creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

공 학 석 사 학 위 논 문

히알루론산 기반의 암 치료용 다자극 반응성 하이드로겔

2022년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

스마트그린기술융합공학과

조 이 준

공 학 석 사 학 위 논 문

히알루론산 기반의 암 치료용 다자극 반응성 하이드로겔

지도교수 임 권 택

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함.

2022년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

스마트그린기술융합공학과

조 이 준

조이준의 공학석사 학위논문을 인준함.

2022년 8월 26일

위 원 장 이학박사 김 용 현 (인)

위 원 공학박사 백 강 준 (인)

위 원 이학박사 임 권 택 (인)

목 차

목차 ····· i

표 목차 ····· iii

그림 목차 ····· iii

ABSTRACT ····· v

제 Ⅰ장 서 론 ····· 1

제 Ⅱ장 이 론 ····· 5

2.1 하이드로겔 개요 ····· 5

2.2 히알루론산 개요 ····· 6

2.3 히알루론산의 원료 ····· 7

2.4 히알루론산의 약물 전달 응용 ····· 8

2.5 클릭 화학(click chemictry) ····· 8

2.6 diels-alder 반응 ····· 9

2.7 근적외선의 의한 가교제에 다이셀레나이드 결합 분해 ····· 10

제 Ⅲ장 실 험 ····· 12

3.1 시약 ····· 12

3.2 분석 ····· 13

3.3 합성 및 실험 요약 ····· 14

3.4 DSeDPA의 합성 ····· 15

3.5 4-(BOC-amino) benzonitrile의 합성 ····· 15

3.6 Tetrazine-BOC의 합성 ····· 16

3.7 Tetrazine amine을 얻기 위한 BOC-기의 탈보호 반응 ····· 17

3.8 Diselenide-ditetrazine(DSe-DTz) 가교제 합성 ····· 17
3.9 HA-Nb의 합성 ····· 18
3.10 하이드로겔의 제조 및 특성 ····· 18
3.11 약물 로딩 및 방출 연구 ····· 19
3.12 전구체와 하이드로겔의 시험관 내 세포 적합성 ····· 20
3.13 DOX-로딩/DOX+ICG-로딩 하이드로겔의 항종양 활성 ····· 20
3.14 시험관 내 ROS 검출 ····· 21
제 Ⅳ장 결과 및 고찰 ····· 22
4.1 DSe-DTz의 합성 ····· 22
4.2 HA-Nb의 합성 ····· 24
4.3 하이드로겔의 제조 및 특성화 ····· 26
4.4 하이드로겔의 겔화 시간 및 기계적 특성 ····· 27
4.5 하이드로겔의 팽윤율 연구 ····· 29
4.6 하이드로겔의 횡단면 표면분석 ····· 30
4.7 약물 로딩 및 방출 연구 ····· 31
4.8 시험관 내 세포독성 ····· 33
제 Ⅴ 장 결 론 ····· 39
제 Ⅵ 장 참고 문헌 ····· 40

표 목차

[표 1] HAHG 하이드로겔의 제조 비율과 겔화 시간 ····· 19

그림 목차

[그림 1] 히알루론산의 구조 ····· 7
[그림 2] diels-alder 반응의 예 ····· 10
[그림 3] DSe-DTz 가교제 합성 과정 ····· 14
[그림 4] 다자극 반응성 하이드로겔의 제조 및 반응 과정 ····· 14
[그림 5] 중간 생성물 및 DSe-Dtz 가교제의 특성화. (a) BOC-4-AM의 1H NMR 스펙트럼, (b) BOC-Tz의 1H NMR 스펙트럼, (c) Tz-아민의 1H NMR 스펙트럼, (d) Tz-아민의 FTIR 스펙트럼, (e-f) 1H DSe-DTz 가교제의 NMR 및 FTIR 스펙트럼. ····· 24
[그림 6] HA-Nb 및 제형화된 하이드로겔의 특성화. (a) 중수소 산화물에서 HA-Nb의 1H NMR 스펙트럼, (b) HA-Nb의 FTIR 스펙트럼, 및 (c) 동결건조된 하이드로겔의 FTIR 스펙트럼 ····· 26
[그림 7] 하이드로겔의 유변학적 특성. (a) 제형화된 하이드로겔의 졸-겔 상태를 보여주는 사진. (b-d) 하이드로겔 HAHG-A, HAHG-B 및 HAHG-C의 시간 함수로서의 저장 모듈러스 및 손실 모듈러스. (e-g) 하이드로겔 HAHG-A, HAHG-B 및 HAHG-C의 각 주파수의 함수로서의 저장 모듈러스 및 손실 모듈러스 ····· 28
[그림 8] PBS(pH 7.4)에서 하이드로겔의 팽윤 특성 ····· 29
[그림 9] (a) HAHG-A, (b) HAHG-B, (c) HAHG-C의 SEM 사진 ····· 30
[그림 10] 하이드로겔 HAHG-B의 시험관 내 DOX 방출 거동. (a) PBS, pH 7.4 및 5에서 하이드로겔의 DOX 방출 연구, (b) 환원 환경(10mM DTT)에서 하이드로겔의 DOX 방출 연구, (c) 산화 환경(0.5% H2O2)에서 하이드로겔의 DOX 방출

연구, 및 (d) NIR 광 조사(808 nm, 4와트 전력, 15분) 후 DOX+ICG 로딩된 하이드로겔의 DOX 방출 연구 ····· 32
[그림 11] 전구체와 HAHG-B 하이드로겔의 시험관 내 세포적합성. (a-b) HEK-293 세포와 BT-20 암세포에서 각각 시험된 HA-Nb의 세포적합성; (c-d) HEK-293 세포 및 BT-20 암세포에서 각각 테스트된 DSe-DTz 가교제의 세포 적합성; (e) HEK-293 세포 및 BT-20 암세포에서 테스트된 HAHG-B 하이드로겔의 세포 적합성 ····· 34
[그림 12] (a) 근적외선 조사(808nm, 2min, 1-와트); (b) NIR 광 조사 전후에 ICG가 로딩된 하이드로겔로 처리된 BT-20 암세포의 세포 생존율; (c) NIR-광(15분)에 노출된 후 ICG 및 ICG-적재/ICG+DOX-하이드로겔의 광열 전환; (d) ICG 또는 ICG 로딩된 HAHG-B 하이드로겔에 NIR 조사 후 ROS 생성의 함수로서 DPBF의 형광 강도 감소. ····· 37

Multi-stimuli responsive hydrogels derived from hyaluronic acid for cancer therapy application

Yijun Jo

Department of Smart Green Technology Engineering,
The Graduate School, Pukyong National University

Abstract

One of the most promising strategies for the controlled release of therapeutic molecules is stimuli-responsive and biodegradable hydrogels developed from natural polymers. Hyaluronic acid is a natural polymer which can uptake a large amount of biological fluids and has been recognized as a safe and highly biocompatible material. In this study, multi-stimuli responsive hydrogels based on hyaluronic acid were prepared for the controlled release of doxorubicin (DOX). Hydrogels were rapidly formed via a reverse electron demand Diels-Alder click chemistry by using a norbornene functionalized hyaluronic acid and a tetrazine cross-linker containing diselenide bonds. To achieve desirable properties, we prepared hydrogels with different crosslinking densities. The formulated hydrogels demonstrated high swelling ratios, good mechanical strength, and higher drug loading capacities (up to 92%). The hydrogels showed minimal DOX release in physiological mimicking buffer, however rapid and sustained release of DOX was observed in 10 mmol DTT. To further confirm the oxidation-dependent cleavage and DOX release from hydrogels, DOX release experiments were also conducted in 0.5 % H2O2, and showed the burst release of DOX. In a parallel experiment, indocyanine green (ICG) dye was encapsulated into hydrogels along with the DOX. The DOX-ICG-loaded hydrogels showed a sustained release of DOX after NIR light exposure. The cytotoxicity experiments with human embryonic kidney cells showed that HA-Nb, crosslinker, and the formulated hydrogels were highly biocompatible (> 90% cell viability). The in vitro anti-tumor assessment experiment demonstrated that DOX-loaded hydrogels induced similar anti-tumor effect as

compared to that of the free-DOX. Furthermore, DOX+ICG loaded hydrogels increased the efficacy of DOX after NIR treatment owing to the combine anti-tumor and photothermal effect.

KEYWORDS: hyaluronic acid; multi-responsive; hydrogels; inverse electron demand Diels-Alder reaction; photo-thermal therapy.s

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

제 Ⅰ장 서 론

지난 수십 년 동안 환경적 요인(예: 효소, 온도, 산화 및 환원, pH, 빛 등)에 대한 반응으로 구조적 또는 기계적 변화를 통한 자극 반응성 하이드로겔은 약물 전달 시스템에서 큰 관심을 받아왔다[40]. 특히, 산화, 환원 반응성 하이드로겔은 종양 조직, 상처 또는 세균 감염에서 생성되는 글루타티온(glutathione, 환원 분자) 또는 활성산소종(Reactive Oxygen Species, 산화 분자)의 과잉 발현으로 분해가 강화되어 많은 관심을 끌고 있다[8]. 환원 반응성 화학물질로 잘 알려진 물질은 이황화물[10], 백금[47] 및 트리메틸록벤조퀴논 함유 물질[9]에서 파생된 것이다. ROS 반응성 물질은 황[13], 아릴보론산 에스테르[38], 티오케탈[23] 및 다이셀레나이드(diselenide) 결합이 포함되는 물질[6]로 구성된다..

최근에는 다이셀레나이드 기반 물질이 환원 및 산화 조건 모두에서 분해가 일어나는 것으로 보고되어 다이셀레나이드 결합을 포함하는 하이드로겔이 환원 및 산화 자극에 동시에 반응하도록 만든다[14]. 또한, 다이셀레나이드 결합은 인도시아닌 그린(Indocyanine green : ICG)과 근적외선(Near Infraed : NIR) 빛의 상호작용에 의해 생성된 ROS에 의해 절단되어 다이셀레나이드 함유 하이드로겔이 NIR 빛에 반응하도록 한다. 또한 ICG 분자는 NIR 빛을 열 에너지로 변환하여 종양을 근절하기 위한 광열 요법으로 활용할 수 있다[20]. 따라서, 다이셀레나이드 기반 하이드로겔은 다중 자극 반응성 약물 전달을 위한 대체 시스템이 될 수 있습니다. 다중 자극 반응성 하이드로겔은 일반적으로 단일 폴리머 또는 가교제에 여러 개의 개열성 결합을 삽입함으로써 설계된다[31]. 그러나 이러한 시스템은 약물 전달에 유망한 응용이 가능하지만 단일 약물 전달 시스템에 이들을 통합하기는 어

렵고 시간이 걸리며 합성 과정에서 여러 단계가 필요하다.

다중 반응성 하이드로겔은 합성 또는 천연 고분자로부터 합성할 수 있다. 히알루론산(HA)은 히알루론산이라고도 하며, N-아세틸-D-글루코사민과 D-글루크론산의 반복 단위로 이루어진 자연에 존재하는 선형 다당류이다[18]. HA는 여러 조직에서 세포외 기질의 주요 구성성분이다[12]. HA의 우수한 물리 화학적 특성 예를 들면 생물학적 유체에서의 우수한 팽윤성, 우수한 생체 적합성 및 생분해성 등으로 인해 이 천연 중합체는 다양한 생물 의학 응용 분야에 매력적이다[15]. 예를 들어, HA는 HA 기반 약물 전달 및 재생 의학을 포함한 다양한 프레임워크에서 세포-기질 상호작용을 조사하는 데 사용되었다[33,34,37]. 그러나 HA는 기계적 강도가 약하고 분해가 빠르기 때문에 다양한 생물 의학적 응용을 위한 생체 재료로서의 응용이 저해된다[30]. HA의 기계적 특성은 화학적 또는 물리적 가교 전략에 의해 향상되었다[21]. 그러나 물리적/이온적 가교 전략은 일반적으로 기계적 특성이 약한 HA-하이드로겔을 생성한다.

물리적으로 가교된 HA-하이드로겔과 관련된 많은 제한으로 인해 대체 공유 가교 접근법이 개발되었다[11,41]. 이러한 공유결합 가교는 HA의 기계적 특성을 대폭 개선할 수 있으며, 안정적이고 균일한 하이드로겔을 생성하는 것으로 보고되었지만 다이비닐 설폰(divinyl sulfones), 티올(thiols), 알데하이드(aldehydes) 및 EDC/NHS와 같은 유해한 가교제를 사용하여 합성된다[7,19,35,39]. 클릭 화학(Click Chemistry)은 최근 공유 가교 하이드로겔을 개발을 위한 대체 전략으로 시작되었다. 이러한 클릭 반응은 초고속 반응 역학, 여러 기능적 부분의 존재 하에서 더 나은 선택성을 가지며 복잡한 생물학적 매질 및 생리학적 pH 및 온도에서 발생할 수 있는 능력을 가지고 있다[16,43]. 그러나 기존의 클릭 반응, 예를 들면 구리 촉매 azide-alkyne cyclo-addition 또는 strain-promoted azide-alkyne

cyclo-addition 클릭 반응은 완전히 생물학적 가교가 아니라 세포 독성 구리 촉매가 필요하거나 세포 독성을 유발할 수 있다[27]. 최근의 생체 가교 클릭 반응은 테트라진(Tetrazine : Tz)과 노르보넨(Norbornene : Nb) 사이의 역전자 수요 Diels-Alder(IEDDA) 클릭 반응 같은 생물학적 가교 클릭 반응을 개발했다[28], 이는 생물학적으로 배향된 하이드로겔 제조를 위한 유망한 접근방식을 보여준다[28]. 또한, IEDDA 클릭 반응은 촉매 없이 일어날 수 있으며 소량의 질소 가스만 생성하고 다른 독성이 있는 부산물을 생성하지 않으므로 약물 전달 응용 분야에 매우 매력적이다.

본 연구에서는 다이셀레나이드 기반의 가교제를 활용하여 환원, 산화 및 근적외선 다중 자극 반응성 HA 하이드로겔을 개발했다. 가교제에는 양쪽 말단에 테트라진 작용기가 존재하며, 노르보넨 기능화된 히알루론산(HA-Nb)과의 생체 직교 IEDDA 클릭 반응을 접목시켰다. 하이드로겔은 생리학적 조건에서 빠르게 형성되었고, 부산물로 무독성 질소만 존재했다. 질소 가스의 방출은 이후 하이드로겔 네트워크 내부에 다공성 구조를 생성했다. 높은 약물 로딩 용량(~91%)을 갖는 모델 의약품으로 제제 중 독소루비신(Doxorubicin : DOX)을 하이드로겔에 캡슐화했다. 병행 실험에서는 인도시아닌 그린(ICG)도 DOX와 함께 HA-하이드로겔에 탑재했다. ICG는 FDA가 승인해 생체 내 이미징과 광열 용도로 잘 알려진 유기염료다[42]. 광열 요법 외에도 ICG는 NIR 빛에 노출되면 반응성 산소종(ROS)을 생성할 수도 있다. NIR 빛과 ICG에 의해 생성된 ROS는 하이드로겔의 가교 부분의 다이셀레나이드 결합을 절단하여 탑재된 DOX의 급속한 방출을 가져왔다. 약물 방출 실험은 시뮬레이션된 생리학적 조건(PBS, pH 7.4)에서 명목상의 DOX 방출(< 25%)을 입증했다. 대조적으로, 하이드로겔이 환원(10mmol의 1,4-디티오트레이톨(DTT)), 산화(0.5% H2O2) 또는 NIR 빛에 노출되었을 때 빠르고 지속적인 DOX 방출이 관찰되었다. 합성된 HA-Nb,

가교제 및 하이드로겔은 검사된 세포주에서 유의한 세포독성을 나타내지 않았다. 대조적으로, DOX가 로딩된 하이드로겔은 유방암 세포(BT-29)에서 항종양 효과를 유발했다. 유사하게, DOX와 ICG가 로딩된 하이드로겔은 근적외선 조사 후 BT-29 암세포의 성장을 억제하고 DOX 단독 및 DOX가 로딩된 하이드로겔과 비교하여 더 높은 항종양 효과를 유발했다. 따라서, 다이셀레나이드 결합 및 IEDDA 클릭 반응을 기반으로 하는 생체 직교 및 다중 반응성 HA 하이드로겔은 질병 특이적 약물전달 응용 분야에 잠재적으로 강력한 후보가 될 수 있다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

제 Ⅱ장 이 론

2.1 하이드로겔 개요

하이드로젤(hydrogel)은 친수성 고분자가 수소결합, 이온결합 등의 물리적인 결합 또는 화학적인 공유결합을 통하여 녹거나 형태가 무너지지 않으면서 3차원적으로 가교된 구조를 지님으로써 많은 수분을 함유할 수 있는 물질을 뜻한다. 아민기(-NH_2), 하이드록실기(-OH), 그리고 아마이드기(-CONH-$CONH_2$) 등의 친수성 작용기를 통해 하이드로겔이 많은 양의 물을 흡수할 수 있고 그로 인해 팽창하는 팽윤이 가능하다. 친수성 주쇄의 하이드로겔은 소수성 주쇄의 하이드로겔보다 높은 팽윤 용량을 가지며. 팽윤 과정 중 가교 결합된 하이드로겔은 물 과의 접촉에 의한 가교 구조의 해리나 완전한 파괴가 일어나지 않는다. 하이드로겔은 서로 다른 여러 가지의 화학적 구성을 갖는 천연 고분자 또는 합성 고분자로부터 형성될 수 있다. 또한, 각각의 기계적 성질 및 화학적 성질은 모두 다르다. 하이드로겔 제조를 위한 천연 고분자로는 히알루론산, 키토산, 알지네이트, 셀룰로스, 젤라틴, 풀루란 등이 있다. 반면 합성 고분자로는 폴리아크릴아마이드, 폴리비닐알콜, 폴리에틸렌글리콜 등의 고분자가 사용된다고 보고되었다. 하이드로겔은 두 가지로 분류할 수 있다. 공유결합으로 가교 네트워크 사이에서의 결합을 통해 형성되는 Chemical or permanent gel과 분자구조 사이의 얽힘이나 이온결합이나 수소결합에 의해 혹은 소수성 작용기의 상호 작용1(Ahmed)에 의한 Physical or reversible gel으로 구분할 수 있다. 물리적 가교 결합에 의해 형성된 겔은 서로 다른 고분자 주쇄 사이에서 물리적 상호작용에 의해 물에서 분해되는 것이 방지된다[1]. 이러한 하이드

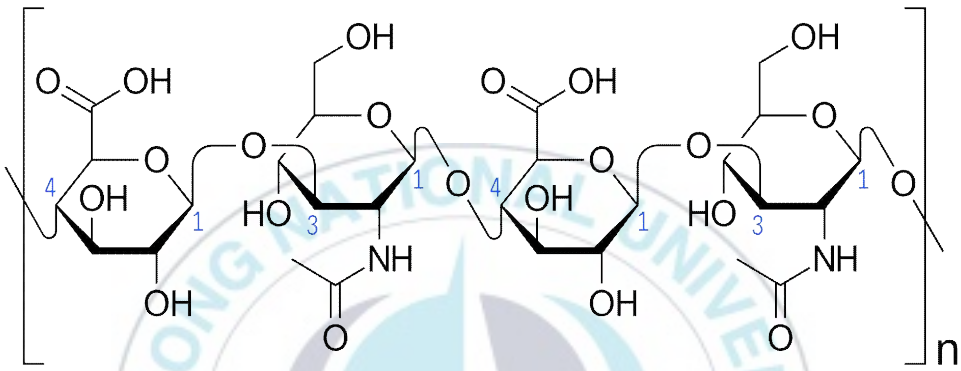
로겔은 slabs, microparticles, nanoparticles, coatings, films로 형성되는 것을 포함한다.

하이드로겔은 주로 인체에 무해한 천연성분으로 합성될 수 있다. 뿐만 아니라 화학적으로 합성된 하이드로겔 역시 무독성이고, 신체 거부반응이 거의 없어서 의료분야에 활발히 활용 가능하다. 몇몇의 경우에는 이 특성이 상처 치료용 드레싱에서 나타나게 되는데, 육아조직과 흉터 형성에서의 치유 효과를 가지기 때문이다[2]. 다루기 까다롭고 약물의 탑재와 살균 작용이 힘들고, 대부분 기계적 성질이 약하다는 것이 그 특징이다. 이런 단점에도 불구하고 하이드로겔은 상처 치료용 드레싱, 약물 전달체, 임플란트, 주사 가능한 고분자 시스템 등의 형태로 아주 다양한 분야에서 조직공학과 약학, 생리의학 등으로의 많은 응용이 있다.

2.2 히알루론산 개요

히알루론산((hyaluronic acid)은 하이드로겔을 제조하기 위한 용도로 사용되는 천연 고분자의 종류 중 하나이다. 주로 동물 등의 관절액, 연골, 피부 등에 많이 존재하는 생체 합성 천연 물질이며, 수산화기(-OH)가 많기 때문에 친수성 물질이다. 따라서 동물 등의 피부에서 보습 작용의 역할을 한다. 또한. 물과 결합하여 겔 상태가 되어 관절의 윤활작용이나 피부의 유연성 등에 관여하며 점성이 크므로 세균의 침입이나 독물의 피부 침투를 막는 데에도 중요한 역할을 한다. 인간의 피부에도 존재하며, 특히 지렁이의 피부에 많은 것으로 알려져 있다. 히알루론산은 높은 생체 적합성과 조직의 세포외 기질(extracellular matrix)에서의 일반적인 존재로 조직 공학 연구에서 생체 재료로 많은 관심을 받고 있다. 히알루론산은 세포외기질에 있는 glycos- aminoglycan의 구성성분 중 하나이다. 히알루론산은 세포와

혈청이 있는 상태에서 hyaluronidase에 의해 분해가 된다. 히알루론산은 주로 인공 피부, 안면 피하이식, 연조직 대체물로 자주 사용되어왔다. 그러나 체내에서의 면역 반응과 기계적 강도가 약하다는 단점을 가지고 있어 제한적으로 사용되고 있다. 약한 기계적 강도를 보완하기 위해 히알루론산은 공유결합을 통하여 다양한 물성을 가진 하이드로젤을 형성할 수 있다.



[그림 1] 히알루론산의 구조

2.3 히알루론산의 원료

1934년 칼 메이어(Karl Meyer)와 존 팔머(John Palmer)는 소의 눈 유리체에서 이전에 알려지지 않은 화학 물질을 발견하였는데, 그 물질은 두 개의 당분자가 포함되어 있었고, 유리체막(hyaloid)과 우론산(uronic acid)이라고 보고한 것에 히알루론산은 기원을 둔다. 편의상 히알루론산이라는 이름을 제안하여 사용하였다. 히알루론산은 1,000~10,000,000 달톤(Da)의 넓은 분자량 범위를 갖는 생분해성, 생체적합성 특성의 천연 선형 다당류이다. 히알루론산은 비황산염(non-sulfated)이며, β 1,4 D glucuronic acid - β 1,3 N acetyl D glucosamine의 반복되는 고분자 이당류로

구성된다. 수용액에서 히알루론산은 안정한 3차 구조를 형성한다.

2.4 히알루론산의 약물 전달 응용

최근에 양이온성 고분자가 유전자 전달 매개체로 광범위하게 연구되고 있다. 양이온 폴리머는 DNA의 안정성을 향상시키고 전하의 작용에 의해 세포막을 관통하여 엔도솜의 분해를 피할 수 있다. 그러나 이러한 유전자 벡터는 표적화(targeting)가 불량하고 세포독성이 높으며 형질 감염율이 낮은 단점이 있다. 따라서, 세포독성을 감소시키고 형질 감염율을 증가시키기 위한 표적 담체 물질에 관한 연구가 많은 주목을 받고 있다. 히알루론산이 암세포 표면의 수용체에 특이적으로 결합하는 점, 생분해성, 생체적합성 측면에서 히알루론산을 항암제의 표적 약물전달에 적용하는 것은 좋은 전력일 수 있다. 약물의 운반체로 사용될 수 있고 다른 약물과 반응하여 접합체를 형성할 수 있다. 접합체는 제어 방출 및 표적 효과를 가지며, 이는 타이밍 및 방향성 방출의 목적을 달성하기 위해 다양한 병리학적 부위에 여러 약물의 전달을 표적화할 수 있다

2.5 클릭 화학(click chemistry)

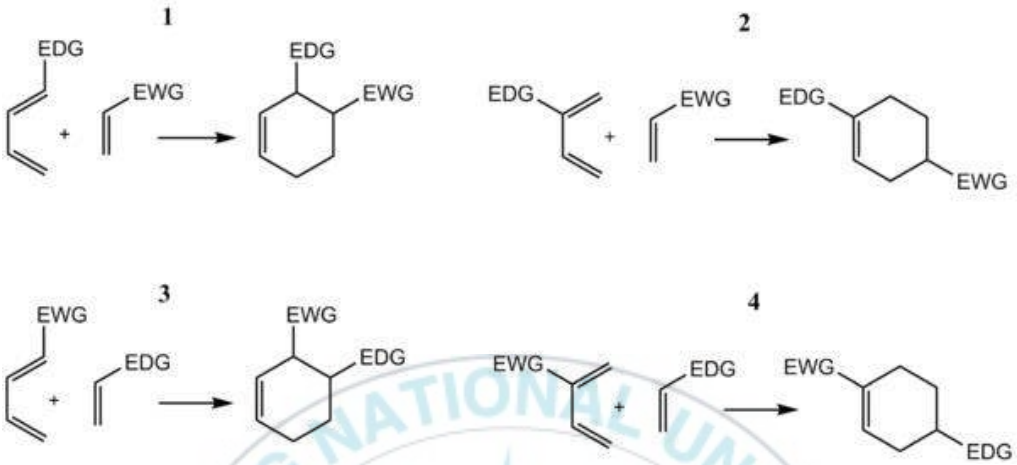
클릭(click)이라는 개념은 2001년 Sharpless 등에 의해서 소개가 되었다. 이 화학적 개념과 원리는 합성을 통한 생체 재료의 응용 분야에 큰 영향을 주었다. 클릭이라는 화학적 원리는 자연에서 영감을 받은 개념이라 할 수 있으며, 자연에서 분자를 쉽게 연결하여 또 다른 분자를 만드는 것을 모방한다. 클릭 화학은 단계적 성장 폴리머를 정량적으로 합성하기 위한 실용

적이고 잘 알려진 유기 반응을 나타낸다. 다양한 작용기에 내성이 있고 온화한 합성 조건에서 발생하는 고효율 합성 반응이다. 클릭 반응의 주요 이점은 반응물의 특이성과 다른 작용기의 내성이다. 또한, 클릭 반응은 수성 용매 시스템을 포함한 거의 모든 용매에서 비교적 낮은 온도에서 높은 전환율로 발생한다. 클릭 화학은 다양한 반응에 쓰일 수 있어야 하며, 수득률은 높아야 한다. 또한, 반응으로 인한 부산물이 없거나 쉽게 제거될 수 있어야 하며 반응 조건은 단순해야 하며 용매가 없거나 무독성이거나 쉽게 제거될 수 있어야 한다.

2.6 diels-alder 반응

다른 많은 반응과는 달리 탄소-탄소 결합 형성으로 인한 고리화가 가능하며 반응성이 상당히 우수하고, 가열하는 것 이외에는 다른 과정이 거의 필요 없을 정도로 편리해서 접근성이 좋다. diels-alder 반응은 diene과 dienophile간의 상호 작용으로 이루어진다. Diene은 반응물 중 이중결합 2개가 결합 되어 있는 것에 해당하며 dienophile은 이중결합이 있는 diene이 아닌 반응물이다. diene과 dienophile의 pi 전자들이 상호 작용하여 기존의 pi bond가 끊기며 새로운 sigma bond가 생긴다. diene의 HOMO(Highest Occupied Molecular Orbital)가 보통은 dienophile의 LUMO(Lowest Unoccupied molecular Orbital)보다 에너지가 낮은데, 오비탈의 겹침은 상호작용하는 오비탈들의 에너지 간격이 작으면 더 잘 일어나기 때문에 diene에는 EDG(Electron donating group), dienophile에는 EWG(Electron withdrawing group)이 붙어 있으면 반응이 잘 일어난다. EDG가 붙어 있으면 전자 간 반발 효과로 전체적인 오비탈 에너지가 상승하고, EWG가 붙어 있으면 그 반대 효과로 오비탈 에너지가 내려가는 효과로 인하여 반

응이 일어나는 것이다.



[그림 2] diels-alder 반응의 예

2.7 근적외선에 의한 가교제의 다이셀레나이드 결합 분해

하이드로겔의 약물 방출 거동을 외부 자극에 의해 제어하기 위한 방법으로는 pH, 빛, 초음파 등이 있다. 근적외선(NIR) 빛은 유해한 부작용 없이 약 3~5 mm 깊이의 체내 조직으로 침투할 수 있다. NIR 빛 반응 하이드로겔을 생산하는 일반적인 방법은 산화 그래핀 나노시트와 탄소나노튜브, 금 나노입자와 같은 NIR 흡수 물질을 사용하는 방법이다. 그러나 이러한 종류의 방법은 열 감응성 중합체에 대해서만 실현 가능하며 NIR 조명이 꺼진 후에는 아무런 효과가 없었다.

인도시아닌 그린(Indocyanine green, ICG)은 NIR 빛을 흡수하고 활성산소종(Reactive oxygen specious, ROS)을 생성할 수 있는 안전한 광 감응성 물질이다.[3,4] 이 단계 이후 ROS는 약한 공유결합에 산화 손상을 일으

키며, 특히 낮은 결합에너지(172 KJ/mol)를 갖는 다이셀레나이드 결합을 분해한다.[5]

따라서 다이셀레나이드 결합과 IEDDA 클릭 반응의 조합은 아주 간단하면서도 생체적합성을 가지며, 별다른 부산물이나 독성을 갖지 않는 키토산의 하이드로겔의 특징을 그대로 살리면서도 약물 방출의 제어에 사용될 수 있는 유망한 전략이 될 수 있다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

제 Ⅲ장 실 험

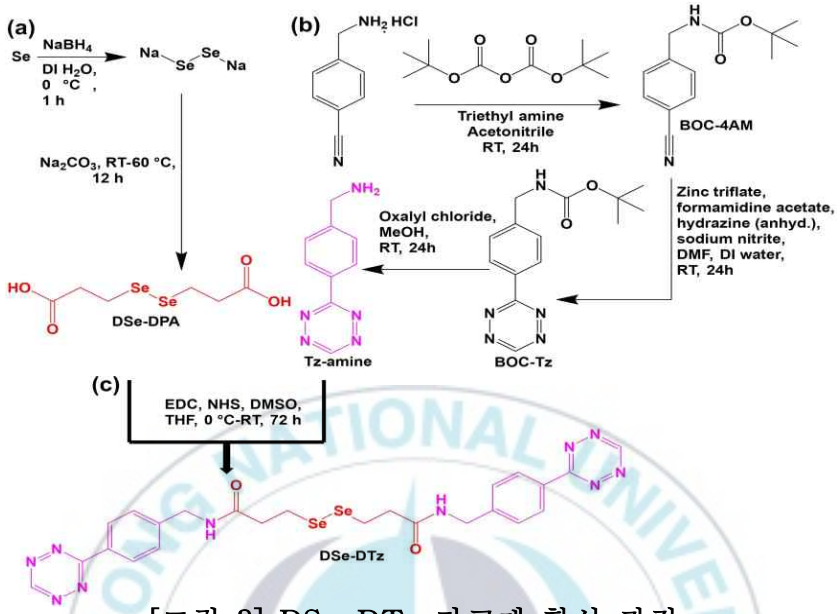
3.1 시약

다이셀레나이드-테트라진(DSe-DTz) 최종 가교제를 합성하기 위한 선행 합성 실험인 3,3′-diselandiyldipropionic acid(DSeDPA) 합성을 위해 Selenium powder(99.99%)와 formamidine acetate salt(99%)는 TCI에서 구매하였다. sodium borohydride(NaBH4, 99%) 3-bromopropionic acid(97%)의 경우 Sigma Aldrich에 구매했다. 또한, 또 다른 선행 합성 실험으로 테트라진-아민((4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenyl) methanamine) 합성을 위해 Hydrazine anhydride(98%), Ttriethyl amine(99.5%), Di-tert-buthyl dicarbonate (99%) 를 Sigma Aldrich에서 구매하여 사용하였다. 또한, 4-(aminomethyl) benzonitrile hydrochloride(97%)를 Scientific Matrix에 구매했으며, Oxalyl chloride (98%), 5-norbornene-2-methylamine(98%), Zinc(II) Trifluoromethanesulfonate(98%), 1-ethyl-3-(3-Dimethylamino propyl)-carbodiimide hydrochloride(EDC, 99%)를 TCI에서 구매했다. N-hydroxy succinimide(NHS, 98%)를 Sigma-Aldrich에서 구매하여 사용하였다. 천연 유래 고분자 hyaluronic acid polymer(Mw=800kDa)는 Bio-land에서 구매하였다. Doxorubicin hydrochloride (DOX)의 경우 Boryung Pharmaceutical. Co., Ltd. (Korea)의 제품을 사용하였다. 다른 모든 화합물 및 용매는 Analytical grade(HPLC)등급이었고 달리 명시되지 않는 한 추가 정제 없이 사용되었다.

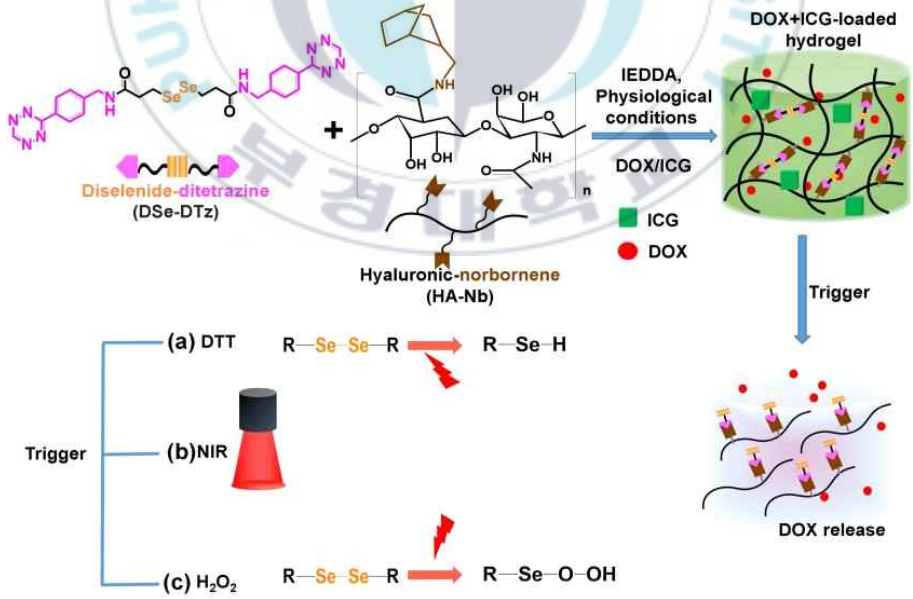
3.2 분석

작용기 및 분자구조 해석을 위해 양성자 푸리에 변환 핵자기공명 스펙트럼(NMR)은 JEOL NMR spectrometer (JNM ECZ-400). 적외선 분광분석 스펙트럼 (FTIR)은 Agilent Cary 640-FTIR 에서 측정되었다. 하이드로겔 내부의 횡단면 구조 분석을 위한 저진공 주사전자 현미경(SEM) 사진은 JOEL, Gatan, JSM-6490LV을 통해 얻었다. 합성 실험 단계마다 실험의 진행 여부 확인을 위한 박막 크로마토그래피(TLC)는 Merck TLC silica gel 60-F254-aluminum-back TLC plates를 사용하였다. UV-vis 스펙트럼은 UV-vis 분광광도계(Optizen POP)를 사용하여 수행되었다. 하이드로겔의 점탄성 특성 측정은 평평한 강판 형상이 부착된 Discovery HR-2 hybrid rheometer (TA instruments)를 사용하였다. 하이드로겔의 팽윤도는 SCALTEC SPB31의 전자저울을 이용하여 측정하였다. 근적외선 조사를 위해 808nm 파장의 NIR-laser photo diode 광원을 사용하였고, 출력값의 경우 2W/cm^2 으로 설정하였다.

3.3 합성 및 실험 요약



[그림 3] DSe-DTz 가교제 합성 과정



[그림 4] 다자극 반응성 하이드로겔의 제조 및 반응 과정

3.4 DSeDPA의 합성

DSeDPA의 경우 이전의 프로토콜에 따라 합성되었습니다[32]. 셀레늄 파우더(2.36g, 30mmol)를 2구 플라스크에서 10mL의 탈이온수에 분산시켰다. 그 후, NaBH4(2.27g, 60mmol)를 25mL의 차가운 탈이온수에 용해시키고 질소 하에 셀레늄 현탁액에 첨가하였다. 현탁액을 0℃에서 30분 동안 또는 무색 혼합물이 얻어질 때까지 교반시켰다. 다음으로, 다른 양의 셀레늄 파우더(2.36g, 30mmol)를 셀레늄 혼합물에 첨가하였다. 이후 반응 플라스크의 온도를 105℃로 30분 동안 또는 갈색 용액이 얻어질 때까지 증가시켰다. 이후 Na2CO3 용액을 이용하여 용액의 pH를 8로 조절한 후 3-bromopropionic acid(9.18g, 60mmol, DI water 30mL에 용해)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 질소 하에 실온에서 12시간 동안 교반하였다. 그 후, 생성물을 1분 동안 공기에 노출시켰다. 현탁액을 여과하고 황색 침전물을 1N HCl을 사용하여 pH 3으로 산성화한 다음 아세트산에틸(ehthyl acetate) 100mL를 2회 사용하여 추출하였다. 이어서, 분리된 유기층을 100mL의 DI water 2회 및 100mL의 염수로 1회 세척하고, MgSO4(무수) 상에서 건조시키고 여과하였다. 다음으로, 유기층(아세트산에틸 함유 생성물)을 냉장고에 넣어 황색 결정을 얻었다. 마지막으로 결정을 여과하고 감압 건조하여 DSeDPA를 얻었다(수율 65%). 1H NMR(400MHz, DMSO-d6) δ=12.35(s, 1H), 3.05(t, 2H), 2.71(t, 2H).

3.5 4-(BOC-amino) benzonitrile의 합성

아세토나이트릴 50mL 중의 4-(아미노메틸) 벤조니트릴 염산염(1g, 5.93mmol)을 유리 플라스크에서 교반하였다. 트라이에틸 아민(0.9g,

8.9mmol)을 플라스크에 넣고 내용물을 질소 환경하에 15분 동안 교반하였다. 그다음, 디-tert-부틸 디카보네이트(1.29g, 5.93mmol, 5mL의 아세토나이트릴에 용해됨)를 통합하고 반응물을 실온에서 24시간 동안 교반했다. 반응 시간 후, 회전증발기로 아세토나이트릴을 제거하고, 얻어진 고체를 DI water 100mL에 녹이고, 1M HCl을 사용하여 pH 3-4로 산성화하였다. 그 후, 생성물을 100mL의 아세트산에틸로 추출하고, 100mL의 di water로 3회 세척하고, 무수 MgSO4로 건조하고, 여과하고, 용매를 감압하에 제거하여 4-(BOC-amino) benzonitrile을 얻었다(90% 수율). 1H NMR(400MHz, DMSO-D6) δ=7.8(d, 2H), 7.54(t, 1H), 7.4(d, 2H), 4.2(d, 2H), 1.38 (s, 9H).

3.6 Tetrazine-BOC의 합성

4mL의 DMF에 4-(BOC-amino) benzonitrile(1.33g, 5.74mmol)을 용해한 뒤 zinc(II) trifluoromethanesulfonate(5mol, 0.105g, 0.287mmol)과 formamidine acetate salt(5.98g, 57.44mmol)를 첨가했다. 다음으로 anhydrous hydrazine(4.6g, 143.6mmol)을 천천히 첨가했다. 격렬한 가스 방출 후 얻은 혼합물을 30℃에서 24시간 교반하였다. 이후 아질산나트륨 수용액(7.97g, 115.5mmol)을 플라스크에 넣었다. 반응 플라스크를 0℃로 냉각한 후 1M HCl 용액을 첨가했다. HCl 용액은 가스 발생이 멈추고 pH가 3으로 떨어질 때까지 지속해서 첨가됐다. 다음으로 아세트산에틸 100mL로 3회 추출하여 di수 100mL로 3회 세척한 후 MgSO4(무수)로 건조한 후 회전증발기를 이용해 용매를 건조한 후 진공 오븐에서 건조하고 분홍색 고체(tetrazine-BOC), 1H NMR(400MHz, DMSO-D6) δ=10.58(s, 1H, 2.57D), 8.57H, 8.57H, 8.57H, 8.57H, 8.57H,

3.7 Tetrazine amine을 얻기 위한 BOC-기의 탈 보호 반응

BOC-기의 탈 보호 반응은 우선 tetrazine-BOC(1.11g, 3.9mmol)를 메탄올(20mL)에 용해한 뒤 oxalyl chloride(2.476g, 19.5mmol)를 조심스럽게 떨어뜨리고 실온으로 24시간 반응한 뒤 소량의 DI수 첨가하고 아세토나이트릴에서 3회 재결정화를 통해 얻은 침전물(분홍색 고체)을 걸러낸 뒤 진공 오븐에서 건조해 tetrazine amine을 얻었다(수율 60%). 1H NMR(400 MHz, DMSO-D6)δ=10.63(s, 1H), 8.55(t, 2H), 8.53(d, 2H), 7.78(d, 2H), 4.18(s, 2H).

3.8 Diselenide-ditetrazine(DSe-DTz) 가교제 합성

DSeDPA(147.2mg, 0.121mmol)를 질소 분위기 및 냉각 하에 THF(10mL)와 함께 플라스크에 용해시켰다. 이후 EDC(204mg, 0.267mmol, 소량의 DMSO에 용해) 및 NHS(122.96mg, 0.267mmol, THF 1mL에 용해)를 첨가하고 0℃에서 1시간 동안 교반하였다. 다음으로, tetrzine amine 용액(200mg, 0.267mmol, DMSO에 용해)을 반응 혼합물에 첨가하였다. 반응물을 먼저 0℃에서 1시간 동안 교반한 다음, 실온에서 3일 동안 교반하였다. 이후 회전증발기를 이용하여 THF를 제거하고 생성된 고체를 디클로로메테인에 녹이고 분액깔때기에서 탈이온수로 3회 세척하였다. 유기층을 MgSO4(무수) 상에서 건조하고 여과하였다. 마지막으로, 유기 용매를 감압하에 건조하여 DSe-DTz 가교제를 수득하였다(49% 수율). 1H NMR(400MHz, DMSO-D6) δ=10.58(s, 1H), 8.61(t, 1H), 8.45(d, 2H), 7.56(d, 2H), 4.42(d, 2H), 3.06(t, 2H), 2.71(t, 2H).

3.9 HA-Nb의 합성

히알루론산나트륨(800KDa, 500mg, 0.00062mmol)을 DI수 50mL에 용해했다. 다음으로 히알루론산 용액에 EDC HCl(118.85mg, 0.62mmol)과 NHS(71.35mg, 0.62mmol)를 더했다. 1시간 교반한 후 DMSO 5mL에 용해된 5-norbornene-2-methylamine(76.38mg, 0.62mmol)을 첨가했다. 상온에서 24시간 교반한 뒤 과량의 아세톤으로 침전시키고, 여과된 고체를 진공오븐에 건조시킨 뒤 탈이온(DI) 물(50mL)로 재수화하고, 14kDaMWCO 투석 봉투를 사용해 DI수 1L에 대해 투석했다. 마지막으로, 이 현탁액을 동결 건조해, 실제 치환도가 20%인 건조 HA-Nb를 얻었다(1HNMR 측정).

3.10 하이드로겔의 제조 및 특성화

DSe-DTz 가교제와 HA-Nb를 상온에서 혼합하고 다양한 겔화 시간을 갖는 클릭 가교 하이드로겔을 형성했다. 하이드로겔의 물리 화학적 성질을 평가하기 위해 표 1에 나타낸 바와 같이 3종류의 가교 조성으로 하이드로겔을 조제하였다. 간단히 설명하면, PBS에서의 HA-Nb의 2%(w/v)인 200μL과 DMSO에서의 가교제의 각종 몰비(10/2.5, 10/5, 10/10 Nb/Tz)를, vortex를 이용해 혼합했다(DMSO:PBS=1:10 v/v). 하이드로겔의 겔화 시간은 역 바이알 방법과 디지털 시간 측정기를 이용하여 기록되었으며, 또한 레오미터에 의해 추가로 확인되었다.

[표 1] HAHG 하이드로겔의 제조 비율과 겔화 시간

Gel	Mol.Feed ratio(Nb : Tz)	Gelation time(s)
HAHG-A	10 : 2.5	509
HAHG-B	10 : 5	372
HAHG-C	10 : 10	155

* Gelation times recorded by invert-vial test.

3.11 약물 로딩 및 방출 연구

Eppendorf 튜브에 1mg/mL의 DOX 또는 1mg/mL의 DOX + 1mg/mL의 ICG와 HA-Nb 용액(2%)을 혼합하여 약물이 로딩된 HA 하이드로겔을 제조했다. 다음으로, 계산된 양의 가교제(DMSO에 용해됨)를 각 바이알에 첨가하고 혼합물을 10초 동안 vortex를 사용하여 부드럽게 교반하였다. 그 후, 하이드로겔을 동결건조시켰다. 표면 결합 또는 느슨하게 부착된 DOX/ICG는 동결건조된 하이드로겔을 PBS에 담가 제거했다. 상충액의 광학 밀도는 UV-가시광 분광광도법(485nm 파장)을 사용하여 측정하여 약물 로딩 용량과 DOX 함량을 계산했다. DOX가 함유된 하이드로겔의 시험관 내 약물 방출 평가는 시뮬레이션 된 생리학적 환경(PBS, pH 7.4), 산성 환경을 모방한 시뮬레이션 된 산성 환경(PBS, pH5), 환원성(DTT 10mmol) 환경, 그리고 0.5% H2O2에서.에서 수행되었다. 또한, DOX+ICG가 로딩된 하이드로겔을 4W 전력에서 15분 동안 NIR 광에 노출시킨 후 약물 방출 실험을 수행했습니다. 모든 약물 방출 연구를 위해 동결건조된 하이드로겔을 투석 백(3.5K MWCO)에 있는 5mL의 각 배지에 담근 다음 37°C 및 100rpm에서 30mL의 각각의 방출 매체에 대해 투석했습니다. 샘플(2mL)을

미리 정해진 시간에 채취하고 각각의 새로운 배지 2mL로 대체했습니다. UV-Vis를 이용하여 PBS 또는 10mM의 DTT에서 DOX의 표준 곡선을 통한 분광 광도계(최대 λ = 485nm)로 DOX의 누적 방출량을 측정하였다.

3.12 전구체와 하이드로겔의 시험관 내 세포 적합성

인간 배아 신장 세포(HEK-293) 및 BT-20 암 세포주에서 WST 분석(EZ-cytox, 한국)을 사용하여 HA-Nb, DSe-DTz 가교제 및 HA 하이드로겔의 세포 적합성을 조사했다. 이를 위해 FBS(10%) 및 1% 항생제-항진균 용액이 포함된 DMEM에서 104개 세포/웰의 세포 파종 밀도로 48웰 플레이트에서 37°C, 5% CO2에서 24시간 동안 세포를 배양했다. 다음으로, 세포 배양 배지를 흡인하고 다양한 농도의 HA-Nb(100, 500, 1000, 1500 및 2000㎍/mL) 또는 가교제(25, 50, 75, 100μg/mL)를 포함하는 새로운 배지로 교체하였다. 24시간 동안 처리한 후, 세포를 100 μL의 PBS로 2회 세척하였다. 그 후, 10μL의 WST 분석 용액을 각 웰에 도입했습니다. 광학 밀도는 마이크로플레이트 판독기(450nm 파장)를 사용하여 측정되었다. 유사하게, 빈 하이드로겔의 세포 적합성은 하이드로겔 추출물을 사용하여 평가되었다.

3.13 DOX-로딩/DOX+ICG-로딩 하이드로겔의 항종양 활성

DOX가 로딩된 하이드로겔의 항종양 활성은 WST 분석을 사용하여 유방암 세포주(BT-20)에서 평가되었다. 산화 환원 반응에 따른 DOX 방출과 그에 따른 항종양 활성을 평가하기 위해 BT-20 세포를 48웰 플레이트에 접종했다. 다음으로, 세포 배양기를 흡입하고 BT-20 세포를 10mmol GSH

를 함유하는 새로운 배지와 함께 배양하였다. 1시간 후, GSH 함유 배지를 제거하고 세포를 DOX-로딩된 하이드로겔 및 유리 DOX로 24시간 동안 처리하였다. 병렬 실험에서, BT-20 세포는 NIR 조사(808 nm, 2분, 1W 전력)와 함께 DOX+ICG 로딩된 하이드로겔과 함께 배양되었다. DOX-로딩/DOX+ICG-로딩된 하이드로겔 및 유리 DOX의 항종양 활성은 위에서 설명한 WST 분석을 사용하여 계산되었다.

3.14 시험관 내 ROS 검출

ROS의 시험관 내 생성은 1,3-디페닐이소벤조프란(DPBF) 분석을 사용하여 평가했다. 이를 위해 10μL의 DPBF 용액(3.7mmol, DMSO)을 석영 셀 내 3mL의 DI water와 함께 20μg의 ICG 또는 HAHG-B 하이드로겔을 포함하는 100μL 용액에 추가했다. 이후 시료에 NIR(4W 전력)을 15분간 조사했다. 이후 410nm에서 여기 후 420~700nm 범위에서 시료의 형광강도를 측정하였다.

제 Ⅳ장 결과 및 고찰

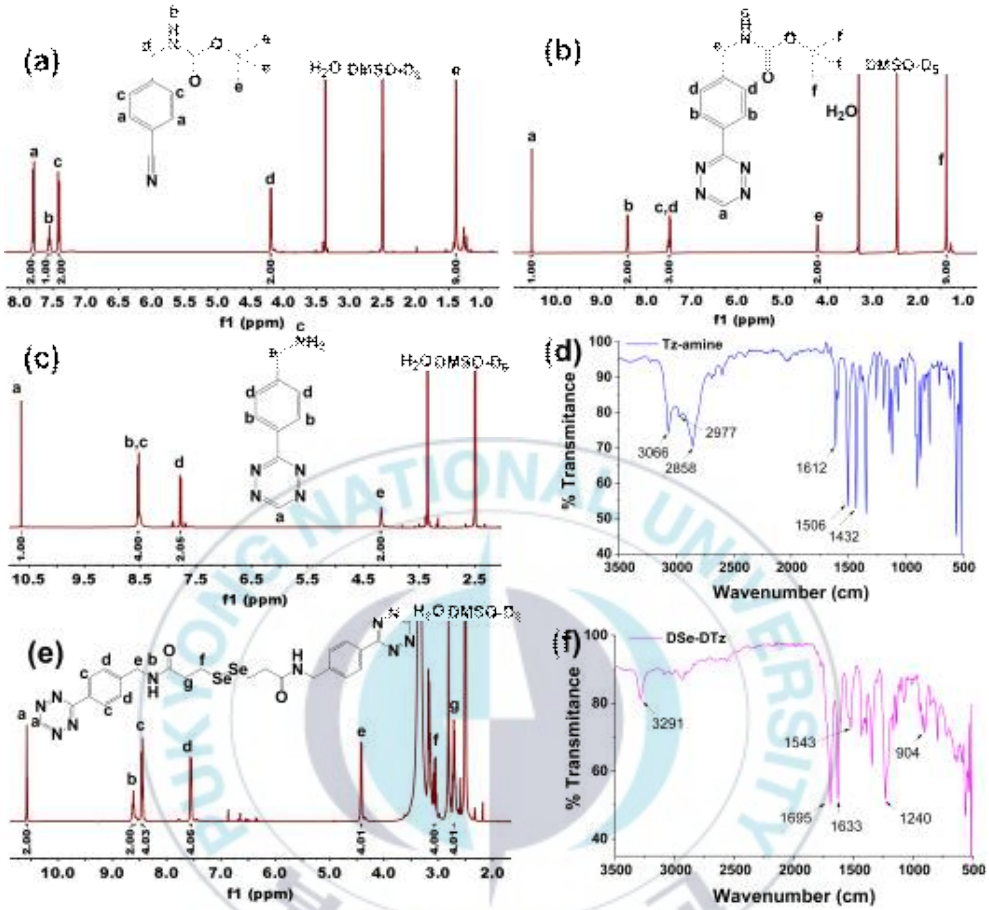
4.1 DSe-DTz의 합성

IEDDA 클릭 반응용 DSe-DTz 가교제는 DSeDPA의 카복실산 기와 테트라진 아민의 아민기 간의 카보디이미드 커플링 반응에 의해 합성되었다. 이를 위해 테트라진 아민은 먼저 aromatic nitrile 4-aminomethyl-benzonitrile hydrochloride(4-AM)로부터 합성되었다. 이전 연구에서 4-AM의 아민 작용기가 하이드라진과 반응할 수 있다고 보고되었기 때문에[45], 따라서 반응 전 BOC 그룹을 통해 아민 작용기는 보호되었다. BOC-4-AM의 합성은 proton NMR에 의해 확인되었으며, BOC의 -CH3 그룹의 proton 피크에 해당하는 1.388ppm에서 특징적인 화학적 이동을 나타낸다. 아마이드기의 -NH-와 관련된 화학적 이동은 7.54ppm에서 나타난 반면, BOC-4-AM의 방향족 고리에 해당하는 화학적 이동은 7.424-7.8 ppm에서 나타났다. 후속 단계에서, BOC-4-AM의 나이트릴 작용기는 포름아미딘 아세테이트의 존재 하에 금속 촉매 zinc(II) trifluoromethanesulfonate 및 무수 하이드라진을 통해 테트라진-고리로 전환되었다. tetrazine-BOC의 형성은 proton NMR로 확인하였다.

흥미롭게도 BOC 그룹의 -CH3의 1H NMR 화학적 이동은 이동하지 않고 같은 위치(1.388 ppm)에서 나타났지만, 테트라진 고리의 -CH에 해당할 수 있는 10.58ppm에서 새로운 화학적 이동이 나타나 테트라진 고리의 합성이 성공했음을 확인했다. 후속 단계에서, 옥살릴 클로라이드와의 반응은 BOC 기를 절단하고 아민기를 탈 보호하여 1H NMR 분석에 의해 확인된 바와 같이 테트라진-아민(60% 수율)을 얻었다. 구체적으로 테트라진아민의 1H

NMR 스펙트럼에서는 테트라진아민의 -NH2에 대응하는 새로운 피크가 8.5ppm으로 나타났다. 반면 BOC 그룹에 관한 화학적 변화는 완전히 사라졌다. 특히 테트라진 고리의 -CH 피크의 약간의 변화도 관찰돼 10.58ppm에서 10.63ppm으로 이동해 테트라진 아민을 합성에 성공한 것으로 확인됐다. 테트라진 아민의 구조는 FTIR에 의해 추가로 분석되었으며, 3066 cm-1에서 1차 아민 신장을 나타내고, 2977 cm-1 및 1432 cm-1에서 방향족 고리의 C-H 신장 및 C=C 신장, 각기. 또한, 테트라진 고리의 C-H 연신, C=N 연신 및 C-N 연신이 각각 2858, 1612 및 1506 cm-1에서 관찰되었다.

가교제(DSe-DTz) 합성을 위해 DSeDPA의 카복실산 그룹을 EDC 및 NHS 화학을 통해 활성화한 다음 테트라진 아민과 반응시켜 DSe-DTz(49% 수율)를 생성했다. 가교제의 -CH2-CO- 및 -Se-CH2-에 해당하는 화학적 이동은 1H NMR 스펙트럼에서 각각 2.8 및 3.1ppm에서 나타났다. 또한, 테트라진 그룹에 속하는 -CH 결합의 proton 피크는 10.6ppm에서 확인되었고, -NH- 결합은 8.6ppm에서 확인되어 DSe-DTz의 합성이 성공적임을 증명하였다. C-Se 그룹의 독특한 피크는 904cm-1에서 나타나고 특징적인 아마이드 밴드(C=N 및 C-N)는 1633, 1543, 1695 및 1240cm-1에서 관찰되었습니다. 더욱이, DSe-DTz 스펙트럼은 3291cm-1에서 2차 아민 스트레칭을 보여주었다. 이러한 결과는 가교제의 성공적인 합성을 입증했습니다.

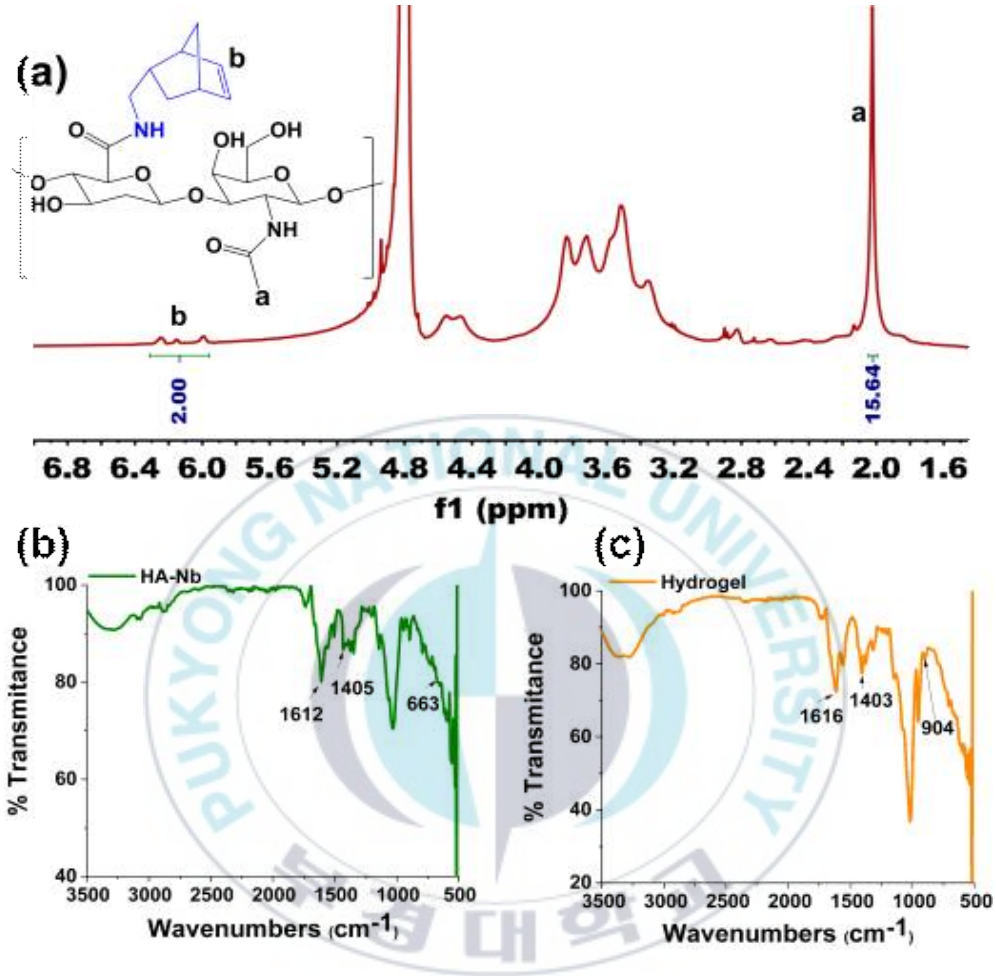


[그림 5] 중간 생성물 및 DSe-Dtz 가교제의 특성화. (a) BOC-4-AM의 1H NMR 스펙트럼, (b) BOC-Tz의 1H NMR 스펙트럼, (c) Tz-아민의 1H NMR 스펙트럼, (d) Tz-아민의 FTIR 스펙트럼, (e-f) 1H DSe-DTz 가교제의 NMR 및 FTIR 스펙트럼

4.2 HA-Nb의 합성

HA는 기계적 특성, 점도, 용해성, 분해성, 생물학적 특성을 포함하는 특성

을 개선하기 위해 화학적으로 변형되었다. HA 유도체는 약물전달, 작은 간섭 RNA(siRNA)의 세포 내 전달, 창상 치유, 그리고 몇 가지 외과 수술 장치로 생성돼 활용되었다. 구체적으로 HA의 카르본산염 및 수산기는 통상 아마이드, 에스터 또는 에테르 결합을 형성하는 시약에 의해 쉽게 표적화할 수 있었다[29]. 이전에 HA는 티오르기, 메타크릴산기, 알킨/아지드 관능성 또는 알데하이드기와 같은 암 치료에 대한 적용을 개선하기 위해 몇 가지 기능으로 수정되었다[26,46]. 그러나 노르보넨 또는 트랜스시클로옥텐과의 HA 기능화로 구리가 없는 IEDDA 클릭 반응에 반응한다[17]. IEDDA 클릭 반응이 가능한 HA-Nb 전구체를 합성하기 위해 HA는 EDC와 NHS를 사용해 카르보디이미드 커플링 반응을 통해 5-노르보넨-2-메틸아민으로 기능화됐다. 노르보넨(Nb)의 이론적 치환도(DS)는 50%를 목표로 했다. 정제된 HA-Nb의 구조를 1H NMR과 FTIR 분광법으로 분석했다. 노르보넨의 DS는 HA의 노르보넨의 프로톤과 메틸기를 1H NMR 스펙트럼으로 통합하여 계산한 결과 20%로 나타났다. HA-Nb의 구조는 FTIR에 의해 추가로 확인되었으며 3300cm-1의 HA 수산기의 특징적인 신장 진동을 나타내며 1612cm-1의 신장 밴드와 1405cm-1의 신장 밴드는 각각 COO-의 비대칭 신장과 대칭 신장에 기인한다. 663cm-1의 현저한 피크는 시스 치환 알켄 만곡에 할당되어 히알루론 사슬의 노르보넨 단위의 존재를 확인할 수 있다.



[그림 6] HA-Nb 및 제형화된 하이드로겔의 특성화. (a) 중수소 산화물에서 HA-Nb의 1H NMR 스펙트럼, (b) HA-Nb의 FTIR 스펙트럼, 및 (c) 동결건조된 하이드로겔의 FTIR 스펙트럼

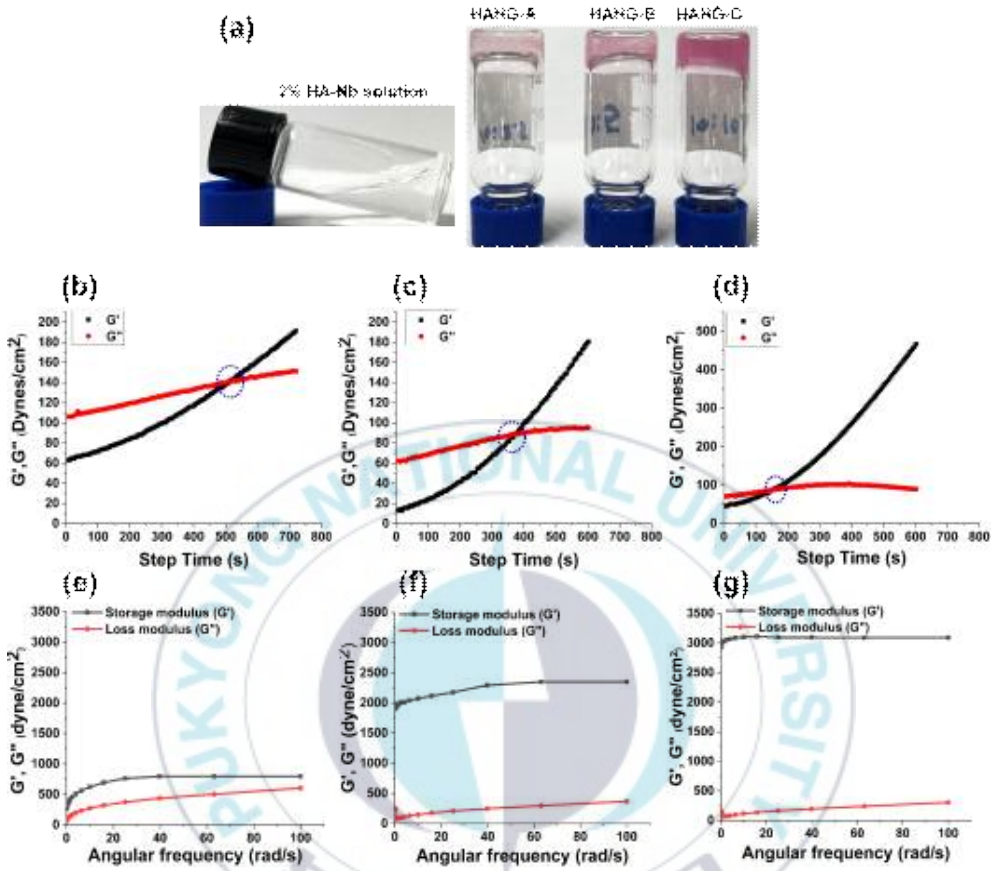
4.3 하이드로겔의 제조 및 특성화

전구체 HA-Nb와 DSe-DTz의 공급비(각 10 : 2.5, 10 : 5, 10 : 10, Nb :

Tz, 몰비)를 변경하여 3종류의 하이드로겔(HAHG-A, HAHG-B, HAHG-C)을 제조했다. 따라서 노르보넨 그룹과 테트라진 그룹 사이의 IEDDA 클릭 반응의 결과로 이들 하이드로겔은 다양한 가교 밀도를 가지고 있다. DSe-DTz 함량이 높을수록 겔화 시간이 빨라지는 것으로 나타났는데, 이는 IEDDA 클릭 반응이 빠르고 촉매 없이 높은 전환을 제공하기 때문이다. HA 하이드로겔의 FTIR 스펙트럼은 904cm-1의 C-Se의 독특한 흡수대를 나타내 HA-Nb와 DSe-DTz 간의 IEDDA 반응을 통해 가교의 성공적인 조합을 나타냈다.

4.4 하이드로겔의 겔화 시간 및 기계적 특성

하이드로겔의 졸-겔 변형 시간은 반전 바이알 테스트를 사용하여 기록되었으며 졸-겔 변형 사진은 그림 3a에 나와 있다. 하이드로겔은 초고속 IEDDA 클릭 반응으로 인해 155~509초 범위의 겔화 시간을 나타내는 빠르게 형성되었다. 제형화된 하이드로겔의 졸-겔 변환 시간 및 기계적 특성은 레오미터를 사용하여 단계 시간 및 각 주파수의 함수로서 각각 저장 모듈러스(G′) 및 손실 모듈러스(G″)를 측정함으로써 추가로 평가되었다. 흥미롭게도, 가장 낮은 DSe-DTz 함량을 가진 하이드로겔 HAHG-A는 G′와 G″의 교차점으로 표시된 것처럼 약 500초의 겔화 시간을 나타낸다. 한편 하이드로겔 HAHG-B와 HAHG-C의 겔화 시간은 높은 가교제의 함량으로 인해 380초, 200초로 감소했다. 하이드로겔의 기계적 강도는 가교제의 몰비를 증가시킴에 따라 향상되었다. 구체적으로, 주파수 스윕 테스트에서, 하이드로겔 HAHG-A, HAHG-B의 저장 모듈, HAHG-C는 각각 750, 2500, 3000dyne/㎠로 측정되었다. 이들 연구결과는 가교제 함유량이 많을수록 더욱 강한 하이드로겔을 생성했다고 보고된 이전의 연구결과와 유사하다[19].

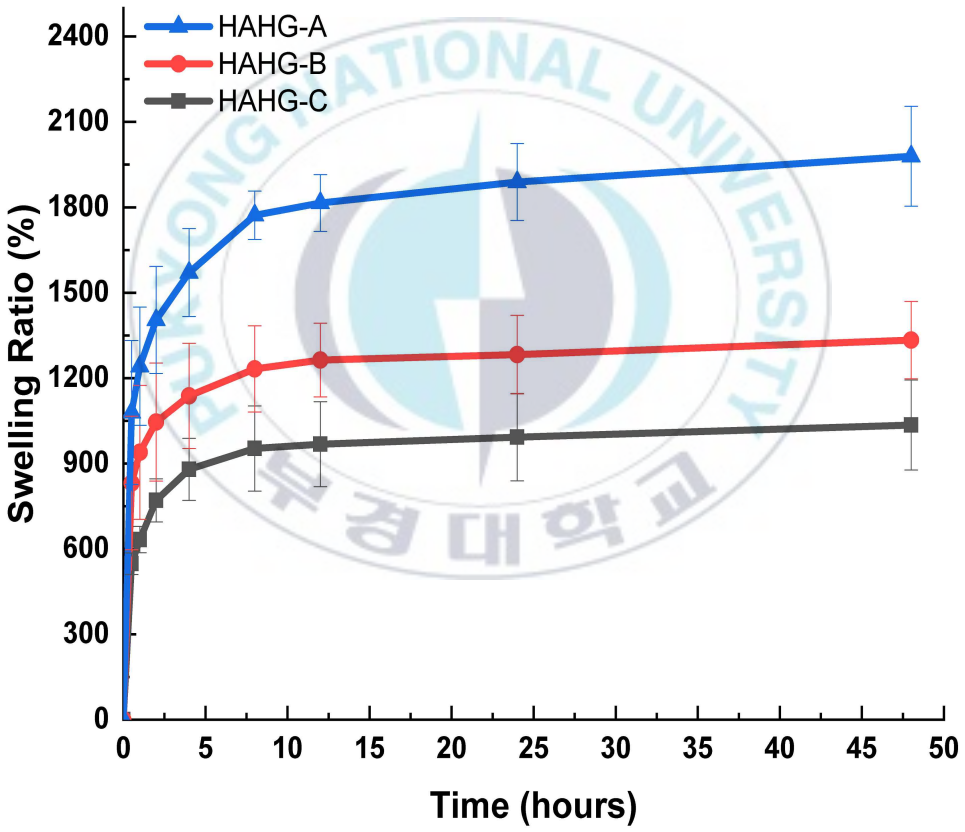


[그림 7] 하이드로겔의 유변학적 특성. (a) 제형화된 하이드로겔의 졸-겔 상태를 보여주는 사진. (b-d) 하이드로겔 HAHG-A, HAHG-B 및 HAHG-C의 시간 함수로서의 저장 모듈러스 및 손실 모듈러스. (e-g) 하이드로겔 HAHG-A, HAHG-B 및 HAHG-C의 각 주파수의 함수로서의 저장 모듈러스 및 손실 모듈러스

4.5 하이드로겔의 팽윤율 연구

하이드로겔의 팽윤성을 중량 측정법으로 조사했다. 이를 위해 미리 계량

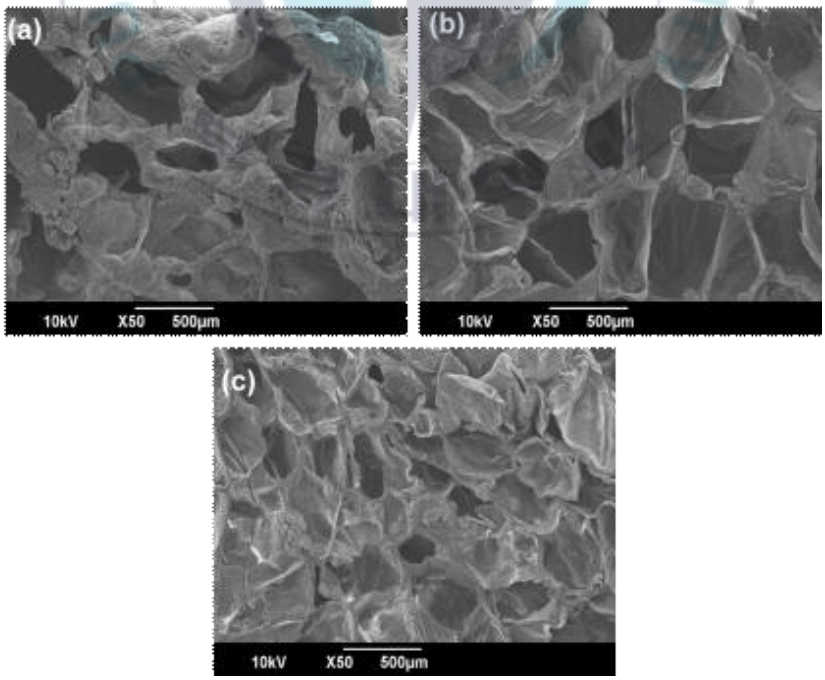
한 건조 하이드로겔을 실온에서 PBS에 침지했다. 모든 하이드로겔은 초기 4시간 사이에 급격히 빠른 팽윤을 나타내며 24시간 후에 서서히 평형 상태에 이르렀고, 구체적으로는 HAHG-A, HAHG-B, HAHG-C는 각각 최대 팽윤율 1,800%, 1,200%, 900%를 나타냈다. 이러한 결과는 가교 밀도가 높고 물의 포수가 제한되어 있으므로 하이드로겔의 고밀도 네트워크에 기인하는 가교제의 몰비가 증가함에 따라 배합된 하이드로겔의 팽윤율이 감소함을 나타낸다.



[그림 8] PBS(pH 7.4)에서 하이드로겔의 팽윤 특성

4.6 하이드로겔의 횡단면 표면분석

하이드로겔의 제형에 따라 네트워크의 미세구조는 달랐다. 다공성 구조는 가교결합에 사용된 화학적 메커니즘에서, 노르보넨과 테트라진 사이의 IEDDA 반응으로 형성된 N_2 가스가 하이드로겔 내부에 갇혀 형성시켜 발생한 구조적 특징임을 예측할 수 있다. 구체적으로, 모든 제형화된 하이드로겔의 내부 구조는 다공성이 높았으나, 가교제의 몰비가 증가함에 따라 다공성이 감소하였다. 이 결과는 가교제의 더 높은 몰비에서 더 높은 가교밀도로 인해 하이드로겔의 고밀도 네트워크에 기인할 수 있다. 하이드로겔의 특성인 팽윤 거동, 약물 로딩 및 방출, 분해 등은 다공성에 의해 직접적으로 영향을 받는다. 따라서 본 연구에서 관찰된 HA 하이드로겔의 다공성 네트워크는 이전에 보고된 바와 같이 약물 방출 및 세포 간 상호 작용에 필수적일 수 있다[22].



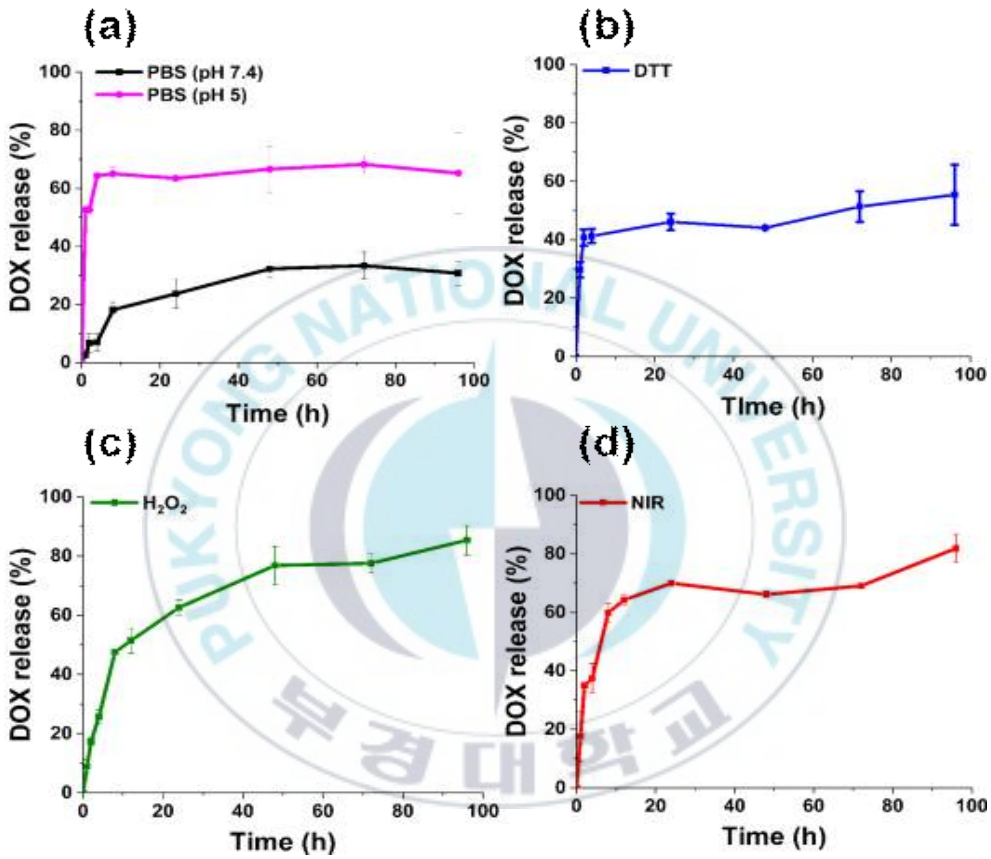
[그림 9] (a) HAHG-A, (b) HAHG-B, (c) HAHG-C의 SEM 사진

4.7 약물 로딩 및 방출 연구

약물전달 시스템의 역할을 하기 위해서는 약물이 하이드로겔 안에 얼마나 캡슐화되느냐가 중요한 매개 변수다. DOX는 HAHG-B 하이드로겔 약물 적재 효율과 제어된 방출 연구를 검토하기 위한 의약품으로 선정했다. DOX 부하 효율은 단독으로 그리고 ICG와 조합해 평가했다. 흥미롭게도 HAHG-B 하이드로겔에 ICG를 넣으면 DOX만 로딩된 하이드로겔(DLE=88%, DC=4.24%)에 비해 DOX 적재 효율이 높고 약물 함량(각 94%, 4.54%)이 높아졌다. 약물 로딩 효율의 이러한 차이는 아마도 DOX의 양으로 하전 된 작용기(아민)와 상호작용하여 DOX의 침출을 제한하는 ICG 분자에 존재하는 음으로 하전 된(-SOO-) 작용기 때문이다.

하이드로겔의 체외 DOX 방출 특성을 평가하기 위해 5가지 다른 조건, 즉 생리적 환경(PBS, pH7.4), 종양 모방 산성 환경(PBS, pH5), 단순화된 종양 환원 환경(10mmol DTT), 산화 환경(0.5% H2O2), NIR 광조사(15분)를 사용했다. 흥미롭게도, DOX 방출의 초기 단계 동안 PBS(pH 7.4)에서 DOX의 폭발적인 방출이 관찰되지 않았으며 96시간 후에 방출된 DOX가 25%만 측정되었다. 대조적으로, DOX의 폭발적 방출(~ 60% DOX 방출)은 도 하이드로겔의 4시간 배양 후 산성 배지(PBS, pH 5)에서 관찰되었다. 산성 매질에서 DOX의 폭발적인 방출은 이전에 보고된 바와 같이 DOX의 아민 그룹의 양성자화로 인해 산성 매질(PBS, pH 5)에서 DOX의 더 나은 용해도에 기인할 수 있으며, 이는 캡슐화된 약물의 배출을 촉진한다[44]. 또한, pH 5에서 HA의 아마이드, 하이드록실 및 카복실기의 양성자화로 인한 더 높은 팽창 또는 습윤도 더 높은 DOX 방출의 원인이 될 수 있다[25]. 유사

하게, DOX의 폭발적인 방출은 환원성 매질 및 산화 매질뿐만 아니라 NIR 광으로 조사된 하이드로겔에서 8시간 만에 약 40, 50 및 60% DOX를 방출하는 것으로 관찰되었다.

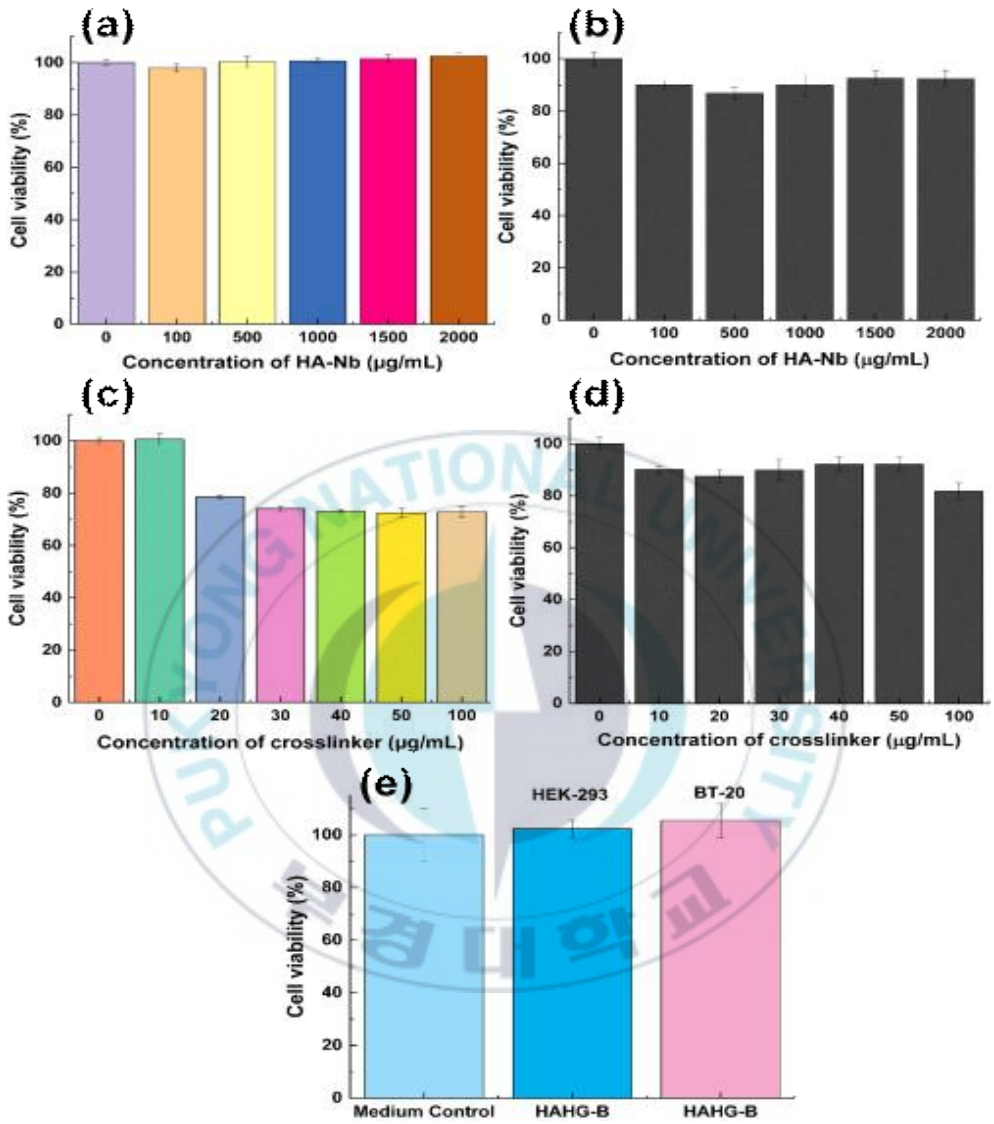


[그림 10] 하이드로겔 HAHG-B의 시험관 내 DOX 방출 거동. (a) PBS, pH 7.4 및 5에서 하이드로겔의 DOX 방출 연구, (b) 환원 환경(10mM DTT)에서 하이드로겔의 DOX 방출 연구, (c) 산화 환경(0.5% H2O2)에서 하이드로겔의 DOX 방출 연구, 및 (d) NIR 광 조사(808nm, 4W 전력, 15분) 후 DOX+ICG 로딩된 하이드로겔의 DOX 방출 연구

자극 처리된 하이드로겔의 초기 폭발 방출 단계는 지속적 또는 시간적 방출 단계에 이어 DTT, H2O2, NIR-light로 처리하면 각각 120시간 후 하이드로겔에서 약 99%, 98%, 96% DOX가 방출됐다. 주목할 점은 DTT와 H2O2에 노출되었을 때 하이드로겔로부터의 초기 버스트 방출은 DTT와 H2O2가 하이드로겔의 가교 부분의 다이셀레나이드 결합과 빠르게 상호작용하여 셀레놀 또는 각각 셀렌산으로 산화된다[24]. 반면, NIR 처리군의 초기 버스트 방출은 온도 상승과 함께 NIR과 ICG 분자의 상호 작용으로 인해 ROS가 생성되었기 때문이다. 결과적으로 생성된 ROS는 광열 효과와 함께 Se-Se 결합(셀렌산으로 산화됨)을 절단하고, 이어서 하이드로겔의 3D 네트워크를 탈 가교 또는 느슨하게 하여 포획된 DOX의 방출을 가속화하였다[6].

4.8 시험관 내 세포독성

생체 재료는 생물학적 시스템에 몇 가지 부작용을 일으킬 수 있기 때문에 세포독성평가는 하이드로겔의 중요한 매개 변수다. 본 연구에서는 HA-Nb, 가교제와 빈 하이드로겔의 세포독성은 WST 분석을 사용하여 비암세포(정상 세포)의 모델인 HEK-293 세포와 BT-20 암세포에서 평가되었다. 이를 위해 HEK-293 및 BT-20 세포를 다른 농도의 HA-Nb, 가교제 또는 HAHG-B 하이드로겔로 24시간 동안 처리했다. HA-Nb는 2000μg/mL 농도까지 HEK-293 및 BT-20 세포에 무독성(> 95% 세포 생존율)을 나타내었다. 각각. 세포독성 연구는 Nb 분자와의 HA 결합이 HA 전구체의 세포 적합성에 악영향을 미치지 않는다는 것을 보여줬다. 유사하게, 가교제 또한 HEK-293과 BT-20의 세포에 대해 최대 100μg/mL의 시험 농도까지 세포 적합했다.



[그림 11] 전구체와 HAHG-B 하이드로겔의 시험관 내 세포 적합성. (a-b) HEK-293 세포와 BT-20 암세포에서 각각 시험된 HA-Nb의 세포 적합성; (c-d) HEK-293 세포 및 BT-20 암세포에서 각각 테스트 된 DSe-DTz 가교제의 세포 적합성; (e) HEK-293 세포 및 BT-20 암세포에서 테스트 된 HAHG-B 하이드로겔의 세포 적합성

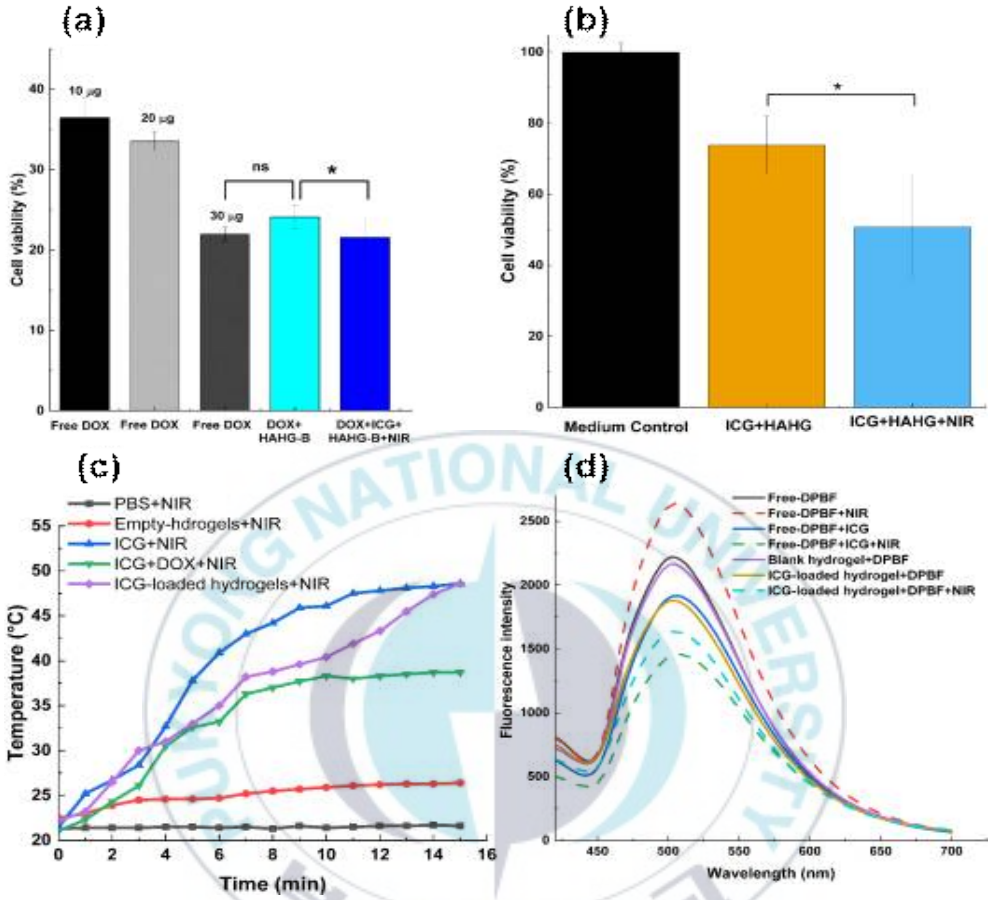
24시간 동안 처리한 후, HA 하이드로겔로 처리된 세포는 여전히 100% 이상 생존성을 유지했으며, 이는 제조된 하이드로겔이 HEK-293 및 BT-20 세포 모두에서 명백한 세포독성을 나타내지 않았음을 나타냅니다. 이러한 발견은 이전에 보고된 HA 기반 하이드로겔과 유사하며, 이는 이전에 보고된 HA 기반 하이드로겔과 유사하고 생물학적으로 호환되며 뚜렷한 세포독성이 없었다[36].

DOX 로딩 및 DOX+ICG 로딩 HA 하이드로겔의 시험관 내 효과는 모델 암 세포주로서 유방암 세포(BT-20) 세포에서 평가되었다. DOX와 함께 배양된 세포는 30μg 농도에서 약 20%의 세포 생존율을 보인 반면, DOX(30μg)와 동등물을 함유하는 하이드로겔은 항종양 활성이 약간 더 낮았다(22% 세포 생존율). DOX와 DOX가 로딩된 하이드로겔 사이의 항종양 활성 차이는 약물 방출 연구에서 볼 수 있듯이 pH를 모방하여 24시간 후에 미세환경을 감소시키는 암 하의 하이드로겔에서 방출된 DOX가 65%와 56%밖에 되지 않는 이유에 의한 것이었다. 전반적으로, DOX가 로딩된 HA 하이드로겔은 DOX와 비교하여 시험관 내 항종양 활성이 매우 유사하게 유도된 것이 분명하다.

항종양 및 광열 효과의 결합을 평가하기 위해 DOX+ICG가 로딩된 하이드로겔과 함께 배양된 BT-20 세포를 NIR 광선으로 처리했습니다. 흥미롭게도, NIR을 DOX+ICG에 로드된 하이드로겔에 노출하면 DOX의 항종양 효과가 약간 증가해 세포 생존율이 약 18%를 나타냈다. DOX+ICG가 로딩된 하이드로겔의 더 큰 항종양 활성은 아마도 ICG 분자에 대한 NIR 노출로 인해 생성된 광열 효과 또는 고열과 함께 하이드로겔에서 DOX의 폭발적인 방출 때문일 것이다. DOX 그룹(30 μg)과 DOX-loaded 하이드로겔 그룹 사이에는 유의한 차이가 없었습니다($p = 0.05$). 대조적으로, 근적외선 조사 후 DOX+ICG가 로딩된 하이드로겔의 항종양 효능은 DOX+ICG가 로

딩된 하이드로겔의 상승적인 항종양 및 광열 효과를 나타내는 DOX가 로딩된 하이드로겔의 항종양 효능과 상당히 달랐다(p 0.05).
광열 효과를 추가로 조사하기 위해 ICG가 로딩된 하이드로겔을 BT-20 암세포와 함께 배양했습니다. 흥미롭게도, ICG가 로딩된 하이드로겔로 처리된 세포는 그림 8b와 같이 약 70%의 세포 생존율을 보였다.

한편 시료에 NIR빛을 조사하면 세포의 생존율은 약 51%까지 떨어지고 NIR 빛과 ICG의 반응에 따라 광열 효과를 확인했다. 이 개념을 증명하기 위해 시험관 내 광열 변환 실험을 수행했다. PBS에 대한 NIR 노출은 온도를 변화시키지 않았지만, ICG/ICG+DOX 용액 또는 ICG가 로딩된 하이드로겔(PBS 내)에 NIR 광을 조사할 때 온도의 일시적인 증가가 관찰되었다. 흥미롭게도 15분의 조사 후 ICG 용액이 포함된 큐벳의 온도는 48°C로 증가한 반면 ICG가 장착된 하이드로겔은 약 49°C의 온도를 나타냈다. 그럼에도 불구하고 ICG+DOX 용액은 근적외선 조사 후 약 38°C의 온도를 보였다. ICG/ICG가 장착된 하이드로겔에 NIR 노출 후 ROS 생성과 함께 온도가 증가하면 광열 치료에 유용할 수 있다. NIR 빛과 ICG 분자의 상호작용에 의한 ROS 생성은 DPBF를 ROS 감지 프로브로 사용하여 평가되었다. DPBF는 형광 분자로, 단일 산소와 하이드록시, 알킬 옥시, 알킬 퍼옥시 라디칼 등 일부 ROS와 특이적으로 반응한다. 이러한 ROS의 작용으로 DPBF는 1,2-dibenzoylbenzene 또는 O-benzoylbenzophenone으로 빠르게 산화되어 DPBF의 형광강도를 감소시킨다.



[그림 12] (a) 근적외선 조사(808nm, 2 min, 1 -와트); (b) NIR 광 조사 전후에 ICG가 로딩된 하이드로겔로 처리된 BT-20 암세포의 세포 생존율; (c) NIR-광(15분)에 노출된 후 ICG 및 ICG-적재/ICG+DOX-하이드로겔의 광열 전환; (d) ICG 또는 ICG 로딩된 HAHG-B 하이드로겔에 NIR 조사 후 ROS 생성의 함수로서 DPBF의 형광강도 감소

구체적으로, ICG가 없거나 NIR 조사가 없을 때 샘플의 형광강도의 변화가 관찰되지 않았다. 대조적으로, NIR 조사 후 ICG 또는 ICG가 로딩된 하

이드로겔을 함유하는 샘플의 형광강도에서 극적인 감소가 관찰되어 NIR 조사 후 ROS의 생성을 확인했다. 전반적으로, 이러한 발견은 다이셀레나이드 결합을 함유하고 IEDDA 클릭 반응을 통해 가교결합 된 ICG/DOX + ICG가 로딩되어 종양을 근절하기 위한 DOX 전달 및 광열 요법의 강력한 후보가 될 수 있음을 보여준다.

약물전달과 암 치료에서의 다자극성 HA 기반의 하이드로겔 적용은 아직 개발 단계에 있다. 특히, 현재 연구의 대부분은 여전히 HA 하이드로겔의 개발, 물리적 특성의 특성화, 시험관 내 및 생체 내 동물 모델 조사에 중점을 두고 있다. 현재 다중 자극 반응성 HA 기반 하이드로겔을 사용하는 임상 연구는 매우 제한적이다. 다중 자극 반응성 HA 기반 하이드로겔의 몇 가지 예가 임상 시험으로 진행되었지만, 이러한 약물전달 시스템의 산업적 프로세스 및 임상 번역으로의 확장의 많은 측면이 해결되어야 하는 과학 분야에는 지식이 부족하다. 그럼에도 확장 및 개발을 위한 최첨단 관행을 활용함으로써 이러한 IEDDA 가교 다중 반응성 HA 기반 하이드로겔은 임상 적용을 위한 약물전달 시스템으로 사용될 수 있는 큰 잠재력을 가지고 있다.

제 V 장 결 론

자극 반응성 HA 기반 하이드로겔은 DOX의 제어 방출을 위한 IEDDA 클릭 반응을 통해 다이셀레나이드 결합을 포함하는 가교제로 성공적으로 조제되었다. HA는 먼저 노르보넨 그룹과 접합된 다음 DSe-DTz 가교제와 반응하여 수성 매질 및 생리학적 온도에서 자극 반응성 하이드로겔을 생성했다. 다양한 가교 비율은 궁극적으로 겔화 시간, 기계적 강도, 미세구조 및 팽윤 비율 측면에서 하이드로겔의 성능에 영향을 미쳤다. 하이드로겔 약물 방출 연구는 하이드로겔이 DTT, H2O2, NIR 조사에 의해 촉발된 선형 사슬과 빠르게 탈 가교 되어 연구 초기에 DOX가 폭발적으로 방출되고 이후 지속적인 DOX 방출이 나타나는 것을 보였다. BT-20 세포에 대한 시험관 내 항종양 평가는 DOX가 로딩된 하이드로겔이 DOX와 비교하여 유사한 항종양 활성을 나타냄을 보여주었다. 반면, DOX+ICG가 로딩된 하이드로겔은 근적외선 조사 후 더 큰 항종양 활성을 나타내어 시너지 효과를 나타내는 항종양 및 광열 요법을 보였다. 전반적으로, 우리는 제형화 된 HA 하이드로겔이 종양을 치료하기 위한 다중 자극 반응성 약물전달 시스템에 사용될 수 있음을 증명한다.

제 Ⅵ 장 참고 문헌

[1] Hennink, W. E., & Nostrum, C. F. (2002), Novel crosslinking methods to design hydrogels, Advanced Drug Delivery Reviews, 54(1), 13-36.

[2] Chung, L. Y., Schmidt, R. J., Hamlyn, P. F., Sagar, B. F., Andrews, A. M., & Turner, T. D. (1994), Biocompatibility of potential wound management products: Fungal mycelia as a source of chitin/chitosan and their effect on the proliferation of human f1000 fibroblasts cultur. J of Biomecical Materials Research, 28, 463-469.

[3] Engel, E., Schraml, R., Maisch, T., Kobuch, K., Konig, B., Szeimies, R. M. (2008), Light-induced decomposition of indocyanine green, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 49(5), 1777-1783.

[4] Tang, Y., & McGoron, A. J. (2009), Combined effects of laser-ICG photothermotherapy and doxorubicin chemotherapy on ovarian cancer cells, Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology, 97(3), 138-144.

[5] Kildahl, N. K. (2009), Bond energy data summarized, Journal of Chemical Education, 72(5), 423.

[6] Anugrah, D. S. B., Ramesh, K., Kim, M., Hyun, K., & Lim, K. T. (2019). Near-infrared light-responsive alginate hydrogels based on diselenide-containing cross-linkage for on demand degradation and drug release. Carbohydrate Polymers, 223, 115070.

[7] Bouhadir, K. H., Hausman, D. S., & Mooney, D. J. (1999). Synthesis of cross-linked poly(aldehyde guluronate) hydrogels. Polymer, 40(12),

3575-3584.

[8] Cheng, W., & Liu, Y. (2017). 2 - Redox-responsive hydrogels. In S. Jana, S. Maiti & S. Jana (Eds.), Biopolymer-Based Composites (pp. 31-60): Woodhead Publishing

[9] Cho, H., Bae, J., Garripelli, V. K., Anderson, J. M., Jun, H.-W., & Jo, S. (2012). Redox-sensitive polymeric nanoparticles for drug delivery. Chemical Communications, 48(48), 6043-6045.

[10] Choh, S.-Y., Cross, D., & Wang, C. (2011). Facile Synthesis and Characterization of Disulfide-Cross-Linked Hyaluronic Acid Hydrogels for Protein Delivery and Cell Encapsulation. Biomacromolecules, 12(4), 1126-1136.

[11] Collins, M. N., & Birkinshaw, C. (2008). Physical properties of crosslinked hyaluronic acid hydrogels. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 19(11), 3335-3343.

[12] Fallacara, A., Baldini, E., Manfredini, S., & Vertuani, S. (2018). Hyaluronic Acid in the Third Millennium. Polymers, 10(7), 701.

[13] Geven, M., d'Arcy, R., Turhan, Z. Y., El-Mohtadi, F., Alshamsan, A., & Tirelli, N. (2021). Sulfur-based oxidation-responsive polymers. Chemistry, (chemically selective) responsiveness and biomedical applications. European Polymer Journal, 149, 110387.

[14] Gong, C., Shan, M., Li, B., & Wu, G. (2017). Injectable dual redox responsive diselenide-containing poly(ethylene glycol) hydrogel. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 105(9), 2451-2460.

[15] Goodarzi, K., & Rao, S. S. (2021). Hyaluronic acid-based hydrogels to study cancer cell behaviors. Journal of Materials Chemistry B, 9(31),

6103-6115.

[16] Gopinathan, J., & Noh, I. (2018). Click Chemistry-Based Injectable Hydrogels and Bioprinting Inks for Tissue Engineering Applications. Tissue engineering and regenerative medicine, 15(5), 531-546.

[17] Gramlich, W. M., Kim, I. L., & Burdick, J. A. (2013). Synthesis and orthogonal photopatterning of hyaluronic acid hydrogels with thiol-norbornene chemistry. Biomaterials, 34(38), 9803-9811.

[18] Hemshekhar, M., Thushara, R. M., Chandranayaka, S., Sherman, L. S., Kemparaju, K., & Girish, K. S. (2016). Emerging roles of hyaluronic acid bioscaffolds in tissue engineering and regenerative medicine. International Journal of Biological Macromolecules, 86, 917-928.

[19] Jeon, O., Bouhadir, K. H., Mansour, J. M., & Alsberg, E. (2009). Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties. Biomaterials, 30(14), 2724-2734.

[20] Jiang, X., Du, B., Huang, Y., Yu, M., & Zheng, J. (2020). Cancer Photothermal Therapy with ICG-Conjugated Gold Nanoclusters. Bioconjugate Chemistry, 31(5), 1522-1528.

[21] Khunmanee, S., Jeong, Y., & Park, H. (2017). Crosslinking method of hyaluronic-based hydrogel for biomedical applications. Journal of tissue engineering, 8, 2041731417726464-2041731417726464.

[22] Li, H., Wu, C.-w., Wang, S., & Zhang, W. (2020). Mechanically strong poly (vinyl alcohol) hydrogel with macropores and high porosity. Materials Letters, 266, 127504.

[23] Liu, B., & Thayumanavan, S. (2020). Mechanistic Investigation on Oxidative Degradation of ROS-Responsive Thioacetal/Thioketal Moieties

and Their Implications. Cell Reports Physical Science, 1(12), 100271.

[24] Ma, N., Li, Y., Xu, H., Wang, Z., & Zhang, X. (2010). Dual Redox Responsive Assemblies Formed from Diselenide Block Copolymers. Journal of the American Chemical Society, 132(2), 442-443.

[25] Maleki, A., Kjøniksen, A.-L., & Nyström, B. (2008). Effect of pH on the Behavior of Hyaluronic Acid in Dilute and Semidilute Aqueous Solutions. Macromolecular Symposia, 274(1), 131-140.

[26] Manzi, G., Zoratto, N., Matano, S., Sabia, R., Villani, C., Coviello, T., . . . Di Meo, C. (2017). "Click" hyaluronan based nanohydrogels as multifunctionalizable carriers for hydrophobic drugs. Carbohydrate Polymers, 174, 706-715.

[27] Meng, X., & Edgar, K. J. (2016). "Click" reactions in polysaccharide modification. Progress in Polymer Science, 53, 52-85.

[28] Oliveira, B. L., Guo, Z., & Bernardes, G. J. L. (2017). Inverse electron demand Diels - Alder reactions in chemical biology. Chemical Society Reviews, 46(16), 4895-4950.

[29] Ossipov, D. A., Piskounova, S., Varghese, O. P., & Hilborn, J. (2010). Functionalization of Hyaluronic Acid with Chemoselective Groups via a Disulfide-Based Protection Strategy for In Situ Formation of Mechanically Stable Hydrogels. Biomacromolecules, 11(9), 2247-2254.

[30] Pérez, L. A., Hernández, R., Alonso, J. M., Pérez-González, R., & Sáez-Martínez, V. (2021). Hyaluronic Acid Hydrogels Crosslinked in Physiological Conditions: Synthesis and Biomedical Applications. Biomedicines, 9(9), 1113.

[31] Pourjavadi, A., Heydarpour, R., & Tehrani, Z. M. (2021).

Multi-stimuli-responsive hydrogels and their medical applications. New Journal of Chemistry, 45(35), 15705-15717.

[32] Salma, S. A., Patil, M. P., Kim, D. W., Le, C. M. Q., Ahn, B.-H., Kim, G.-D., & Lim, K. T. (2018). Near-infrared light-responsive, diselenide containing core-cross-linked micelles prepared by the Diels - Alder click reaction for photocontrollable drug release application. Polymer Chemistry, 9(39), 4813-4823.

[33] Schanté, C. E., Zuber, G., Herlin, C., & Vandamme, T. F. (2011). Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. Carbohydrate polymers, 85(3), 469-489.

[34] Seidlits, S. K., Khaing, Z. Z., Petersen, R. R., Nickels, J. D., Vanscoy, J. E., Shear, J. B., & Schmidt, C. E. (2010). The effects of hyaluronic acid hydrogels with tunable mechanical properties on neural progenitor cell differentiation. Biomaterials, 31(14), 3930-3940.

[35] Seliktar, D. (2012). Designing Cell-Compatible Hydrogels for Biomedical Applications. Science, 336(6085), 1124-1128.

[36] Seo, J., Park, S. H., Kim, M. J., Ju, H. J., Yin, X. Y., Min, B. H., & Kim, M. S. (2019). Injectable Click-Crosslinked Hyaluronic Acid Depot To Prolong Therapeutic Activity in Articular Joints Affected by Rheumatoid Arthritis. ACS Applied Materials & Interfaces, 11(28), 24984-24998.

[37] Sepantafar, M., Maheronnaghsh, R., Mohammadi, H., Radmanesh, F., Hasani-Sadrabadi, M. M., Ebrahimi, M., & Baharvand, H. (2017). Engineered hydrogels in cancer therapy and diagnosis. Trends in

biotechnology, 35(11), 1074-1087.
[38] Song, C.-C., Ji, R., Du, F.-S., & Li, Z.-C. (2013). Oxidation-Responsive Poly(amino ester)s Containing Arylboronic Ester and Self-Immolative Motif: Synthesis and Degradation Study. Macromolecules, 46(21), 8416-8425.
[39] Tan, H., Li, H., Rubin, J. P., & Marra, K. G. (2011). Controlled gelation and degradation rates of injectable hyaluronic acid-based hydrogels through a double crosslinking strategy. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 5(10), 790-797.
[40] Tanaka, M., Nakahata, M., Linke, P., & Kaufmann, S. (2020). Stimuli-responsive hydrogels as a model of the dynamic cellular microenvironment. Polymer Journal, 52(8), 861-870.
[41] Wu, X., He, C., Wu, Y., & Chen, X. (2016). Synergistic therapeutic effects of Schiff's base cross-linked injectable hydrogels for local co-delivery of metformin and 5-fluorouracil in a mouse colon carcinoma model. Biomaterials, 75, 148-162.
[42] Xu, P., Hu, L., Yu, C., Yang, W., Kang, F., Zhang, M., . . . Wang, J. (2021). Unsymmetrical cyanine dye via in vivo hitchhiking endogenous albumin affords high-performance NIR-II/photoacoustic imaging and photothermal therapy. Journal of Nanobiotechnology, 19(1), 334.
[43] Xu, Z., & Bratlie, K. M. (2018). Click Chemistry and Material Selection for in Situ Fabrication of Hydrogels in Tissue Engineering Applications. ACS Biomaterials Science & Engineering, 4(7), 2276-2291.
[44] Yadav, S., Ramesh, K., Kumar, P., Jo, S.-H., Yoo, S. I., Gal, Y.-S.,

. . . Lim, K. T. (2021). Near-Infrared Light-Responsive Shell-Crosslinked Micelles of Poly(d,l-lactide)-b-poly((furfuryl methacrylate)-co-(N-acryloylmorpholine)) Prepared by Diels–Alder Reaction for the Triggered Release of Doxorubicin. Materials, 14(24), 7913.

[45] Yang, J., Karver, M. R., Li, W., Sahu, S., & Devaraj, N. K. (2012). Metal-Catalyzed One-Pot Synthesis of Tetrazines Directly from Aliphatic Nitriles and Hydrazine. Angewandte Chemie International Edition, 51(21), 5222-5225.

[46] Yang, X., Akhtar, S., Rubino, S., Leifer, K., Hilborn, J., & Ossipov, D. (2012). Direct ″Click″ Synthesis of Hybrid Bisphosphonate - Hyaluronic Acid Hydrogel in Aqueous Solution for Biomineralization. Chemistry of Materials, 24(9), 1690-1697.

[47] Zhang, X.-P., Liu, F.-Q., Lai, J.-C., Li, C.-H., Li, A.-M., & You, X.-Z. (2016). Novel redox responsive chiral cyclometalated platinum(ii) complexes with pinene functionalized C^N^N ligands. New Journal of Chemistry, 40(3), 2628-2636.