에 9.67 mg의 N-(3-Dimethylaminopropyl)-N′-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC)와 6.73 mg의 1-Hydroxybenzotriazole (HOBT)를 넣어 녹인 후, 이 용액에 1.16 mg의 Hexamethyldiamine (HMDA)를 가하여 상온에서 교반하여 완전히 용해 시킨 다음, 40도에서 18시간 동안 교반 및 반응을 진행하여 점성있는 액체를 수득하였다. 다음으로, 10 mL의 에탄올을 가하고, 제거하는 과정을 3 내지 5회 반복하여 미반응 시약들을 제거한 다음 동결건조하여 고체물질을 얻었으며, 1mL의 증류수를 가하여 히알루론산 하이드로겔을 제조하였다(도 1의 3단계 반응 및 도3 참고).

[0133] **실시예 3. 본 발명에 따른 황산화 히알루론산 하이드로겔([화학식 6]으로 표시되는 화합물)의 제조**

[0134] 상기 실시예 1로부터 제조된 황산화된 히알루론산 50mg (s-HA-2)을 증류수 2 ml에 녹인 용액에 58 mg의 N-(3-Dimethylaminopropyl)-N′-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC)와 40 mg의 1-Hydroxybenzotriazole (HOBT)를 넣어 녹인 후, 이 용액에 7 mg의 HMDA를 가하여 상온에서 교반하여 완전히 용해 시킨 다음, 40도에서 18시간 동안 교반 및 반응을 진행하여 점성있는 액체를 수득하였다. 다음으로 10 mL의 에탄올을 가하고, 제거하는 과정을 3 내지 5회 반복하여 미반응 시약들을 제거한 다음 동결건조하여 고체물질을 얻었으며, 1 mL의 증류수를 가하여 황산화 히알루론산 하이드로겔을 제조하였다(도 1의 3단계 반응 및 도3 참고).

[0136] **실시예 4. 본 발명에 따른 황산화 히알루론산 하이드로겔([화학식 6]으로 표시되는 화합물)의 제조**

[0137] 상기 실시예 3과 동일한 방법에 의하되, 68 mg의 N-(3-Dimethylaminopropyl)-N′-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC)와 47 mg의 1-Hydroxybenzotriazole (HOBT) 및 8 mg의 HMDA를 사용하여 황산화 히알루론산 하이드로겔을 제조하였다.

[0139] **실시예 5. 본 발명에 따른 황산화 히알루론산 하이드로겔([화학식 6]으로 표시되는 화합물)의 제조**

[0140] 상기 실시예 3과 동일한 방법에 의하되, 77 mg의 N-(3-Dimethylaminopropyl)-N′-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC)와 54 mg의 1-Hydroxybenzotriazole (HOBT) 및 9 mg의 HMDA를 사용하여 황산화 히알루론산 하이드로겔을 제조하였다.

[0142] **실시예 6. 본 발명에 따른 황산화 히알루론산 하이드로겔([화학식 6]으로 표시되는 화합물)의 제조**

[0143] 상기 실시예 3과 동일한 방법에 의하되, 87 mg의 N-(3-Dimethylaminopropyl)-N′-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC)와 60 mg의 1-Hydroxybenzotriazole (HOBT) 및 10 mg의 HMDA를 사용하여 황산화 히알루론산 하이드로겔을 제조하였다.

[0145] **실시예 7. 히알루론산 하이드로겔과, 본 발명에 따른 황산화 히알루론산 하이드로겔의 점도 비교 분석**

[0146] 상기 실시예 2 내지 6에 따른 하이드로겔을 레오미터로 점성도를 측정하였으며, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

[0147] [표 1]

40℃ 18hrs	HA(mg)	HMDA(mg)	EDC(mg)	HOBt(mg)	점도(G') Pa
실시예 2	50	1.16	9.67	6.73	70

40℃ 18hrs	sHA(mg)	HMDA(mg)	EDC(mg)	HOBt(mg)	점도(G') Pa
실시예 3	50	7	58	40	60
실시예 4	50	8	68	47	70
실시예 5	50	9	77	54	50
실시예 6	50	10	87	60	40

[0148]

[0149] 황산화된 히알루론산은 히알루론산과는 달리 친수성이 강하고, 제조과정에서 분자량이 감소하기 때문에 히알루론산의 경우보다 광범위한 가교 결합이 필요하고, 따라서, 황산화 히알루론산 하이드로겔이 만족할만한 점도를 가지기 위해서는 HMDA, EDC, HOBT 시약의 적정 사용량이 중요한 요소로 작용한다.

[0150] 상기 표 1에 나타난 바와 같이 실시예 4에 따를 경우 히알루론산 하이드로겔과 동등한 수준의 점성도를 보이는 반면, 실시에 3과 같이 시약의 사용량이 적을 경우 가교결합이 범위가 협소하여 점성도가 낮으며, 실시예 5, 6과 같이 시약의 사용량이 과도할 경우 가교 결합이 지나치게 광범위하게 형성되어 하이드로겔의 수화 특성이 오히려 감소함으로써 점성도가 오히려 낮아지게 되는 것을 확인하였다. 결과적으로, 실시예 4에 따른 중량 범위의 시약을 사용하는 것이 바람직하며, 특히 HMDA의 중량비는 황산 히알루론산 중량 대비 14 내지 16%의 범위에 해당하는 양을 사용하는 것이 가장 바람직하다는 것을 확인하였다.

[0152] **실시예 8. 황산화된 히알루론산의 관절염 개선효과**

[0153] 제2형 콜라겐을 0.1N acetic acid에 녹인 후 제2형 콜라겐 용액을 동일한 농도의 complete Freund's adjuvant (CFA) 와 1 : 1의 비율로 혼합하였다. 2 mg/ml의 콜라겐 혼합액 0.1 mL (제2형 콜라겐 100 ㎍)을 마우스 꼬리의 피내를 통해 천천히 주입하였다. 1차 주사를 시행하고 21일 후 2차 주사를 실시하였다. 1차 시기와 동일하게 꼬리의 기저부 피내에 CFA대신 incomplete Freund's adjuvant (IFA) 과 혼합한 콜라겐을 1차 주사와 동량으로 주사하였다. 2차 주사와 동시에 실시예 2에 따른 히알루론산 하이드로겔 25 mg/kg과, 실시예 4에 따른 황산화된 히알루론산 하이드로겔 25 mg/kg을 각각 복강 주사하였다. 약물 주사는 2주 동안 주 3회씩 총 6번 투여한 후 30일 동안 관절염을 관찰하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 황산화된 히알루론산 하이드로겔을 투여한 마우스에서 관절염이 현저하게 호전되는 것을 확인할 수 있었다(도 4). 실험군 개체 수: NC (n=2), PC (n=7), 25 mg/kg HA-hydrogel (n=3), 25 mg/kg s-HA hydrogel (n=3).

[0155] **실시예 9. 황산화된 히알루론산 하이드로겔의 사이토카인 및 케모카인 분비 감소 효과**

[0156] 류마티스 관절염 환자의 활막 조직에서 활막 섬유모세포를 추출한 뒤 실시예 2에 따른 히알루론산 하이드로겔 20 ㎍/ml과, 실시예 4에 따른 황산화된 히알루론산 하이드로겔 20 ㎍/ml을 각각 10 ng/ml의 TNF-α와 함께 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 세포 배양액을 얻고 ELISA 분석을 실시하여 IL-6와 IL-8의 분비량을 확인해 본 결과, TNF-α를 처리함과 동시에 본 발명에 따른 황산화 히알루론산 하이드로겔을 jf1한 군에서 inflammatory cytokine인 IL-6와 chemokine인 IL-8의 분비량이 현저히 감소하는 것을 확인하였다(Mean ±SD of triplicates)(도 5).

[0158] **실시예 10. 소수성 기능기(Cholanic acid)가 결합된 황산화 히알루론산 유도체 및 이를 이용한 나노입자의 합성**

[0159] (1) 황산화 히알루론산을 나노입자형태로 제조하기 위해서는 소수성 성질을 가진 기능기를 황산화 히알루론산에 공유결합을 통해 결합시켜 양친성의 성질을 갖도록 하여야 한다. 이를 위해 먼저 [화학식 2] 또는 [화학식 4]로 표시되는 황산 히알루론산의 단량체의 글루크로닉산 (glucuronic acid)에 존재하는 카르복실기의 활성화와 소수성기에 도입된 말단 아민기의 반응을 통해 소수성 기능기가 결합된 [화학식 3]으로 표시되는 황산화 히알루론산 유도체를 합성하였으며, 구체적인 제조과정은 다음과 같다.

[0160] 10 g의 콜란산 (Sigma사, USA)을 메탄올 600 ㎖에 녹인 후 염산 1.6 ㎖을 가한 후 60 ℃에서 6시간 동안 교반하였다. 이후 상기 용액을 증류농축장치(rotary evaporator)를 이용하여 100 ㎖으로 농축시킨 후 증류수 2 L에서 석출하여 여과하고, 이를 증류수로 수회 세척 후 동결 건조하였다. 건조 후 수득된 메틸-5-β 콜라네이트 10 g에 에틸렌디이민(ethylenediamine) 60㎖을 첨가하여 130 ℃에서 8시간 동안 교반하였다. 상온에서 100 ㎖ 메탄올로 희석시키고 2 L 증류수에서 석출하였다. 이를 여과하고, 증류수로 수회 세척하여 동결 건조하였다. 실시예 1로부터 제조된 황산화된 히알루론산(s-HA-2) 1 g을 160 ㎖ 증류수에 가하여 교반하여 용해시켰다. 1.57 g의 1-에틸-3-(3-디메틸-아미노프로필)카보디이미드(EDC)를 상기 용액에 첨가하고, 0.941 g의 N-하이드록시숙신이미드(NHS)를 1 ㎖ 디메틸포름이미드(DMF)에 용해시킨 후 상기 용액에 가하여 교반하면서 황산화 히알루론산의 카르복실기를 활성화시켰다. 상기 제조된 아미노에틸 5-β 콜라노아미드 125 ㎎을 320 ㎖ DMF 에 용해시킨 후 반응기에서 교반하면서 히알루론산 용액을 점적하였다. 이때 반응 온도는 60 ℃, 반응시간은 3 일로 하였다.

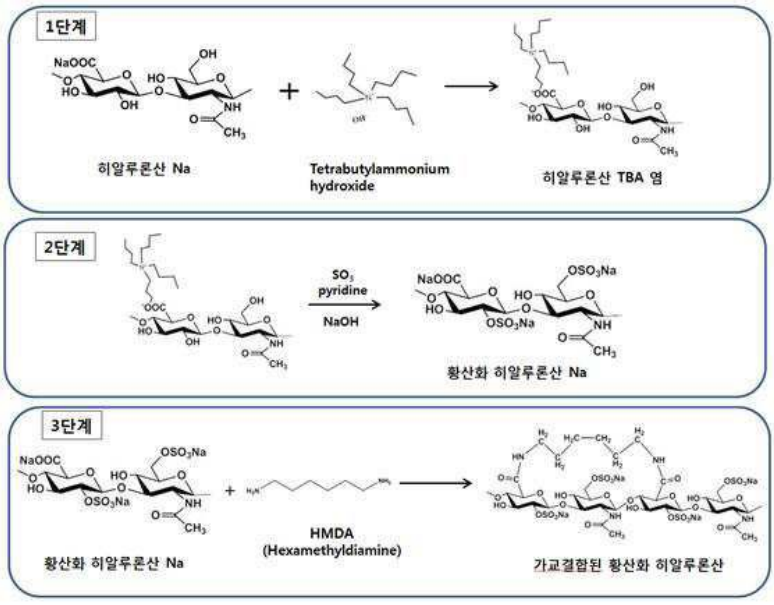
[0161] 반응이 완료된 혼합액을 석출 용매에 점적하면서 파우더 형태로 황산 히알루론산-콜란산 복합체를 수득하였다. 이소프로필알콜과 이소프로필에테르를 1:1로 혼합하여 석출 용매로 사용하였으며, 석출 용매와 반응액의 비율은 4:1로 하였다. 석출 용매에 반응액을 점적하면서 교반시킨 후, 석출 용매와 동일한 용매로 3회 세척하고 진공 건조하였다. 진공건조 후 수득된 히알루론산-콜란산 복합체를 정제하였다. 불순물 및 잔류 용매를 제거하기 위해 100 ㎖ 증류수에 복합체를 녹인 후 분리기에 넣고 100 ㎖ 디클로로메탄을 가하여 분리 및 정제하였다. 이때 증류수의 pH는 8이상이 되게 하였으며 상기 과정을 수회 반복한 후 수층만을 취하여 동결 건조함으로써 소수성 기능기가 결합된 황산화 히알루론산 유도체(황산화 히알루론산-콜란산 복합체)를 수득하였다.

[0162] (2) 상기 수득한 황산화 히알루론산-콜란산 복합체 90 ㎎을 10 ㎖ 증류수에 용해시켰다. 10 ㎎의 소수성 항암제(파클리탁셀)를 30 ㎖ 에탄올에 용해시킨 후 상기 복합체 수용액과 혼합하여 둥근 플라스크에서 교반하였다. 증류농축장치(rotary evaporator)를 이용하여 용매를 증발시키고 둥근플라스크 주변에 필름을 형성시켰다. 필름이 완전히 형성된 것을 확인한 후 50 ㎖ 증류수를 첨가하여 수화시켰다. 필름이 완전히 수화된 것을 확인한 후 초음파 분쇄기를 이용해 나노입자를 분산시켜 전자현미경으로 분석하였으며, 이를 통해 수십 내지 수백 나노미터의 구형의 입자들이 성공적으로 형성됨을 확인하였다(도 6).

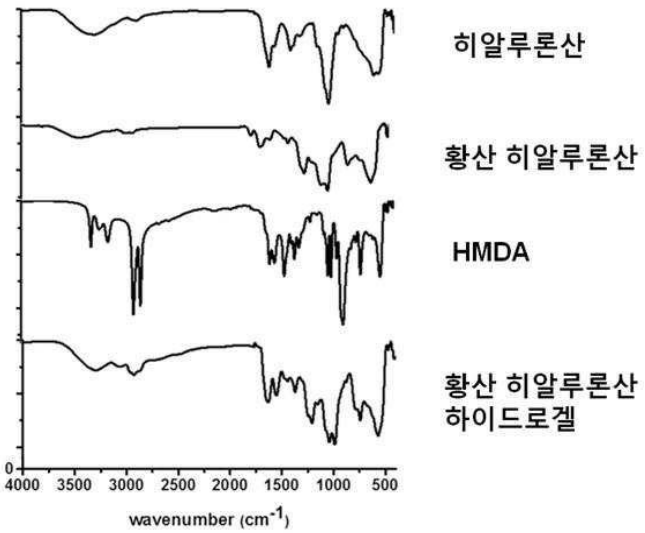
[0164] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



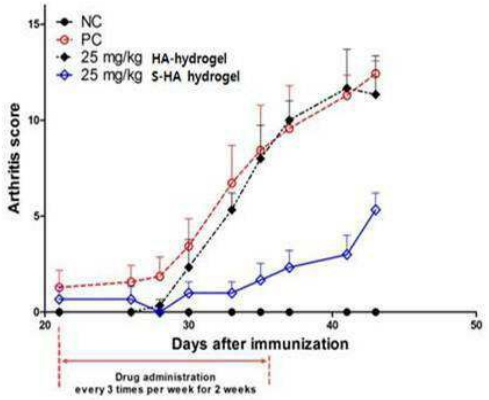
도면2


히알루론산
황산 히알루론산
HMDA
황산 히알루론산
하이드로겔
0
4000 3500 3000 2500 2000 1500 1000 500
wavenumber (cm-1)

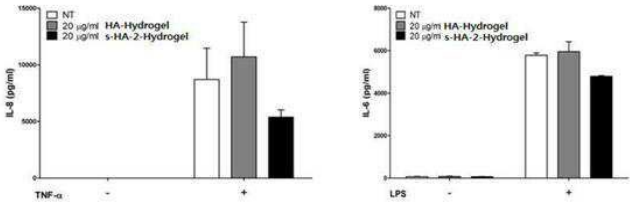
도면3

히알루론산
하이드로겔
건조후
동결 건조 후
증류수 가한 후
황산화 히알루론산
하이드로겔
건조후
동결 건조 후
증류수 가한 후

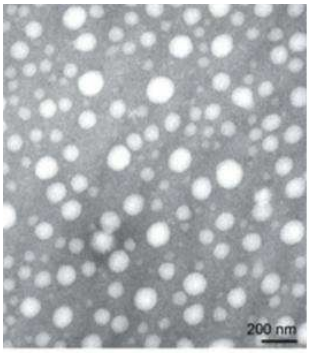
도면4


NC
PC
25 mg/kg HA-hydrogel
25 mg/kg S-HA hydrogel
Arthritis score
0
5
10
15
20
30
40
50
Days after immunization
Drug administration
every 3 times per week for 2 weeks

도면5


NT
20 μg/ml HA-Hydrogel
20 μg/ml s-HA-2-Hydrogel
IL-6 (pg/ml)
TNF-α
-
+
NT
20 μg/ml HA-Hydrogel
20 μg/ml s-HA-2-Hydrogel
IL-6 (pg/ml)
LPS
-
+

도면6


200 nm