



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0137253
(43) 공개일자 2023년10월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08B 37/08 (2006.01) C08J 3/075 (2006.01)
C08K 3/16 (2006.01) C08K 3/20 (2006.01)
C08K 3/22 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/08 (2006.01) C12P 19/26 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C08B 37/0072 (2013.01)
C08J 3/075 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-0035845
(22) 출원일자 2023년03월20일
심사청구일자 2023년03월20일
- (30) 우선권주장
1020220034516 2022년03월21일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
주식회사 세라트젠
서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 공학원 332에이비씨호(신촌동)
- (72) 발명자
조승우
서울특별시 서대문구 연세로 50, 공학원 347호(신촌동)
안수환
서울특별시 서대문구 연세로 50, 제2공학관 525호(신촌동)
전은제
서울특별시 서대문구 연세로 50, 공학원 332ABC호(신촌동)
- (74) 대리인
특허법인엠에이피에스

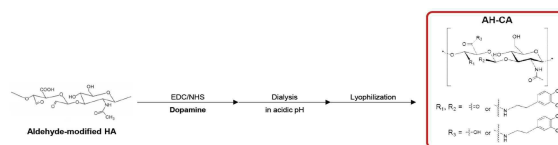
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 아민-말단화 된 페놀 유도체가 수식된 알데히드 치환 히알루론산 유도체 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명에서는 세포외기질 성분으로서 생체적합성이 우수하며 다양한 의생명공학 분야에 응용되고 있는 천연고분자인 히알루론산에 알데히드 기를 치환해준 뒤에 아민-말단화 페놀 유도체를 화학적으로 결합하는 것을 통해 새로운 히알루론산 유도체를 제작하였다. 이 유도체는 우수한 생체적합성을 그대로 유지하면서 히알루론산에 페놀 유도체가 아미드 결합 및 2차 아민 결합의 두 가지 방식으로 수식되어 있기 때문에 산성 (pH 2)부터 중성 (pH 6.7~7.2)에 걸쳐 염기성 (> pH 7.4) 조건까지 전 pH 범위에 걸쳐 페놀 유도체의 효과적인 산화를 유도할 수 있어 pH 조건의 제한없이 고분자 유도체의 가교를 통한 하이드로젤 형성이 가능하고 표면에 대한 우수한 접착력을 가질 수 있다.

대표도 - 도1c



(52) CPC특허분류

C08K 3/16 (2013.01)
C08K 3/20 (2013.01)
C08K 3/22 (2013.01)
C12N 9/0065 (2013.01)
C12N 9/0071 (2013.01)
C12P 19/26 (2013.01)
C08L 2203/02 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711191960
과제번호	2021R1A2C3004262
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	오가노이드 모듈 합체 · 정렬 기술을 통한 바이오 인공 장기 생산 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711159273
과제번호	2018M3A9H1021382
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발사업
연구과제명	간 조직 특이적 매트릭스와 마이크로 디바이스를 이용한 간 오가노이드 생산 플랫폼

개발

기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

아민-말단화 페놀 유도체가 수식된 알데히드 치환 히알루론산 유도체.

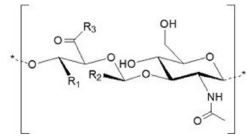
청구항 2

제1항에 있어서,

상기 히알루론산 유도체는 하기 화학식 2를 포함하는,

히알루론산 유도체.

[화학식 2]



여기서,

R₁ 및 R₂는 -O- 또는 아민-말단화 페놀 유도체

R₃는 -OH 또는 아민-말단화 페놀 유도체

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 아민-말단화 페놀 유도체는 tyramine, tyrosine, 4-Hydroxybenzylamine, dopamine, 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), norepinephrine, serotonin, 5-hydroxydopamine, 3,4,5-Trihydroxyphenylalanine (TOPA) 및 각 화합물의 염으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 화합물인 것인, 히알루론산 유도체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 히알루론산 유도체를 산화시켜 제조된,

하이드로젤.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 산화는 산화제, 효소 또는 pH 조절제의 첨가에 의한 것인,

하이드로젤.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 산화제는 과요오드산염(Periodate salt) 또는 과산화수소(Hydrogen peroxide)인 것인,

하이드로젤.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 효소는 과산화효소(Peroxidase), 겨자무과산화효소(Horseradish peroxidase) 및 타이로시네이스(Tyrosinase)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인,

하이드로젤.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 pH 조절제는 수산화나트륨(Sodium hydroxide), 수산화리튬(Lithium hydroxide), 수산화칼륨(Potassium hydroxide), 수산화루비듐(Rubidium hydroxide), 수산화세슘(Cesium hydroxide), 수산화마그네슘(Magnesium hydroxide), 수산화칼슘(Calcium hydroxide), 수산화스트론튬(Strontium hydroxide) 및 수산화바륨(Barium hydroxide)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인,

하이드로젤.

청구항 9

제4항에 있어서,

상기 산화는 산화제, 효소 또는 pH 조절제의 첨가 없이 체내 효소에 의한 것인,

하이드로젤.

청구항 10

제4항에 있어서,

상기 산화는 pH 2 내지 pH 14 범위에서 일어나는 것인,

하이드로젤.

청구항 11

제4항에 있어서,

상기 하이드로젤은 가교속도, 젤 유지기간, 접착력 또는 융합력이 향상된 것인,

하이드로젤.

청구항 12

제4 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하이드로젤은 약물전달, 생체 조직공학 용도, 지혈제, 창상 피복재, 필터(충진제) 또는 유착 방지제로 사용되는 것인,

하이드로젤.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 생체 조직공학 용도는 조직 접착제, 세포 이식, 장기 이식, 조직 재생 및 의료기기 부착으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인,

하이드로젤.

청구항 14

페놀 유도체가 수식된 알데히드 치환 히알루론산 유도체 제조방법에 있어서,

- (1) 히알루론산(HA) 및 산화제를 사전 결정된 비율로 반응하는 단계
- (2) 디올기 화합물을 반응하고 투석하는 단계
- (3) 상기 (1) 및 (2) 단계를 거쳐 생성된 알데히드 치환 히알루론산(AH), EDC, NHS 및 아민-말단화 페놀 유도체를 사전 결정된 비율로 EDC/NHS 반응을 거치는 단계를 포함하는, 제조방법.

청구항 15

제14항에 있어서,
상기 (1) 단계의 산화제는 과요오드산 염(Periodate salt)인,
제조방법.

청구항 16

제14항에 있어서,
상기 (3) 단계의 아민-말단화 페놀 유도체는 tyramine, tyrosine, 4-Hydroxybenzylamine, dopamine, 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), norepinephrine, serotonin, 5-hydroxydopamine, 3,4,5-Trihydroxyphenylalanine (TOPA) 및 각 화합물의 염으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 화합물인 것인,
제조방법.

청구항 17

제14항에 있어서,
상기 (1) 단계의 HA 및 산화제는 1:1 비율로 반응하는 것인,
제조방법.

청구항 18

제14항에 있어서,
상기 (3) 단계의 AH, EDC, NHS 및 아민-말단화 페놀 유도체는 각각 1 : 1.5 : 2 : 1의 비율로 반응하는 것인,
제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포외기질 성분이자, 생체적합성이 우수하여 다양한 의생명공학 분야에 응용되고 있는 천연고분자인 히알루론산에 관한 발명으로서, 구체적으로 알데히드 작용기를 치환한 후 아민-말단화 페놀 유도체가 화학적으로 결합된 신규한 히알루론산 유도체에 관한 발명이다.

배경 기술

[0002] 전 세계적으로 약물 전달, 세포 이식 및 지혈, 봉합 등 의료적 처치를 위한 기능성 의료용 소재 기술과 관련된 시장은 매우 가파르게 성장하고 있다. 통계자료를 보면, 조절 방출 약물 전달 시장의 경우 연구개발 증가 추세와 더불어 노인과 소아 환자군에서의 필요성 인해 2025년까지 연간 평균 13.8%씩 성장할 전망이다. 그리고 글로벌 줄기세포 시장은 2017년 628억달러 규모 수준에서 향후 빠르게 성장하여 2025년에는 3,944억달러 규모로 급성장할 전망이다.

[0003] 이런 전망에 따라 약물 전달 및 세포 이식용 소재에 대한 수요는 급증할 것으로 예상된다. 또한, 지혈 및 봉합 소재 시장 규모는 2024년까지 4.5조원 수준으로 성장할 것으로 추정되며 향후 더욱 커질 것으로 기대된다.

[0004] 생체 내로의 안정적인 약물 전달 및 세포의 이식 그리고 출혈 부위의 지혈 및 상처 조직의 봉합에 있어 다양한

재료의 표면 또는 생체 조직에 대한 접착성을 갖는 생체재료의 필요성이 요구되면서 다양한 종류의 접착성 하이드로젤 기술이 개발되고 있고 일부는 임상에도 적용되고 있다. 그 중에서도 홍합의 수중 접착 기전을 모방하기 위하여 카테콜 기를 고분자에 수식하는 방식으로 제작한 고분자 유도체 및 그 하이드로젤은 우수한 접착성과 생체적합성을 보여 최근 접착성 하이드로젤 분야에서 각광받고 있다.

[0005] 그러나 종래의 기술들로 제작된 카테콜 기 수식 하이드로젤들은 카테콜 기의 산화가 촉진될 수 있는 중성 pH 이상의 알칼리성 pH 조건에서만 효과적으로 가교 및 접착이 일어날 수 있어 산성 및 중성 pH 부근의 조건에서는 적용이 어려운 한계가 있다. 이런 제한적인 pH 의존적인 가교 방식은 생체 내 적용 부위 및 응용 범위를 제한하는 요인으로 작용한다.

[0006] 예시로, 종래의 기술인 카테콜 기 수식 히알루론산 유도체(HA-CA)의 경우에는 고분자 내에 존재하는 카르복시기(-COOH)에 수용액 상에서 비교적 손쉽게 도입할 수 있는 carbodiimide 화학반응을 적용하여 도파민 분자의 아민기와 아미드 결합을 유도하여 히알루론산에 카테콜 기를 수식하게 되는데, 이 경우 형성된 아미드 결합은 화학적 반응성이 낮아 카테콜의 산화 반응에 의해 유도되는 화학 반응에 참여할 수가 없다. 이로 인해 종래의 유도체는 카테콜 기 간의 반응이 활발히 일어날 수 있는 알칼리 및 염기성 조건에서만 고분자 유도체 간의 가교 및 하이드로젤 형성이 용이하게 일어날 수 있다.

[0007] 이러한 문제점을 일부 해결하기 위해 아민 기(-NH₂)가 풍부한 합성 및 천연 고분자를 이용하려는 시도가 있었지만, 1차 아민 기가 풍부한 고분자들 (예; 폴리 에틸렌아민, 폴리 라이신, 키토산 등)의 경우에는 세포 및 조직에 대한 생체 독성을 보이기 때문에 생체적합성이 떨어진다는 문제점이 있었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본원은 종래 기술과는 달리 넓은 pH 범위에서도 산화 반응이 가능한 히알루론산 고분자를 개발하여 조직 표면에 대한 뛰어난 부착력을 가지는 접착성 하이드로젤을 제공하고자 한다. 이를 통해 다양한 pH 환경의 생체 조직에 범용적으로 사용될 수 있는 의료용 신소재를 제공하고자 한다.

[0009] 그러나 본원이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제를 해결하기 위해 본원의 제1측면은 아민-말단화 페놀 유도체가 수식된 알데히드 치환 히알루론산 유도체를 제공한다.

[0011] 본원의 제2측면은 상기 히알루론산 유도체를 산화시켜 제조한 하이드로젤을 제공한다.

[0012] 본원의 제3측면은 페놀 유도체가 수식된 알데히드 치환 히알루론산 유도체 제조방법에 있어서,

[0013] (1) 히알루론산(HA) 및 산화제를 사전 결정된 비율로 반응하는 단계

[0014] (2) 디올기 화합물을 반응하고 투석하는 단계

[0015] (3) 상기 (1) 및 (2) 단계를 거쳐 생성된 알데히드 치환 히알루론산(AH), EDC, NHS 및 아민-말단화 페놀 유도체를 사전 결정된 비율로 EDC/NHS 반응을 거치는 단계를 포함하는 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에서는 세포외기질 성분으로서 생체적합성이 우수하며 다양한 의생명공학 분야에 응용되고 있는 천연고분자인 히알루론산에 알데히드 기를 치환해준 뒤에 아민-말단화 페놀 유도체를 화학적으로 결합하여 새로운 히알루론산 유도체를 제작하였다. 이 유도체는 우수한 생체적합성을 그대로 유지하면서 히알루론산에 아민-말단화 페놀 유도체가 아미드 결합 및 2차 아민 결합의 두 가지 방식으로 수식되어 있기 때문에 산성 (pH 2)부터 중성 (pH 6.7 ~ 7.2)에 걸쳐 염기성 (> pH 7.4) 조건까지 전 pH 범위에 걸쳐 페놀 유도체의 효과적인 산화를 유도할 수 있어 pH 조건의 제한없이 고분자 유도체의 가교를 통한 하이드로젤 형성이 가능하고 표면에 대한 우수한 접착력을 가질 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017]

도 1a는 일 실시예에 따른 AH 제작과정을 나타낸 도면이다.

도 1b는 도 1a에 따라 치환한 고분자의 ^1H -NMR 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 1c는 일 실시예에 따른 AH-CA 제작과정을 나타낸 도면이다.

도 1d는 도 1c에 따라 합성한 유도체의 UV-vis spectroscopy 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 1e는 도 1c에 따라 합성한 유도체의 ^1H -NMR spectroscopy 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 1f는 일 실시예에 따른 이차아민 확인에 사용한 물질을 나타낸 도면이다.

도 1g는 클로라닐(Chloranil)이 이차아민과 반응하는 과정을 나타낸 도면이다.

도 1h는 일 실시예에 따른 이차아민 확인을 위한 UV-vis spectroscopy 분석의 흡광 변화를 나타낸 도면이다.

도 1i는 일 실시예에 따른 FTIR spectroscopy 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 1j는 일 실시예에 따른 FTIR spectroscopy 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 2a는 일 실시예에 따른 HA-CA와 AH-CA의 예상 반응 경로를 나타낸 도면이다.

도 2b는 HA-CA와 AH-CA의 UV-vis spectroscopy 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 2c는 AH-CA의 X-ray photoelectron spectroscopy 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 3은 각 pH 조건 별(산성 pH 2.5, 중성 pH 6.8, 알칼리성 pH 7.5) 하이드로젤 형성 양상(a), 속도(b), 탄성 계수(c), 팽윤 양상(d)를 나타낸 도면이다.

도 4는 도 3의 d에서 분자량을 1Mda로 변경하여 팽윤 양상을 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 5a는 산성 조건에서 일 실시예에 따른 AH-CA 하이드로젤의 가교 진행 시간을 나타낸 도면이다.

도 5b는 산성 조건에서 HA-CA 하이드로젤의 가교 진행 시간을 나타낸 도면이다.

도 5c는 AH-CA 및 HA-CA 하이드로젤의 접착력(Adhesion force)를 비교한 도면이다.

도 6a는 산성 조직인 위에서 일 실시예에 따른 AH-CA 하이드로젤이 약물을 담지하는 예상도이다.

도 6b는 실제 마우스 위 조직에서 AH-CA 하이드로젤이 약물을 담지하고 있는 것을 Hematoxylin & eosin (H&E) 염색한 사진을 나타낸다.

도 6c는 실제 마우스 위 조직에서 AH-CA 하이드로젤이 약물을 담지하고 있는 것을 FITC-dextran과 DAPI 염색한 사진을 나타낸다.

도 6d는 돼지 위 조직에서 AH-CA 하이드로젤이 형성되는 모습을 나타낸 도면이다.

도 7은 마우스 위 점막에 위궤양을 유발한 후, 산성 조건에서 일 실시예에 따른 AH-CA 하이드로젤을 포함하여 비교군과 실험군을 처리한 결과를 나타낸 도면이다. 각각 처리 후 3일이 경과했을 때의 실제 모습(a) / hematoxylin & eosin staining 분석 결과(c) / Alcian Blue Periodic acid-Schiff staining 분석 결과(e) 및 첫날(Day 1)과 3일 후(Day 3)의 궤양 면적(b) / 궤양 말단 부위 높이(d) / 궤양 기저 부위의 점막 형태(f)를 분석한 결과를 나타낸 도면이다.

도 8a는 중성 pH에서 형성한, 일 실시예에 따른 AH-CA 하이드로젤을 인간 진피 섬유아세포에 처리하고 이를 Live/Dead 염색한 사진을 나타낸 도면이다.

도 8b는 중성 pH에서 형성한, 일 실시예에 따른 AH-CA 하이드로젤을 인간 진피 섬유아세포에 처리하고 MTT 시험법을 진행한 결과를 나타낸 도면이다.

도 9a는 일 실시예에 따른 AH-CA 하이드로젤과 HA-CA 하이드로젤을 각각 중성과 알칼리 pH에서 형성했을 때 접착력을 비교한 결과를 나타낸 도면이다.

도 9b는 일 실시예에 따른 AH-CA 하이드로젤을 조직 상처 봉합제로 사용했을 때 조직이 봉합되는 예상경과를 나

타낸 도면이다.

도 9c는 중성 pH 조건에서 형성한, 일 실시예에 따른 AH-CA 하이드로젤과 HA-CA 하이드로젤의 가교 속도를 비교 분석한 결과를 나타낸 도면이다.

도 10은 마우스 피부 절개 모델에 각각 NT(No treatment), HA-CA, Fibrin, 일 실시예에 따른 AH-CA를 처리했을 때 Day 0의 실제 모습(a), 사용한 마우스 모델(b), Day 7의 실제 모습(c), 7일 후 상처의 면적 비교 결과(d), hematoxylin & eosin(H&E) 및 Masson's trichrome(MT) 염색한 모습(e), 최대 상처 너비 비교 결과(f)를 나타낸 도면이다.

도 11은 산성 pH, 중성 pH와 알칼리 pH에서 형성한, 일 실시예에 따른 AH-CA 하이드로젤과 fibrin 기반 접착제의 접착력을 비교한 도면이다.

도 12는 중성 pH에서 형성한, 일 실시예에 따른 AH-CA 하이드로젤 내에 봉입하여 3차원 배양한 인간 지방 유래 줄기세포를 Live/Dead 염색한 사진(a), Live/Dead 염색법으로 세포 생존율을 정량 분석한 결과(b), AH-CA 하이드로젤을 움직임이 많은 조직에 사용해 부착력을 측정하는 실험 모식도(c), 실제 마우스 심장에 AH-CA 하이드로젤이 부착된 모습(d 및 e), 마우스 심장에 부착된 AH-CA 하이드로젤을 H&E 염색한 사진(f), AH-CA 하이드로젤을 이용해 DiI 형광 시약으로 표지한 인간 지방 유래 줄기세포를 마우스 심장 조직에 도포한 후 형광 현미경으로 관찰한 사진(g)를 나타낸 도면이다.

도 13은 알칼리 pH에서 형성한, 일 실시예에 따른 AH-CA 하이드로젤과 HA-CA 하이드로젤의 가교 속도 비교 결과(a), AH-CA 하이드로젤을 이용해 지혈 실험을 진행하는 모식도(b), AH-CA 하이드로젤의 예상 지혈 기전(c), 마우스 간 출혈 모델에서 AH-CA 하이드로젤의 지혈 성능을 실험한 사진(d), 지혈 성능을 혈액 흡수용 거름종이로 나타낸 사진(e), 시간에 따른 출혈 양상을 각각 NT(no treatment), fibrin 기반 접착제, AH-CA 하이드로젤을 처리했을 때로 나누어 비교한 결과를 나타낸 도면이다.

도 14는 알칼리 pH에서 형성한, 일 실시예에 따른 AH-CA 하이드로젤을 마우스 신장 조직에 처리한 사진 및 H&E 염색 사진(a), 절제된 마우스 간 조직에 AH-CA 하이드로젤을 처리한 사진(b)를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 아래에서는 첨부한 도면을 참조하여 본원이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본원은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본원을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [0019] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부재가 다른 부재 "상에" 위치하고 있다고 할 때, 이는 어떤 부재가 다른 부재에 접해 있는 경우뿐 아니라 두 부재 사이에 또 다른 부재가 존재하는 경우도 포함한다.
- [0020] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0021] 본원 명세서 전체에서 사용하는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용 오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본원의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다. 본원 명세서 전체에서 사용하는 정도의 용어 "~(하는) 단계" 또는 "~의 단계"는 "~를 위한 단계"를 의미하지 않는다.
- [0022] 본원 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 "이들의 조합(들)"의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.
- [0023] 본원 명세서 전체에서, "A 및/또는 B"의 기재는 "A 또는 B, 또는 A 및 B"를 의미한다.
- [0024] 본 발명에서 사용되는 용어, "히알루론산(Hyaluronic acid, HA)"은 D-글루쿠론산(D-glucuronic acid, GlcA) 및 N-아세틸-D-글루코사민(GlcNAc)기 β 1,3-글라이코시드 결합(β 1,3-glycosidic bond)에 의해 연결되어 있는 다이사카라이드를 반복단위로 포함하는 고분자량의 선형 폴리사카라이드로서, 히알루론산과 그의 염을 모두 지칭하고, 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 염으로는 나트륨염, 칼륨염, 마그네슘염, 칼슘염, 알루미늄염 등이

예시된다.

[0025] 본 발명에서 사용되는 용어, "히알루론산 유도체"는 히알루론산 및 알데히드 치환 히알루론산 및 각각의 염의 글루쿠론산의 골격에 페놀 유도체가 도입되어 있는 히알루론산 또는 그의 염을 모두 포함하는 것을 의미한다.

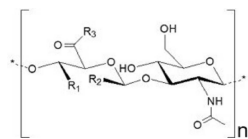
[0026] 본 발명에서 사용되는 용어, "페놀 유도체"는 벤젠기(benzene group)에 하이드록시기(hydroxy group)를 1개 이상 포함하는 화합물을 의미하는 것으로 페놀기(phenol group), 카테콜기(catechol group), 5-hydroxyindole기 또는 갈롤기(gallol group)를 포함한다. 또한 "아민-말단화"란 페놀 유도체 말단에 아민기(amine group)를 포함한다는 것으로, 위 아민기를 통해 페놀 유도체가 알데히드 치환 히알루론산에 아미드 결합 또는 2차 아민 결합의 두 가지 방식으로 수식되어 가교시 효과적인 산화를 유도할 수 있다.(도 1c 및 2a 참조)

[0027] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 페놀 유도체는 (phenol 작용기) tyramine, tyrosine, 4-Hydroxybenzylamine, (catechol 작용기) dopamine, 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), norepinephrine, (5-hydroxyindole 작용기) serotonin, (gallol 작용기) 5-hydroxydopamine, 3,4,5-Trihydroxyphenylalanine (TOPA) 및 각 화합물의 염을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 본원의 일 실시예에서 아민-말단화 페놀 유도체의 대표적 예시로 카테콜 작용기인 도파민을 사용하여 AH-CA를 제작하였으나, 이는 아민-말단화 페놀 유도체가 카테콜 작용기에만 한정된다는 것을 의미하지 않는다.

[0028] 본원의 제1측면은 아민-말단화 페놀 유도체가 수식된 알데히드 치환 히알루론산 유도체를 제공한다. 상기 유도체는 히알루론산(HA; Hyaluronic acid)에 산화제를 가하여 일부 디올기를 알데히드 그룹으로 치환한 히알루론산 유도체(AH; Aldehyde-modified Hyaluronic acid)를 준비한 다음, 상기 AH에 페놀 유도체를 수식하여 제작한다. 수식된 페놀 유도체는 겔화(gelation)시 산화되어 가교반응을 일으키는 역할을 한다.

[0029] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 히알루론산 유도체는 하기 화학식 1을 포함하는 것일 수 있다.

[0030] [화학식 1]



[0031] 여기서,
[0032]

[0033] R_1 및 R_2 는 $-H$ 또는 아민-말단화 페놀 유도체,

[0034] R_3 는 $-OH$ 또는 아민-말단화 페놀 유도체,

[0035] n 은 1 내지 10000.

[0036] 본원의 히알루론산 유도체는 고분자 용액의 pH 등 산화 조건을 조절하여 하이드로젤의 가교 정도, 가교 속도 및 하이드로젤의 기계적 물성, 접착성 등 다양한 특성을 쉽게 조절할 수 있다. 이를 통해 상기 히알루론산 유도체를 사용 목적 및 용도에 맞게 효율적으로 변형하고 활용할 수 있다.

[0037] 본원의 히알루론산 유도체는 페놀 유도체와 그것의 산화 과정 시 생성되는 중간산물들이 약물의 다양한 작용기(예; 아민 기, 티올 기 등)와 다양한 방식으로 결합할 수 있는 성질을 가지고 있다. 이에 따라 해당 유도체로부터 제작되는 하이드로젤은 상기 다양한 작용기를 포함하는 여러가지 약물을 탑재하여 전달하는 Drug Delivery System(DDS) 시스템으로 활용할 수 있다. 또한, 종래 카테콜 수식 히알루론산 유도체(HA-CA)로는 불가능했던 pH 2 정도의 강산 조건에서도 빠른 가교 및 접착이 가능하여 위 조직 같은 산성 환경에도 하이드로젤의 적용이 가능하다. 이런 장점들을 이용하여 산성 환경의 생체 조직을 타겟으로 하는 약물 전달 시스템으로도 사용이 가능할 것으로 기대된다. 하기 설명할 실시예로 개발된 신규 히알루론산 하이드로젤을 이용한 EGF 성장인자 전달을 마우스 위궤양 모델에 적용해 보았을 때, 종래 위궤양, 위염 등에 사용되는 수크랄페이트 및 기존 카테콜 수식 히알루론산 하이드로젤과 비교하여 우수한 조직 재생효과를 유도하는 것을 확인하였다.

[0038] 본원의 제2측면은 아민-말단화 페놀 유도체가 수식된 알데히드 치환 히알루론산 유도체 기반 하이드로젤을 제공한다.

[0039] 상기 하이드로젤의 제조 과정은, 상기 히알루론산 유도체의 가교 반응에 의해 진행될 수 있으며, 상기 가교 반응을 위하여 상기 히알루론산 유도체와 PBS 등과 혼합하여 히알루론산 하이드로젤 전구체 용액을 제조하는 단계

를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 가교는 UV 조사에 의한 화학적 가교, 물리학적 가교 또는 생물학적 가교에 의해 하이드로젤로 형성될 수 있다. 여기서, UV 조사에 의한 화학적 가교로는 광가교(photo-crosslinking) 또는 반응성 가교제(reactive crosslinker)를 활용한 가교 등이 있고, 생물학적 가교로는 헤파린과 성장인자의 결합력을 활용한 가교 또는 DNA 등의 상보적 결합을 이용한 가교 등이 있으며, 물리적 가교로는 수소결합에 의한 가교, 소수성(hydrophobic) 상호작용에 의한 가교 또는 정전기적 상호작용을 활용한 가교 등이 있으나, 가장 바람직하게는, 산화제, 효소 또는 pH 조절제를 첨가하여 가교시킬 수 있다.

[0040] 상기 산화제는 과요오드산염 또는 과산화수소일 수 있고, 상기 효소는 과산화효소(oxidase), 겨자무과산화효소 또는 타이로시네이스일 수 있고, 상기 pH 조절제는 수산화나트륨, 수산화리튬, 수산화칼륨, 수산화루비듐, 수산화세슘, 수산화마그네슘, 수산화알루미늄, 수산화스트론튬 또는 수산화바륨일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 본원의 신규 히알루론산 하이드로젤은 중성 pH 조건에서도 종래의 기술로 개발한 카테콜 수식 히알루론산 기반 하이드로젤에 비해 우수한 접착성을 가지는 것을 확인했다. 뛰어난 접착성과 히알루론산의 우수한 생체적합성을 바탕으로 절개된 조직 부위에 대한 조직 접착제 용도로도 사용이 가능할 것으로 기대된다. 일 실시예에서 본원의 하이드로젤을 마우스 피부 절개 모델에 적용해보았을 때, 상용화된 피브린 기반 조직 접착제 및 기존 방식으로 합성된 카테콜 수식 히알루론산 하이드로젤과 비교하여 우수한 봉합 및 조직 재생 효과를 보이는 것을 확인했다. 또한, 세포 독성이 거의 없는 것으로 확인되어 세포의 삼차원 배양용 지지체로 사용이 가능하고 하이드로젤의 뛰어난 조직 접착성을 이용하여 생체 내의 효율적인 세포 이식용 지지체로서 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

[0042] 본원의 신규 히알루론산 하이드로젤은 알칼리성 pH 조건에서도 종래의 카테콜 수식 히알루론산 하이드로젤과 비교하여 비슷하거나 우수한 접착성을 보임과 동시에 5배 이상의 매우 빠른 가교 속도를 보였고, 이에 따라 빠른 가교 및 접착이 필요한 지혈 및 봉합과 같은 응급 의료 상황에 적용하기에 유리할 것으로 기대된다. 일 실시예에서 마우스 간 출혈 모델에 적용해 보았을 때, 피브린 기반 지혈제와 비교하여 우수한 지혈 성능을 보이는 것을 확인하였다.

[0043] 따라서 본원의 하이드로젤은 약물전달, 생체 조직공학 용도, 지혈제, 창상 피복재, 필터(충진제) 또는 유착 방지제로 사용될 수 있다. 상기 생체 조직공학 용도는 조직 접착제, 세포 이식, 장기 이식, 조직 재생 및 의료기기 부착일 수 있다. 위 용도는 예시이며 그 외에도 통상의 기술자가 이해할 수 있는 범위의 용도는 모두 포함한다.

[0044] 본원의 제3측면은 아민-말단화 페놀 유도체가 수식된 알데히드 치환 히알루론산 유도체 제조방법을 제공한다.

[0045] 일 실시예에서 본원의 제조방법은

[0046] (1) 히알루론산(HA) 및 산화제를 사전 결정된 비율로 반응하는 단계

[0047] (2) 디올기 화합물을 반응하고 투석하는 단계

[0048] (3) 상기 (1) 및 (2) 단계를 거쳐 생성된 알데히드 치환 히알루론산(AH), EDC, NHS 및 페놀 유도체를 사전 결정된 비율로 EDC/NHS 반응을 거치는 단계를 포함한다.

[0049] 일 구현예에서 상기 (1) 단계의 HA 및 산화제는 1:1 비율로 반응할 수 있고, 산화제는 과요오드산염(Periodate salt), 대표적으로는 NaIO_4 일 수 있다. 이 단계는 히알루론산의 디올기를 알데히드로 치환하는 단계일 수 있다.

[0050] 상기 (2) 단계의 디올기 화합물은, Periodate와 같은 산화제들이 디올(diol)과 반응한다는 점을 이용하여 상기 (1) 단계에서 반응하고 남은 산화제를 제거하는 역할을 한다. 대표적으로 에틸렌 글라이콜일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0051] 일 구현예에서 상기 (3) 단계의 AH, EDC, NHS 및 페놀 유도체는 1 : 1.5 : 2 : 1의 비율로 반응할 수 있다.

[0052] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본원의 구현예 및 실시예를 상세히 설명한다. 그러나, 본원이 이러한 구현예 및 실시예와 도면에 제한되지 않을 수 있으며, 각 측면 간 중복되는 내용은 모두 공히 적용된다.

[0053] **실시예 1-1. AH 및 AH-CA 제작**

[0054] 본원의 일 실시예로서 화학적인 방식으로 히알루론산 고분자의 디올 (diol)을 알데히드기 (aldehyde group)로 치환한 히알루론산 고분자에 생체 내 존재하는 카테콜아민 분자인 도파민 (dopamine, 3,4-

dihydroxyphenethylamine)을 두 가지 결합방식으로 수식하여 합성한 유도체(AH-CA)를 제작하였다.

- [0055] 히알루론산 고분자의 일부 디올기(diol group)를 알데히드 그룹으로 치환하기 위하여 산화제인 NaIO_4 와 반응시켰다. (molar ratio of HA: NaIO_4 = 1 : 1) 반응하지 않은 잔여 NaIO_4 를 제거하기 위해 ethylene glycol를 반응시키고 투석 과정을 거친 뒤에 동결건조하였다. (도 1a 참조)
- [0056] 치환 반응의 결과물을 정량적으로 확인하기 위해 hydroxylamine hydrochloride와 지시약을 이용한 titration을 진행했다. 그 결과 약 45%의 HA의 디올이 알데히드로 치환된 것을 확인했다.
- [0057] 치환이 완료된 고분자는 ^1H -NMR 분석을 통해 HA에 알데히드 그룹이 치환됨을 확인했다. 좌측은 치환 전 HA의 ^1H -NMR spectrum을, 우측은 치환 후 AH의 ^1H -NMR spectrum을 나타낸다. (도 1b 참조)
- [0058] 동결건조가 완료된 알데히드 그룹 치환 히알루론산에 카테콜 그룹 (Catechol group)을 도입하기 위해 EDC/NHS 화학반응 (molar ratio of AH : EDC : NHS : Dopamine = 1 : 1.5 : 2 : 1)을 통해 도파민과 반응을 진행하였다. (도 1c 참조)
- [0059] 합성이 완료된 유도체는 UV-vis spectroscopy (도 1d 참조) 및 ^1H -NMR spectroscopy (도 1e 참조) 분석을 통해 AH에 카테콜 그룹이 수식되었음을 확인했고, 히알루론산에 대한 카테콜 그룹의 치환 비율 (Degree of Substitution; DS)은 약 8%였다.
- [0060] **실시예 1-2. 합성 된 AH, AH-CA 내 이차아민(secondary amine) 확인**
- [0061] 합성이 완료된 유도체 내 이차아민의 존재를 확인하기 위한 분석을 진행하였다. 이를 위해 비교 물질로 화학적 수식 이전의 히알루론산 (HA), 아마이드 본드(amide bond)로만 카테콜이 수식된 HA-CA, 이차아민으로만 카테콜이 수식된 aH-CA, 아마이드 본드 및 이차아민으로 수식된 AH-CA를 분석에 사용하였다. (도 1f 참조).
- [0062] 이차아민에 대해 특이적인 반응성을 가지고 반응의 결과로 흡광 변화를 일으키는 클로라닐(Chloranil)이라는 화합물질을 각 고분자에 반응한 뒤에 UV-vis spectroscopy를 통해 분석해 보았을 때, 이차아민이 포함된 aH-CA와 AH-CA에서만 반응의 결과물에 의한 360 nm wavelength에 peak가 검출되는 것을 확인하였다. (도 1g, 도 1h 참조) 이를 통해 AH-CA 유도체 내에 이차아민이 존재함을 확인하였다.
- [0063] 물질 내 결합의 상태 및 존재를 확인할 수 있는 Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy를 통해 각 고분자를 분석해 보았을 때, 마찬가지로 aH-CA와 AH-CA에서만 N-H wag에 해당하는 $\sim 710\text{ cm}^{-1}$ wavenumber에 peak가 관찰되었다. (도 1i, 도 1j 참조) 이를 통해 AH-CA 유도체 내 이차아민이 존재함을 재차 검증하였다.
- [0064] **실시예 2. 다양한 pH 범위에서 가교 반응 확인**
- [0065] 기존에 보고된 카테콜 그룹 수식 히알루론산 유도체 (HA-CA; 히알루론산의 카르복실 그룹에 도파민 분자를 아마이드 결합의 형태로 수식한 것)의 경우는 예상 경로 중 ①에 해당하는 반응만이 가능하므로 알칼리 pH에서만 효과적인 가교 반응이 가능하다. 그러나 본원에 따른 신규 유도체(AH-CA)의 경우 ①과 ② 경로에 따른 화학반응이 모두 일어날 수 있다. 따라서 신규 합성된 AH-CA 유도체는 알칼리 pH 조건 뿐 아니라 산성이나 중성 등 보다 넓은 pH 범위의 조건에서도 가교 반응을 통해 하이드로젤이 형성될 수 있다. (도 2a 참조)
- [0066] 본원에 따른 AH-CA 유도체 용액 (0.2666%)과 기존에 사용하던 방식으로 합성된 HA-CA 유도체 용액 (0.2666%)을 각각 pH 2.5, pH 6.8 및 pH 7.5로 준비하였다. 각 용액과 산화제 용액(NaIO_4 , 0.45 mg/ml)을 3:1의 부피비로 혼합하여 (최종 고분자 농도는 0.2%) 산화를 통한 화학적 가교 반응을 진행했다.
- [0067] 여기서 일어나는 화학적 반응을 확인하고 비교하기 위해 UV-vis spectroscopy 분석을 진행하였다. 그 결과 HA-CA에서 일어나지 않는 특이적인 화학반응 양상 및 산물에 해당하는 peak가 본원에 따른 AH-CA에서 검출되었다. (도 2b 참조) 이는 앞서 설명한 바와 같이, ② 경로 차이에 의해 형성될 수 있는 물질들인 것으로 보인다. AH-CA 분석 그래프에서 녹색 박스에 해당하는 반응 산물은 quinone-amine adducts, α, β -dehydro derivative of dopamine, DOPA-indole derivatives이고, 노란 박스에 해당하는 반응 산물은 catechol quinone과 quinone-amine adducts이며, 붉은 박스는 quinone-amine adduct이고, 갈색박스는 앞서 phenol coupling에 의해 형성된 dicatechol 등의 물질에 해당한다.
- [0068] 또한 X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) 분석도 진행하였다.(도 2c참조) 그 결과 기존 HA-CA 가교 반응에서 확인할 수 없었던, 카테콜 그룹과 secondary amine 그룹과의 결합에 의해 생성되는 C-N 결합, 카테콜-카테

콜 결합, 그리고 카테콜 그룹의 퀴논화에 의해 생성되는 peak 변화가 관찰되었다. 이는 앞서 제시한 ② 경로 차이에 따른 반응인 것으로 여겨진다.

[0069] 따라서 본원의 히알루론산 유도체의 경우 기존 HA-CA에서 가교 반응이 일어날 수 없는 산성 pH 조건 뿐만 아니라 중성 및 알칼리성 pH에서도 가교 반응이 유도되고 있음을 확인하였다.

[0070] 실시예 3. pH 조건 별 하이드로젤 형성 양상, 속도, 탄성계수, 팽윤 양상비교

[0071] AH-CA (HA 분자량: 200 kDa) 용액을 산화시켜 (2.666% AH-CA solution : 4.5 mg/ml NaIO_4 = 3 : 1, volumetric ratio) 가교된 최종 2% 농도의 AH-CA 하이드로젤을 준비했다. 이때 용액의 pH에 따라 다른 화학반응에 의해 가교가 진행되어 서로 다른 색깔을 가지는 하이드로젤이 형성되었다. (도 3의 a 참조)

[0072] 각 pH 조건에서의 가교 속도 측정을 위해 각 고분자 용액과 산화제를 glass vial 내에서 stirring bar를 이용하여 섞어 주면서 산화를 유도한 이후 용액의 점도가 급격히 변화하는 시점 (Sol-gel transition)과 젤화가 완료되어 bar와 분리되어 안정적인 젤의 형태가 된 시점 (Gelation completion)까지 소요된 반응 시간을 각각 측정하였다. 측정 결과 모든 pH 조건에서 수초 내지 수십 초 내에 하이드로젤이 형성되었고 산성 pH에서 알칼리성 pH로 갈수록 산화 시 가교 속도가 빨라지는 것을 확인하였다. (도 3의 b 참조) 따라서 pH 조절을 통해 본원에 따른 AH-CA를 이용한 하이드로젤 형성 속도를 조절할 수 있다.

[0073] 각 pH 조건에서 형성된 하이드로젤에 대한 탄성계수 측정을 위해 rheometer를 이용하여 frequency sweep mode (0.1 ~ 10 Hz 구간)로 측정하였고, 1 Hz일 때의 저장 탄성률 (storage modulus)의 평균 값을 구하여 탄성계수 (Elastic modulus)를 계산하였다. (도 3의 c 참조) 계산 결과 산성 pH에서 알칼리성 pH로 갈수록 탄성계수가 증가함을 확인하였다.

[0074] 따라서 pH를 조절하여 본원에 따른 히알루론산 유도체 기반 하이드로젤의 탄성계수를 조절할 수 있다.

[0075] 또한 팽윤 양상의 측정을 위해서 각 pH 조건에서 형성된 하이드로젤을 PBS에 넣은 상태로 37℃ 에서 incubation 하였고, 각 분석 시점에서의 하이드로젤 무게를 측정하여 팽윤 정도 (Swelling ratio = $(W_m - W_i) / W_i \times 100$, W_m = 각 시점에서 측정된 하이드로젤 무게, W_i = 초기 하이드로젤 무게)를 계산하였다. 그 결과 산화 시 용액의 pH 조건에 따라 형성된 하이드로젤의 물리적 성질 (탄성계수 및 팽윤 양상)이 특이적으로 달라짐을 확인했다. (도 3의 d 참조) 따라서 pH 조건에 따라 본원에 따른 히알루론산 유도체 기반 하이드로젤의 물성을 원하는 수준으로 조절할 수 있다.

[0076] 실시예 4. 1MDa HA 하이드로젤의 팽윤 양상 분석

[0077] 1 MDa의 HA를 이용하여 합성한 AH-CA 유도체로 제작된 하이드로젤 (2.666% AH-CA solution : 4.5 mg/ml NaIO_4 = 3 : 1, volumetric ratio로 혼합, 최종 고분자 농도는 2%)을 앞서 분석한 팽윤 양상 측정과 동일한 방식 (PBS에 넣은 상태로 37℃에서 incubation하며 각 분석 시점에서 무게 측정 후 계산)으로 측정하였다. 실시예 3에서 200kDa의 HA를 이용한 경우와 비교했을 때, (도 3의 d 참조) 1 Mda의 HA를 이용한 경우 팽윤 정도가 더 크고 하이드로젤의 유지 기간도 더 길어짐을 확인했다. (도 4 참조) 이는 사용되는 HA 고분자의 분자량 변화를 통해 팽윤 양상 및 하이드로젤 유지기간을 조절할 수 있음을 의미한다.

[0078] 실시예 5. 산성 pH 조건에서 하이드로젤 형성 시간 및 접착력 비교 분석

[0079] 기존의 HA-CA 유도체 (분자량 200 kDa)와 본원의 일 실시예에 따른 AH-CA 유도체(분자량 200 kDa)를 준비하고, 각각 pH 2.5에서 유변학(rheometer) 분석을 통해 time sweep mode(시료에 가해주는 strain과 frequency를 고정해놓은 상태로 계속 측정하여 시간에 따른 시료의 유변학적 변화를 관찰하는 방식)에서 가교 kinetics를 비교하였다. 가교 조건은 2.666% polymer solution : 4.5 mg/ml NaIO_4 = 3 : 1, volumetric ratio로 혼합 및 최종 고분자 농도는 2%로 동일했다.

[0080] 기존의 HA-CA 하이드로젤의 경우에 70분 이상의 시간에 걸쳐 가교가 진행되며 형성된 하이드로젤의 물성도 약한 것으로 확인되었다. 반면 AH-CA의 경우에는 1분 내에 가교가 진행되며 우수한 물성을 가진 온전한 하이드로젤이 형성되는 것을 확인했다. 여기서 Storage modulus와 Loss Modulus가 동일해지는 지점이 곧 히알루론산 고분자 유도체 용액이 유체 상태에서 젤 상태로 변하는 지점을 의미한다. (도 5a 및 5b 참조)

[0081] 레오미터 (rheometer) 장비의 metal plate 상에서 각 하이드로젤의 접착력을 비교해 보았을 때 AH-CA의 접착력이 훨씬 우수함을 확인했다. (도 5c 참조)

[0082] 실시예 6. 마우스 및 돼지의 산성 조직 실험

[0083] 본원의 일 실시예에 따른 AH-CA를 이용하여, 모델 약물 (FITC-dextran)을 혼합한 AH-CA 용액을 경구 투여용 존데를 이용하여 마우스 위 내에 주입하고 3시간 뒤에 수거하여 관찰하였다.

[0084] 도 6b를 참조했을 때, 흰색 그물망 구조의 하이드로젤이 진한 자주색으로 염색(H&E 염색)된 위 조직 위에 잘 도포되어 있음을 확인했다. 도 6c를 참조했을 때, 모델 약물(FITC-dextran)을 담지한 하이드로젤이 초록색 형광을 띠는 채로 위 조직(DAPI 염색; 파란색)에 도포되어 있었으며, 이는 곧 마우스 위 조직에서 하이드로젤이 약물을 제대로 담지하고 있음을 의미한다.

[0085] 산성 조건에서의 생체 조직에 대한 접착성을 확인하기 위해 위액 모사 용액 (simulated gastric fluid; SGF = 0.2 % (w/v) NaCl in 0.7% (v/v) HCl)에 하루동안 담가 두어 산성화된 돼지 위 조직을 준비했다. 그 표면에 ex vivo 조건으로 산화제 혼합을 통해 가교 반응을 개시한 상태의 AH-CA 용액 (2.666% AH-CA solution : 4.5 mg/ml NaIO₄ = 3 : 1, volumetric ratio로 혼합하고, 최종 고분자 농도는 2%, HA의 분자량은 200 kDa)을 처리하였을 때, 산성화된 조직에서도 하이드로젤이 형성되면서 위 조직 표면에 잘 접착되어 있는 것을 확인했다. (도 6d 참조)

[0086] 따라서 본원의 히알루론산 유도체는 산성 조건의 생체조직에 대한 봉합 및 약물전달 등 다양한 의료적 용도로 사용될 수 있다.

[0087] 실시예 7. 마우스 위궤양 실험

[0088] 마우스 위 점막에 50% (v/v) acetic acid를 1분간 국소 노출하여 위궤양을 유발 후, 산성 조건에서 본원의 일 실시예에 따른 AH-CA 하이드로젤에 의한 약물 전달 효과를 확인했다.

[0089] 상피세포 성장인자 (Epidermal Growth Factor, EGF)를 약물로 사용하여 HA-CA, AH-CA, sucralfate 용액에 혼합하여 담지하고 위 점막 하층에 주입하였고 첫날(Day 1)과 3일 후(Day 3) 궤양의 크기 및 형태를 분석했다. (이때 HA-CA와 AH-CA 하이드로젤의 가교 조건은 2.666% polymer solution : 4.5 mg/ml NaIO₄ = 3 : 1, volumetric ratio로 혼합하고, 최종 고분자 농도 2%로 적용하였다. HA-CA와 AH-CA에 사용된 HA의 분자량은 200 kDa. Sucralfate 용액은 0.33 mg/mouse로 적용하였으며 EGF는 0.05 mg/mouse로 적용함) 도 7의 b, d 및 f에서 왼쪽은 첫날(Day 1), 오른쪽은 3일 후(Day 3)의 분석 결과를 의미한다.

[0090] 어떤 처치도 하지 않은 그룹(no treatment)과 비교했을 때 EGF를 함께 전달한 모든 그룹에서 궤양의 크기가 유의하게 감소하였으며 (도 7의 a 및 b 참조; 점선의 왼쪽이 궤양, 오른쪽은 정상 조직), AH-CA + EGF 그룹에서 궤양 말단 부위 (ulcer margin) 위 점막의 비 정상적 과증식이 가장 적게 일어났고 (도 7의 c 및 d 참조; hematoxylin & eosin staining 분석) 궤양 기저 부위 (ulcer base)의 점막 형태가 가장 정상에 가까운 것을 (정상 점막이 grade 1을 의미함) 조직학 분석을 통해 확인했다. (도 7의 e 및 f 참조; Alcian Blue Periodic acid-Schiff staining 분석)

[0091] 특히 AH-CA + EGF 그룹은 비교군인 HA-CA 용액을 사용한 그룹 (HA-CA + EGF) 뿐만 아니라 실제 임상에서 위궤양 및 위염 질환 치료에 사용되는 약물인 Sucralfate 용액을 사용한 그룹 (Sucralfate + EGF)과 비교했을 때도 더욱 우수한 위궤양 치료 효과를 보였다.

[0092] 따라서 본원의 히알루론산 유도체는 산성 조건에서도 하이드로젤을 형성하여 오랜 시간동안 안정적이고 지속적인 약물 전달을 가능하게 함으로써 향상된 위궤양 치료 효과를 유도할 수 있음을 확인했다.

[0093] 실시예 8. 세포독성/활성 확인 실험

[0094] 중성 pH 조건 (pH 6.8)에서 형성한 AH-CA 하이드로젤(2.666% AH-CA solution : 4.5 mg/ml NaIO₄ = 3 : 1, volumetric ratio로 혼합, 최종 고분자 농도는 2%, HA 고분자의 분자량은 200 kDa)을 DMEM 배양액에 넣고 24 시간 동안 incubation 한 후 수거된 conditioned medium을 인간 진피 섬유아세포 (Human Neonatal Dermal Fibroblasts; nHDF)에 24 시간 처리하였다.

[0095] AH-CA를 처리한 그룹들은(2.5mg/ml, 5.0mg/ml) 기본 배양액이 처리된 control 그룹과 유사한 수준으로 독성이 거의 없음을 Live/Dead 염색법으로 확인하였다. (도 8a 참조) 또한, 동일한 조건으로 배양한 세포에 대해서 MTT 시험법으로 테스트 했을 때 세포의 활성에도 문제가 없음을 확인하였다. (도 8b 참조) 따라서 본원에 따른 AH-CA 하이드로젤은 세포독성이 없음을 확인했다.

[0096] **실시예 9-1. 중성 및 알칼리 조건에서 접착력 비교 실험**

[0097] 유변학 (rheometer) 분석 장비를 이용하여, 종래 HA-CA와 본원의 일 실시예에 따른 AH-CA를 동일한 고분자 유도체 농도와 산화 조건(2.666% polymer solution : 4.5 mg/ml NaIO₄ = 3 : 1, volumetric ratio로 혼합, 최종 고분자 농도는 2%, HA 고분자의 분자량 200 kDa)과, pH 6.8 또는 pH 7.5에서 형성된 하이드로젤의 접착력을 각각 측정했다. (도 9a 참조) 레오미터의 metal plate 상에서 AH-CA 하이드로젤의 중성 pH에서의 접착력은 알칼리 pH 조건에서 가교된 경우 보다 높았고, 특히 중성 및 알칼리 pH 조건에서 가교된 HA-CA 하이드로젤과 비교하여 월등히 우수한 것을 확인하였다.

[0098] 따라서 실시예 8 및 9를 종합하면 본원의 히알루론산 유도체 기반 하이드로젤은 낮은 세포 독성과 우수한 접착력을 가져 생체적합성이 뛰어나고 생분해가 가능하여 효과적인 조직 상처 봉합제로 사용할 수 있다. (도 9b 참조)

[0099] **실시예 9-2. 중성 pH 조건에서 AH-CA 하이드로젤의 가교 속도 비교 분석**

[0100] 중성 pH 조건 (pH 6.8)에서의 AH-CA 하이드로젤의 빠른 가교 속도를 HA-CA와 비교 확인하기 위해 유변학 분석을 진행하였다. 이 때 AH-CA 하이드로젤 및 HA-CA 하이드로젤의 가교 조건은 2.666% polymer solution : 4.5 mg/ml NaIO₄ = 3 : 1, volumetric ratio로 혼합하고, 최종 고분자 농도 2%로 적용하였다. HA 고분자의 분자량은 200 kDa다.

[0101] 그 결과 AH-CA 하이드로젤은 30초 이내의 빠른 시간 내에 storage modulus (G')가 loss modulus (G'') 값을 넘어서면서 젤화 (gelation)가 일어나는 것과 달리, 종래 기술인 HA-CA 하이드로젤은 15분 이상의 비교적 긴 시간에 걸쳐 젤화가 일어나는 것을 확인했다. 이는 중성 pH 조건에서는 가교가 느리거나 쉽지 않았던 종래의 HA-CA 하이드로젤의 한계점을 벗어나 AH-CA 하이드로젤은 종래 기술 대비 중성 pH에서도 우수한 접착성 뿐만 아니라 빠르게 가교될 수 있는 성질 또한 가지고 있음을 의미한다. (도 9c 참조)

[0102] **실시예 10. 마우스 모델을 이용한 봉합 실험**

[0103] 중성 pH 조건 (pH 6.8)에서 AH-CA 하이드로젤의 우수한 접착력에 의한 봉합 효과를 확인하기 위해 마우스 피부 절개 모델을 준비했다. 마우스 등 피부에 2 cm 크기의 절개 상처를 유발하고 비처리군(NT), 비교군인 HA-CA 하이드로젤 처리 그룹 (HA-CA), 양성 대조군인 Fibrin 처리 그룹 (Fibrin), 실험군인 AH-CA 처리 그룹으로 나누어 실험을 진행했다. (도 10의 a 및 b 참조) (이 때 HA-CA와 AH-CA 하이드로젤의 가교 조건은 2.666% polymer solution : 4.5 mg/ml NaIO₄ = 3 : 1, volumetric ratio로 혼합하고, 최종 고분자 농도 2%로 적용하였다. HA 고분자의 분자량은 200 kDa로 동일함)

[0104] 처리한 시점으로부터 7일 뒤에 절개 부위를 관찰하였을 때 아물지 않은 상처의 면적은 비처리 그룹에서 가장 컸고, 비교군인 HA-CA에서도 비처리군과 비슷한 수준으로 상처가 남아 있었고, Fibrin 그룹과 AH-CA 그룹에서 상처의 양상과 크기를 보았을 때 봉합 효과를 확인할 수 있었다. (도 10의 c 참조) AH-CA 그룹은 비교군인 모든 그룹 중에서 가장 우수한 봉합효과를 보이는 것을 확인하였다. (도 10의 d 참조)

[0105] 또한 H&E 염색을 통한 조직학 분석에서 AH-CA 그룹에서 상처의 너비(조직 위쪽 점선 사이 너비)가 가장 많이 줄어든 것을 확인했다. MT 염색법을 통한 조직학 분석에서 AH-CA 그룹에서 피부조직이 가장 정상적으로(파란 부분이 콜라겐을 포함한 정상 조직을 의미) 재생된 것을 확인했다. (도 10의 e 및 f 참조)

[0106] 따라서 본원의 히알루론산 유도체는 종래 기술에 비해 더 우수한 상처 봉합 및 조직 재생 효과를 유도할 수 있다.

[0107] **실시예 11. 산성, 중성 및 알칼리 pH 조건에서 조직접착성 비교 분석**

[0108] 산성 pH 조건 (pH 2.5), 중성 pH 조건 (pH 6.8)과 알칼리 pH 조건 (pH 7.5)에서의 AH-CA 하이드로젤의 우수한 조직 접착력을 확인하기 위해 돼지의 간 조직을 레오미터 하판과 프로브에 부착한 뒤에 조직 사이에 각 하이드로젤을 도포하고 부착시킨 뒤에 떼어내는 방식으로 접착력을 측정했다. (이 때 AH-CA 하이드로젤의 가교 조건은 2.666% polymer solution : 4.5 mg/ml NaIO₄ = 3 : 1, volumetric ratio로 혼합하고, 최종 고분자 농도 2%로 적용하였다. HA 고분자의 분자량은 200 kDa이다.

[0109] 측정 결과 산성, 중성 및 알칼리 pH 조건에서 AH-CA 하이드로젤이 임상적으로 널리 사용되는 피브린(fibrin) 기반 접착제와 비교하여 보다 우수한 조직 접착성을 보이는 것을 확인했다. (도 11 참조) 즉 본 발명에서 개발된

AH-CA 하이드로젤은 산성부터 알칼리 조건에 이르기까지 다양한 pH 범위에서 기존 피브린 접착제와 비교하여 우수한 조직 접착성을 보여줌으로써 체내 다양한 pH 조건을 가진 장기에 접착 소재로서 범용적으로 적용 가능성이 높다.

[0110] **실시예 12. 중성 pH 조건에서 AH-CA 하이드로젤의 삼차원 세포 배양 및 세포 이식 성능 확인 실험**

[0111] 중성 pH (pH 6.8)에서 가교한 AH-CA 하이드로젤 (2.666% AH-CA solution : 4.5 mg/ml NaIO₄ = 3 : 1, volumetric ratio로 혼합, 최종 고분자 농도는 2%, HA 고분자의 분자량은 200 kDa와 1 MDa) 내에 봉입하여 3D 배양한 인간 지방 유래 줄기세포 (human adipose-derived stem cells)의 생존율을 Live/Dead 염색법을 통해 분석했다. (도 12의 a 및 b 참조) 4일간 배양하였을 때 90% 수준의 세포 생존율이 관찰되어 AH-CA 하이드로젤은 세포독성이 거의 없음이 확인되었다.

[0112] 중성 pH 조건에서 움직임이 많은 조직(심장 등)에 부착력 테스트를 진행하였다.(도 12의 c 참조) 마우스의 심장에 AH-CA 하이드로젤 (2.666% AH-CA solution : 4.5 mg/ml NaIO₄ = 3 : 1, volumetric ratio로 혼합, 최종 고분자 농도는 2%, HA 고분자의 분자량은 200 kDa)을 도포하였을 때 (도 12의 d 참조) 심장 조직 표면에 잘 부착이 되었고 (도 12의 e 참조; 화살표 부분) 조직학 분석 결과도 수거된 심장 조직 표면에 하이드로젤이 잘 부착되어 있음을 나타냈다. (도 12의 f 참조) AH-CA 하이드로젤을 이용하여 인간 지방 유래 줄기세포를 심장 조직에 도포하였을 때 세포가 잘 부착되어 이식되었다. (도 12의 g 참조)

[0113] 따라서 본원의 히알루론산 유도체 기반 하이드로젤은 움직임이 많아 세포 이식이 어려운 장기 및 조직에도 활용할 수 있다.

[0114] **실시예 13. 알칼리 pH 조건에서 AH-CA 하이드로젤의 특성 확인**

[0115] 동일한 유도체 농도, 산화 조건 (2.666% polymer solution : 4.5 mg/ml NaIO₄ = 3 : 1, volumetric ratio로 혼합, 최종 고분자 농도 2%, HA 고분자의 분자량 = 200 kDa) 및 알칼리 pH (pH 7.5)에서 하이드로젤의 가교속도를 측정했다. 측정을 위해 각 고분자 용액과 산화제를 glass vial 내에서 stirring bar를 이용하여 섞어 주면서 산화를 유도한 이후 용액의 점도가 급격히 변화하는 시점 (Sol-gel transition)과 젤화가 완료되어 bar와 분리되어 안정적인 젤의 형태가 된 시점 (Gelation completion)을 측정하였다. 기존의 HA-CA는 알칼리 pH 조건에서 1분 내외의 속도로 가교가 진행되는데 비해서 AH-CA의 경우 알칼리 pH에서 10초 내외로 매우 빠른 속도로 가교가 진행되어 5배 이상 빠른 속도로 하이드로젤이 형성되는 것을 확인하였다. (도 13의 a 및 b 참조)

[0116] 마우스 간 출혈 모델을 이용하여 출혈 상황에 대한 지혈 용도 테스트를 진행하였다. 간 조직에 출혈을 유도한 후 알칼리 pH의 AH-CA 하이드로젤을 처리하였을 때, 상처 부위 표면에 부착되어 물리적으로 출혈을 막음과 동시에 혈액 내 혈장단백질 및 응고인자 성분 뿐만 아니라 적혈구 및 혈소판 등 혈액 응고작용을 담당하는 세포들과도 결합하여 효과적인 지혈작용이 일어났다. (도 13의 c 내지 e 참조)

[0117] 특히 기존에 임상적으로 주로 적용되어 왔던 fibrin 접착제와 비교하였을 때에도 더욱 우수한 지혈 효과를 보였으며, AH-CA 하이드로젤의 빠른 가교와 우수한 접착성에 기인하여 초기 시점 (30초)에서 더욱 뛰어난 지혈 성능을 보였다.(도 13의 f 및 g 참조)

[0118] 따라서 본원의 히알루론산 유도체 기반 하이드로젤은 빠른 가교 속도를 활용하여 긴급한 처리가 필요한 외상 치료 및 수술 중 응급 상황에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

[0119] **실시예 14. 마우스 조직 실험**

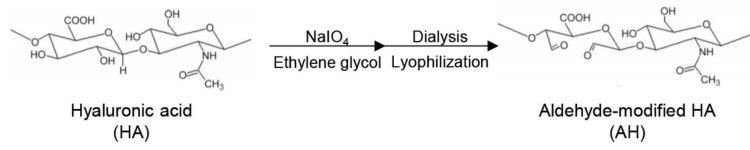
[0120] 마우스로부터 수거한 신장 조직에 자상을 낸 뒤에, 손상된 부위에 알칼리 pH 조건 (pH 7.5)의 AH-CA 하이드로젤 (2.666% AH-CA solution : 4.5 mg/ml NaIO₄ = 3 : 1, volumetric ratio로 혼합, 최종 고분자 농도는 2%, HA 고분자의 분자량은 200 kDa)을 처리한 후의 조직 (도 14의 a 참조; 왼쪽) 및 조직학적 염색(H&E staining)을 통해 (도 14의 a 참조; 오른쪽) 본원에 따른 AH-CA 하이드로젤이 상처가 난 부위를 잘 메우고 있음을 확인했다.

[0121] 마우스로부터 수거한 간 조직을 절제한 뒤에, 조직 사이에 알칼리 pH 조건의 AH-CA 하이드로젤을 처리하여 다시 붙인 후의 조직에서, 절제된 조직간 접합이 잘 이루어졌음을 확인했다. (도 14의 b 참조)

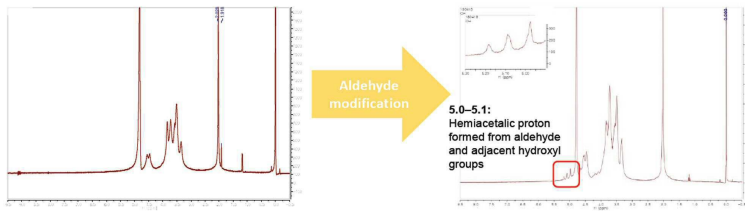
[0122] 이를 통해 알칼리 pH 조건에서 본원의 히알루론산 유도체 기반 하이드로젤은 빠른 가교 반응을 통해 다양한 내부 장기의 봉합 용도로도 사용할 수 있을 정도의 충분한 조직 접착성을 가지고 있음을 확인했다.

도면

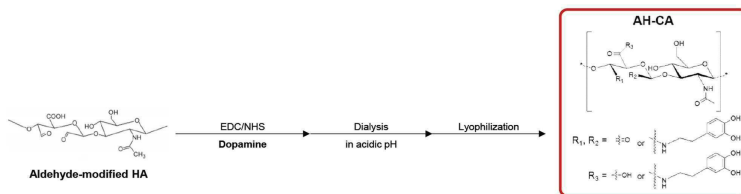
도면1a



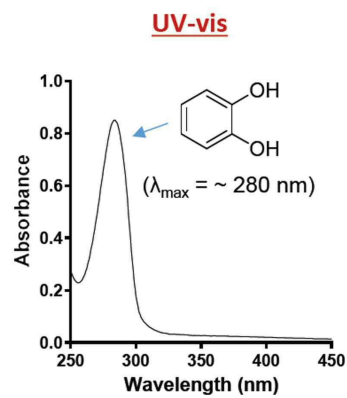
도면1b



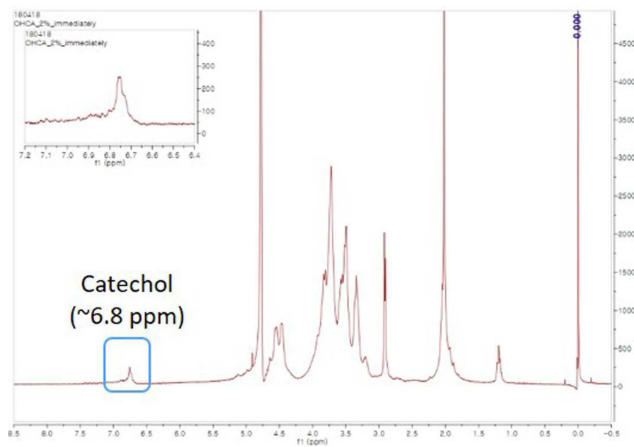
도면1c



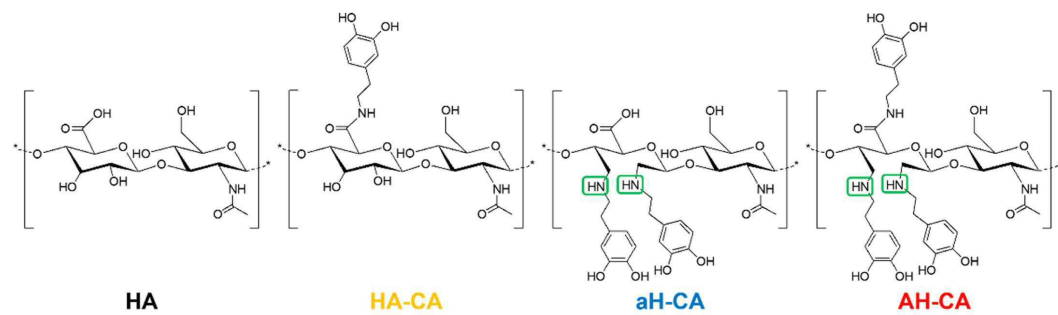
도면1d



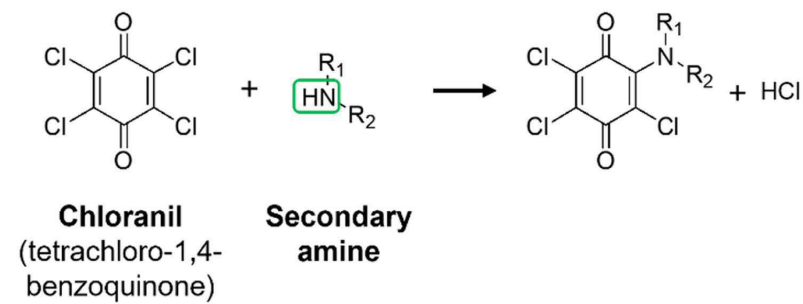
도면1e



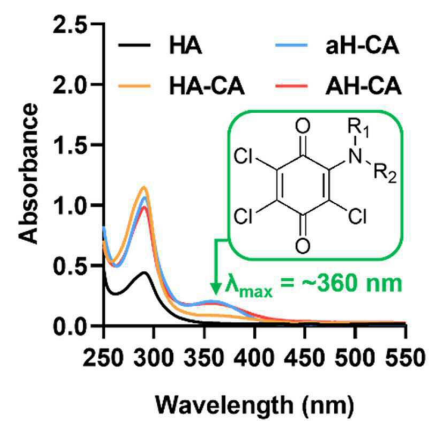
도면1f



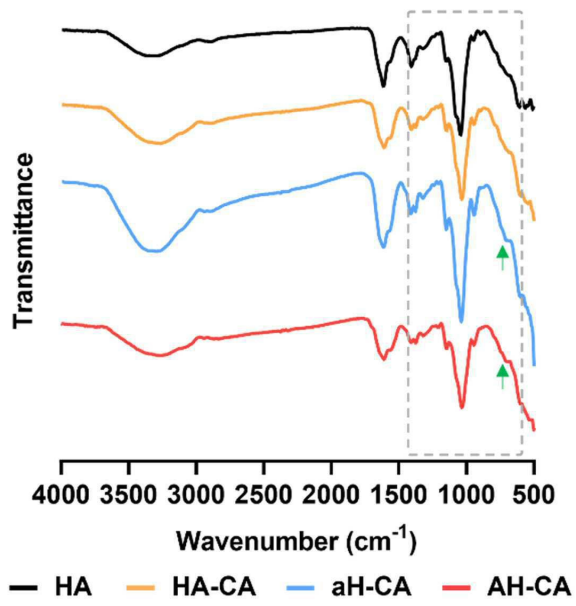
도면1g



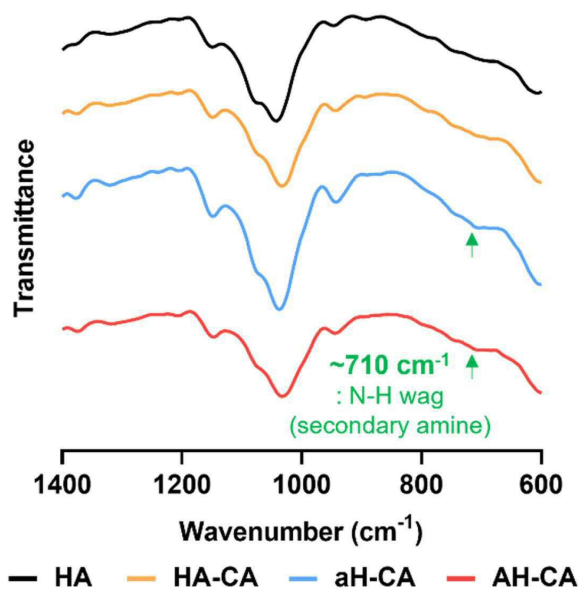
도면1h



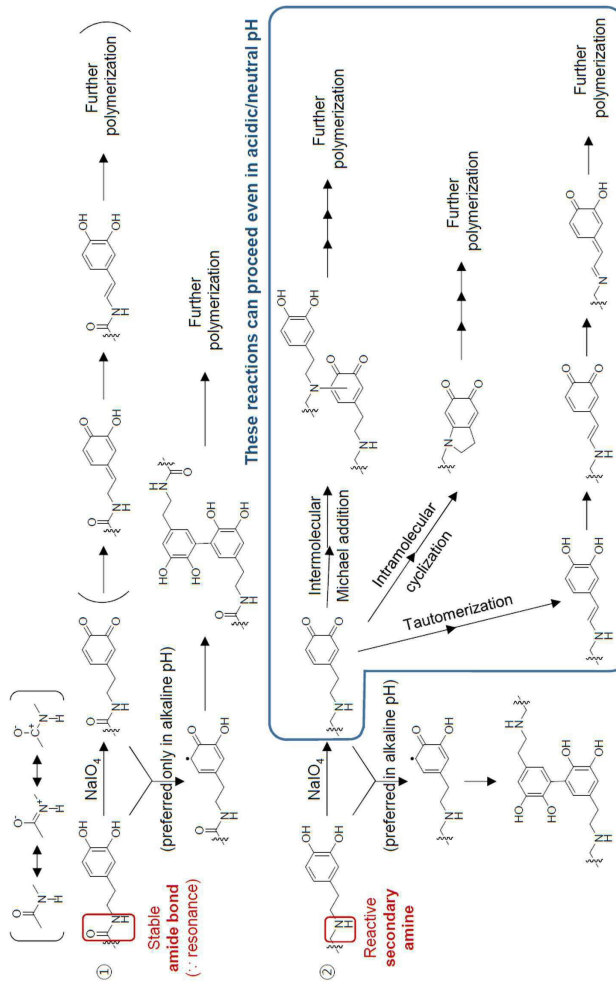
도면1i



도면1j

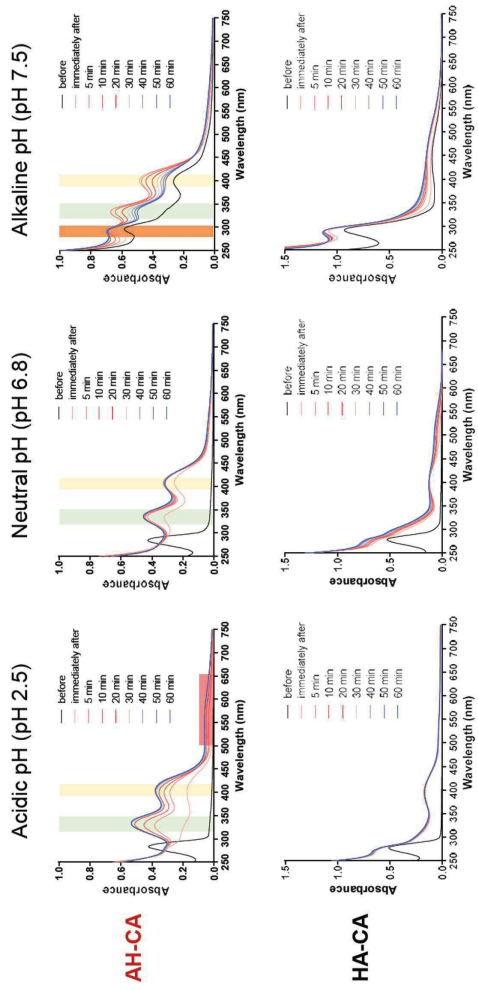


도면2a



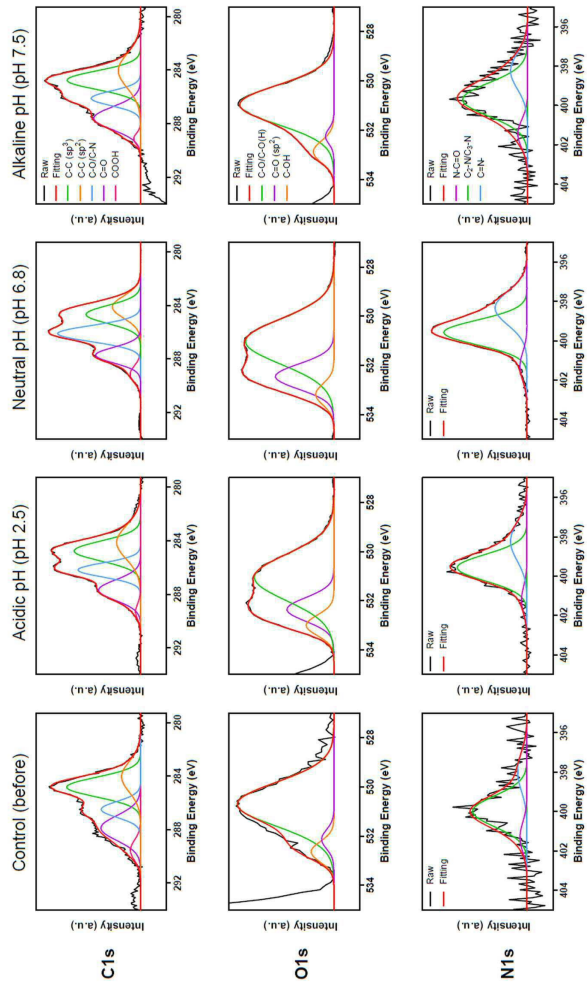
도면2b

UV-vis

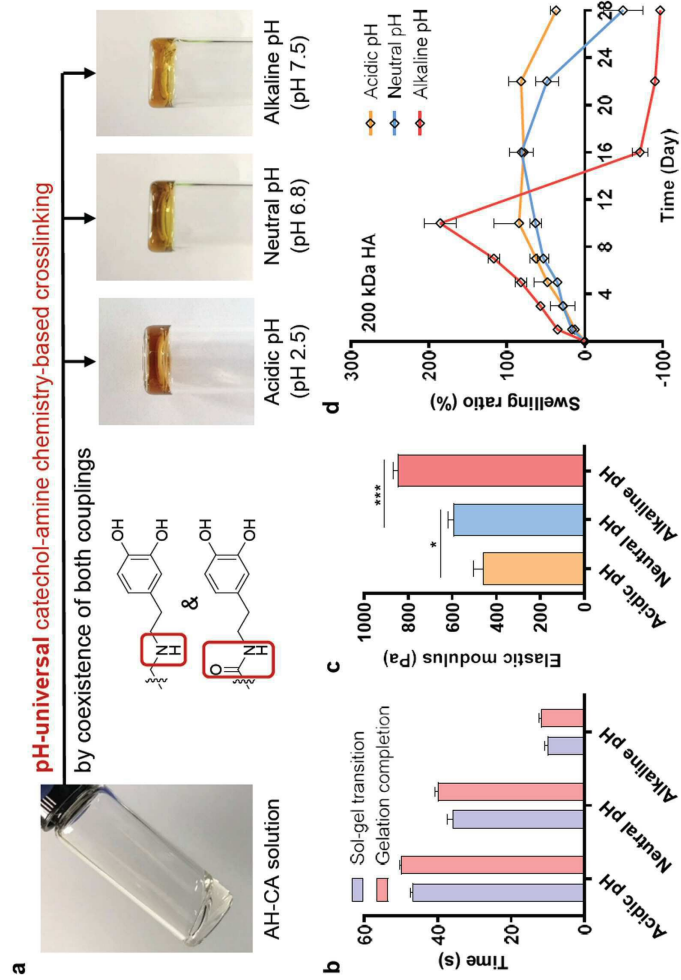


도면2c

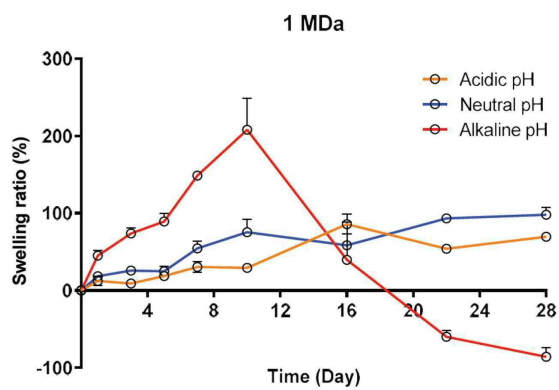
XPS



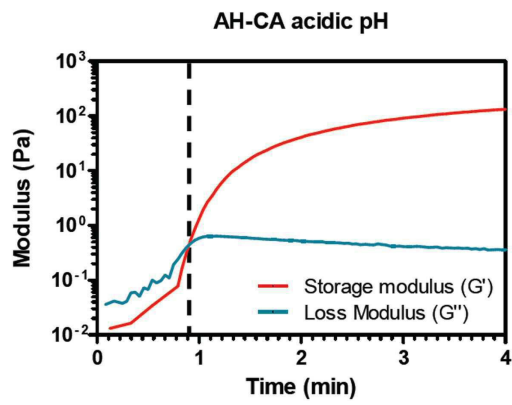
도면3



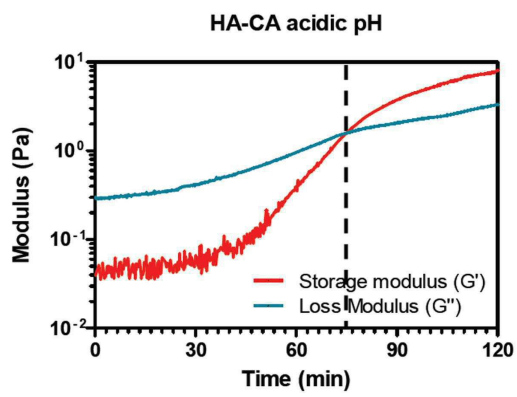
도면4



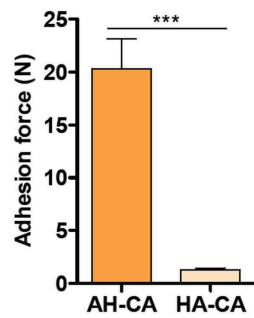
도면5a



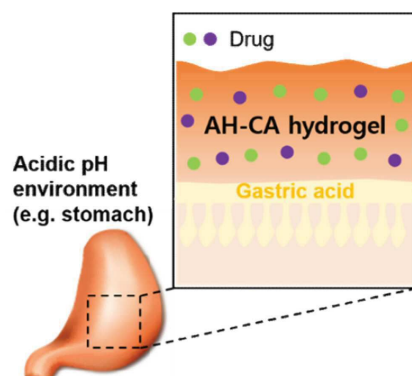
도면5b



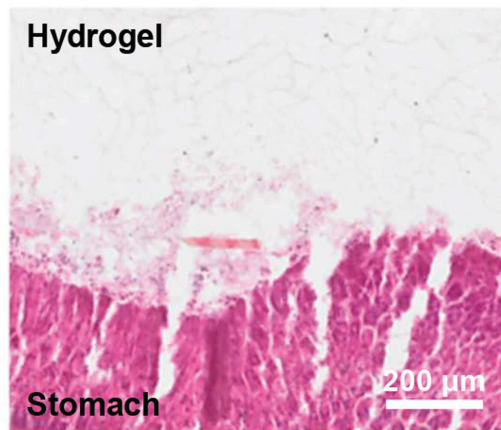
도면5c



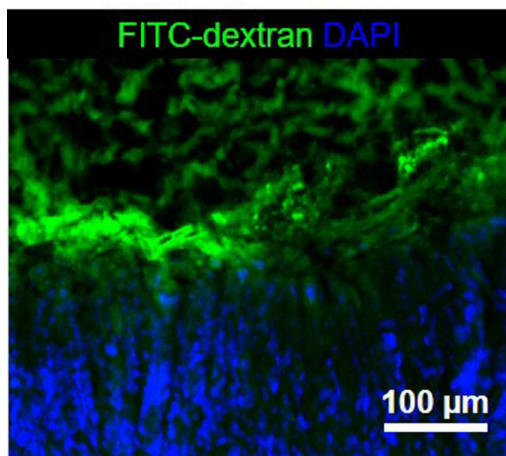
도면6a



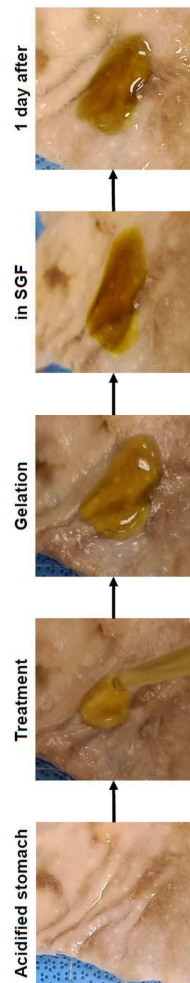
도면6b



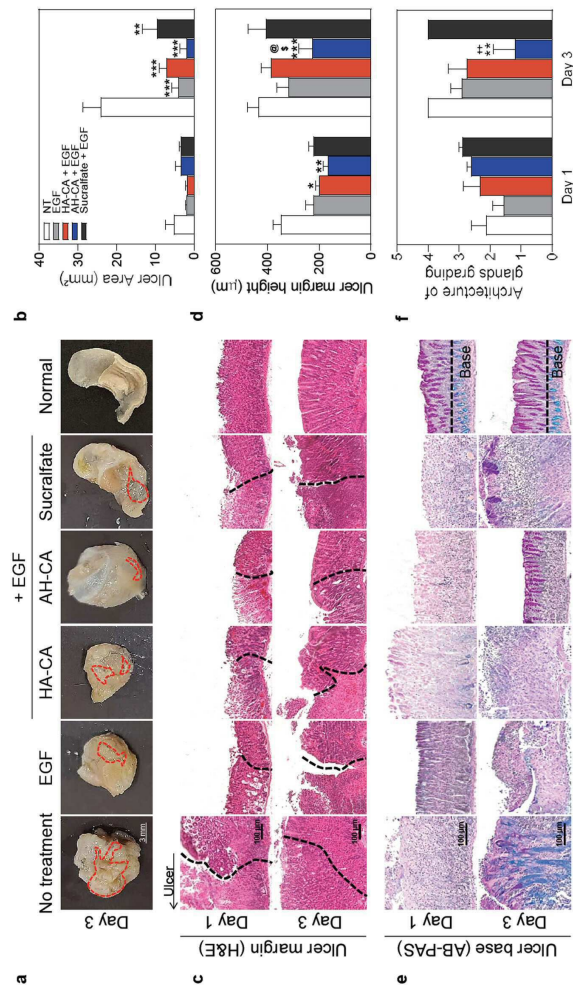
도면6c



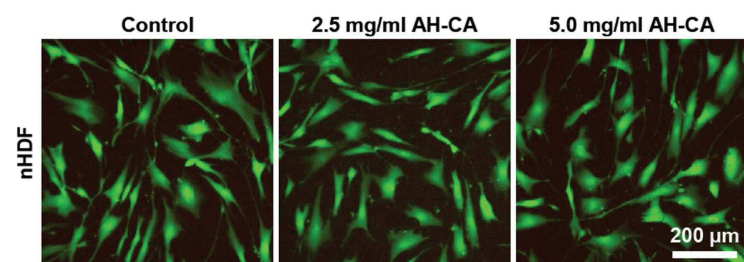
도면6d



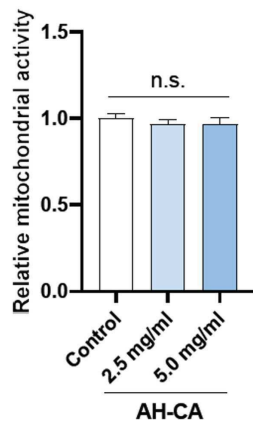
도면7



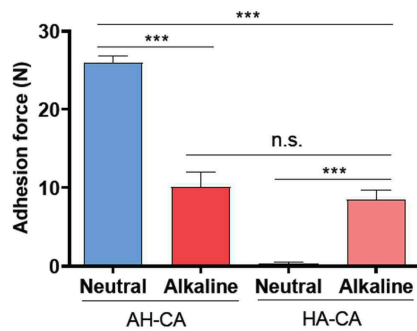
도면8a



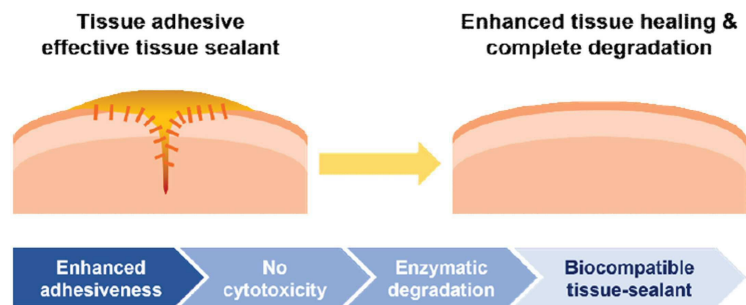
도면8b



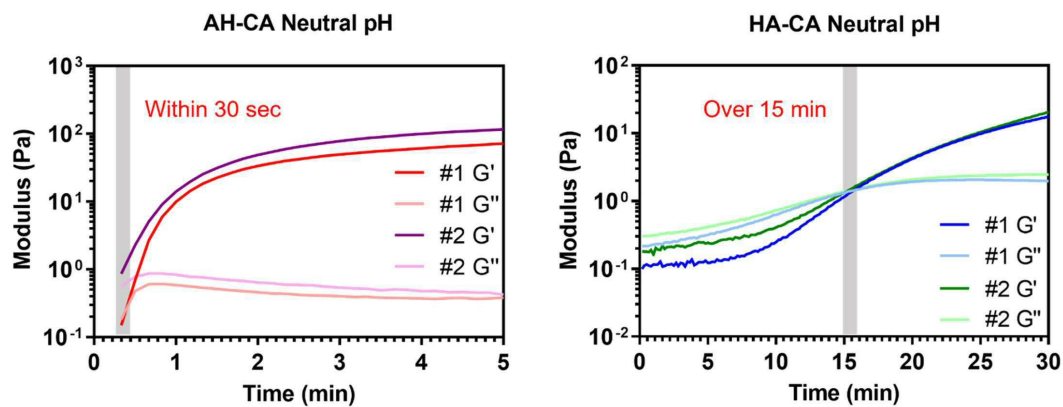
도면9a



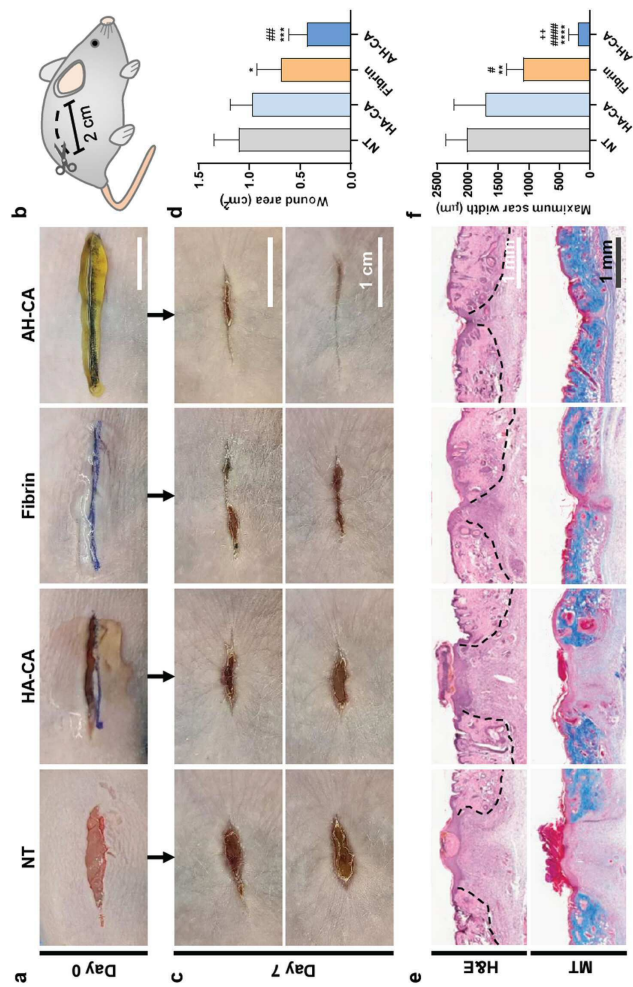
도면9b



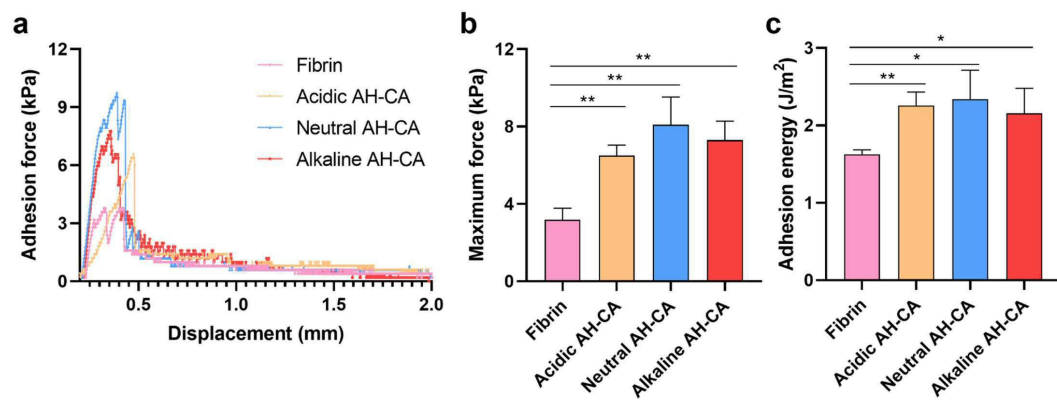
도면9c



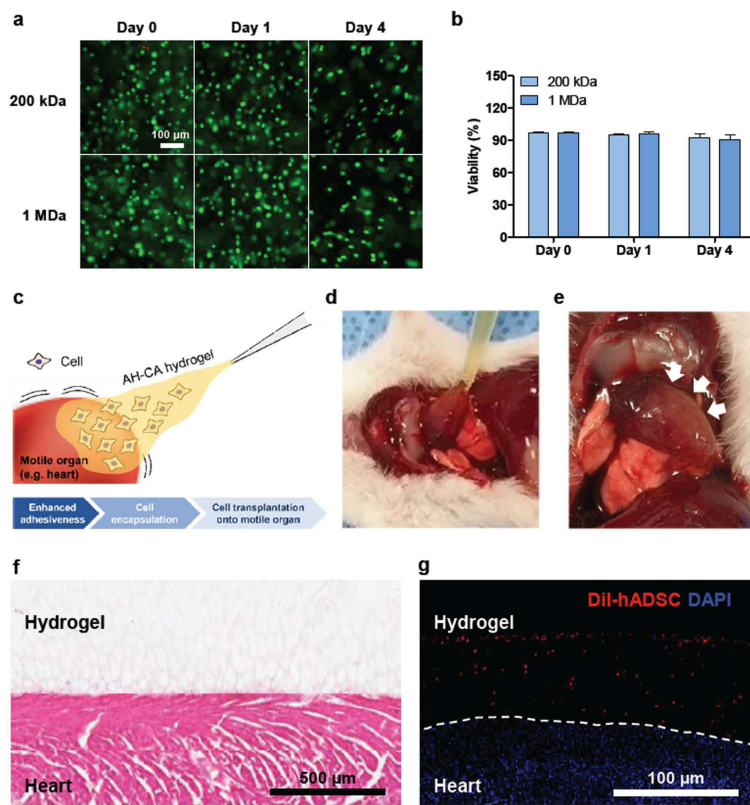
도면10



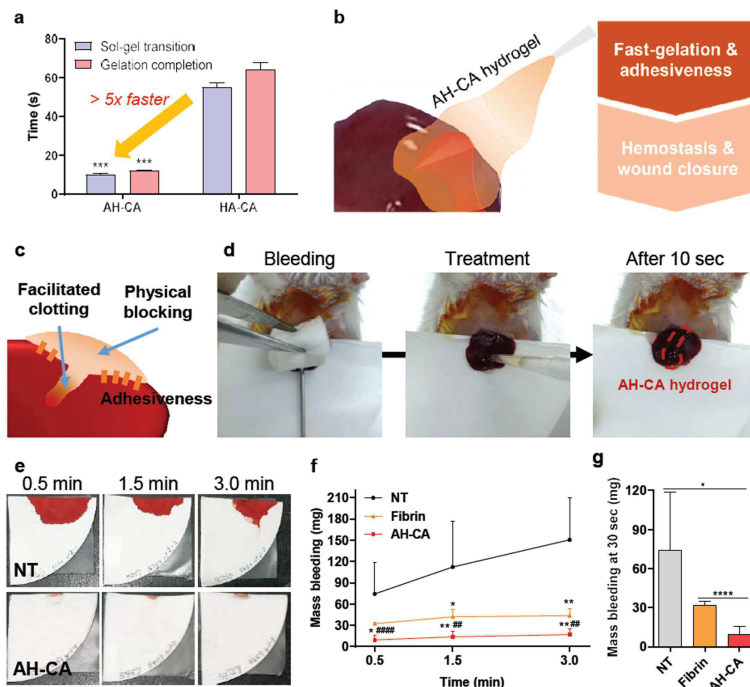
도면11



도면12

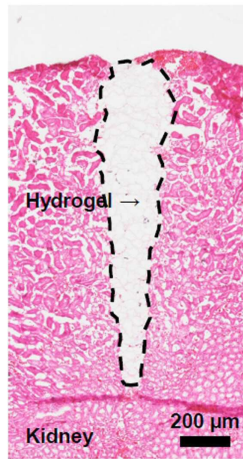
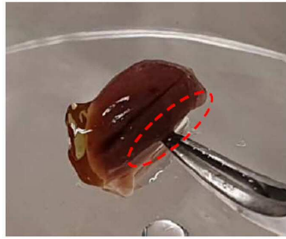


도면13

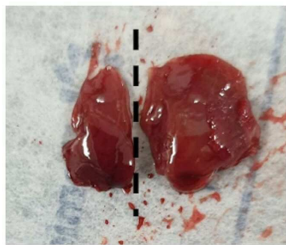


도면14

a



b



AH-CA
(alkaline pH)

