(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012 년 8 월 16 일 (16.08.2012)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2012/108606 A1

(51) 국제특허분류:
C08L 5/08 (2006.01) *A61K 47/36* (2006.01)
C08L 71/02 (2006.01) *A61L 27/20* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2011/007516

(22) 국제출원일: 2011 년 10 월 11 일 (11.10.2011)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2011-0010969 2011 년 2 월 8 일 (08.02.2011) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **이화여자대학교 산학협력단 (EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교 내, 120-750 Seoul (KR).

(72) 발명자; 겸
(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **정병문 (JEONG, Byeongmoon)** [KR/KR]; 서울 은평구 진관동 84 번지 은평뉴타운 우물골 241 동 610 호, 122-200 Seoul (KR). **장지혜 (JANG, Ji Hye)** [KR/KR]; 경기도 수원시 영통구 영통동 1024-14 번지 경희유니빌오피스텔 702 호, 443-470 Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: **특허법인 엠에이피에스 (MAPS INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM)**; 서울 강남구 신사동 587-23 성도빌딩 11 층, 135-747 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

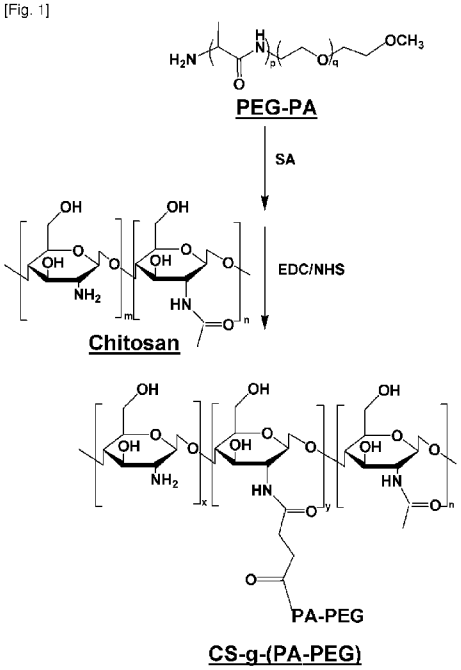
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: SOL-GEL TRANSITION CHITOSAN-POLYMER COMPOSITE AND USE FOR SAME

(54) **발명의 명칭** : 졸-겔 전이 키토산-폴리머 복합체 및 그의 용도

[Fig. 1]



(57) **Abstract**: The present invention relates to a chitosan-graft-(polypeptide-poly(ethylene glycol)) (CS-g-(PP-PEG)) having a molecular weight of between 5,000 and 2,000,000 Daltons, which is obtained through a reaction between chitosan and a poly(ethylene glycol)/poly(peptide) block copolymer having a molecular weight of between 1,000 and 50,000 Daltons comprising poly(ethylene glycol) having a molecular weight of between 500 and 5,000 Daltons and a hydrophobic poly(peptide) having a molecular weight of between 300 and 10,000 Daltons. A feature of this macromolecular aqueous solution is that, at above a predetermined concentration, the sol-gel transition temperature can be adjusted in accordance with the pH and the temperature, and the aim is use in medicinal product delivery systems, three-dimensional cell culturing and tissue engineering.

(57) **요약서**: 본원은 분자량 500 내지 5000 달톤의 폴리(에틸렌 글리콜)과 분자량 300 내지 10,000 달톤의 소수성 폴리(펩타이드)로 이루어진 분자량 1,000 내지 50,000 의 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(펩타이트) 블록 공중합체를 키토산에 반응하여 분자량 5,000 내지 2,000,000 달톤의 키토산-그래프트-(폴리펩타이드-폴리(에틸렌글리콜)) (CS-g-(PP-PEG))에 관한 것이다. 이 고분자 수용액은 일정 농도 이상에서, pH 및 온도에 따라 졸-겔 전이 온도가 조절이 가능함을 특징으로 하며, 의약품 전달 시스템, 3 차원 세포배양 및 조직공학으로 응용을 목적으로 한다.

WO 2012/108606 A1

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

명세서

발명의 명칭: 졸-겔 전이 키토산-폴리머 복합체 및 그의 용도

기술분야

[1] 본원은 졸-겔 전이 키토산-폴리머 복합체 및 상기의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[2] 키토산-기재 생체물질은, 1) 갑각류 껍질에서 천연 키토산의 풍부함, 2) 잠재적인 생체적합성, 3) 효소 분해성, 4) pH 민감성, 5) 아민 팬던트 기(pendant amine groups) 변형의 용이함 및 6) 항종양, 항진균, 항균, 콜레스테롤 저하 및 항당뇨 활성과 같은 생활성으로 인해 약물 수송, 상처 치유 및 조직 공학에 적용하기 위해 널리 연구되고 있다. 키토산은 미국에서 식품용 GRAS(generally regarded as safe) 물질로 분류되며 이탈리아, 일본 등에서는 식품첨가제로 사용되나, 키토산의 울혈 작용, 대식세포 활성화 및 사이토카인 자극에 기인한 체내사용(parenteral) 에 대해 아직까지 허가되지 않은 실정이다. 분자량의 재현가능한 조절 및 탈아세틸화의 정도는 키토산의 생산에서 중요한 파라미터이다. 최근에는, 잘 정의된 분자량을 갖는 수용성 키토산이 상업적으로 시판되고 있다.

[3] PEG/PLGA 시스템에서 기초한 선구적인 연구 이후로, 폴리에스테르, 다당류, 폴리포스파젠, 폴리(N-(2-히드록시프로필)메타크릴아미드-락테이트), 폴리카보네이트, 폴리시아노아크릴레이트 및 폴리펩티드와 같은 열겔화 생분해성 폴리머(thermal gelling biodegradable polymers)가 최소한의 침투성 주사 시스템으로서 널리 연구되고 있다. pH의 기능으로서 이온화가능한 기의 도입이 pH 뿐만 아니라 온도 민감성을 갖는 열겔화 폴리머를 제공한다. 저온에서 낮은 점성을 갖는 폴리머 수용액은 온도가 증가함에 따라 졸-겔 변환이 일어난다. 약학제제를 함유하는 수화겔 데포(depot)는 온도 민감성 졸-겔 전이를 통해 온혈동물에 주입되자마자 형성될 수 있으며 상기 데포는 서방성 약물 또는 세포 성장 매트릭스로서 작용한다. 특히, 열겔화 키토산/글리세롤 인산염 수용액은 약 10여년 동안 연구되고 있다.이 경우에서, 키토산을 3.0의 산성 pH에서 용해시킨 후에 pH를 7.0으로 조절하여 맑은 수용액을 만든다. 그 후에, PEG 그래프트 키토산 (CS-g-PEG)을 열겔화 물질로서 전환시킨다. 그러나, 이들 키토산-기재 겔들은 특정 용도에 적용 시 낮은 모듈러스(modulus)를 나타낸다.

[4] 한편, 소수성인 생분해성 고분자와 친수성 고분자와의 블록 공중합체(block copolymer)를 이용하여 온도에 따라 졸-겔 전이 현상을 보이도록 하는 연구가 보고되었으나(대한민국 공개특허 제 10-2008-0017850호), 이러한 블록 공중합체를 졸 상태인 수용액 형태로 체내에 주입하는 경우 체온에 의하여 겔 상태로 전이됨으로써, 체내에서 안정하게 약물을 담지하여 서서히 약물을 방출하는 서방형 약물 전달체로서 이용되었다. 그러나 온도에만 민감한 졸-겔

전이 특성을 나타내는 블록 공중합체를 사용하는 경우, 체내로 주사하는 과정에서 체내 온도로 인하여 주사 바늘의 온도가 체내 온도와 열적 평형에 도달하여, 체내에 완전히 주입되기 전에 겔화가 일어남으로써 주사 바늘이 막히는 현상 등의 문제점이 발생할 수 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[5] 이에, 본 발명자들은 지금까지의 졸-겔 전이 고분자가 갖는 특성 이외에 생체적합성 키토산을 이용하여 pH 민감성을 도입하여 주사성 (Injectability)을 개선하고 분해 시에 pH의 변화가 거의 없는 폴리펩타이드를 이용하여 바이오 의약품 및 세포에 대한 생체적합성을 증가시키기 위하여 연구한 결과 본원을 완성하였다.

[6] 이에, 본원은, 폴리(에틸렌 글리콜)과 키토산 사이에 소수성 폴리펩타이드를 도입하는 공정을 통해 수성 매질에서 온도 및 pH 민감성 졸-겔 전이특성을 가질 수 있는 키토산-폴리머 복합체, 및 상기 키토산-폴리머 복합체의 약물전달체 및 조직공학용 지지체로서의 용도를 제공하고자 한다.

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

과제 해결 수단

[8] 본원의 일 측면은, 폴리(에틸렌 글리콜) 블록과 키토산 사이에 결합된 소수성 폴리펩타이드 블록을 포함하는, 키토산-폴리머 복합체를 제공한다. 상기 키토산-폴리머 복합체는 수성 매질 내에서 pH 및 온도 민감성 졸-겔 전이특성을 가질 수 있다.

[9] 일 구현예에 있어서, 상기 키토산-폴리머 복합체는 그에 혼입된 약물을 추가 포함하여 약물전달체로서 사용될 수 있다.

[10] 일 구현예에 있어서, 상기 키토산-폴리머 복합체는 조직공학용 지지체로서 사용될 수 있다.

발명의 효과

[11] 본원에 의하여, 폴리(에틸렌 글리콜)과 키토산 사이에 소수성 폴리펩타이드를 도입하는 공정을 통해 제조되는 키토산-폴리머 복합체가 제공되며, 상기 키토산-폴리머 복합체는 수성 매질 내에서 온도 및 pH 민감성 졸-겔 전이특성을 가지며, 상기 키토산-폴리머 복합체 및 수성 매질을 포함하는 키토산-함유 졸-겔 용액은 체내 pH 및 온도 조건에서 겔화되어 주사성을 개선하고 생체 내에서 장기간 안정하게 겔 상태를 유지하며 독성 없이 분해되는 유용한 특성을 가진다. 이에 따라, 상기 온도 및 pH 민감성 졸-겔 전이특성을 갖는 키토산-함유 졸-겔 용액은, 생물학적 활성 분자 전달체 및 조직공학용 지지체로서 사용될 수 있다. 구체적으로, 본원의 일 구현예에 따른 상기 키토산-함유 졸-겔 용액은 일정 농도

이상의 수용액 형태에서 5℃ 내지 체온 (37℃)에서는 수용액으로 존재하나, 졸-겔 전이 온도 이상, 특히 체온 근처 (10℃ 내지 42℃) 에서는 수화겔로 전이가 일어나므로, 의약 전달 물질 또는 조직 공학용 생체 재료 등으로 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[12] 도 1은 본원의 일 구현예에 있어서 CS-g-(PA-PEG)의 합성 과정을 나타낸 개략도이다 (x + y = m이고, p = 11이며, q = 45임).

[13] 도 2는 키토산 (용매 = D_2O), PEG-PA (용매 = CF_3COOD) 및 본원의 일 실시예에 따른 CS-g-(PA-PEG) (용매 = CF_3COOD)의 ^{1}H-NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

[14] 도 3은 본원의 일 실시예에 따른 CS-g-(PA-PEG) 수용액의 시차 주사 분석(a) 및 열 중력 분석(b) 결과를 나타낸 그래프이다.

[15] 도 4는 pH 6.5에서 온도에 따른 키토산(CS), PEG-PA, 및 CS-g-(PA-PEG) (본원의 일 실시예) 수용액(6.0 중량%)의 점성 변화(a), 및 pH 3.0, 6.5 및 9.0에서 온도에 따른 CS-g-(PA-PEG) 수용액(6.0 중량%)의 계수 변화(b)를 나타낸 그래프이다 (데이터는 0.5℃/min의 가열속도 및 1.0 rad./s의 빈도 하에서 수득되었음).

[16] 도 5는 키토산 및 본원의 일 실시예에 따른 CS-g-(PA-PEG) 수용액(1.2 중량%)의 온도에 따른 pH 변화를 나타낸 그래프이다.

[17] 도 6는 본원의 일 실시예에 따른 CS-g-(PA-PEG) 수용액(6.0 중량%)의 FTIR 스펙트럼(a) 및 ^{13}C-NMR 스펙트럼 (b)을 나타낸 것이다.

[18] 도 7a 내지 도 7d는 30℃에서 본원의 일 실시예에 따른 CS-g-(PA-PEG) 수용액의 CS의 이온화 정도의 pH 의존도(a), FTIR(b), CD(circular dichroism)(a) 및 ^{13}C-NMR 스펙트럼(b)을 나타낸 그래프이다 (폴리머 농도는 CD 스펙트럼(0.05 중량%)을 제외하고는 6.0 중량% 임).

[19] 도 8은 pH 3.0 및 9.0의 수용액에서 형성된 본원의 일 실시예에 따른 CS-g-(PA-PEG)의 투과 전자 현미경 이미지를 나타낸 것이다 (폴리머 수용액(0.05 중량%)은 20℃에서 공기 건조시켰음).

[20] 도 9는 pH 3.0(a) 및 pH 9.0(b)에서 온도에 따른 본원의 일 실시예의 CS-g-(PA-PEG) 조립체의 외형 크기를 나타낸 그래프이다.

[21] 도 10은 pH 3.0 및 9.0에서 본원의 일 실시예에 따른 CS-g-(PP-PEG) 수화겔의 구조를 도시한 것이다.

[22] 도 11은 본원의 일 실시예에 따른 0.5 mL의 CS-g-(PP-PEG) 수용액 (6.0 중량%)을 쥐의 피하 (subcutaneous layer)에 주사한 후 1일, 10일 및 14일 후의 수화겔의 생성 및 분해 거동을 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[23] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 구현예 및 실시예를 상세히 설명한다.

[24] 그러나 본원은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 구현예 및 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.

[25] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 소자를 사이에 두고 "전기적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다.

[26] 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.

[27] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[28] 본 명세서에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 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. 또한, 본원 명세서 전체에서, "~ 하는 단계" 또는 "~ 의 단계"는 "~ 를 위한 단계"를 의미하지 않는다.

[29] 본원 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 "이들의 조합"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.

[30] 본원의 일 측면은, 폴리(에틸렌 글리콜) 블록과 키토산 사이에 결합된 소수성 폴리펩타이드 블록을 포함하는, 키토산-폴리머 복합체를 제공한다.

[31] 일 구현예에 있어서, 상기 키토산-폴리머 복합체는 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 및 소수성 폴리펩타이드 (PP) 블록을 포함하는 공중합체와 키토산 (CS)을 반응시켜 상기 키토산이 상기 소수성 폴리펩타이드 (PP) 블록에 그래프트시킴으로써 제조될 수 있다. 일 구현예에 있어서, 상기 키토산 1 개에 그래프트된 PP-PEG의 수는 약 1 개 이상 약 100 개 이하의 범위일 수 있으나 (즉, 키토산 1분자에 PP-PEG가 약 1 개 내지 약 100 개가 그래프트됨) 이에 제한되는 것은 아니다. 이하, 필요한 경우, 이러한 본원의 일 구현예에 따른 키토산-폴리머 복합체를 "CS-g-(PP-PEG)"로써 나타낼 수 있다.

[32] 일 구현예에 있어서, 상기 CS-g-(PP-PEG)는 N-히드록시 숙신 이미드(N-hydroxy succinic imide)와 EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carboimide hydrochloride)를 촉매로 사용하여 키토산의 아민기와 PEG-PP의 말단의 카르복시산기 사이의 축합반응으로 합성될 수 있다.

[33] 일 구현예에 있어서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜)의 분자량은 약 300 내지 약

5,000 달톤이고 상기 폴리펩타이드의 분자량은 약 300 내지 약 10,000 달톤이고, 상기 키토산의 분자량은 약 1,000 내지 약 1,000,000 달톤이며, 상기 키토산-폴리머 복합체의 분자량은 약 8,000 내지 약 2,000,000 달톤일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 폴리펩타이드-폴리(에틸렌 글리콜) 블록 공중합체의 분자량 범위가 약 1,000 내지 약 50,000인 경우에 소수성과 친수성의 균형 및 물에 대한 용해도 조절이 용이하고, 분자량이 약 10,000 이상인 폴리(에틸렌 글리콜)은 주사 후에 체외로 배출되는 데에 한계가 있을 수 있다. 이에, 상기 폴리(에틸렌 글리콜), 상기 폴리펩타이드의 분자량, 상기 키토산, 및 상기 키토산-폴리머 복합체의 분자량을 상기한 범위 내에서 조절하는 것이 바람직하다.

[34] 일 구현예에 있어서, 상기 소수성 폴리펩타이드 블록은 글라이신, 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스팔산, 시스틴, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 및 발린으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 포함하여 형성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[35] 일 구현예에 있어서, 상기 소수성 폴리펩타이드는 DL-형 아미노산, D-형 아미노산, 및 L-형 아미노산에서 선택되는 1종 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[36] 일 구현예에 있어서, 상기 소수성 폴리펩타이드가 α-헬릭스 또는 β-시트(sheet) 구조를 가지는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 상기 소수성 폴리펩타이드가 α-헬릭스 구조 또는 β-시트(sheet) 구조와 같은 폴리펩타이드 2차 구조를 갖는 경우 우수한 모듈러스(modulus) 또는 기계적 강도를 달성할 수 있다.

[37] 일 구현예에 있어서, 상기 키토산-폴리머 복합체는 수성 매질 내에서 pH 및 온도 민감성 졸-겔 전이 특성을 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[38] 일 구현예에 있어서, 상기 폴리펩타이드의 함량은 약 10 중량% 내지 약 60 중량%, 상기 폴리(에틸렌 글리콜)의 함량은 약 10 중량% 내지 약 60 중량%, 상기 키토산의 함량은 약 20 중량% 내지 약 80 중량%일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[39] 예를 들어, 상기 CS-g-(PP-PEG)가 상기한 바와 같은 조성을 갖는 경우에 소수성과 친수성의 균형으로 수성 매질에서 졸-겔 전이가 가능하게 된다. 상기 폴리(에틸렌 글리콜)의 함량이 너무 크면 물에 잘 용해되지만 졸-겔 전이가 관찰되지 않으며, 상기 폴리펩타이드의 조성이 너무 크면 물에 용해되지 않는다. 또한 상기 키토산의 조성이 너무 크면 졸-겔 전이가 일어나지 않고, 상기 키토산의 조성이 너무 작으면 pH 민감성을 가질 수 없고 본래 키토산의 특성을 잃게 된다. 또한, 상기 소수성 폴리펩타이드는 겔 강도유지에 중요한 역할을 하여, 상기 소수성 폴리펩타이드를 키토산과 폴리(에틸렌 글리콜) 사이에

삽입함으로써 상기 소수성 폴리펩타이드는 수화겔의 함수율, 분해 속도, 겔 강도 등을 조절할 수 있게 하여 결국 약물 전달 시의 약물방출속도를 조절할 수 있고, 조직공학 재료로 쓰일 때 겔의 지속성 및 세포와의 상호작용을 조절할 수 있다. 수화겔의 강도는 조직공학에서 세포성장과 분화에 직접적으로 영향을 미치므로 적당한 겔 강도의 유지는 중요하다. 예를 들어, 겔 강도가 증가함에 따라 줄기세포가 신경세포, 근육세포, 뼈 등으로 분화하게 된다. 한편, 효소에 특이적으로 분해되는 서열을 갖는 폴리펩타이드와 그렇지 않은 폴리펩타이드는 분해속도에서 차이가 나게 되며, 또한, 효소와의 접근성을 위해서 지나치게 소수성인 폴리펩타이드는 함수율을 떨어뜨리므로 상기 폴리펩타이드의 소수성을 적절히 조절하는 것이 바람직하다.

[40] 본원의 일 구현예에 따른 CS-g-(PP-PEG)를 포함하는 수용액은 일정 농도 이상에서, 체온 (37℃) 이하의 온도에서는 수용액으로 존재하지만, 약 37℃ 이상의 온도에서는 수화겔로 전이가 일어나는 것을 특징으로 한다. 따라서 본원의 일 구현예에 따른 CS-g-(PP-PEG)는 약물전달체, 소수성 의약의 가용화제로 사용될 수 있으며, 세포 배양, 조직 공학등 다양한 용도로서 의학적으로 응용될 가능성이 있다. 키토산의 특성 상, 음이온을 띄는 의약은 이온결합에 의해 초기과량방출을 막을 수 있게 되어 등전하점 (isoelectric point)이 약 6 이하인 의약품에 유망하나, 이러한 응용들에만 제한되는 것은 아니다.

[41] 따라서, 상기 CS-g-(PP-PEG)는 콘드로사이트, 배아 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 간세포, 심장 줄기 세포, 심근 세포, 내피 세포 또는 섬유 아세포를 이용한 치료에 사용될 수도 있다.

[42] 즉, 상기 본원의 일 구현예에 따른 키토산-폴리머 복합체 및 수성 매질을 포함하는 수용액은 pH 및 온도 민감성 졸-겔 전이 특성을 가질 수 있다. 특히, 상기 키토산-폴리머 복합체 및 수성 매질을 포함하는 수용액은 체온 이상의 온도에서 수화겔로 전이가 일어나는 특성을 가지며, 이러한 특성을 이용하여 키토산-폴리머 복합체는 약물전달체, 및 조직공학용 지지체로서 사용될 수 있다.

[43] 일 구현예에 있어서, 상기 키토산-폴리머 복합체는 그에 혼입된 약물을 추가 포함하여 약물전달체로서 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[44] 예를 들어, 상기 약물은 항암제, 호르몬, 항생제, 진통제, 항감염제, 단백질 또는 펩티드 의약, 핵산, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[45] 일 구현예에 있어서, 상기 항암제는 탁솔, 아드리아마이신, 블레오마이신, 시스플라틴, 카보플라틴, 독소루비신, 5-플로로우라실, 메톡트렉세이트 또는 안티노마이신 D 를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[46] 일 구현예에 있어서, 상기 단백질 또는 펩티드 의약은, 옥시토신, 바소프레신, 루테나이징 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬, 인슐린, 글루카곤, 인터루킨, 인터페론, 가스트린, 칼시토닌, 에리쓰로포이어틴, 칼씨토닌, 엔돌핀,

앤지오탠신, 암 고사 인자 (TNF), 신경 성장 인자 (NGF), 뼈형성 폴리펩타이드 (BMP), 혈관형성 성장인자 (VEGF), 그래뉼로사이트 콜로니 자극 인자 (GCSF), 레닌 또는 항체를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[47] 일 구현예에 있어서, 상기 핵산은 DNA, 플라즈미드 DNA, RNA, RNAi, 또는 siRNA 를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[48] 일 구현예에 있어서, 상기 키토산-폴리머 복합체는 조직공학용 지지체로서 사용되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 본원의 일 구현예에 따른 키토산-폴리머 복합체 및 수성 매질을 포함하는 수용액은 체온 이상의 온도에서 수화겔로 전이가 일어나고 체내에서 안정하게 유지되는 특성을 가지며, 이러한 특성을 이용하여 상기 키토산-폴리머 복합체를 조직공학용 지지체로서 유용하게 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 본원의 일 구현예에 따른 상기 키토산-폴리머 복합체가 조직공학용 지지체로서 사용되는 경우, 상기 키토산-폴리머 복합체 내에 혼입된, 콘드로사이트, 배아 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 간세포, 심장 줄기 세포, 심근 세포, 내피 세포, 및 섬유아세포로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 살아있는 세포를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[49] 특히, 키토산이 연골조직의 재생에 관여함이 알려진 바 이를 주사형 조직공학 재료로 응용하여, 마이크로드릴링과 CS-g-(PP-PEG) 수용액의 졸-겔 전이를 이용하여 연골 상처 부위에 주사를 함으로써 연골 재생능력을 극대화할 수 있다.

[50] 이하, 본원에 대하여 실시예를 이용하여 좀더 구체적으로 설명하지만, 본원이 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

[51] <u>사용물질들</u>

[52] α-메톡시-아미노 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) (M_n = 2,000 달톤)은 ID Bio 사 (Korea)에서, L-알라닌의 N-카르복시 무수물은 M & H Laboratory(Korea)에서, 키토산 (M.W. ~ 7,500 달톤, 5,000 및 10,000 달톤의 컷-오프 분자량을 갖는 투석막으로 정제함)은 Kitto Life 사 (Korea)에서 입수하였다. 무수 숙신산, 숙신산, N-히드록시 숙신이미드(NHS), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보이미드 염산(EDC), 무수 N,N-디메틸 포름아미드 및 무수 디메틸은 Sigma-Aldrich에서 입수하였다. 톨루엔 및 클로로포름은 사용 전에 건조시켰다.

[53] **실시예 1: CS-g-(PA-PEG) 키토산-폴리머 복합체**

[54] **(1) 폴리(에틸렌 글리콜)-폴리알라닌 (PEG-PA) 2원 블록 공중합체의 합성**

[55] CS-g-(PA-PEG)는 도 1에 나타낸 바와 같은 스킴에 따라 PEG 존재 하에서 알라닌의 N-카르복시 무수물의 개환중합반응에 의하여 제조되었다. 즉, 플라스크 내에서 PEG (10.0 g, 5.0 mmol)를 건조된 톨루엔 (200 mL)에 녹였다. 톨루엔(190 mL)을 증류 제거하여 잔류물을 제거하였다. 그 후, 상기 반응 혼합물을 40℃로 온도를 냉각한 후 L-알라닌의 N-카르복시 무수물 (5.0 g, 49.5

mmol)을 무수 클로로포름/무수 N,N-디메틸포름이미드(3/1 v/v) 공용매(40 mL)에 녹인 후 상기 플라스크에 첨가하고, 40℃에서 19 시간 동안 중합반응을 진행하였다. 상기 반응 생성물을 디에틸에테르 내에서 침전하여 고분자를 분리한 후 잔존 용매를 진공펌프로 제거하였다. 그 다음, PEG-PA의 아민그룹을 무수숙신산과 반응시켜 카르복시산으로 말단을 변화시켰다. 즉, PEG-PA (5.7 g; 2.1 mmol)을 무수클로로포름 (40 mL)에 녹인 후 24 시간 동안 무수숙신산(0.43 g; 4.3 mmol)과 반응시켰다. 반응물을 디에틸에테르에 침전하여 고분자를 분리한 후 용매를 진공펌프로 제거하였다. 이 최종 물질을 투석막 (컷-오프 분자량=1,000 달톤)을 이용하여 정제하였다.

[56] **(2) CS-g-(PA-PEG)의 합성**

[57] N-히드록시 숙신이미드 (0.081 g, 0.7 mmol)를 카르복시산 말단을 갖는 PEG-PA (1.0 g, 0.4 mmol) 수용액 (50 mL)에 첨가하고 0℃에서 15 분간 교반하면서 반응시킨 후, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카보이미드 염산 (EDC) (0.14 g, 0.7 mmol)과 0℃에서 4 시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 그 다음, 키토산 (0.56 g)을 증류수 10 mL에 용해시키고 0℃에서 한 시간 동안 실시예 1에서와 같이 제조한 폴리(에틸렌 글리콜)-폴리알라닌 (PEG-PA) 블록 공중합체에 적하시켰다. 상기 반응 혼합물을 실온(20℃)에서 72 시간 동안 교반하면서 반응시킨 후 반응물을 맴브레인 (컷-오프 분자량 = 8,000 달톤)으로 투석하고 동결건조하여 분말로 만들어 키토산-폴리머 복합체를 수득하였다.

[58] **(3) CS-g-(PA-PEG)의 특성 분석**

[59] ^{1}H- 및 ^{13}C-NMR 분석

[60] 상기 제조된 키토산-폴리머 복합체의 조성을 결정하기 위해 CF_3COOD 에서 ^{1}H-NMR 스펙트럼(500 MHz NMR spectrometer; Varian 사용)을 측정하여 도 2에 나타내었다. CS-g-(PA-PEG) 수용액(6.0 중량% in D_2O)의 ^{13}C-NMR 스펙트럼의 변화를 pH 및 온도에 따라 조사하였다. 각 시료들을 각 온도와 pH에서 20분간 평형화시켰다.

[61] 겔 침투 크로마토그래피 분석

[62] 굴절률 검출기(refractive index detector)를 구비한 겔 침투 크로마토그래피 시스템 (Waters 515, Waters)으로 상기 제조된 키토산-폴리머 복합체의 분자량 및 분자량 분포를 조사하였다. 물/아세토니트릴 (80/20 v/v)을 용출 용매로서 사용하고 Ultrahydrogel™ 120 (Waters)을 컬럼으로 사용하였다. 분자량이 400 내지 150,000 달톤인 PEG를 분자량 표준으로서 사용하였다.

[63] 열분석

[64] CS-g-(PA-PEG)에 대한 시차 주사 분석(differential scanning analysis; TA instrument DSC Q10)을 질소 대기 하에서 실행하였다. 4.5 mg의 폴리머를 10℃/min의 가열 및 냉각 속도로 0℃로부터 200℃까지 가열한 후 0℃까지 냉각시켰다. 열 중력 분석(thermal gravitation analysis) (TA instrument TGA Q50)에서, 10.0 mg의 폴리머를 질소 대기 하에서 10℃/min의 가열 속도로

가열하고 질량 변화를 측정하였다.

[65] **(4) CS-g-(PA-PEG)의 졸-겔 전이 특성 분석**

[66] 동역학 분석(Dynamic mechanical Analysis)

[67] 상기 제조된 키토산-폴리머 복합체를 포함하는 수용액의 졸-겔 전이 특성을 동역학 분석을 통하여 분석하였다.

[68] CS-g-(PA-PEG) 수용액(6.0 중량%)의 계수를 pH 및 온도에 따라 동역학 유동측정기(dynamic rheometry)(Rheometer RS 1; Thermo Haake)로 조사하였다. 상기 수용액의 pH는 1.0 M 염산 또는 1.0 M 수산화나트륨 수용액으로 조절하였다. 폴리머 수용액을 25 mm 지름 및 0.5 mm 간격의 평행 평판(parallel plate) 사이에 위치시켰다. 동역학 분석 동안에, 시료를 물을 함유한 솜을 갖는 챔버 내부에 위치시켜 물 증발을 최소화시켰다. 제어된 스트레스 조건(4.0 dyne/cm^2) 및 1.0 rad./s의 빈도 하에서 데이터를 수집하였다. 가열속도는 0.5 ℃/min이었다.

[69] **(5)CS-g-(PA-PEG)의 온도 및 pH에 따른 졸-겔 전이 특성 분석**

[70] CS-g-(PA-PEG)의 겉보기 pK_a 및 이온화 정도

[71] 키토산 및 CS-g-(PA-PEG) 수용액(1.2 중량%)의 pH 변화를 온도에 따라 조사하였다. 키토산 및 CS-g-(PA-PEG)의 이온화 정도 또한 pH의 기능으로서 키토산 수용액 (1.2 중량%)에 대하여 조사하였다.

[72] FTIR 분석

[73] CS-g-(PA-PEG)의 폴리알라닌의 이차 구조 정보를 얻기 위해 폴리머 수용액(6.0 중량% in D_2O)의 IR 스펙트럼(FTIR spectrophotometer FTS-800; Varian)을 pH 및 온도의 기능으로서 조사하였다.

[74] CD(Circular Dichroism) 분석

[75] pH 및 온도에 따라 CS-g-(PA-PEG) 수용액(0.05 중량%)의 타원율을 원평광이색성 (circular dichroism) 장치 (J-810; JASCO) 를 사용하여 조사하였다. 평균 잔기 타원율 [Θ] (degcm^{2}dmol^{-1})을 다음 식에 따라 계산하였다: $[\Theta] = [\Theta]_{obs}$ MRW/(10*l*c). MRW는 펩티드의 평균 잔기 분자량, 즉 아미노산의 수에 의해 나누어진 펩티드 분자량이다. 폴리알라닌에 있어서, 이는 단순히 71개의 알라닌 반복 유닛의 분자량이다. *l* 은 세포의 광로 길이 (1.0 cm) 이며 c 는 폴리머의 폴리펩타이드 함수와 폴리머 농도의 곱에 의해 보정된 폴리펩타이드 농도(mg/ml)이다.

[76] 투과 전자 현미경(Transmission Electron Microscopy) 분석

[77] pH 3.0 및 9.0에서의 CS-g-(PA-PEG) 수용액 (0.05 중량%, 10 μL)을 카본 그리드에 위치시키고 초과된 용액을 필터 페이퍼로 블롯팅하였다. 그리드를 24 시간 동안 실온에서 공기건조시켰다. 200 kV 가속 전압의 JEM-2100F (JEOL)로 현미경 이미지를 산출하였다.

[78] 동적 광 산란법(Dynamic Light Scattering)

[79] 물(1.2 중량%)에서의 CS-g-(PA-PEG) 응집체의 외형 크기(apparent size)를, pH

3.0 및 pH 9.0에서 온도의 기능으로서 동적 광 산란 기구(ALV 5000-60x0)로 측정하였다. 532 nm에서 작동하는 YAG DPSS-200 레이저 (Langen, Germany)를 광원으로서 사용하였다. 산란된 광의 측정은 입사빔(incident beam)에 대하여 90°의 각도로 이루어졌다. 동적 광 산란법의 결과를 정규화된 CONTIN 방법으로 분석하였다. 감쇠율(decay rate) 분포를 명백한 확산계수로 전환시켰다. 확산계수로부터, 폴리머 응집체의 명확한 유체역학적 크기를 Stokes-Einstein 방정식을 사용하여 수득할 수 있다.

[80] **<분석결과>**

[81] PEG-PA(PEG-PA-NH_2)의 아미노 말단기가 숙신산 무수물과 반응하여 카르복시산 말단을 갖는 PEG-PA가 생성되었으며, 이것이 키토산의 아민기와 결합하여 CS-g-(PA-PEG)가 형성되었다. EDC 및 NHS가 결합 반응에서 촉매로서 사용되었다(도 1의 스킴 참조). 물/아세토니트릴 공용매에 용해된 PEG-PA 및 CS-g-(PA-PEG)의 겔 침투 크로마토그래피 결과는 분자량의 단봉 분포(unimodal distribution)를 나타낸다. PEG-PA와 비교했을 때, PEG-PA와 키토산 사이에 결합작용이 일어난 후 CS-g-(PA-PEG)의 체류시간이 24분에서 22.5분으로 감소되었다. PEG-PA 및 CS-g-(PA-PEG)의 구조는 CF_3COOD에서 ^{1}H-NMR에 의해 분석하였다 (도 2). 1.4 ppm 내지 1.9 ppm (PA의 CH_3CONH-), 3.6 ppm 내지 3.7 ppm (PEG 말단 그룹의 -OCH_3), 및 3.8 ppm 내지 4.1 ppm (PEG의 -OCH_2CH_2)에서의 피크에 의해 계산된 PEG-PA의 각 블록의 분자량은 2,000 달톤 내지 800 달톤이었다. C1 위치에서의 메틴 프로톤(5.3 내지 5.6 ppm) 및 아세틸기(2.3 ppm 내지 2.5 ppm)에 의해 계산된 키토산의 탈아세틸화 정도(도 1의 m/(n+m))는 84.5%이었다. 도 1에 있어서 y/(x+y+n)에 의해 규정되는 그래프트 비율을 키토산의 C1 위치에서의 메틴 프로톤(5.3 ppm 내지 5.6 ppm) 및 폴리알라닌(PA)과 키토산 사이에 결합된 숙신산에테르의 에틸렌 양성자(2.7 ppm 내지 2.9 ppm)에 의해 계산하였다. 상기 그래프트 비율은 49.6%이었다. 상기 분석 결과를 근거로 한, 도 1의 CS-g-(PA-PEG)의 각 블록 비율(x/y/n)은 34.9/49.6/15.5이었다. 키토산의 분자량 7,500 달톤을 기초로, CS-g-(PA-PEG)의 구조에 대하여 x=16, y=22 및 n=7로 계산하였다.

[82] 질소 대기 하에서의 시차 주사 열량계 및 열 중력 분석으로, CS-g(PA-PEG)가 48℃의 용융점 및 415℃의 분해온도를 갖는 것을 확인하였다(도 3 참조).

[83] PEG-PA 및 CS-g-(PA-PEG) 의 수용액은 양자 모두 온도 증가에 따라 졸-겔 전이를 나타내었다. PEG-PA 및 CS-g-(PA-PEG) 수용액 (6.0 중량%)의 점성은 10℃ (졸 상태)에서 37℃ (겔 상태)로 증가함에 따라 0.01 Pas 내지 0.1 Pas에서 20 Pas로 증가하였으며, 16℃ 내지 22℃ 및 25℃ 내지 32℃에서 점성이 200배 이상 증가하는 것은 각각 PEG-PA 및 CS-g-(PA-PEG)의 수용액의 졸-겔 전이를 나타내는 것이다 (도 4a). 변이되지 않은 키토산 수용액은 같은 온도 범위에서 유의성있는 점성의 변화가 없었다. 이전의 온도민감성 CS-g-PEG는 겔 상태에서 6 Pas의 점성을 나타낸다고 보고되었다. 겔 점성 또는 계수의 조절은 약물 수송

및 조직공학 적용에 중요하다. 제니핀(genipin)으로 CS-g-PEG을 화학적 가교결합시킨 후, 우혈청 알부민(BSA)이 40일 동안 소량의 초기 버스트(burst) 방출(< 20 %)을 수반하는 서방성 방출을 보였으며, 변이되지 않은 CS-PEG은 첫째 날에 약 50% 내지 70%의 유의성있는 초기 버스트 BSA 방출을 나타냈다. 수화겔의 단단함 역시 3D 생체외 배지에서 연골세포의 증식 및 분화에 영향을 미친다. 수화겔을 통한 산소 및 영양소의 투과성 이외에, 성장 세포에 대한 기계적 자극 및 스트레스에서의 차이가 이러한 작용에 원인이 된다.

[84] 계수에서의 변화를 온도뿐만 아니라 pH에 따라 조사하였다. 키토산은 6.5의 pK_a 값을 갖는 아민 그룹을 갖는다. pH 3.0에서, 키토산의 아민 그룹은 양자화되어 암모늄 그룹을 형성하며, pH 9에서 키토산의 아민 그룹 대부분이 중성 아민 그룹으로서 존재한다. $pH=pK_a=6.5$에서, 아민 그룹과 암모늄 그룹은 동일 비율로 존재한다. 졸-겔 전이 온도는 저장 탄성률(storage modulus)(G')이 손상 탄성률(loss modulus)(G")을 넘는 교차점에 의해 결정될 수 있다. G' 및 G"는 복소 탄성률(complex modulus) (G*)의 점성 성분 및 탄성 성분을 측정한 값이다. G'가 G"보다 더 큰 경우 탄성 겔 형성을 나타낸다. pH가 6.5에서 3.0으로 감소함에 따라 졸-겔 전이 온도는 27℃에서 17℃로 감소하였으며, pH가 9.0으로 증가함에 따라 졸-겔 전이 온도는 32℃로 증가하였다 (도 4의 b). 겔 모듈러스로부터, 교차결합 사이의 분자량, 교차결합 분자량 (M_c)을 하기 식에 의해 계산할 수 있다:

[85] $M_c = \rho rRT/G'$ (1)

[86] 상기 식에서, ρ는 폴리머 농도(g/m^3)이고, R은 기체 상수이며, T는 절대 온도이다. 본 실시예에 비해, 6.0 중량% 폴리머 용액에 대한 ρ는 6.0×10^4 (g/m^3) 이었다. 37℃ 온도 하에서, pH 3.0, 6.5 및 9.0에서의 겔 모듈러스는 각각 396 Pa, 241 Pa, 및 43 Pa이므로, 상응하는 M_c는 각각 391 KD, 642 KD, 및 3596 KD이다. 이러한 계산식은 pH가 증가함에 따라 온도민감성 겔의 메쉬 사이즈가 증가함을 제시한다. 2-(디이소프로필아미노)에틸 메타크릴레이트 공중합체와 같은 통상적인 수화겔은, pH의 변화에 따라 폴리머의 충전된 종이 증가함에 따라 팽창하였다. 따라서, 수화겔 감소의 전하 및 모듈러스 사이의 정전기적 반발에 기인하여 충전된 형태에서 메쉬 사이즈가 증가하게 된다. 본원의 폴리머는, 충전된 형태를 갖는 낮은 pH에서 겔의 모듈러스가 증가한다는 점에서 모순되는 것이다.

[87] 졸-겔 전이 거동 및 겔 모듈러스의 이러한 변화를 이해하기 위해서, pH 및 온도의 기능으로서 하기 사항에 초점을 맞추어 상기 CS-g-(PA-PEG) 수용액을 분석하였다: 1) 키토산의 양자화 정도, 2) 폴리알라닌의 이차 구조, 및 3) PEG의 탈수화 범위.

[88] $$CS\text{-}NH_3^+ + H_2O \rightleftharpoons CS\text{-}NH_2 + H_3O^+,\ K_a=[CS\text{-}NH_2][H_3O^+]/[CS\text{-}NH_3^+] \quad (2)$$

[89] $\Delta pK_a = pK_a(T) - pK_a(T_{ref}) = pH(T) - pH(T_{ref})$ (3)

[90] 10℃에서 50℃로 온도가 증가함에 따라, CS-g-(PA-PEG) 수용액 (1.2 중량%)의 pH는 6.2에서 5.0으로 감소되었으며, 이는 식 (2)에서 평형상태가 우측으로 변동되었음을 나타낸다 (도 5). $\Delta pK_a/\Delta T$로서 규정된 온도에 대한 pK_a 의 민감도는 CS-g-(PA-PEG) 및 키토산에 대하여 각각 -0.022 및 -0.026 pK_a unit/℃이었다. 민감도 ($\Delta pK_a/\Delta T$)는 553 KD의 분자량 및 0.72의 탈아세틸화 정도를 갖는 키토산 (-0.00232 pK_a unit/℃) 및 글루코사민 (-0.0027 pK_a unit/℃)과 유사한 범위이다. 키토산, 글루코사민 및 CS-g-(PA-PEG) 사이의 유사한 양상은 온도에 대한 CS-g-(PA-PEG)의 pH 민감도가 키토산의 암모늄/아민 그룹의 탈양자화로부터 기인한 것임을 나타내는 것이다.

[91] 저온에서는 G"이 크나, 전이 온도에서는 G'=G"이 되고, G'이 G"보다 클 경우, 겔로 정의할 수 있다. 즉, G'이 G"보다 크면 겔, 작으면 졸로 정의할 수 있다.

[92] 주사 가능한 생체 재료로 이용하기 위해서는 체온 근처 (32℃ 내지 42℃)에서 겔 상태로 존재하여야 한다 (도 4의 b). 따라서, 본원에 따른 CS-g-(PP-PEG)는 의약 전달 시스템 및 조직 공학에 응용될 수 있을 것이다.

[93] CS-g-(PA-PEG) (6.0 중량% in D_2O)의 FTIR 스펙트럼 및 ^{13}C-NMR 스펙트럼을 pH 9의 고정 pH 하에서 온도에 따라 조사하였다. 도 6a 및 도 6b는 본 실시예에 따른 CS-g-(PA-PEG) 수용액(6.0 중량%)의 FTIR 스펙트럼(a) 및 ^{13}C-NMR 스펙트럼 (b)을 나타낸 것이다. 도 6a를 참조하면, 1630 cm^{-1} 내지 1640 cm^{-1} (랜덤 코일(random coil)) 또는 1620 cm^{-1} 내지 1630 cm^{-1} (β-시트)에 대한 1650 내지 1660 cm^{-1} (α-헬릭스)에서 피크 높이에 의해 이차구조 비율을 평가할 수 있었다. 온도가 10℃에서 50℃로 증가함에 따라, 1650 cm^{-1} 내지 1660 cm^{-1} 에서의 피크도 증가하였으며, 이는 PA의 α-헬릭스 구조의 비율이 증가한다는 것을 나타내는 것이다 (도 6a). 온도가 증가함에 따른 이차구조의 보강은 폴리알라닌-폴록사머-폴리알라닌, HOOC-GKLKLKLKQQDLELDLEG-NH_2와 같은 β-스트랜드 양친매성 펩타이드 및 엘라스틴-기저 폴리머에 대한 보고에서 β-시트 구조가 온도 증가에 따라 보강된다고 이미 보고된 것이다.

[94] ^{1}CS-g-(PA-PEG) (6.0 중량% in D_2O)의 ^{13}C-NMR은 72.3 ppm 내지 72.5 ppm(확대된 스펙트럼)에서 PEG의 에틸렌옥사이드기, 폴리아닐린 및($PA-CH_3$; 17 ppm 내지 19 ppm) 및 키토산의 메틸기($CS-CH_3$; 23 ppm 내지 25 ppm)의 피크 톱이가 졸-겔 전이 온도 바로 아래에서 최대임을 보여준다 (도 6b). 이러한 관찰은, 폴리(락티드-코-글리코리드)/폴리(에틸렌글리콜)(PLGA/PEG), 및 폴리포스파젠/PEG의 경우에서와 같이, 온도가 상기 졸-겔 전이 온도로 증가하는 것과 같이 PEG의 분자 이동이 감소되었음을 시사하는 것이다.

[95] 또한, pH의 기능으로서 상기 변이를 연구하였다. 키토산 및 CS-g-(PA-PEG)의 아민기의 이온화 정도를 pH의 기능으로서 조사하였다(도 7a). 예상된 바와 같이, 이온화 정도는 pH의 증가에 따라 감소되었다. 50%의 이온화 정도가 나타난 pH가 폴리머의 pK_a 이다. 키토산 및 CS-g-(PA-PEG)의 pK_a는 각각 6.5 및 6.0으로 관찰되었다.

[96] FTIR 스펙트럼은 pH 증가에 따라 상대적인 α-헬릭스 구조가 감소함을 시사한다. CS-g-(PA-PEG) 수용액(0.05 중량%)의 CD 스펙트럼은 폴리펩타이드의 통상적인 α-헬릭스 구조 및 α-헬릭스 밴드 또한 3의 산성 pH에서 가장 우세하고 pH가 증가함에 따라 감소함을 보여준다 (도 7c). CS-g-(PA-PEG) 수용액 (6.0 중량% in D_2O)의 ^{13}C-NMR 스펙트럼은 30℃의 고정 온도 하에서 pH의 기능으로서 수득된 것이다(도 7d). 30℃에서, pH 3.0 및 6.5에서 겔 상태를 나타낸다. 그러므로, 72.3 ppm 내지 72.5 ppm (확대된 스펙트럼)에서의 PEG의 에틸렌옥사이드 그룹, 23 ppm 내지 25 ppm에서의 키토산의 메틸 그룹 ($CS-CH_3$) 및 17 ppm 내지 19 ppm에서의 폴리알라닌의 메틸 그룹($PA-CH_3$; 17 내지 19 ppm)의 피크 높이가 pH 9.0 (졸 상태)에서보다는 pH 3.0에서 좀더 낮다. 졸-겔 전이 온도 바로 아래에서 pH 9보다 pH 3에서 CS-g-(PA-PEG)의 더 큰 G" 이외에(도 4b), pH 3.0에서의 PEG 피크의 업필드 시프트(upfield shift)는 PEG와 키토산 사이의 수소결합이 산성 pH와 관련된 것임을 나타내는 것이다. 산성 pH에서 PEG 산소의 단순 탈양자화는 PEG 단일 분자를 좀더 유체역학적으로 만들 수 있다. 그러나, PEG 피크가 pH 9.0에서보다 pH 3.0에서 상당히 낮다는 사실은 PEG와 키토산의 암모늄 그룹 사이의 사슬간 수소결합을 통해 PEG의 분자이동이 제한됨을 나타내는 것이다.

[97] 폴리머의 나노구조는 겔 구조가 이들의 나노조립 패턴으로부터 유래된 것이기 때문에 중요하다. 키토산이 pH 3.0에서 양자 형태로서 상당히 소수성인 반면 pH 9.0에서는 중성 형태로 소수성이 덜하기 때문에 CS-g-(PA-PEG)의 나노구조는 pH에 의해 영향을 받을 수 있다. 수용액 내에서의 CS-g-(PA-PEG)의 자가-조립도를 pH 3.0 및 pH 9.0에서 비교하였다 (도 8). pH 3.0에서, 폴리머는 특정 나노조립 구조를 형성하지 않는 반면, pH 9.0에서 폴리머는 응집된 마이셀 구조를 나타냈다.

[98] 물(1.2 중량%)에서의 폴리머 조립체의 외형 크기를 온도의 기능으로서 동적 광산란법으로 조사하였다 (도 9). pH 3.0에서, 온도가 15℃로부터 20℃ 및 25℃까지 증가됨에 따라 폴리머 조립체의 외형 크기의 상당한 증가가, 80 nm로부터 300 nm 및 1500 nm까지에서 관찰되었으며, 이는 졸-겔 전이 온도와 일치하는 결과이다. 관찰 결과는 pH 3.0에서 폴리머 사이의 광범위한 분자간 상호작용을 시사한다. pH 9.0에서, 37 nm의 피크 평균 크기를 갖는 폴리머 조립체의 외형 크기는 30℃ 이상에서 증가하기 시작하였다. 그러나, pH 9에서의 폴리머 조립체의 크기 증가는 pH 3.0에서만큼 크지 않았으며, 이는 pH 9.0에서 50℃ 이하에서 마이셀 구조가 보존되는 것으로 보여짐을 시사하는 것이다.

[99] 상기 결론에 기초하여, 수화겔 구조를 도 10에 도시하였다. pH 3.0에서 키토산의 아민 그룹은 우세하게 양자화된 아민 그룹으로서 존재하여 CS-g-(PA-PEG)의 키토산을 친수성으로 만든다. 소수성 폴리알라닌 그룹이 PEGs 및 키토산의 친수성 블록 중에서 분리되어, 폴리머는 특정 나노구조로 조립될 수 없다. 대신에, 폴리머는 PEG의 산소와 암모늄 이온 사이의 대규모 수소결합으로

무작위로 응집될 수 있다. 키토산과 PEG 사이의 분자간 수소결합 및 대규모의 무작위 응집에 의해 저온에서 졸-겔 전이가 나타난다. 또한, 큰 계수를 갖는 겔이 온도 증가에 따라 형성된다.

[100] pH 9.0에서, 키토산은 중성 아민 형태로서 존재해 키토산이 소수성을 덜 나타내도록 한다. 그러므로, CS-g-(PA-PEG)의 소수성 PA 및 키토산이 마이셀의 소수성 코어로서 작용하고 PEG가 마이셀의 친수성 셀로서 작용한다. 따라서, 폴리머 수용액은 적은 점성을 나타내고 졸-겔 전이 온도는 3.0 또는 6.5의 낮은 pH에 비해 9.0의 높은 pH 하에서는 고온이다. 졸-겔 전이는 마이셀 응집 및 결합에 의해 유도된다.

[101] 그러므로 pH 9.0에서 중성 형태인 것보다 pH 3.0에서 전하를 띤 형태가 온도민감성 겔의 명백히 더 작은 메쉬 크기를 갖는데 이는 나노조립성, PEG 및 키토산 사이의 사슬내 교차결합 α-헬릭스에서 풍부한 폴리알라닌의 이차구조에서의 차이에 의한 것이다.

[102] 상기한 바와 같이, 본원의 일 실시예의 CS-g-(PA-PEG)는 신규한 pH/온도 민감성 키토산-폴리머 복합체이다. 졸-겔 전이 온도, 키토산의 양자화/또는 이온화 정도, 폴리아닐린의 이차 구조, 및 PEG의 분자 이동을 pH 및 온도의 기능에 따라 상기와 같이 조사한 결과, 온도가 증가함에 따라, 키토산은 탈양자화되고, 폴리아닐린의 α-헬릭스 이차 구조가 강화되며, PEG의 분자 이동이 감소하여, 열겔화가 발생하였다. 반면에, pH가 증가함에 따라, 키토산의 암모늄기가 탈양자화되고 폴리아닐린의 α-헬릭스 함량이 감소하며, PEG가 광범위한 사슬간 수소결합으로부터 해방되어 높은 pH에서 졸-겔 전이 온도 및 겔 계수가 증가되도록 한다.

[103] **실시예 2: CS-g-(PP-PEG) 수용액의 동물 내 졸-겔 전이 특성**

[104] 0.5 mL의 CS-g-(PP-PEG) 수용액 (6.0 중량%)을 쥐의 피하 (subcutaneous layer)에 주사하여 수화겔의 생성 및 분해 거동을 관찰하였다. 주사 후에 1, 10, 14 일 후에 수술하여 주사 후 10일 이상의 기간 동안 체내에서 겔 상태로 존재하는 것을 볼 수 있다 (도 11 참조). 따라서, 본원에 따른 CS-g-(PP-PEG)를 이용하는 경우, 단순한 주사를 통하여 임플란트를 만들 수 있다는 것이 검증되었다.

[105] 상기에서는 본원의 바람직한 구현예 및 실시예를 참조하여 설명하였지만, 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 하기의 특허 청구의 범위에 기재된 본원의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본원을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

청구범위

[청구항 1] 폴리(에틸렌 글리콜) 블록과 키토산 사이에 결합된 소수성 폴리펩타이드 블록을 포함하는, 키토산-폴리머 복합체.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 폴리(에틸렌 글리콜)의 분자량은 300 내지 5,000 달톤이고,
상기 소수성 폴리펩타이드의 분자량은 300 내지 10,000 달톤이고,
상기 키토산의 분자량은 1,000 내지 1,000,000 달톤이며, 상기 키토산-폴리머 복합체의 분자량은 8,000 내지 2,000,000 달톤인, 키토산-폴리머 복합체.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 소수성 폴리펩타이드 블록은, 글라이신, 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스팔산, 시스틴, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 발린, 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산을 포함하여 형성된 것인, 키토산-폴리머 복합체.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 소수성 폴리펩타이드는 DL-형 아미노산, D-형 아미노산, L-형 아미노산, 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 포함하는 것인, 키토산-폴리머 복합체.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 소수성 폴리펩타이드의 함량은 10 중량% 내지 60 중량%이고, 상기 폴리(에틸렌 글리콜)의 함량은 10 중량% 내지 60 중량%이고, 상기 키토산의 함량은 20 중량% 내지 80 중량%인, 키토산-폴리머 복합체.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 소수성 폴리펩타이드가 α-헬릭스 또는 β-시트(sheet) 구조를 가지는 것인, 키토산-폴리머 복합체.

[청구항 7] 제1항에 있어서,
수성 매질 내에서 pH 및 온도 민감성 졸-겔 전이특성을 가지는 것인, 키토산-폴리머 복합체.

[청구항 8] 제1항에 있어서,
수성 매질을 추가 포함하는, 키토산-폴리머 복합체.

[청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 키토산-폴리머 복합체 내에 혼입된 약물을 추가 포함하여 약물전달체로서 사용되는 것인, 키토산-폴리머 복합체.

[청구항 10] 제9항에 있어서,

상기 약물은 항암제, 호르몬, 항생제, 진통제, 항감염제, 단백질 또는 펩티드 의약, 핵산, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함하는 것인, 키토산-폴리머 복합체.

[청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 항암제는 탁솔, 아드리아마이신, 블레오마이신, 시스플라틴, 카보플라틴, 독소루비신, 5-플로로우라실, 메톡트렉세이트 또는 안티노마이신 D 를 포함하는 것인, 키토산-폴리머 복합체.

[청구항 12] 제10항에 있어서,
상기 단백질 또는 펩티드 의약은 옥시토신, 바소프레신, 루테나이징 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬, 인슐린, 글루카곤, 인터루킨, 인터페론, 가스트린, 칼시토닌, 에리쓰로포이어틴, 칼씨토닌, 엔돌핀, 앤지오탠신, 암 고사 인자 (TNF), 신경 성장 인자 (NGF), 뼈형성 폴리펩타이드 (BMP), 혈관형성 성장인자 (VEGF), 그래뉼로사이트 콜로니 자극 인자 (GCSF), 레닌 또는 항체를 포함하는 것인, 키토산-폴리머 복합체.

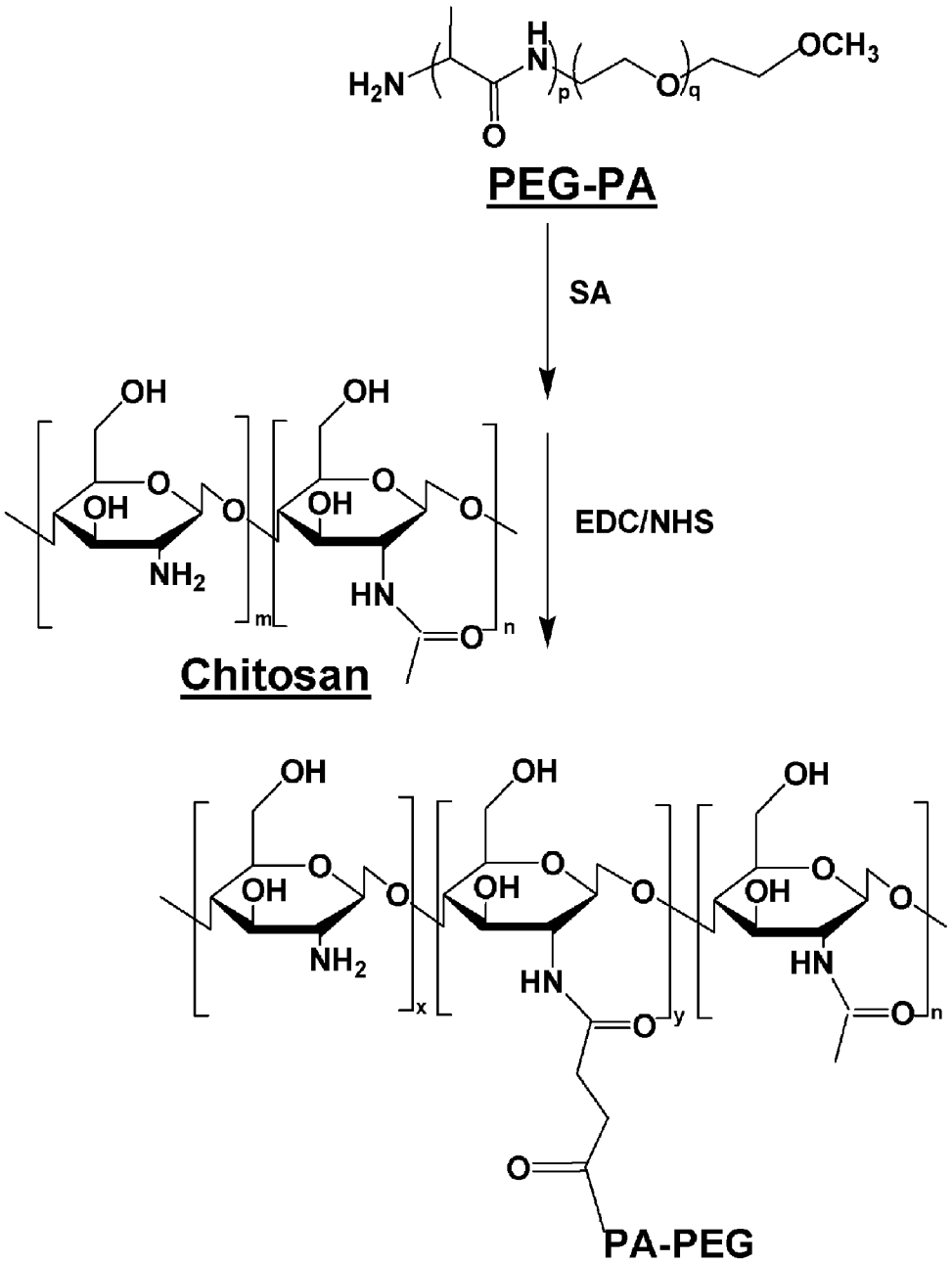
[청구항 13] 제10항에 있어서,
상기 핵산은 DNA, 플라즈미드 DNA, RNA, RNAi, 또는 siRNA 를 포함하는 것인, 키토산-폴리머 복합체.

[청구항 14] 제1항에 있어서,
조직공학용 지지체로서 사용되는 것인, 키토산-폴리머 복합체.

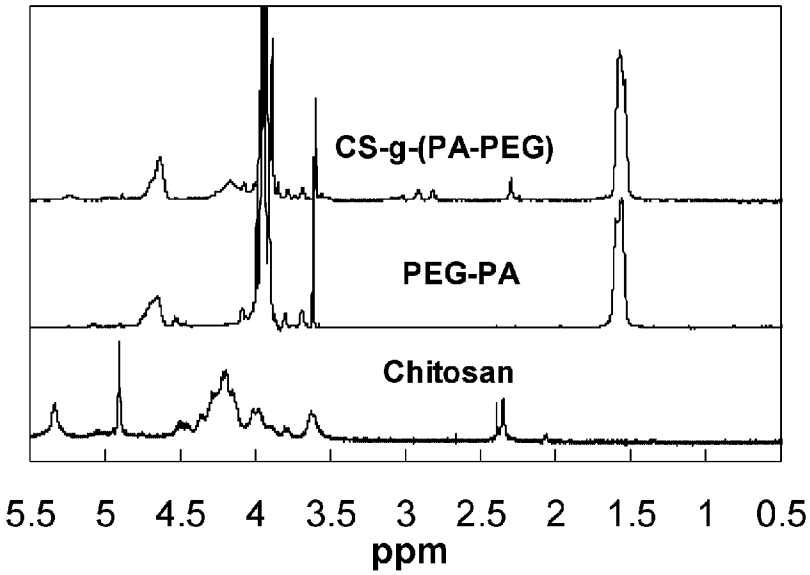
[청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 키토산-폴리머 복합체 내에 혼입된, 콘드로사이트, 배아 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 간세포, 심장 줄기 세포, 심근 세포, 내피 세포, 섬유아세포, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 세포를 추가 포함하는 것인, 키토산-폴리머 복합체.

[청구항 16] 제14항에 있어서,
마이크로드릴링을 통한 연골조직 재생 시 조직공학용 지지체로서 사용되는 것인, 키토산-폴리머 복합체.

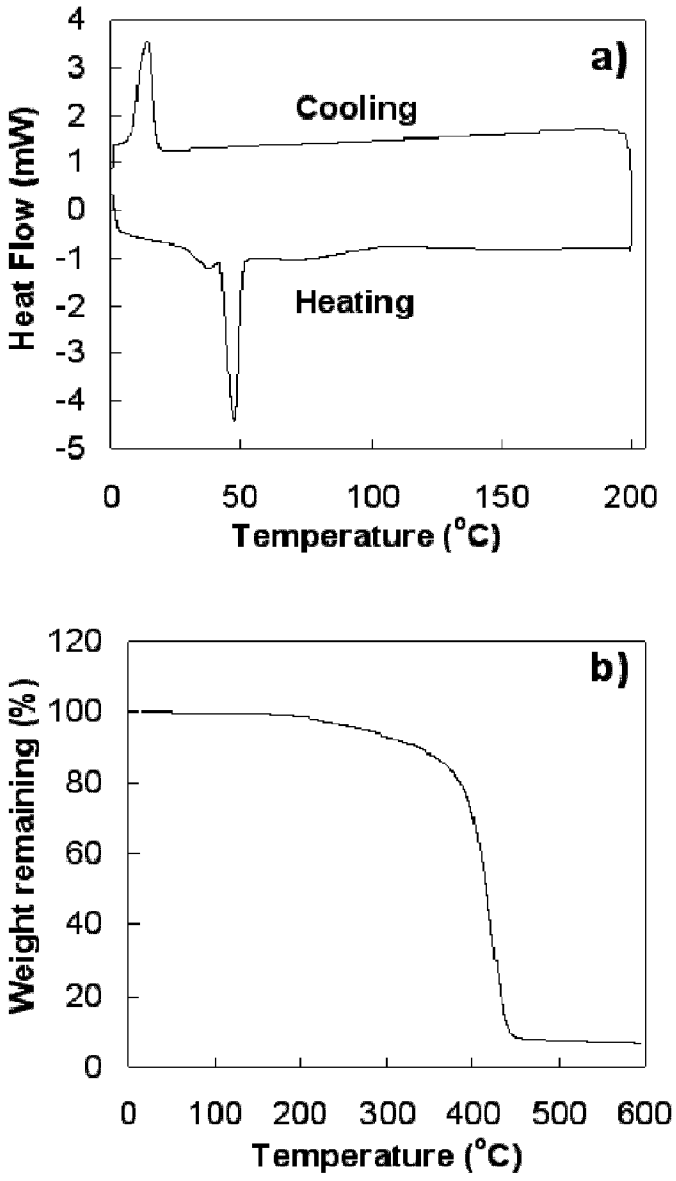
[Fig. 1]



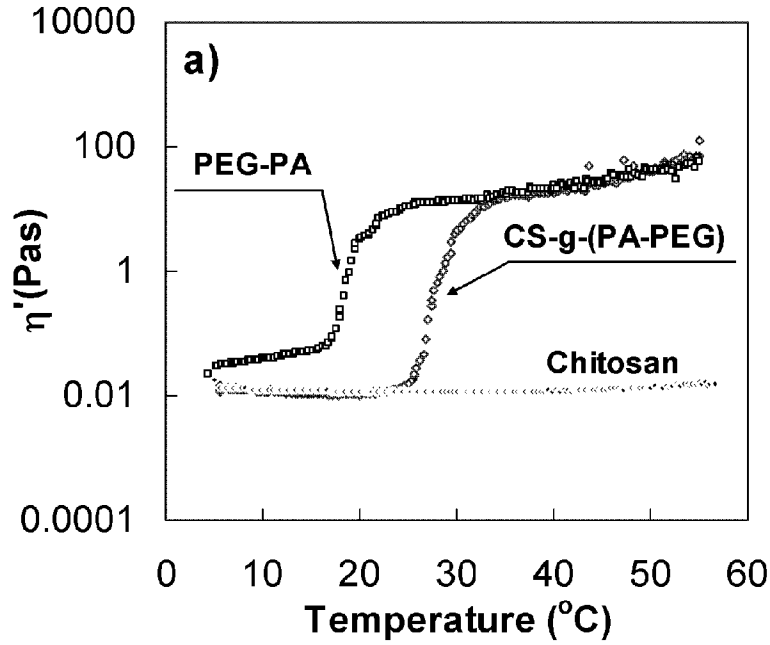
[Fig. 2]

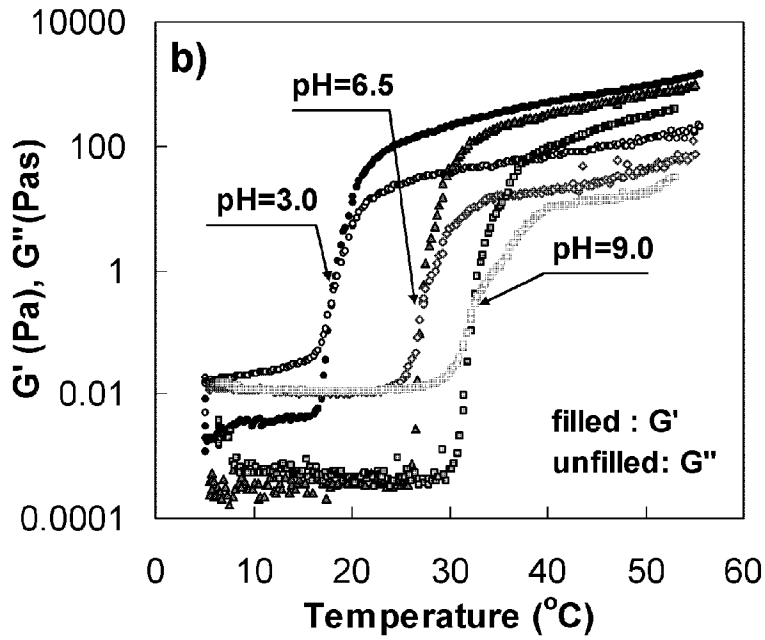

CS-g-(PA-PEG)
PEG-PA
Chitosan
5.5 5 4.5 4 3.5 3 2.5 2 1.5 1 0.5
ppm

[Fig. 3]

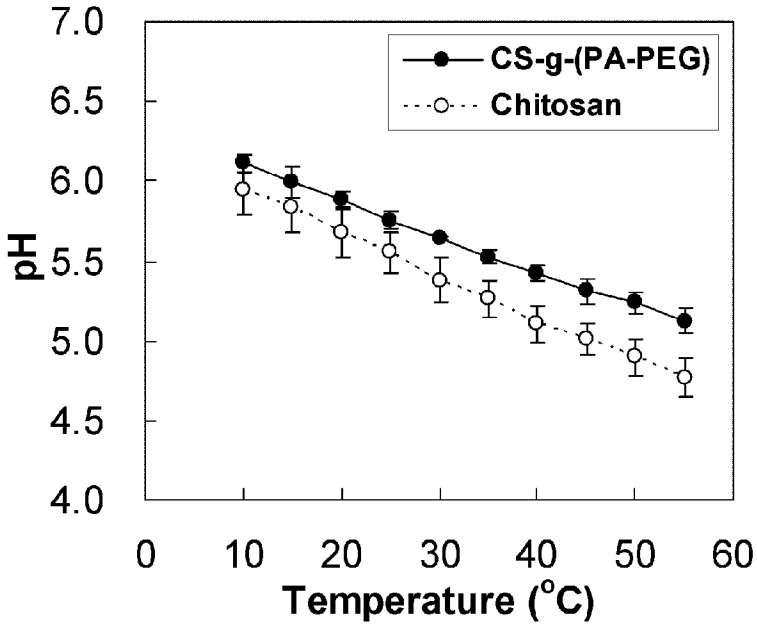

a)
Cooling
Heating
Heat Flow (mW)
4 3 2 1 0 -1 -2 -3 -4 -5
0 50 100 150 200
Temperature (°C)
b)
Weight remaining (%)
120 100 80 60 40 20 0
0 100 200 300 400 500 600
Temperature (°C)

[Fig. 4]

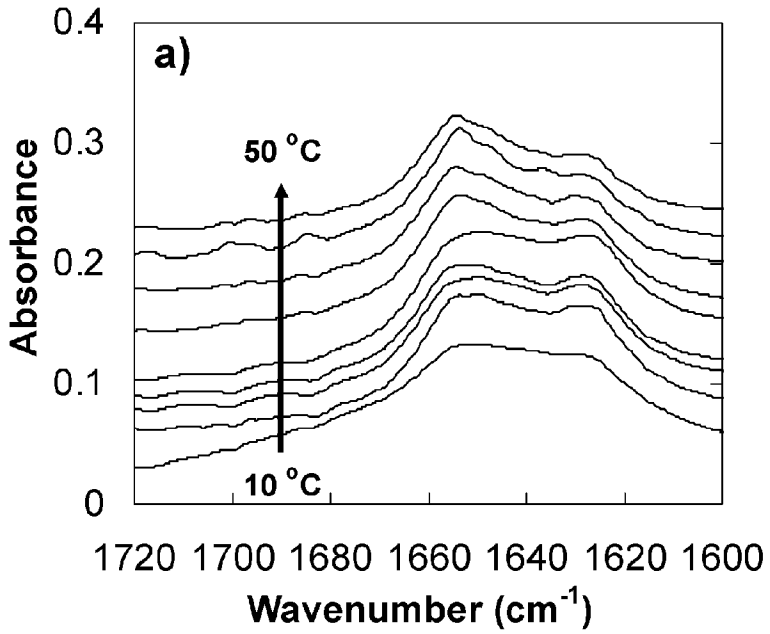

a)
PEG-PA
CS-g-(PA-PEG)
Chitosan
η'(Pas)
10000
100
1
0.01
0.0001
0
10
20
30
40
50
60
Temperature (°C)

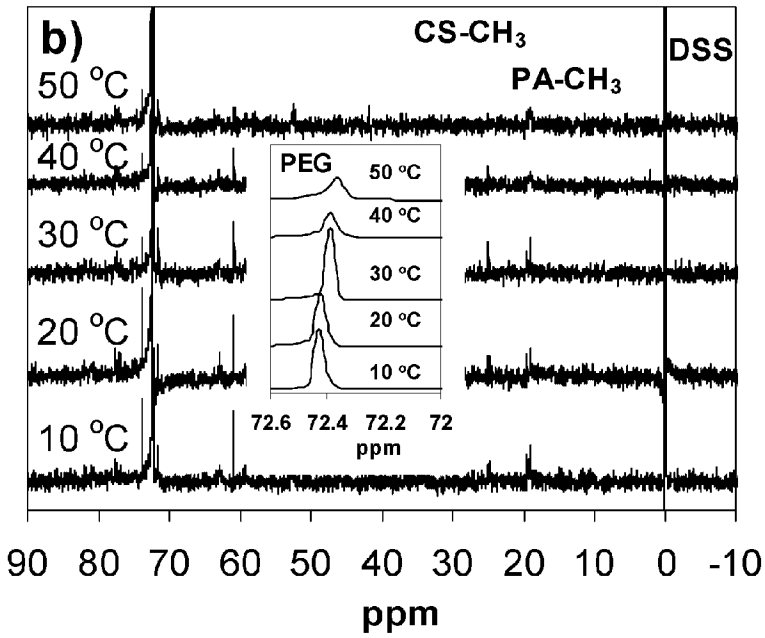

b)
pH=6.5
pH=3.0
pH=9.0
filled : G'
unfilled: G"
G' (Pa), G"(Pas)
10000
100
1
0.01
0.0001
0
10
20
30
40
50
60
Temperature (°C)

[Fig. 5]

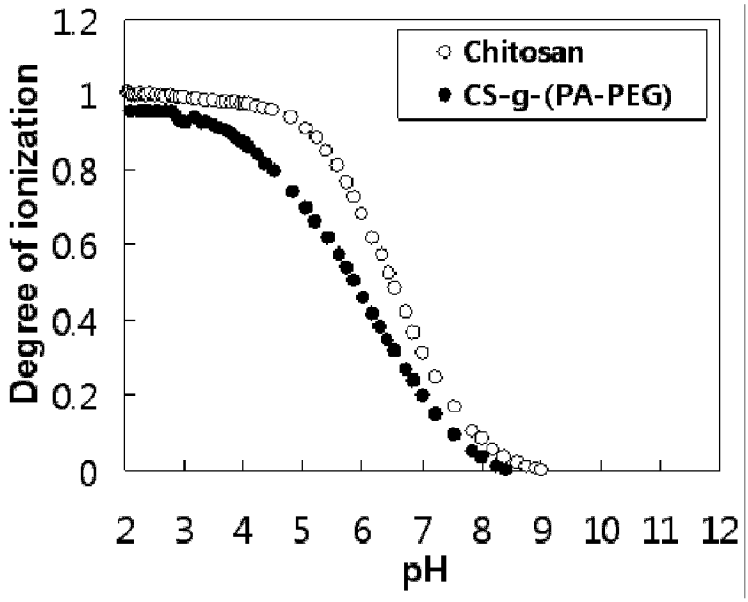

7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
pH
0
10
20
30
40
50
60
Temperature (°C)
CS-g-(PA-PEG)
Chitosan

[Fig. 6]

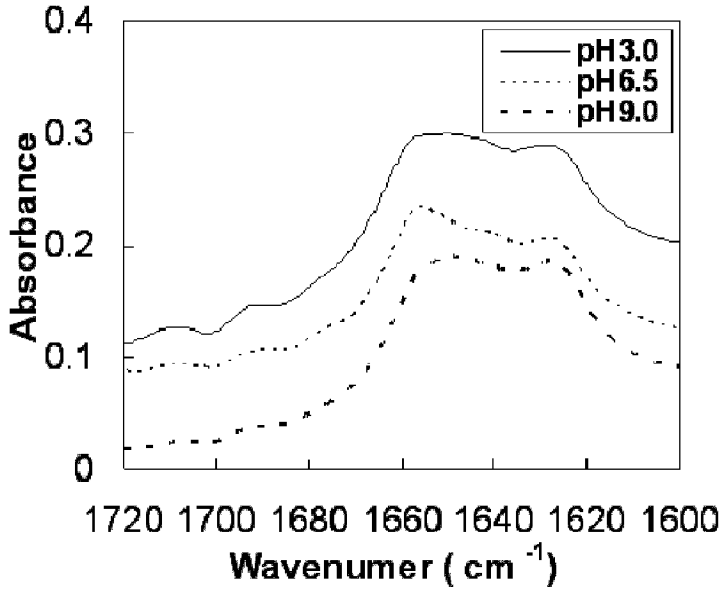

a)
50 °C
10 °C
Absorbance
0.4
0.3
0.2
0.1
0
1720 1700 1680 1660 1640 1620 1600
Wavenumber (cm-1)


b)
CS-CH3
PA-CH3
DSS
50 °C
40 °C
30 °C
20 °C
10 °C
PEG
72.6 72.4 72.2 72
ppm
90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 -10
ppm

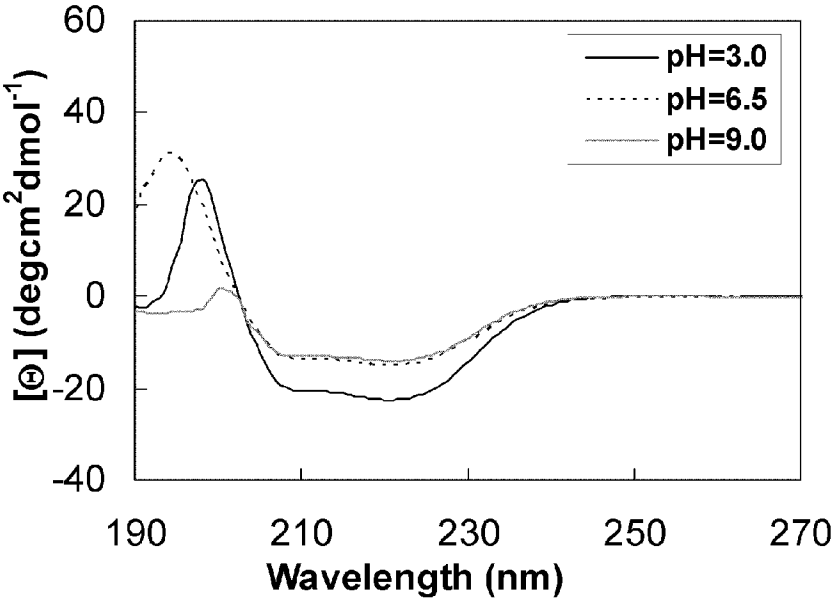
[Fig. 7a]


Chitosan
CS-g-(PA-PEG)
Degree of ionization
pH
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

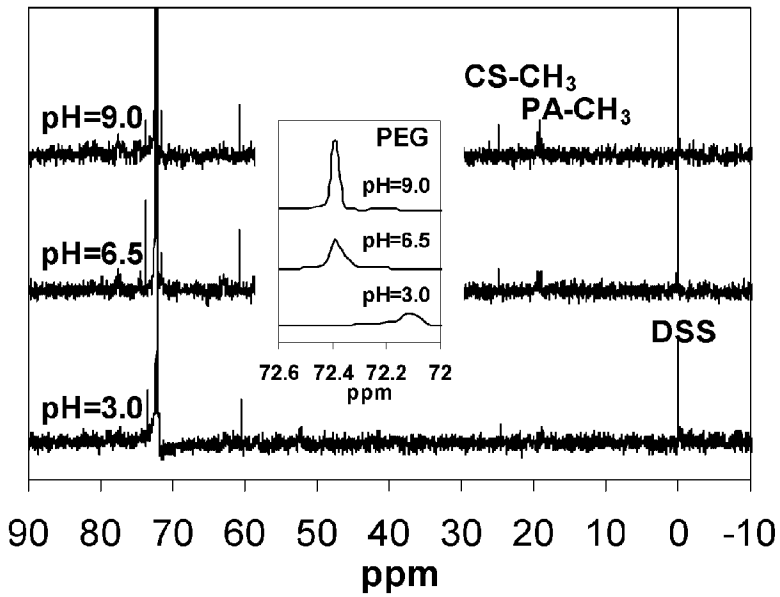
[Fig. 7b]


pH3.0
pH6.5
pH9.0
Absorbance
Wavenumer (cm -1)
0.4
0.3
0.2
0.1
0
1720 1700 1680 1660 1640 1620 1600

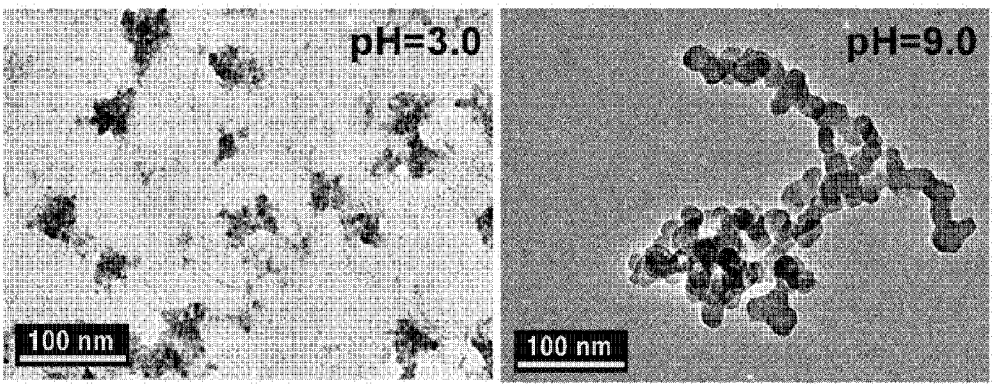
[Fig. 7c]



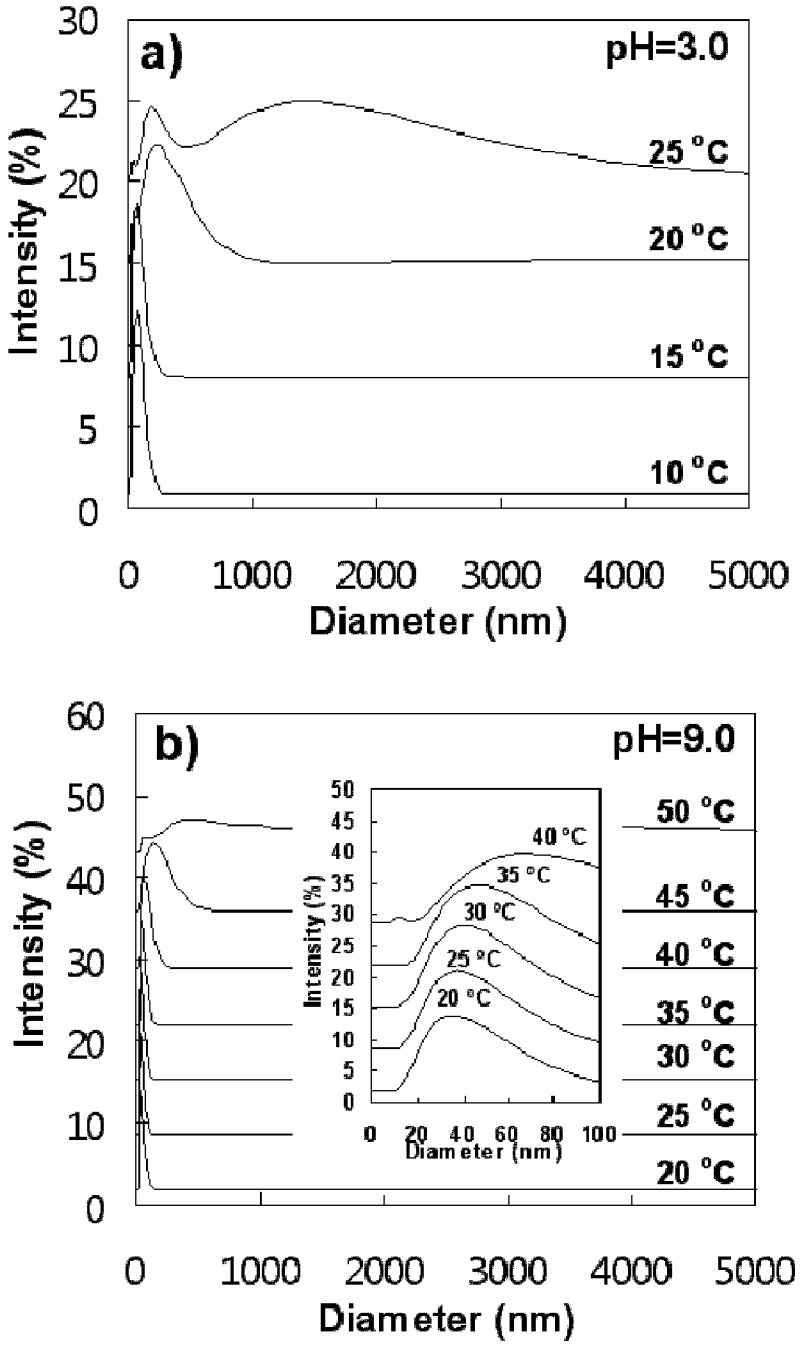
[Fig. 7d]



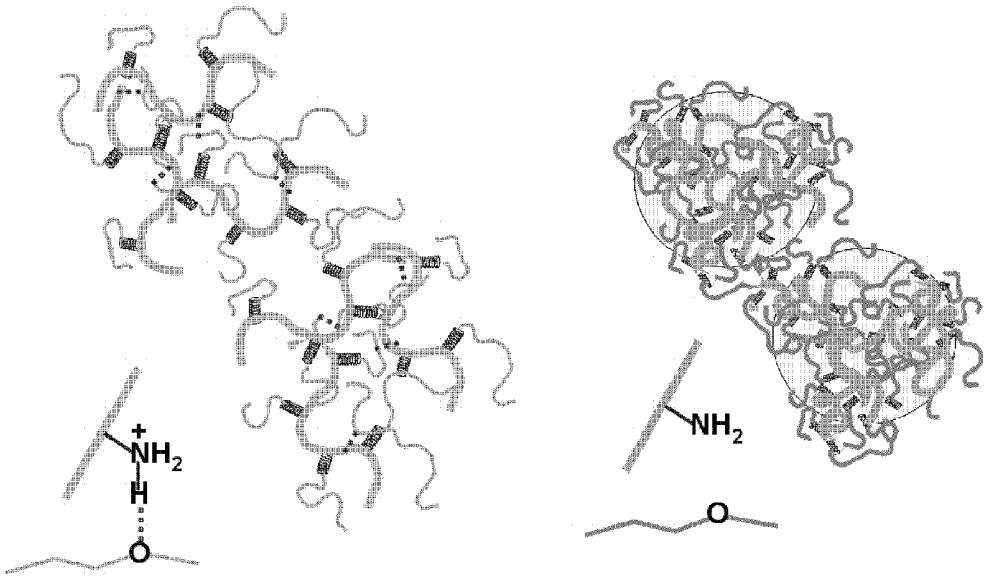
[Fig. 8]



[Fig. 9]

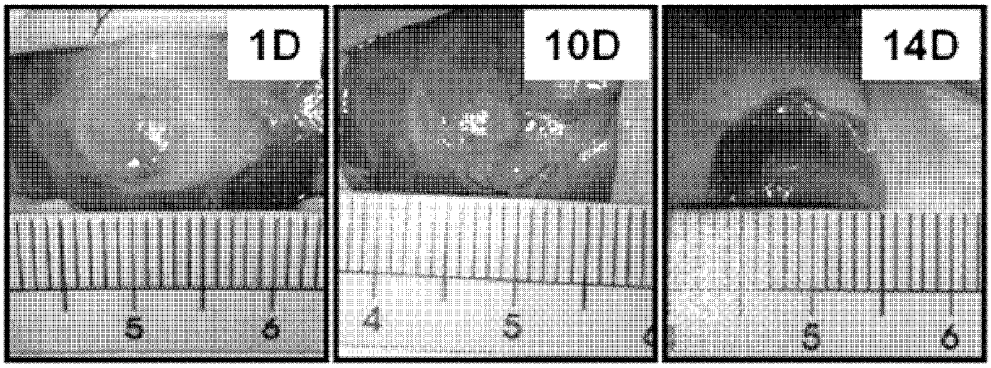

a)
pH=3.0
25 °C
20 °C
15 °C
10 °C
Intensity (%)
Diameter (nm)
b)
pH=9.0
50 °C
45 °C
40 °C
35 °C
30 °C
25 °C
20 °C
Intensity (%)
Diameter (nm)

[Fig. 10]



pH=3.0 pH=9.0

[Fig. 11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2011/007516

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08L 5/08(2006.01)i, C08L 71/02(2006.01)i, A61K 47/36(2006.01)i, A61L 27/20(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C08L 5/08; C08G 79/02; C08G 59/16; B82Y 5/00; A61L 27/00; A61K 31/745; C08G 65/48; C08G 81/00; A61K 9/50; C08G 59/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: (sol gel, sol gel), ethylene glycol, chitosan, hydrophobic property, hydrophicity, (peptide, peptide)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2001-0063314 A (SAMYANG HOLDINGS CORPORATION) 09 July 2001 See claims1-15,18-19	1-16
A	KR 10-2008-0110472 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 18 December 2008 See claims1-16 and examples26	1-16
A	KR 10-2008-0017850 A (EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) 27 February 2008 See claims1-10	1-16
A	KR 10-2009-0049328 A (EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) 18 May 2009 See claims1-10	1-16
A	KR 10-2001-0010393 A (SAMYANG HOLDINGS CORPORATION) 05 February 2001 See claims1-11	1-16
A	Peggy Chan et al.,Biomaterials 28, pp 540-549. 25 September 2006 See figures 3-4	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
31 MAY 2012 (31.05.2012)	**01 JUNE 2012 (01.06.2012)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2011/007516

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2001-0063314 A	09.07.2001	AU 2001-25550 A1	03.07.2001
		AU 2001-25550 B2	10.02.2005
		CA 2395077 A1	28.06.2001
		CA 2395077 C	08.07.2008
		CN 1204924 C	01.06.2005
		CN 1204924 C0	08.06.2005
		CN 1413118 A0	23.04.2003
		EP 1244471 A1	02.10.2002
		JP 03-614820 B2	26.01.2005
		JP 2003-517886 A	03.06.2003
		US 2003-0082234 A1	01.05.2003
		US 6916788 B2	12.07.2005
		WO 01-45742 A1	28.06.2001
KR 10-2008-0110472 A	18.12.2008	EP 2158254 A1	03.03.2010
		WO 2008-153277 A1	18.12.2008
KR 10-2008-0017850 A	27.02.2008	NONE	
KR 10-2009-0049328 A	18.05.2009	NONE	
KR 10-2001-0010393 A	05.02.2001	AU 2000-60247 A1	05.02.2001
		AU 2000-60247 B2	03.04.2003
		CA 2379672 A1	25.01.2001
		CA 2379672 C	22.03.2005
		CN 1205248 C	01.06.2005
		CN 1205248 C0	08.06.2005
		CN 1361684 A0	31.07.2002
		EP 1196149A1	17.04.2002
		EP 1196149 B1	26.05.2010
		JP 03-955759 B2	08.08.2007
		JP 2003-504393 A	04.02.2003
		KR 10-0431491 B1	14.05.2004
		US 6599519 B1	29.07.2003
		WO 01-05379 A1	25.01.2001

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2011/007516

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류**(IPC)**)

C08L 5/08(2006.01)i, C08L 71/02(2006.01)i, A61K 47/36(2006.01)i, A61L 27/20(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C08L 5/08; C08G 79/02; C08G 59/16; B82Y 5/00; A61L 27/00; A61K 31/745; C08G 65/48; C08G 81/00; A61K 9/50; C08G 59/14

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: (졸 겔,졸 젤)&에틸렌글리콜&키토산&소수성&친수성&(펩티드,펩타이드)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2001-0063314 A (주식회사 삼양사) 2001.07.09 청구항1-15,18-19 참조	1-16
A	KR 10-2008-0110472 A (한국과학기술연구원) 2008.12.18 청구항1-16 및 실시예26 참조	1-16
A	KR 10-2008-0017850 A (이화여자대학교 산학협력단) 2008.02.27 청구항1-10 참조	1-16
A	KR 10-2009-0049328 A (이화여자대학교 산학협력단) 2009.05.18 청구항1-10 참조	1-16
A	KR 10-2001-0010393 A (주식회사 삼양사) 2001.02.05 청구항1-11 참조	1-16
A	Peggy Chan 외 3명,Biomaterials 28, pp 540-549. 2006.09.25 도면 3-4 참조	1-16

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2012년 05월 31일 (31.05.2012)	**2012년 06월 01일 (01.06.2012)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관
김재민
전화번호 82-42-481-8146

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2011/007516

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2001-0063314 A	2001.07.09	AU 2001-25550 A1	2001.07.03
		AU 2001-25550 B2	2005.02.10
		CA 2395077 A1	2001.06.28
		CA 2395077 C	2008.07.08
		CN 1204924 C	2005.06.01
		CN 1204924 C0	2005.06.08
		CN 1413118 A0	2003.04.23
		EP 1244471 A1	2002.10.02
		JP 03-614820 B2	2005.01.26
		JP 2003-517886 A	2003.06.03
		US 2003-0082234 A1	2003.05.01
		US 6916788 B2	2005.07.12
		WO 01-45742 A1	2001.06.28
KR 10-2008-0110472 A	2008.12.18	EP 2158254 A1	2010.03.03
		WO 2008-153277 A1	2008.12.18
KR 10-2008-0017850 A	2008.02.27	없음	
KR 10-2009-0049328 A	2009.05.18	없음	
KR 10-2001-0010393 A	2001.02.05	AU 2000-60247 A1	2001.02.05
		AU 2000-60247 B2	2003.04.03
		CA 2379672 A1	2001.01.25
		CA 2379672 C	2005.03.22
		CN 1205248 C	2005.06.01
		CN 1205248 C0	2005.06.08
		CN 1361684 A0	2002.07.31
		EP 1196149 A1	2002.04.17
		EP 1196149 B1	2010.05.26
		JP 03-955759 B2	2007.08.08
		JP 2003-504393 A	2003.02.04
		KR 10-0431491 B1	2004.05.14
		US 6599519 B1	2003.07.29
		WO 01-05379 A1	2001.01.25