



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0116811
(43) 공개일자 2017년10월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C08J 3/075 (2006.01) A61K 31/337 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01) A61L 29/14 (2006.01)
A61L 31/14 (2006.01) C08J 3/24 (2006.01)
C08L 33/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C08J 3/075 (2013.01)
A61K 31/337 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0044883

(22) 출원일자 2016년04월12일

심사청구일자 2016년04월12일

(71) 출원인

아주대학교산학협력단

경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)

(72) 발명자

박기동

서울특별시 서초구 사임당로 137, 3동 710호 (서초동, 신동아아파트)

박경민

경기도 안양시 만안구 삼성산길 8, 104동 102호 (석수동, 석수역푸르지오아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

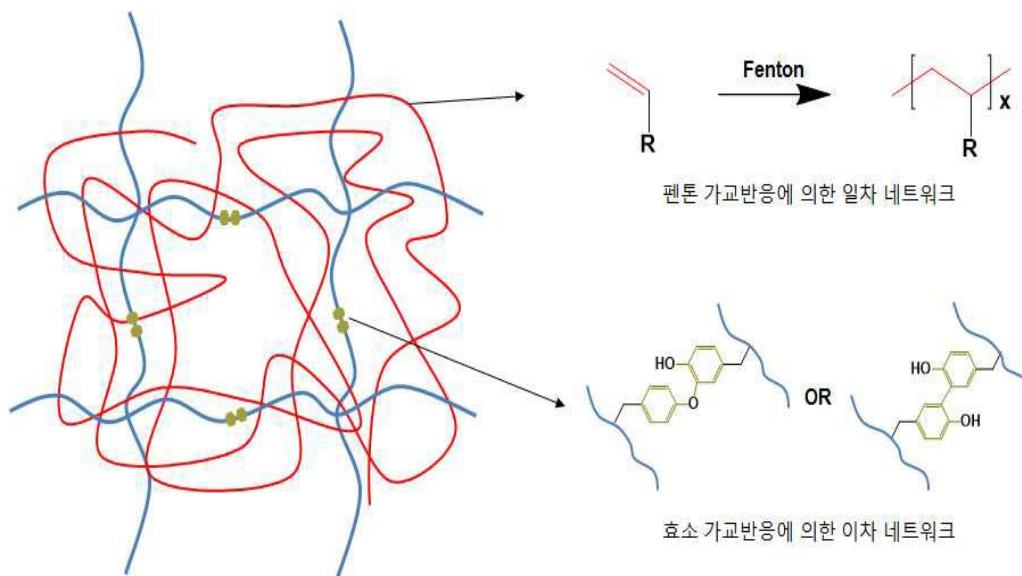
전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 주입형 이중가교 하이드로젤 및 이의 생의학적 용도

(57) 요약

본 발명은 주입형 이중 가교 하이드로젤에 관한 것으로서, 주입형 이중 가교 하이드로젤은 펜톤 가교반응 및 효소 가교반응을 포함하는 방법을 이용해 합성된 기존의 단일 가교 하이드로젤 대비 기계적 물성을 향상시킬 수 있으며, 또한 기존에 제시된 원-팟 합성법 대비, 간단하고 신속한 방법으로 이중가교 하이드로젤을 제조할 수 있음과 동시에 제조 조건에 따라 이중가교 하이드로젤의 물리/화학적 특성을 쉽게 제어할 수 있는 제조법을 제시한다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 38/1825 (2013.01)
A61K 47/6903 (2017.08)
A61L 27/52 (2013.01)
A61L 29/145 (2013.01)
A61L 31/145 (2013.01)
C08J 3/24 (2013.01)
C08L 33/02 (2013.01)
C08J 2205/022 (2013.01)
C08L 2203/02 (2013.01)

오동환

서울특별시 관악구 신림로48길 17-20, 103동 1105호 (신림동, 신림건영4차아파트)

(72) 발명자

이윤기

경기도 성남시 분당구 동판교로 225, 407동 301호
 (삼평동, 봇들마을4단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2015028578
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업 - 바이오의료기술개발사업
연구과제명	항균/항혈전 복합기능성 생체소재 및 다기능성 카디오도관 표면개질 기술 개발
기 여 율	1/1
주관기관	아주대학교 산학협력단
연구기간	2015.06.01 ~ 2020.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

아크릴 반응기를 갖는 단량체 및 가교제를 사용한 펜톤 가교반응에 의한 일차 네트워크 하이드로젤, 및 링커를 포함하거나 포함하지 않고 고분자의 결사슬에 페놀 유도체 또는 아닐린 유도체가 결합된 동종 또는 이종의 고분자를 둘 이상 포함하며, 둘 이상의 고분자 간 인접된 페놀 유도체 또는 아닐린 유도체 간의 탈수소 결합에 의해 연결된 효소 가교반응에 의한 이차 네트워크 하이드로젤로 이루어진 것을 특징으로 하는, 주입형 이중 가교 하이드로젤.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 일차 네트워크 하이드로젤은 2가 철이온, 아스코르브산 및 과산화수소를 포함한 용액 하에서 아크릴 반응기를 갖는 단량체 및 가교제의 펜톤 가교반응을 통해 in situ 가교시켜 제조된 것을 특징으로 하는, 주입형 이중 가교 하이드로젤.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 단량체는 아크릴산, 아크릴아미드, 메타크릴아미드, 디메틸아크릴아미드, 하이드록시에틸 메타크릴레이트, 하이드록시에틸 아크릴레이트, 비닐알코올, N-이소프로필아크릴아미드, 비닐피롤리돈, 2-카복시에틸아크릴레이트 및 셀포베테인으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상인 것을 특징으로 하는, 주입형 이중 가교 하이드로젤.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 가교제는 에틸렌글리콜 디메타크릴레이트, 에틸렌글리콜 디아크릴레이트, N,N'-메틸렌 비스아크릴아미드로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상인 것을 특징으로 하는, 주입형 이중 가교 하이드로젤.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 이차 네트워크 하이드로젤은 호스래디시 퍼록시데이즈 및 과산화수소의 존재 하에서 동종 또는 이종 고분자들이 in situ 가교된 것을 특징으로 하는, 주입형 이중 가교 하이드로젤.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 페놀 유도체는 티라민, 하이드록시페닐아세트산 및 하이드록시페닐프로피온산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상인 것을 특징으로 하는, 주입형 이중 가교 하이드로젤.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 아닐린 유도체는 하이드록시에틸아닐린, 아미노에틸아닐린 및 아미노벤질알코올로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상인 것을 특징으로 하는, 주입형 이중 가교 하이드로젤.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 고분자는 젤라틴, 키토산, 해파린, 셀룰로스, 텍스트란, 텍스트란 설페이트, 콘드로이틴 설페이트, 케라탄 설페이트, 더마탄 설페이트, 알지네이트, 콜라겐, 알부민, 피브로넥틴, 라미닌, 엘라스틴, 비트로넥틴, 히알루론산, 피브리노겐 및 다지-고분자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 주입형 이중 가교 하이드로젤.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 다지-고분자는 3지(3-arm)-폴리에틸렌글리콜(3armPEG), 4지(4-arm)-폴리에틸렌글리콜(4armPEG), 6지(6-arm)-폴리에틸렌글리콜(6armPEG) 또는 8지(8-arm)-폴리에틸렌글리콜(8armPEG)에서 선택된 어

는 하나 또는 둘 이상의 다지-폴리에틸렌글리콜, 및 테트로닉 시리즈(4arm-PPO-PEO)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 고분자인 것을 특징으로 하는, 주입형 이중 가교 하이드로젤.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 링커는 다관능기를 포함하는 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 폴리에틸렌이민(PEI), 폴리비닐알콜(PVA), 및 이들의 공중합체로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상의 수용성 고분자인 것을 특징으로 하는, 주입형 이중 가교 하이드로젤.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 주입형 이중 가교 하이드로젤은 아크릴 반응기를 갖는 단량체 및 가교제와 수용성 링커를 포함하거나 포함하지 않고 겔사슬에 페놀 유도체 또는 아닐린 유도체가 결합된 고분자를 2가 철이온, 아스코르브산 및 과산화수소를 포함한 용액 하에서 펜톤/효소반응을 이용하여 in situ 가교시켜 제조한 것을 특징으로 하는, 주입형 이중 가교 하이드로젤.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 상기 주입형 이중 가교 하이드로젤은 2가 철이온과 아스코르브산의 비율, 호스레디시 퍼록시데이즈의 농도 또는 과산화수소의 농도를 조절하여 겔화 시간 또는 기계적 강도에서 선택된 물리화학적 성질을 조절할 수 있는 것을 특징으로 하는, 주입형 이중 가교 하이드로젤.

청구항 13

단량체로 아크릴산을, 가교제로써 매크로 가교제(macro cross-linker)를 펜톤 가교반응에 의해 매크로코어를 갖는 일차 네트워크 하이드로젤, 및

링커를 포함하거나 포함하지 않고 고분자의 겔사슬에 페놀 유도체 또는 아닐린 유도체가 결합된 동종 또는 이종의 고분자를 둘 이상 포함하며, 둘 이상의 고분자 간 인접된 페놀 유도체 또는 아닐린 유도체 간의 탈수소 결합에 의해 연결된 효소 가교반응에 의한 이차 네트워크 하이드로젤로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 매크로코어를 갖는 주입형 이중 가교 하이드로젤.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 매크로 가교제(macro cross-linker)는 플루로닉 F127-디아크릴레이트(pluronic F127-diacrylate), 플루로닉 F68-디아크릴레이트(pluronic F68-diacrylate), 플루로닉 F108-디아크릴레이트(pluronic F108-diacrylate), 플루로닉 P85-디아크릴레이트(pluronic P85-diacrylate), 플루로닉 P123-디아크릴레이트(pluronic P123-diacrylate), 테트로닉 T1307-테트라아크릴레이트 (Tetronic T1307-tetraacrylate), 테트로닉 T1107-테트라아크릴레이트 (Tetronic T1107-tetraacrylate), 테트로닉 T908-테트라아크릴레이트 (Tetronic T908-tetraacrylate), 테트로닉 T90R4-테트라아크릴레이트 (Tetronic T90R4-tetraacrylate), 텍스트란 메타크릴레이트(dextran methacrylates), N,N-디메틸아미노에틸메타크릴레이트(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate), N-아이소프로필아크릴아마이드 (N-isopropylacrylamide) 및 스테아릴메타크릴레이트 (stearyl methacrylate)로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는, 주입형 이중 가교 하이드로젤.

청구항 15

청구항 1 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 따른 주입형 이중 가교 하이드로젤을 포함하는, 조직재생 및 충전용 임플란트 소재.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 임플란트 소재는 연골 재생(cartilage regeneration), 골 재생(bone regeneration), 치주골 재생, 피부 재생(skin regeneration), 심근 재생(cardiac tissue regeneration), 인공 수정체 (artificial intraocular lens), 척수 신경 재생(spinal cord regeneration), 뇌신경 재생(cranial regeneration), 성대 재생 및 충전제(vocal regeneration and augmentation), 유착 방지막 (adhesion barrier), 요실금 치료제(urinary incontinence treatment), 주름 제거(wrinkles removal)용 충전제, 화상 치료제(wound dressing), 조직 충전제(tissue augmentation) 및 척추 추간판 치료제(intervertebral disc treatment)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나에 적용된 것을 특징으로 하는 조직재생 및 충전용 임플란트 소

재.

청구항 17

청구항 1 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 따른 주입형 이중 가교 하이드로젤을 포함하는, 체내 삽입용 의료기기의 표면코팅 소재.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 체내삽입용 의료기기는 스텐트 (stent), 카테터 (catheter), 피하 이식편 (subcutaneous implant), 화학 센서, 도관 (lead), 심장 박동기 (pacemaker), 이식 혈관편 (vascular graft), 상처용 드레싱 (dressing), 남성기 삽입물 (penile implant), 삽입용 심박 발생 장치 (implantable pulse generator), 삽입용 심장 제세동기 (cardiac defibrillator), 및 또는 신경 흥분기 (nerve stimulator)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나에 적용된 것을 특징으로 하는, 체내 삽입용 의료기기의 표면코팅 소재.

청구항 19

청구항 1 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 따른 주입형 이중 가교 하이드로젤을 포함하는, 조직 접착 및 지혈용 소재.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 상기 지혈용 소재는 혈관 외과 영역을 포함한 뇌신경 외과수술, 뼈의 접착을 포함한 정형외과 수술, 열상 환자의 지혈, 대퇴동맥의 봉합, 백내장 절개 봉합, 연골 및 관절연골 치유, 피부 접합, 장기/분비선 절개면 지혈, 위장관 봉합, 및 힘줄 및 인대 치유로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나에 적용된 것을 특징으로 하는, 조직 접착 및 지혈용 소재.

청구항 21

청구항 1 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 따른 주입형 이중 가교 하이드로젤을 포함하는, 생리활성 물질 또는 약물 전달체용 담체.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 상기 생리활성물질 또는 약물은 펩타이드 또는 단백질 의약품, 항균제, 항암제 및 항염증제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상인 것을 특징으로 하는, 생리활성 물질 또는 약물 전달체용 담체.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 상기 펩타이드 또는 단백질 의약품은 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor; FGF), 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor; VEGF), 전환 성장인자(transforming growth factor; TGF), 골형성 성장인자(bone morphogenetic protein; BMP), 인간성장호르몬(hGH), 돼지성장호르몬(pGH), 백혈구성장인자(G-CSF), 적혈구성장인자(EPO), 대식세포성장인자(M-CSF), 종양 괴사 인자(TNF), 상피세포 성장인자(EGF), 혈소판유도성장인자(PDGF), 인터페론- α , β , γ , 인터루킨-2(IL-2), 칼시토닌, 신경성장인자(NGF), 성장호르몬 방출인자, 엔지오텐신, 황체형성 호르몬 방출 호르몬(LHRH), 황체 형성 호르몬 방출 호르몬 작용약(LHRH agonist), 인슐린, 갑상선 자극 호르몬 방출 호르몬(TRH), 엔지오스테틴, 엔도스테틴, 소마토스타틴, 글루카곤, 엔도르핀, 바시트라신, 머게인, 콜리스티닌, 바시트라신, 단일 항체, 백신류 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 생리활성 물질 또는 약물 전달체용 담체.

청구항 24

청구항 22에 있어서, 상기 항균제는 미노싸이클린, 테트라싸이클린, 오픈록사신, 포스포마이신, 머게인, 프로플록사신, 암피실린, 페니실린, 독시싸이클린, 티에나마이신, 세팔로스포린, 노르카디신, 겐타마이신, 네오마이신, 가나마이신, 파로모마이신, 마이크로 노마이신, 아미카신, 토브라마이신, 디베카신, 세포탁신, 세파클러, 에리스로마이신, 싸이프로플록사신, 레보플록사신, 엔옥사신, 반코마이신, 이미페넴, 후시딕산 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 생리활성 물질 또는 약물 전달체용 담체.

청구항 25

청구항 22에 있어서, 상기 항암제는 파클리탁셀, 텍소터어, 아드리아마이신, 엔도스타틴, 엔지오스타틴, 미토마이신, 블레오마이신, 시스플레틴, 카보플레틴, 독소루비신, 다우노루비신, 이다루비신, 5-플로로우라실, 메토트렉세이트, 액티노마이신-D 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 생리활성 물질 또는 약물 전달체용 담체.

청구항 26

청구항 22에 있어서, 상기 항염증제는 아세트아민펜, 아스피린, 이부프로펜, 디크로페낙, 인도메타신, 피록시캄, 페노프로펜, 플루비프로펜, 케토프로펜, 나프록센, 수프로펜, 록소프로펜, 시녹시캄, 테녹시캄 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 생리활성 물질 또는 약물 전달체용 담체.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 주입형 이중 가교 하이드로젤 및 이의 생의학적 용도에 관한 것으로서, 보다 상세하게는, 상기 주입형 이중 가교 하이드로젤은 기존 단일 가교 고분자 하이드로젤에 비해 기계적 강도를 개선시킬 수 있으며, 또한 기존의 이중 가교 하이드로젤 제조방법에 비해 간편한 방법으로 제조할 수 있을 뿐 아니라 제조 조건에 따라 이중가교 하이드로젤의 물리/화학적 특성을 쉽게 제어할 수 있다.

배경 기술

- [0002] 친수성 고분자의 3차원(3D) 네트워크로 이루어진 고분자 하이드로젤은 생체 조직과의 구조적 유사성 뿐 아니라, 생체적합성과 다중 가변성(multi-tunable properties)으로 인해 다양한 생의학적 응용분야에 널리 사용되어 왔다.
- [0003] 특히, in situ 형성 하이드로젤은 최소침습성 기술(minimally invasive techniques)을 기반으로 약물/세포 전달체, 조직 충전제, 혹은 조직공학용 지지체로 사용되어 환자의 편의성을 크게 증대시켜주었다. 그러나, 상기 in situ 형성 하이드로젤은 낮은 파괴 인성(fracture toughness)과 낮은 탄성 계수와 같은 고유의 기계적 성능에 한계가 있기 때문에 인공 연골, 인공 인대, 인공 근육 등, 높은 부하하중을 견딜 수 있는 연조직 대체 물질로의 활용은 제한되고 있는 실정이다.
- [0004] 따라서, 기계적 성능이 우수한 주입형 하이드로젤의 개발은 상기 의료용 임플란트 뿐 아니라 마이크로캡슐 및 패치 등의 약물전달체, 콘택트렌즈와 같은 생체 재료에 활용되고 더 나아가 액추에이터, 센서 보호용 코팅제, 스마트섬유, 밀봉제 혹은 개스킷 등 기존 하이드로젤의 사용이 제한되었던 다양한 응용분야로 적용 범위를 확장할 수 있다.
- [0005] 하이드로젤의 낮은 기계적 성능 문제를 해결하기 위해, 이중 가교(double-network; DN) 하이드로젤, 나노복합체 하이드로젤(nanocomposite hydrogels), 마크로/마이크로파티클 복합 하이드로젤(macromolecular microsphere composite hydrogels) 초분자 슬라이드-링 하이드로젤(supramolecular slide-ring hydrogels) 및 테트라-PEG 하이드로젤(tetra-PEG hydrogels)을 포함한 다양한 하이드로젤들이 개발되고 있다.
- [0006] 이 중에서도 이중 가교 하이드로젤은 강성(brittle) 및 연성(ductile)의 고분자 네트워크가 상호 침투(interpenetrating) 구조로 이루어진 하이드로젤로 강성 고분자 네트워크는 외부에서 가해지는 에너지를 효과적으로 분산시킴과 동시에 연성 고분자 네트워크는 구조를 안정화하여 우수한 기계적 성질을 가지는 바, 기존 하이드로젤의 낮은 기계적 물성을 극복할 대안으로서 제안되고 있다.
- [0007] 그러나, 통상적인 이중가교 하이드로젤의 제조는 다단계의 광 중합방법을 이용하고 고분자의 팽윤 및 확산을 필요로 하는 바, 수 일 이상의 제조 시간, 낮은 재현성, 그리고 복잡한 하이드로젤의 형성이 불가능한 문제는 주입형 하이드로젤로의 응용에 있어 단점으로 작용하고 있다.
- [0008] 최근, 이러한 문제점을 해결하기 위하여 이중 가교 하이드로젤의 원-팟(one-pot) 합성 방법들이 소개되고 있지만, 여전히 간단하고 신속한 제조 방법으로 주입형 하이드로젤로써 응용 가능한 제조시간을 만족함과 동시에 하이드로젤의 물리/화학적 특성의 제어가 가능한 제조방법이 대두되지 못한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제2013-0138948호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은, 기존의 제조방법 대비, 간단하고 신속한 방법으로 기존 단일 결합 고분자 하이드로젤에 비해 향상된 기계적 성능을 갖는 이중가교 하이드로젤을 제조할 수 있으며, 또한 이중가교 하이드로젤의 물리/화학적 특성을 쉽게 제어할 수 있는 주입형 이중 가교 하이드로젤 제조방법 및 이의 생의학적 용도를 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아크릴 반응기를 갖는 단량체, 및 가교제를 사용한 펜톤 가교반응에 의한 일차 네트워크 하이드로젤, 및 링커를 포함하거나 포함하지 않고 고분자의 결사슬에 페놀 유도체 또는 아닐린 유도체가 결합된 동중 또는 이종의 고분자를 둘 이상 포함하며, 둘 이상의 고분자 간 인접된 페놀 유도체 또는 아닐린 유도체 간의 탈수소 결합에 의해 연결된 효소 가교반응에 의한 이차 네트워크 하이드로젤로 이루어진 것을 특징으로 하는, 주입형 이중 가교 하이드로젤을 제공한다.

[0012] 또한 본 발명은 단량체로 아크릴산을, 가교제로써 매크로 가교제(macro cross-linker)를 펜톤 가교반응에 의해 매크로코어를 갖는 일차 네트워크 하이드로젤, 및 링커를 포함하거나 포함하지 않고 고분자의 결사슬에 페놀 유도체 또는 아닐린 유도체가 결합된 동중 또는 이종의 고분자를 둘 이상 포함하며, 둘 이상의 고분자 간 인접된 페놀 유도체 또는 아닐린 유도체 간의 탈수소 결합에 의해 연결된 효소 가교반응에 의한 이차 네트워크 하이드로젤로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 매크로코어를 갖는 주입형 이중 가교 하이드로젤을 제공한다.

[0013] 또한 본 발명은 주입형 이중 가교 하이드로젤을 포함하는, 조직재생 및 충전용 임플란트 소재를 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 주입형 이중 가교 하이드로젤을 포함하는, 카테터와 같은 심혈관계 의료기기뿐만 아니라 체내 삽입용 의료기기의 표면코팅 소재를 제공한다.

[0015] 또한 본 발명은 상기 주입형 이중 가교 하이드로젤을 포함하는, 조직 접착 및 지혈용 소재를 제공한다.

[0016] 또한 본 발명은 주입형 이중 가교 하이드로젤을 포함하는, 생리활성 물질 또는 약물 전달체용 담체를 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 주입형 이중 가교 하이드로젤은 펜톤반응과 효소 가교반응을 이용하여 기존 단일가교 하이드로젤에 비하여 기계적 물성을 향상시킬 수 있으며, 또한 원-팟 합성법에 의해 제조가 가능한 바, 종래 제조방법에 비해 보다 간편하고 신속한 방법으로 제조할 수 있으며 동시에 물리/화학적 특성을 쉽게 제어할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 펜톤가교반응을 이용한 아크릴산 하이드로젤 제조 모식도를 나타낸 도면이다.

도 2는 펜톤/효소 가교반응을 이용한 이중 가교 하이드로젤 모식도를 나타낸 도면이다.

도 3은 펜톤 및 효소가교된 하이드로젤, 펜톤/효소 이중 가교 결합된 하이드로젤 각각의 최대 압축강도를 나타낸 도면이다.

도 4는 Fe^{2+} 비율 변화(a), H_2O_2 농도 변화(b) 및 HRP 농도 변화(c)에 따른 이중 가교 하이드로젤의 젤화시간을 나타낸 도면이다.

도 5는 가교도에 따른 이중 가교 하이드로젤의 기계적 물성을 나타낸 도면이다.

도 6은 AAc 및 GH 농도에 따른 이중 가교 하이드로젤의 기계적 물성을 나타낸 도면이다.

도 7은 Fe^{2+} 비율 변화(a), H_2O_2 농도 변화(b) 및 HRP 농도 변화(c)에 따른 이중 가교 하이드로젤의 기계적 물성을 나타낸 도면이다.

도 8은 다양한 pH 조건 변화에 따른 이중 가교 하이드로젤의 기계적 물성을 나타낸 도면이다.

도 9는 Fe^{2+} 비율 변화 및 H_2O_2 농도 변화(a), 및 가교도(EGDA 함량변화) 변화 (b)에 따른 이중 가교 하이드로젤의 세포적합성 조절을 나타낸 도면이다.

도 10은 다양한 조성을 갖는 이중 가교 하이드로젤의 기계적 강도를 나타낸 도면이다.

도 11은 다양한 조성을 갖는 이중 가교 하이드로젤의 세포부착성 평가를 나타낸 도면이다.

도 12는 마크로코어를 갖는 이중 가교 하이드로젤의 제조 모식도를 나타낸 도면이다.

도 13은 마크로코어를 갖는 이중 가교 하이드로젤의 기계적 물성을 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0020] 본 발명의 발명자들은 주입형 이중 가교 하이드로젤이 펜톤 반응과 효소 가교반응을 동시에 이용하여 기존 합성된 단일 가교 하이드로젤보다 기계적 물성을 향상시킬 수 있으며, 또한 원-팟 합성법에 의한 제조가 가능함과 동시에 물리/화학적 특성을 제어할 수 있음을 밝혀내어 본 발명을 완성하였다.

[0021] 본 발명은 아크릴 반응기를 갖는 단량체 및 가교제를 사용한 펜톤 가교반응에 의한 일차 네트워크 하이드로젤, 및 수용성 링커를 포함하거나 포함하지 않고 고분자의 결사슬에 페놀 유도체 또는 아닐린 유도체가 결합된 동종 또는 이종의 고분자를 둘 이상 포함하며, 둘 이상의 고분자 간 인접된 페놀 유도체 또는 아닐린 유도체 간의 탈수소 결합에 의해 연결된 효소 가교반응에 의한 이차 네트워크 하이드로젤로 이루어진 것을 특징으로 하는, 주입형 이중 가교 하이드로젤을 제공한다.

[0022] 도 1을 참조하면, 상기 일차 네트워크 하이드로젤은 2가 철이온, 아스코르브산 (ascorbic acid) 및 과산화수소를 포함한 용액 하에서 아크릴 반응기를 갖는 단량체 및 가교제의 펜톤 가교반응을 통해 in situ 가교시켜 제조하며 2가 철이온과 아스코르브산의 비율을 조절하여 반응 속도를 제어할 수 있고 이에 제한되는 것은 아니다.

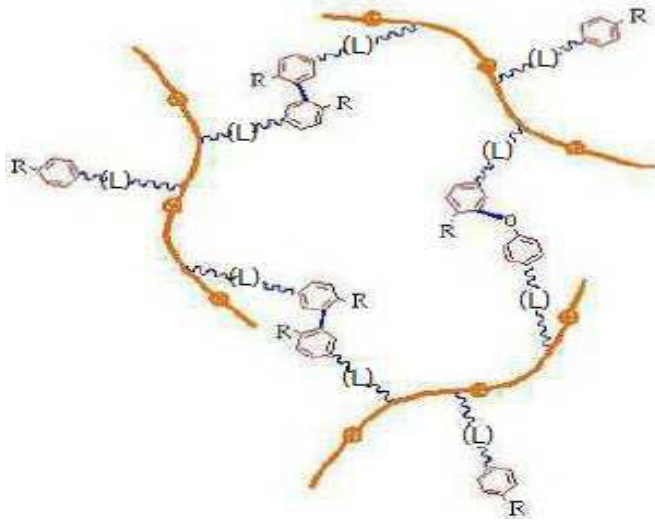
[0023] 또한 상기 단량체는 아크릴산, 아크릴아미드, 메타크릴아미드, 디메틸아크릴아미드, 하이드록시에틸 메타크릴레이트, 하이드록시에틸 아크릴레이트, 비닐알코올, N-이소프로필아크릴아미드, 비닐피롤리돈, 2-카복시에틸아크릴레이트 및 셀로베테인으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상일 수 있으며 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 또한 상기 가교제는 에틸렌글리콜 디메타크릴레이트, 에틸렌글리콜 디아크릴레이트, N,N'-메틸렌비스아크릴아미드로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상일 수 있으며 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 또한 상기 이차 네트워크 하이드로젤은 호스래디시 퍼옥시다이스 (horseradish peroxidase) 및 과산화수소의 존재 하에서 동종 또는 이종 고분자들이 in situ 가교될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 또한 본 발명에 따른 주입형 이중 가교 하이드로젤의 이차 네트워크 하이드로젤은 하기 화학식 1로 표시될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] [화학식 1]



[0028]

[0029] 상기 화학식 1에서, R은 하이드록시 또는 아민기이고, L은 링커로서, 수용성 고분자이다.

[0030] 상기 페놀 유도체는 티라민, 하이드록시페닐아세트산 및 하이드록시페닐프로피온산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상일 수 있다.

[0031] 상기 아닐린 유도체는 하이드록시에틸아닐린, 아미노에틸아닐린 및 아미노벤질알콜로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상일 수 있다.

[0032] 상기 고분자는 젤라틴, 키토산, 헤파린, 셀룰로스, 텍스트란, 텍스트란 설페이트, 콘드로이틴 설페이트, 케라탄 설페이트, 더마탄 설페이트, 알지네이트, 콜라겐, 알부민, 피브로넥틴, 라미닌, 엘라스틴, 비트로넥틴, 히알루론산, 피브리노겐 및 다지-고분자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0033] 상기 다지-고분자는 3지(3-arm)-폴리에틸렌글리콜(3armPEG), 4지(4-arm)-폴리에틸렌글리콜(4armPEG), 6지(6-arm)-폴리에틸렌글리콜(6armPEG) 또는 8지(8-arm)-폴리에틸렌글리콜(8armPEG)에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 다지-폴리에틸렌글리콜, 및 테트로닉 시리즈(4arm-PPO-PEO)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 고분자일 수 있다.

[0034] 상기 링커는 다관능기를 포함하는 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 폴리에틸렌이민(PEI), 폴리비닐알콜(PVA), 및 이들의 공중합체로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상의 수용성 고분자일 수 있다.

[0035] 도 2를 참조하면, 상기 주입형 이중 가교 하이드로젤은 아크릴 반응기를 갖는 단량체 및 가교제와 수용성 링커를 포함하거나 포함하지 않고 겔사슬에 페놀 유도체 또는 아닐린 유도체가 결합된 고분자를 2가 철이온, 아스코르브산 및 과산화수소를 포함한 용액 하에서 펜톤/효소반응을 이용하여 in situ 가교시켜 제조할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036] 상기 주입형 이중 가교 하이드로젤은 2가 철이온과 아스코르브산의 비율, 호스래디시 퍼록시데이즈의 농도 또는 과산화수소의 농도를 조절하여 젤화 시간 또는 기계적 강도에서 선택된 물리화학적 성질을 조절할 수 있으며 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 또한 본 발명은 단량체로 아크릴산을, 가교제로써 매크로 가교제(macro cross-linker)를 펜톤 가교반응에 의해 매크로코어를 갖는 일차 네트워크 하이드로젤 및 링커를 포함하거나 포함하지 않고 고분자의 겔사슬에 페놀 유도체 또는 아닐린 유도체가 결합된 동종 또는 이종의 고분자를 둘 이상 포함하며, 둘 이상의 고분자 간 인접된 페놀 유도체 또는 아닐린 유도체 간의 탈수소 결합에 의해 연결된 효소 가교반응에 의한 이차 네트워크 하이드로젤로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 매크로코어를 갖는 주입형 이중 가교 하이드로젤을 제공한다.

[0038] 상기 매크로 가교제에 의해 생성되는 매크로코어는 이중 가교 하이드로젤 내부에서 부가적인 플랫폼으로 작용하여 외부에서 가해지는 충격에너지를 효과적으로 분산시켜 하이드로젤의 기계적 강도 및 내피로성을 향상시킬 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0039] 상기 매크로 가교제(macro cross-linker)는 플루로닉 F127-디아크릴레이트(pluronic F127-diacrylate), 플루로닉 F68-디아크릴레이트(pluronic F68-diacrylate), 플루로닉 F108-디아크릴레이트(pluronic F108-diacrylate), 플루로닉 P85-디아크릴레이트(pluronic P85-diacrylate), 플루로닉 P123-디아크릴레이트(pluronic P123-diacrylate), 테트로닉 T1307-테트라아크릴레이트 (Tetronic T1307-tetraacrylate), 테트로닉 T1107-테트라아크릴레이트 (Tetronic T1107-tetraacrylate), 테트로닉 T908-테트라아크릴레이트 (Tetronic T908-tetraacrylate), 테트로닉 T90R4-테트라아크릴레이트 (Tetronic T90R4-tetraacrylate), 덱스트란 메타크릴레이트(dextran methacrylates), N,N-디메틸아미노에틸메타크릴레이트(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate), N-아이소프로필아크릴아마이드 (N-isopropylacrylamide) 및 스테아릴메타크릴레이트 (stearyl methacrylate)로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 상기 마크로코어를 갖는 주입형 이중 가교 하이드로젤의 보다 상세한 설명은 앞선 주입형 이중 가교 하이드로젤과 동일한 바 생략한다.
- [0041] 또한 본 발명은 주입형 이중 가교 하이드로젤을 포함하는, 조직재생 및 충전용 임플란트 소재를 제공한다.
- [0042] 상기 임플란트 소재는 연골 재생(cartilage regeneration), 골 재생(bone regeneration), 치주골 재생, 피부 재생(skin regeneration), 심근 재생(cardiac tissue regeneration), 인공 수정체(artificial intraocular lens), 척수 신경 재생(spinal cord regeneration), 뇌신경 재생(cranial regeneration), 성대 재생 및 충전제(vocal regeneration and augmentation), 유착 방지막 (adhesion barrier), 요실금 치료제(urinary incontinence treatment), 주름 제거(wrinkles removal)용 충전제, 화상 치료제(wound dressing), 조직 충전제(tissue augmentation) 및 척추 추간판 치료제(intervertebral disc treatment)로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 또한 본 발명은 주입형 이중 가교 하이드로젤을 포함하는, 카테터 등, 체내 삽입용 의료기기의 표면코팅 소재를 제공한다.
- [0044] 상기 체내삽입용 의료기기는 스텐트 (stent), 카테터 (catheter), 피하 이식편 (subcutaneous implant), 화학 센서, 도관 (lead), 심장 박동기 (pacemaker), 이식 혈관편 (vascular graft), 상처용 드레싱 (dressing), 남 성기 삽입물 (penile implant), 삽입용 심박 발생 장치 (implantable pulse generator), 삽입용 심장 제세동기 (cardiac defibrillator), 또는 신경 흥분기 (nerve stimulator)로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 또한 본 발명은 상기 주입형 이중 가교 하이드로젤을 포함하는, 조직 접착 및 지혈용 소재를 제공한다.
- [0046] 상기 지혈용 소재는 혈관 외과 영역을 포함한 뇌신경 외과수술, 뼈의 접착을 포함한 정형외과 수술, 열상 환자의 지혈, 대퇴동맥의 봉합, 백내장 절개 봉합, 연골 및 관절연골 치유, 피부 접합, 장기/분비선 절개면 지혈, 위장관 분합, 및 힘줄 및 인대 치유로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나에 적용될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 또한 본 발명은 주입형 이중 가교 하이드로젤을 포함하는, 생리활성 물질 또는 약물 전달체용 담체를 제공한다.
- [0048] 상기 생리활성물질 또는 약물은 펩타이드 또는 단백질 의약품, 항균제, 항암제 및 항염증제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상일 수 있다.
- [0049] 상기 펩타이드 또는 단백질 의약품은 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor; FGF), 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor; VEGF), 전환 성장인자(transforming growth factor; TGF), 골형성 성장인자(bone morphogenetic protein; BMP), 인간성장호르몬(hGH), 돼지성장호르몬(pGH), 백혈구성장인자(G-CSF), 적혈구성장인자(EPO), 대식세포성장인자(M-CSF), 종양 괴사 인자(TNF), 상피세포 성장인자(EGF), 혈소판 유도성장인자(PDGF), 인터페론- α , β , γ , 인터루킨-2(IL-2), 칼시토닌, 신경성장인자(NGF), 성장호르몬 방출인자, 엔지오텐신, 황체형성 호르몬 방출 호르몬(LHRH), 황체 형성 호르몬 방출 호르몬 작용약(LHRH agonist), 인슐린, 갑상선 자극 호르몬 방출 호르몬(TRH), 엔지오스테틴, 엔도스테틴, 소마토스타틴, 글루카곤, 엔도르핀, 바시트라신, 머게인, 콜리스틴, 바시트라신, 단일 항체, 백신류 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 상기 항균제는 미노사이클린, 테트라사이클린, 오픈록사신, 포스포마이신, 머게인, 프로플록사신, 암피실린, 페니실린, 독시사이클린, 티에나마이신, 세팔로스포린, 노르카디신, 젠타마이신, 네오마이신, 가나마이신, 파로마이신, 미크로 노마이신, 아미카신, 토브라마이신, 디베카신, 세프트라신, 세파클러, 에리스로마이신, 사이프로

플록사신, 레보플록사신, 엔옥사신, 반코마이신, 이미페넴, 후시딕산 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0051] 상기 항암제는 파클리탁셀, 텍소티어, 아드리아마이신, 엔도스타틴, 엔지오스타틴, 미토마이신, 블레오마이신, 시스플레틴, 카보플레틴, 독소루비신, 다우노루비신, 이다루비신, 5-플로로우라실, 메토틱세이트, 액티노마이신-D 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0052] 상기 항염증제는 아세트아미노펜, 아스피린, 이부프로펜, 디크로페낙, 인도메타신, 피록시캄, 페도프로펜, 플루비프로펜, 케토프로펜, 나프록센, 수프로펜, 록소프로펜, 시녹시캄, 테녹시캄 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 이하, 하기 실시예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0054] <실시예 1> 재료 준비

[0055] 아크릴산(Acrylic acid; 이하 'AAc'), 아크릴아마이드(acrylamide; 이하 'AAm'), 에틸렌글리콜 디아크릴레이트(ethylene glycol diacrylate; 이하 'EGDA'), 폴리에틸렌글리콜(Polyethylene glycol; 이하 'PEG'), 플루로닉 F127-디아크릴레이트(pluronic F127-diacrylate; 이하 'F127DA'), 헤파린, 호스래디시 퍼옥시데이즈(horseradish peroxidase, 250~330 U/mg; 이하 'HRP'), 과산화수소(hydrogen peroxide, 이하 ' H_2O_2 '), 4-메틸아미노피리딘 (4-dimethylaminopyridine; 이하 'DMAP'), p-니트로페닐클로로포르메이트 (p-nitrophenylchloroformate; 이하 'PNC'), 티라민(tyramine; 이하 'TA'), 3-하이드록시프로피온산(3-Hydroxypropionic acid; 이하 'HPA'), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide; 이하 'EDC'), N-하이드록시석신이미드(N-Hydroxysuccinimide; 이하 'NHS'), 에틸렌 디아민(ethylene diamine; 이하 'EA'), 2-모르폴리노에탄술포산(2-morpholinoethanesulfonic acid; 이하 'MES'), 염화철(ferrous chloride; 이하 ' $FeCl_2$ '), 1-아스코르브산(1-ascorbic acid; 이하 'AA')를 시그마 알드리치 사로부터 구입하였다(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

[0056] 4-지 폴리프로필렌 옥사이드(4-arm polypropylene oxide; PPO) 폴리에틸렌 옥사이드(polyethylene oxide; 이하 'PEO') (분자량= 18,000 g/mol; Tetronic)를 바스프 코리아로부터 구입하였다(BASF Korea, Seoul, Korea). 디메틸 설폭사이드(Dimethyl sulfoxide; 이하 'DMSO') 및 트리에틸아민(triethylamine; 이하 'TEA')를 준세이화학(Junsei Chemical, Tokyo, Japan), 및 간토화학(Kanto Chemical, Tokyo, Japan)에서 각각 구입하였다. 모든 화학물질은 추가적인 정제 없이 사용하였다.

[0057] 생체 외 세포를 관찰하기 위해, 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's modified eagle medium; 이하 'DMEM'), 소태아혈청(fetal bovine serum; 이하 'FBS'), 페니실린-스트렙토마이신 (penicillinstreptomycin; 이하 'PS'), 및 돌베코 인산 완충액(Dulbecco's phosphate buffered saline; 이하 'DPBS')을 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA)로부터 구매하였으며, WST-1 시약은 두젠바이오사(Dogenbio, Seoul, Korea)로부터 구입하였다.

[0058] <실시예 2> 젤라틴-히드록시페닐프로피온산 (GH) 고분자 합성

[0059] 젤라틴-히드록시페닐프로피온산(gelatin-hydroxyphenyl propionic acid; 이하 'GH') 고분자는 종래 방법에 따라 EDC 및 NHS의 존재 하에 젤라틴과 HPA의 결합에 의해 합성되었다.

[0060] DI water와 DMF 가 3:2의 비율로 구성된 조용매(co-solvent)를 사용, 15 mL의 조용매에 용해된 EDC 3.83 g을 HPA 3.32 g이 125 mL의 조용매에 용해된 용액에 투입하였다. 1시간 동안 활성화시킨 후에, 상기 용액에 3.45 g의 NHS가 조용매 15 mL에 용해된 용액을 투입하여 1시간 동안 교반 하였다.

[0061] 상기 활성화된 HPA 용액을 젤라틴 용액(5 g in 150 mL DI water, 40℃)에 투입한 후 24시간 동안 40℃의 온도를 유지하며 반응시켰으며, 상기 반응시킨 혼합물을 40℃에서 여과막(분자량컷오프=15,000 Da)을 이용하여 여과하고, 동결건조하여 GH 고분자를 수득하였다.

[0062] <실시예 3> 테트로닉-티라민 (TTA) 고분자 합성

[0063] 테트로닉-티라민(TTA) 고분자는 종래 알려진 방법에 따라 합성하였다.

[0064] 테트로닉을 다이옥산에 용해시킨 후, 이 용액에 DMAP 및 TEA를 다이옥산에 용해시킨 용액과, PNC를 다이옥산에 용해시킨 용액을 순차적으로 혼합하여 아민-반응성 테트로닉-PNC를 얻었다.

- [0065] TA가 용해된 DMSO 용액에 상기 아민-반응성 테트로닉-PNC를 천천히 투입한 후 중합시켰다. 이렇게 중합된 반응물은 메탄올을 이용한 멤브레인 투석을 수행하였고, 농축, 침전물 석출, 여과 및 건조과정을 거쳐 진공 상태에서 TTA 고분자를 얻었다.
- [0066] 상기 얻어진 TTA 고분자의 화학적 구조는 ¹H-NMR 분광법(AS400, OXFORD instrument, UK) 및 자외선/가시광선 분광 광도계(V-750, Jasco, Japan)을 이용하여 확인하였다.
- [0067] <실시예 4> 헤파린-폴리에틸렌글리콜-티라민 (HPT) 중합체 합성
- [0068] 헤파린-폴리에틸렌글리콜-티라민(heparin-PEG-tyramine; HPT) 중합체는 종래 알려진 방법에 따라 합성하였다.
- [0069] 4 kDa의 분자량을 갖는 PEG를 다이옥산에 용해시킨 후, 질소분위기 하에서 상기 용액에 DMAP 0.61g과 TEA 0.51g을 다이옥산 100 ml에 용해시킨 용액과 PNC 1.01g을 다이옥산 20ml에 용해시킨 용액을 순차적으로 첨가하여 24시간 동안 교반하였다. 상기 교반한 반응물을 회전식 증발기를 이용하여 고농도로 농축한 후 차가운 디에틸에테르에 천천히 떨어뜨려 침전시키고 감압 여과하여 PNC-PEG-PNC 침전물을 수득하였다.
- [0070] 앞서 얻어진 PNC-PEG-PNC(10 g)을 DMF 40 ml에 용해시키고, TA 0.3641 g을 DMF 40 ml에 용해시킨 후, 30 °C의 질소분위기에서 PNC-PEG-PNC 용액에 티라민 용액을 천천히 적하한 후 6시간 동안 교반하였다. 그 후, EA 4.629 g을 DMF(20 ml)에 용해시킨 용액을 상기 혼합물에 천천히 적하한 후 24시간 동안 교반하였다. 상기 혼합물을 차가운 디에틸에테르에 적하한 후 감압 여과하여 얻어진 침전물을 감압건조하여 흰색 분말 형태의 NH₂-PEG-TA를 수득하였다.
- [0071] 헤파린 1 g을 30 ml의 0.1 M MES에 용해시킨 후, 1 ml의 0.1 M MES에 용해시킨 EDC 65 mg를 넣어 주었다. 15분이 지난 후 1 ml의 0.1 M MES에 용해시킨 NHS 19 mg을 넣어주었다. 15분이 지난 후 10 ml의 0.1 M MES에 용해시킨 NH₂-PEG-TA(1.42 g)을 넣어주고 24시간 동안 교반하였다. 그 후 감압여과 한 뒤, 상기 혼합물을 여과막(분자량컷오프=15,000 Da)을 이용하여 3일간 여과하였고 동결건조하여 HPT 고분자를 수득하였다.
- [0072] <실시예 5> 펜톤가교 반응을 이용한 아크릴산 하이드로젤 제조
- [0073] 개시제인 EGDA를 포함한 증류수에 AAc를 용해시켜 고분자 전구체 용액을 제조하였다. 그 후 상기 고분자 전구체 용액을 FeCl₂, AA 및 H₂O₂와 혼합한 후 교반하여 아크릴산 하이드로젤을 제조하였다. 하이드로젤 내의 각 시료의 농도는 EGDA (0.25 중량%), AAc (30 중량%), FeCl₂ (0.025 mM), AA (4.975 mM) 및 H₂O₂ (20 mM)이었다.
- [0074] <실시예 6> 효소가교반응을 이용한 젤라틴 하이드로젤 제조
- [0075] 5 중량%의 GH 고분자를 40°C의 20 mM H₂O₂ 용액 (용액 A) 및 0.005 mg/mL HRP 용액 (용액 B)에 각각 완전히 용해시킨 후 상기 용액 A 및 용액 B를 혼합하고 흐름이 관찰되지 않을 때까지 완만히 교반하여 젤라틴 하이드로젤을 제조하였다.
- [0076] <실시예 7> 펜톤/효소 가교반응을 이용한 이중 가교 하이드로젤 제조
- [0077] 이중 가교 하이드로젤을 제조하기 위해, AAc 단량체, EGDA 가교제, GH 고분자 및 펜톤/효소 시약을 바이알에 투입하였고, AAc/GH 이중 가교 하이드로젤의 합성을 개시하기 위해 H₂O₂ 용액을 첨가하였다. 상기 AAc/GH 이중 가교 하이드로젤은 복잡한 처리과정 없이 재료 및 시약의 간단한 혼합과 펜톤 및 효소 반응을 통해 형성할 수 있었다.
- [0078] 즉, 다양한 농도의 EGDA를 함유한 증류수에 AAc 단량체와 GH를 용해시켰다. 상기 용해시킨 전구체 용액을 FeCl₂, AA, HRP 및 H₂O₂와 혼합시켜 이중 가교 하이드로젤을 제조하였다. 이중 가교 하이드로젤 내 각 시료의 농도는 AAc (30 중량%), GH (5 중량%), FeCl₂ (0.025 mM), AA (4.975 mM), HRP (0.05 mg/mL), H₂O₂ (20 mM) 이었으며 EGDA의 농도는 0.1, 0.25, 및 0.5 중량%가 되도록 제조하였다.
- [0079] <실험예 1> 기계적 강도 측정
- [0080] 실시예 7에서 제조한 이중 가교 하이드로젤의 기계적 성능은 실시예 5 및 실시예 6에 따른 하이드로젤의 기계적 성능과 비교하여 측정하였으며, 기계적 성능 측정을 위하여 만능 재료 시험기(universal testing machine; UTM)를 이용하였다.

- [0081] 압축 강도 측정을 위하여, 테프론 몰드($10 \times 10 \times 10 \text{ mm}^3$)에서 준비한 입방형 하이드로젤 시료를 UTM의 하부 플레이트 상에 배치하고 1000 N 로드셀을 장착하였으며 로드셀과 연결된 상부 플레이트로 꼭 눌렀고, 3 mm/min의 압축 속도로 크랙이 생길 때까지 눌렀다.
- [0082] 인장 강도 측정을 위하여, 테프론 몰드($10 \times 35 \times 3 \text{ mm}^3$)에서 준비한 하이드로젤 시료를 준비하였고, 100 N 로드셀을 장착하였으며, 크로스헤드 속도를 30 mm/min으로 하였다. 압축과 연신을 위한 변형은 최초 길이에 대한 변형된 길이로서 정의하였고, 응력은 힘을 시료의 최초 단면적으로 나누어 산출하였다.
- [0083] (1) 기계적 강도 평가
- [0084] 도 3과 같이, 펜톤가교 반응을 통한 AAc 하이드로젤 및 효소가교 반응을 통한 젤라틴 하이드로젤의 최대 압축강도는 각각 0.8 MPa 및 0.26 MPa인 반면, 펜톤/효소가교 반응을 통한 AAc/GH 이중 가교 하이드로젤의 압축강도는 4.2 MPa를 나타내었으며 또한 AAc/GH 이중 가교 하이드로젤의 최대 압축 변형율은 AAc 하이드로젤 및 젤라틴 하이드로젤의 최대 압축 변형율보다 더 우수함을 알 수 있었다. 상기 AAc/GH 이중 가교 하이드로젤은 98%의 압축 변형에서도 쉽게 붕괴되지 않으며, 외관상 손상 없이 원래의 형상으로 완전히 회복된 반면, AAc 하이드로젤은 95%의 압축 변형에서 파괴되었으며, 또한 GH 하이드로젤은 오직 80%의 압축 변형만을 유지할 수 있었다.
- [0085] 또한 AAc/GH 이중 가교 하이드로젤은 AAc 하이드로젤 및 젤라틴 하이드로젤에 비해 우수한 인장 특성을 나타내었다. AAc/GH 이중 가교 하이드로젤의 파괴변형 및 인장강도는 각각 6.9 mm/mm 및 0.2 MPa를 나타내었으며, AAc 하이드로젤의 파괴변형 및 인장강도는 각각 5.9 mm/mm 및 0.07 MPa이며, 젤라틴 하이드로젤의 파괴변형 및 인장강도는 각각 0.75 mm/mm 및 0.02 MPa를 나타내었다.
- [0086] 상기 이러한 결과를 통해 펜톤/효소가교 반응을 통한 AAc/GH 이중 가교 하이드로젤은 기계적 강도가 탁월하게 개선되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0087] (2) 젤화시간 평가
- [0088] 펜톤시약인 Fe^{2+} 비율 및 H_2O_2 농도의 변화와, 효소반응 시약인 HRP의 농도 변화에 따른 이중 가교 하이드로젤의 젤화시간을 vial tilting method를 이용하여 평가하였다.
- [0089] 도 4를 참조하면, Fe^{2+} 비율에 따라, 5초 내지 90초의 범위에서 이중 가교 하이드로젤의 젤화시간을 제어하였다. 그리고, H_2O_2 의 농도가 10 mM에서 40 mM으로 증가하는 경우 젤화시간이 감소된 반면, HRP 농도는 젤화속도에 미치는 영향을 미치지 못하였고, H_2O_2 의 농도가 20 mM 이상인 경우, 젤화속도는 HRP 농도에 의해 영향을 받지 않았다.
- [0090] (3) 가교도에 따른 이중 가교 하이드로젤 기계적 물성 평가
- [0091] 가교제인 EGDA의 농도 변화[0.10 중량%(DN (L)), 0.25 중량%(DN (M)) 및 0.50 중량%(DN (H))]에 따른 AAc/GH 이중 가교 하이드로젤의 기계적 성능을 정량적으로 측정하였다.
- [0092] 그 결과, 도 5와 같이 각각의 샘플에 대한 최대 압축강도는 DN (L), DN (M) 및 DN (H)이 각각 2.6 MPa, 4.2 MPa, 및 3.3 MPa를 나타내었다. 이를 통해 가교제인 EGDA의 함량이 0.25 중량%일 때 가교도가 우수함을 알 수 있었고, 96%에서도 쉽게 붕괴되지 않으며, 외관상 손상 없이 원래의 형상으로 완전히 회복되었다. 또한 이 실험은 가교제의 농도의 변화에 따라 이중 가교 하이드로젤의 물성을 다양하게 구현하는 것이 가능함을 나타내는 결과로 기존의 제조방법이 가지는 제어가 용이하지 않던 한계점을 해결하는 수단으로 본 제조법이 이용될 수 있음을 입증한다.
- [0093] (4) AAc 및 GH 함량에 따른 이중 가교 하이드로젤의 기계적 물성 평가
- [0094] 이중 가교 하이드로젤의 AAc 단량체 및 GH 고분자의 다양한 농도 변화에 따른 기계적 물성을 평가하였다.
- [0095] 즉, GH(5 중량%), EGDA(0.25 중량%), Fe^{2+} 비율(0.5%), HRP(0.05 mg/ml), 및 H_2O_2 (20 mM)의 일정한 조성 하에 AAc의 함량을 10 중량%, 20 중량%, 30 중량% 및 40 중량%로 함량을 변화시켜 각각 투입하여 제조된 이중 가교 하이드로젤은 도 6과 같이 각각 2.1 MPa, 3.1 MPa, 4.2 MPa, 및 3.3 MPa의 최대 압축강도 값을 나타내었다.
- [0096] 또한, AAc(30 중량%), EGDA(0.25 중량%), Fe^{2+} 비율(0.5%), HRP(0.05 mg/ml) 및 H_2O_2 (20 mM)의 일정한 조성 하

에 GH 고분자를 3 중량%, 5 중량%, 10 중량%, 및 20 중량%로 함량을 변화시켜 각각 투입하여 제조된 이중 가교 하이드로젤은 도 6과 같이 각각 1.8 MPa, 4.4 MPa, 3.8 MPa, 및 2.6 MPa의 최대 압축강도 값을 나타내었다.

[0097] (5) Fe^{2+} 비율, H_2O_2 농도, 및 HRP 농도의 변화에 따른 이중 가교 하이드로젤의 기계적 물성 평가

[0098] 일정한 GH(5 중량%), AAc(30 중량%), EGDA(0.25 중량%), HRP(0.05 mg/ml), 및 H_2O_2 (20mM)의 조성 하에 다양한 Fe^{2+} 비율(0.1%, 0.25%, 0.5%, 및 1%) 변화에 따른 이중 가교 하이드로젤의 최대 압축강도를 측정하였다. 도 7(a)을 참조하면, Fe^{2+} 비율이 0.5%일 경우 우수한 최대 압축강도 값을 나타냈으며, 그 값은 4.2 MPa 임을 알 수 있었다.

[0099] 또한, 일정한 GH(5 중량%), AAc(30 중량%), EGDA(0.25 중량%), HRP(0.05 mg/ml) 및 Fe^{2+} (0.5 중량%)의 조성 하에 다양한 H_2O_2 농도(5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 및 40 mM) 변화에 따른 이중 가교 하이드로젤의 최대 압축강도를 측정하였다. 도 7(b)를 참조하면, H_2O_2 농도가 30 mM일 경우, 우수한 최대 압축강도 값을 나타냈으며, 그 값은 4.1 MPa 임을 알 수 있었다.

[0100] 또한, 일정한 GH(5 중량%), AAc(30 중량%), EGDA(0.25 중량%), Fe^{2+} (0.5%) 및 H_2O_2 (20mM)의 조성 하에 다양한 HRP 농도(0 mg/ml, 0.025 mg/ml, 0.05 mg/ml 및 0.1 mg/ml) 변화에 따른 이중 가교 하이드로젤의 최대 압축강도를 측정하였다. 도 7(c)를 참조하면, HRP 농도가 0.05 mg/ml일 경우 우수한 최대 압축강도 값을 나타냈으며, 그 값은 4.2 MPa 임을 알 수 있었다.

[0101] (6) pH 조건 변화에 따른 이중 가교 하이드로젤의 기계적 물성 평가

[0102] 기본적인 조성은 GH(5 중량%), AAc(30 중량%), EGDA(0.25 중량%), Fe^{2+} 비율(0.5%), HRP(0.05 mg/ml) 및 H_2O_2 (20mM)에서 수산화나트륨(NaOH) 및 염산(HCl)을 적정량 혼합함으로써 고분자 전구체 용액의 다양한 pH 조건(pH 2, pH 5, pH 7, 및 pH 10) 변화에 따른 이중 가교하이드로젤의 최대 압축강도를 측정하였다.

[0103] 도 8을 참조하면, pH에 따라 팽윤 및 효소반응의 활성도가 변화하여 압축강도의 변화를 보였으며, pH 5 조건에서 형성된 하이드로젤의 압축강도가 가장 높았음을 알 수 있다.

[0104] 이는 팽윤 및 효소반응의 pH에 따른 반응 활성(각 반응의 최대 활성 pH: 팽윤반응(pH 2), 효소반응(pH 6))이 이중 가교 하이드로젤의 물성에 영향을 미치기 때문이며 pH 5에서 이중 가교 하이드로젤의 최적 물성이 나타났음을 알 수 있다.

[0105] 즉, 상기 다양한 조건에서의 수행된 기계적 물성 평가로부터 이중 가교 하이드로젤을 제조하는 최적의 함량은 GH(5 중량%), AAc(30 중량%), EGDA(0.25 중량%), Fe^{2+} 비율(0.5%), HRP(0.05 mg/ml), H_2O_2 (20 mM) 및 pH 5 조건임을 알 수 있었다.

[0106] <실험예 2> 이중 가교 하이드로젤의 세포적합성 시험

[0107] 이중 가교 하이드로젤 추출물의 세포독성을 평가하기 위해 용출시험법(eluting test methods)을 이용하여 세포적합성 시험을 수행하였다. 즉, 분리된 배지에서 30분 동안 예비경화시킨 하이드로젤(1 g)을 24시간 동안 37°C의 인큐베이터에서 배양시켜 추출물(10 ml)을 얻었다. 인간 피부 섬유아세포(Human dermal fibroblasts; hDFBs)는 96-웰 플레이트(5×10^3 세포/웰)에 분주하였고, 37°C에서 24시간 동안 5% CO_2 의 가습 분위기 하에서 10% FBS 및 1% PS를 첨가한 DMEM에서 배양하였다.

[0108] 상기 추출물(200 μl)을 96-웰 플레이트에 첨가하였고, 12시간 후에 WST-1 용액을 각 웰 플레이트에 첨가한 후 상기 웰 플레이트를 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 세포생존율은 450 nm의 파장에서 각 웰 플레이트의 흡광도를 마이크로플레이트 리더기(BioRad, Model 550, Hercules, CA, USA)에 의해 측정하였다.

[0109] 그 결과, 도 9와 같이 이중 가교 하이드로젤의 세포적합성은 H_2O_2 농도에 영향을 받지 않으며 Fe^{2+} 비율이 0.1%에서 1.0%로 증가할수록 세포적합성은 증가하였다. 이때, Fe^{2+} 비율이 낮음도 불구하고 상대적으로 높은 세포독성을 나타내는 것은 잔류하는 AAc 단량체에 의한 것으로 판단되었다. 보다 높은 농도의 팽윤 시약의 처리는 중

합 공정을 더 가속화함으로써 중합도를 더 높일 수 있었다. 일반적으로 독성 시약으로 분류되는 H_2O_2 에 의해 세포독성을 초래하지만, 본 발명에 따른 하이드로젤 중 H_2O_2 의 잔류량은 중합 후 극히 소량이기 때문에 큰 문제를 야기하지 않는 것으로 판단되었다.

[0110] 상기 방법에 따라 과산화수소 정량 분석 키트를 이용하여 잔류하는 H_2O_2 의 양을 측정하였다. 하지만, 정량키트의 분석범위 내에서 H_2O_2 는 검출되지 않았으며, 이는 H_2O_2 농도가 $5\mu M$ 미만의 소량임을 의미한다. 상기 H_2O_2 농도는 세포독성 수준인 1 mM H_2O_2 농도보다 훨씬 적은 양이다.

[0111] 도 9를 참조하면, 다양한 EGDA 함량(0.1 내지 0.5 중량%) 변화에 따라 가교도의 영향을 추가적으로 평가하였으며 hDFB 세포의 80% 이상이 생존하는 것을 확인하였다. 상기 결과로부터 AAc/GH 이중 가교 하이드로젤의 세포독성 주요 원인은 잔류하는 AAc 단량체에 의한 것이며, 또한 Fe^{2+} 비율을 제어함으로써 AAc/GH 이중 가교 하이드로젤의 세포적합성을 향상시킬 수 있었다.

[0112] <실험예 3> 다양한 조성을 갖는 이중 가교 하이드로젤의 기계적 강도 평가

[0113] 하기 표 1과 같이 일차 네트워크 하이드로젤에 이용되는 단량체의 종류와, 이차 네트워크 하이드로젤에 이용되는 고분자의 종류를 변경시켜 앞선 실시예 7과 동일한 방법으로 제조한 이중 가교 하이드로젤의 기계적 강도를 측정한 결과, 도 10과 같이 아크릴 기능기 및 효소가교 기능기를 함유한 단량체와 다양한 고분자들에서 간단하게 이중 가교 하이드로젤을 제조할 수 있음을 확인하였다. 특히, 일차 네트워크 하이드로젤에 이용되는 단량체로서 아크릴산을 이용하고, 이차 네트워크 하이드로젤에 이용되는 고분자로서 GH를 이용한 경우 가장 우수한 최대 압축강도 값(4.2 MPa)을 나타내었다.

표 1

No.	1차 가교(중량%)		2차 가교(중량%)			가교제(중량%)
	AAc	AAM	TTA	GH	HPT	MBAA
1	30		5			0.25
2	30			5		0.25
3	30				5	0.25
4		30	5			0.25
5		30		5		0.25
6		30			5	0.25

[0115] <실험예 4> 세포 부착성 평가

[0116] 세포 부착성 평가를 위하여 실험예 3에 개시된 방법으로 하이드로젤을 제조한 후 제조된 하이드로젤 표면에 섬유아세포를 배양하였다. 실험에 사용된 세포의 농도는 5×10^4 cells/well 이었으며 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포는 live/dead 분석키트로 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다. 부착된 세포의 양은 AAc/HPT, AAc/TTA, AAc, AAc/GH 순서로 증가하였으며 AAc/GH 이중 가교 하이드로젤에선 AAc대비 증가하였을 뿐 아니라 컨트롤로 이용된 TCPS 대비 더 우수한 세포부착 특성을 나타내었다. 이는 GH 고분자의 젤라틴 내에 발현되어있는 RGD 등의 세포부착단백질의 효과이다. AAc/HPT 혹은 AAc/TTA가 이용된 이중 가교 하이드로젤에선 AAc 대비 현저히 감소한 세포부착 특성을 보였는데, 이는 HPT와 TTA 고분자가 가진 방오횜성에 기인하였다.

[0117] 결과를 도 11에 나타내었다. 도 11을 참조하면, 고분자의 조성변화를 통해 이중 가교 하이드로젤의 세포부착특성을 용이하게 변화시킬 수 있음이 확인되었다.

[0118] <실시예 8> 마크로코어를 갖는 이중 가교 하이드로젤 제조

[0119] AAc, GH 및 F127DA를 포함하는 고분자 전구체 용액을 $37^\circ C$ 에서 30분 동안 가열한 후 $FeCl_2$, AA, HRP 및 H_2O_2 를 가하여 실시예 7과 동일한 방법으로 펜톤/효소 가교반응을 통해 이중 가교 하이드로젤을 제조하였다. 이중 가교 하이드로젤 내 각 시료의 농도는 AAc (25 중량%), GH (5 중량%), F127DA (5 중량%), $FeCl_2$ (0.025 mM), AA (4.975 mM), HRP (0.05 mg/mL), H_2O_2 (20 mM)이 되도록 제조하였다.

[0120] <실험예 5> 마크로코어를 갖는 이중 가교 하이드로젤의 기계적 강도 평가

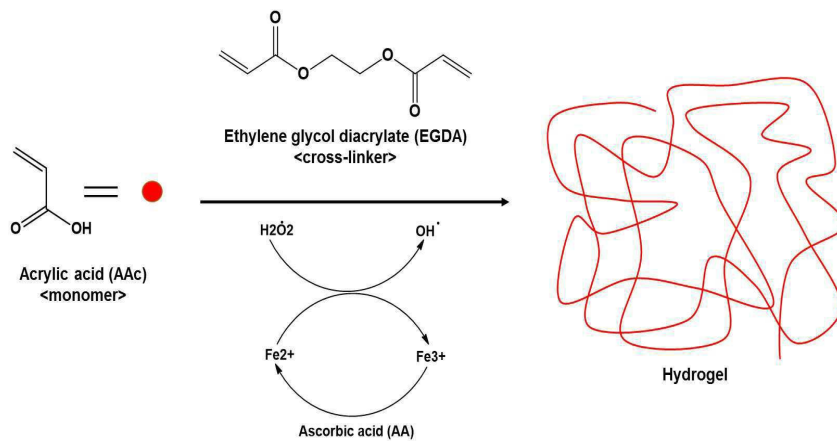
[0121] 실시예 8에 따른 마크로코어를 갖는 AAc/GH 이중 가교 하이드로젤과, 가교제로서 EGDA를 이용한 AAc/GH 이중 가교 하이드로젤을 비교하여 기계적 강도를 측정하였으며, 상기 기계적 강도는 만능 재료 시험기(universal testing machine; UTM)를 이용하였다. 이때, 가교제로서 EGDA를 이용한 AAc/GH 이중 가교 하이드로젤은 GH(5 중량%), AAc(30 중량%), EGDA(0.25 중량%) Fe^{2+} 비율(0.5%), HRP(0.05 mg/ml), 및 H_2O_2 (20 mM)의 조성으로 제조하였다.

[0122] 그 결과, 도 13과 같이 F127DA를 가교제로 이용하여 제조한 하이드로젤은 기존 EGDA를 가교제로 이용한 하이드로젤에 비해 향상된 물성을 나타내었다. 상기 F127DA는 온도감응성 고분자로서 37°C 에서 자가조립을 통해 이중 가교 하이드로젤 내부에 마이셀을 형성할 수 있으며, 상기 이중 가교 하이드로젤 내부에 형성된 마이셀 마크로코어는 외부에서 가해지는 충격을 효과적으로 분산시켜 결과적으로 보다 향상된 물성을 나타내었다.

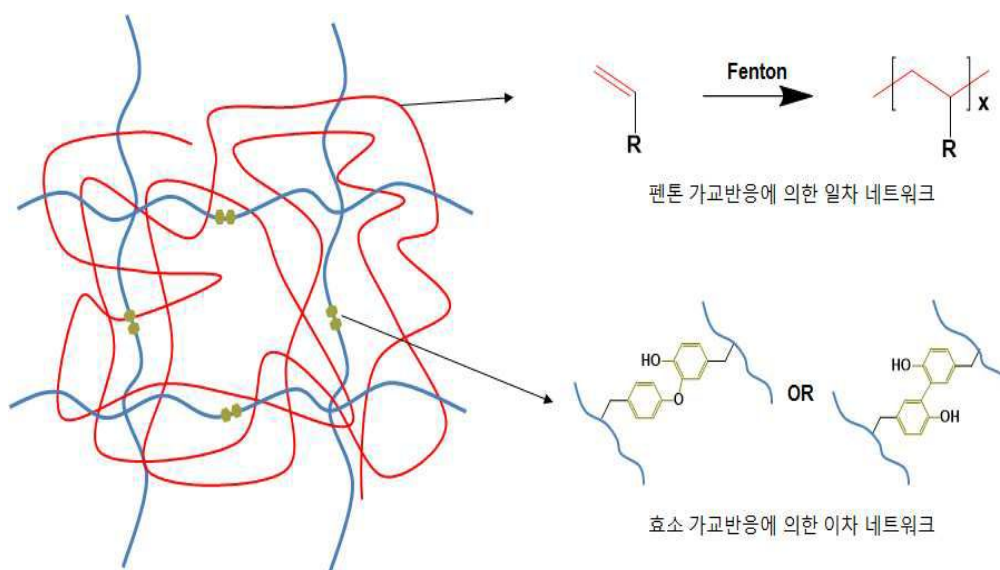
[0123] 이상과 같이, 본 발명은 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 본 발명은 이것에 의해 한정되지 않으며 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 본 발명의 기술 사상과 아래에 기재될 청구범위의 균등 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능함은 물론이다.

도면

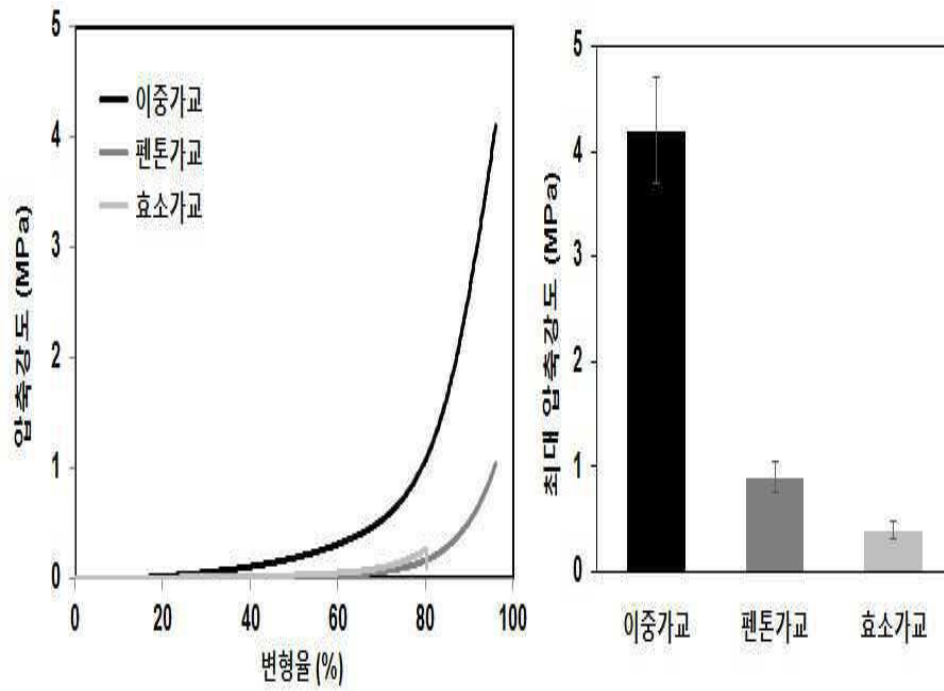
도면1



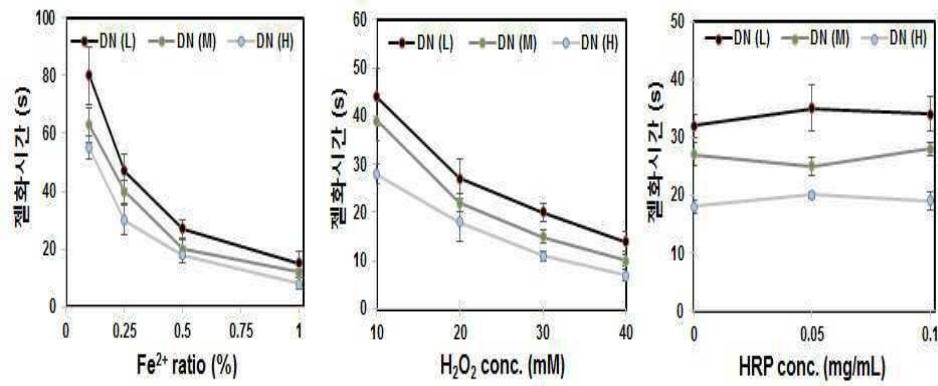
도면2



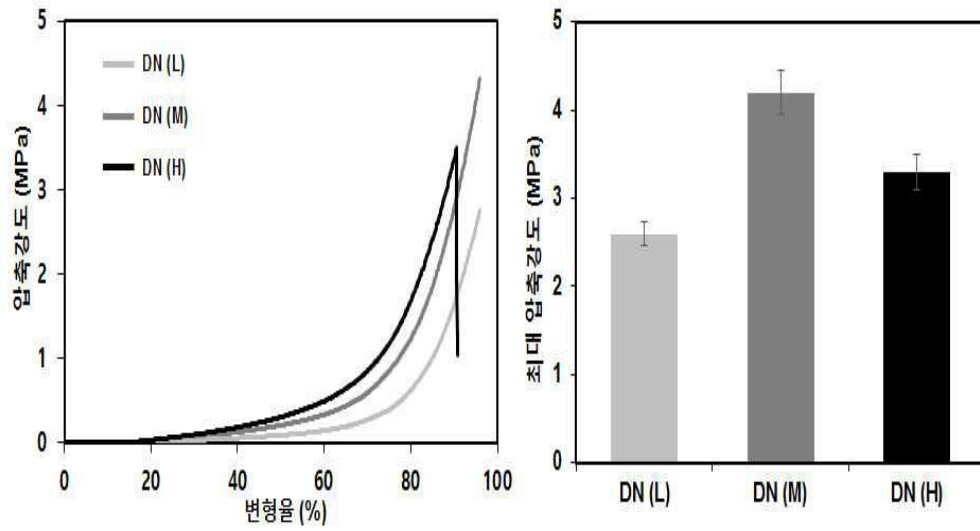
도면3



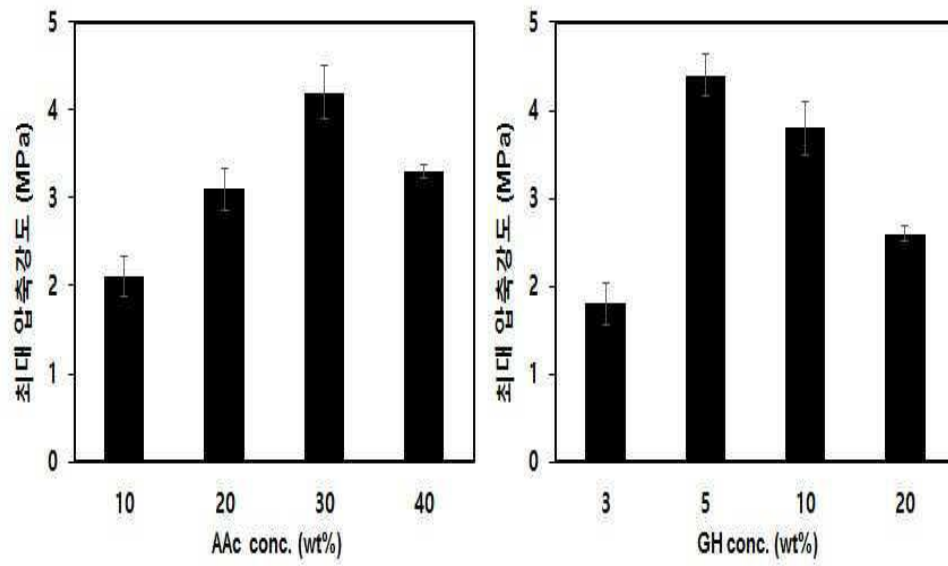
도면4



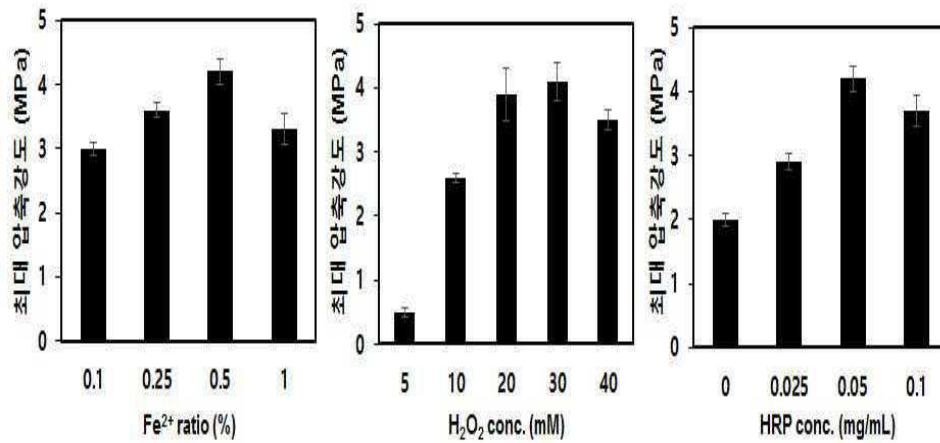
도면5



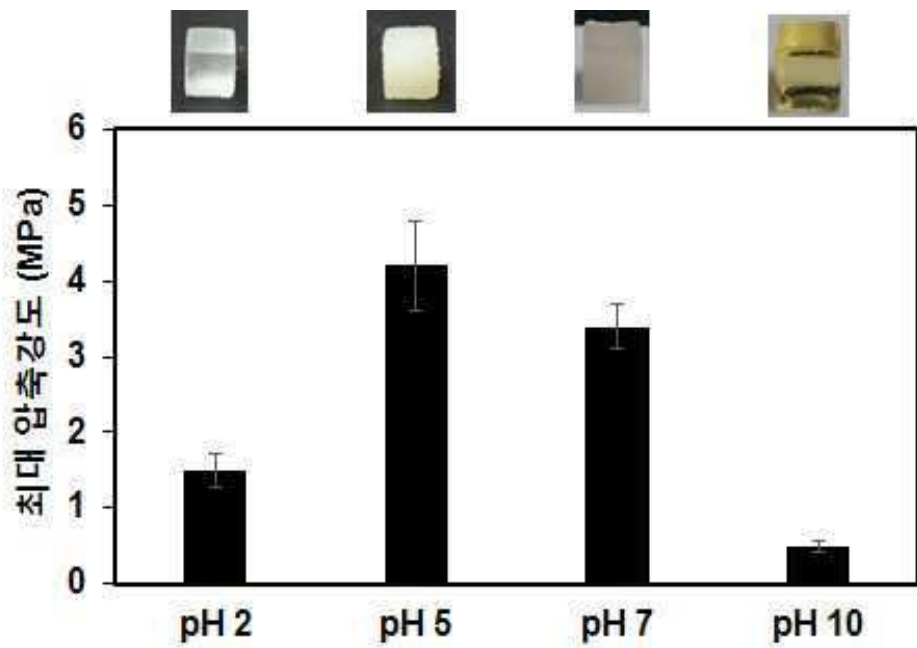
도면6



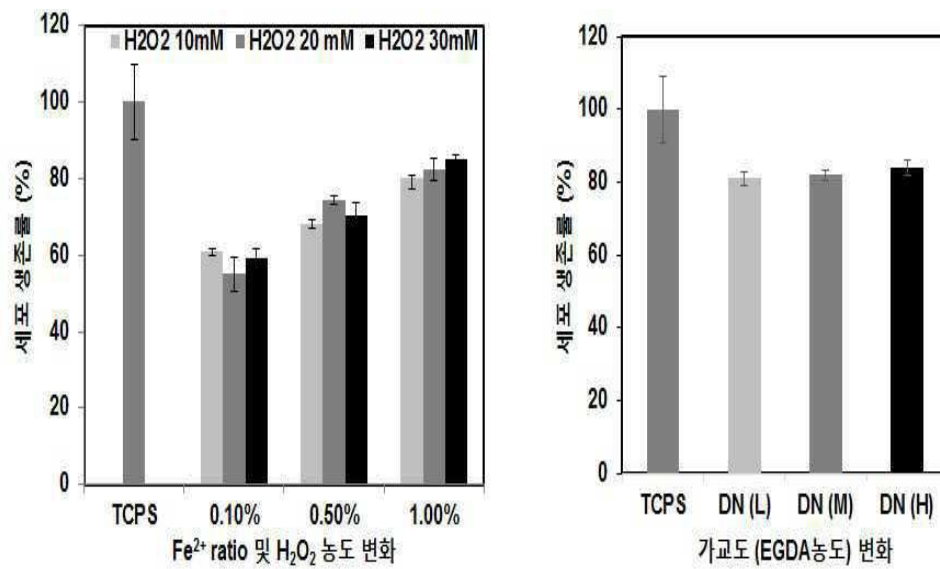
도면7



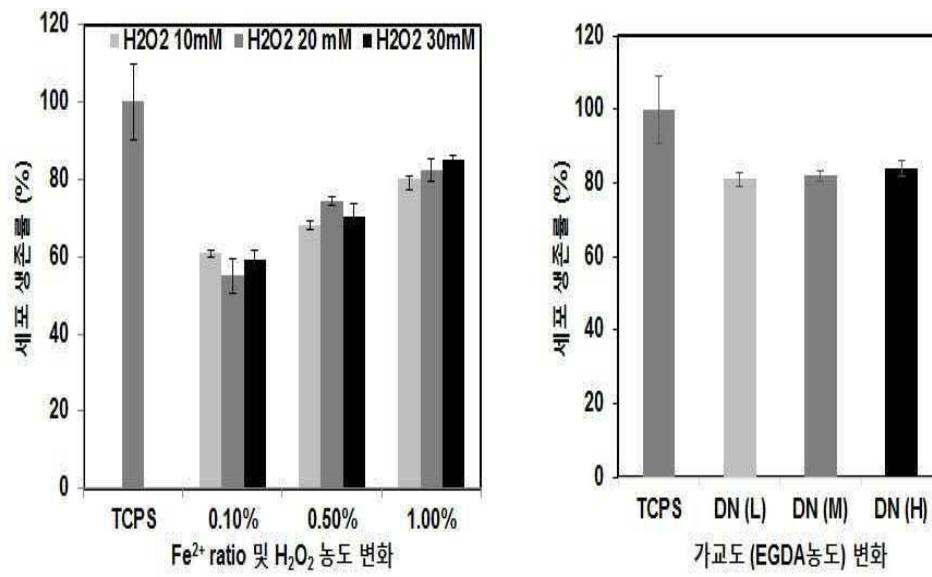
도면8



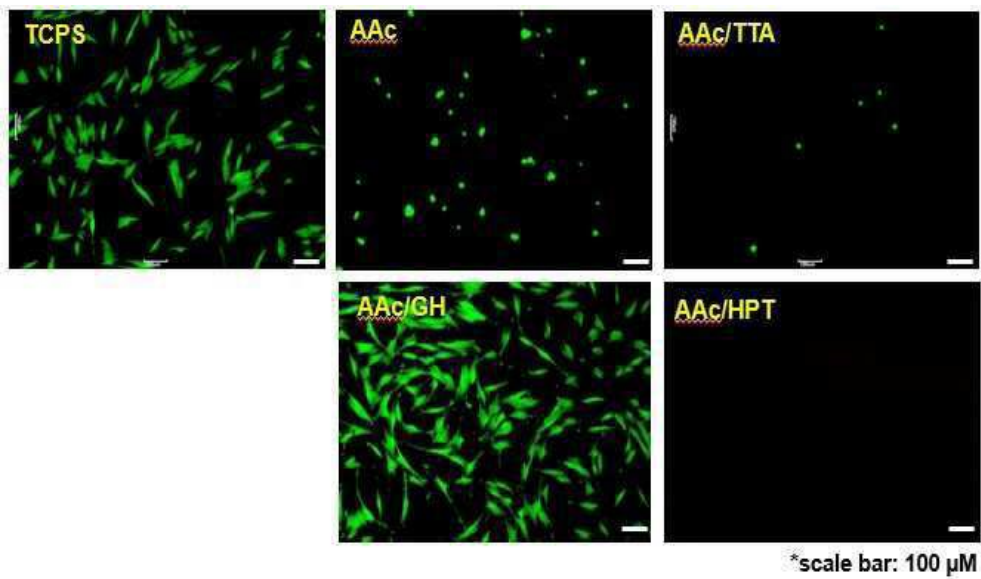
도면9



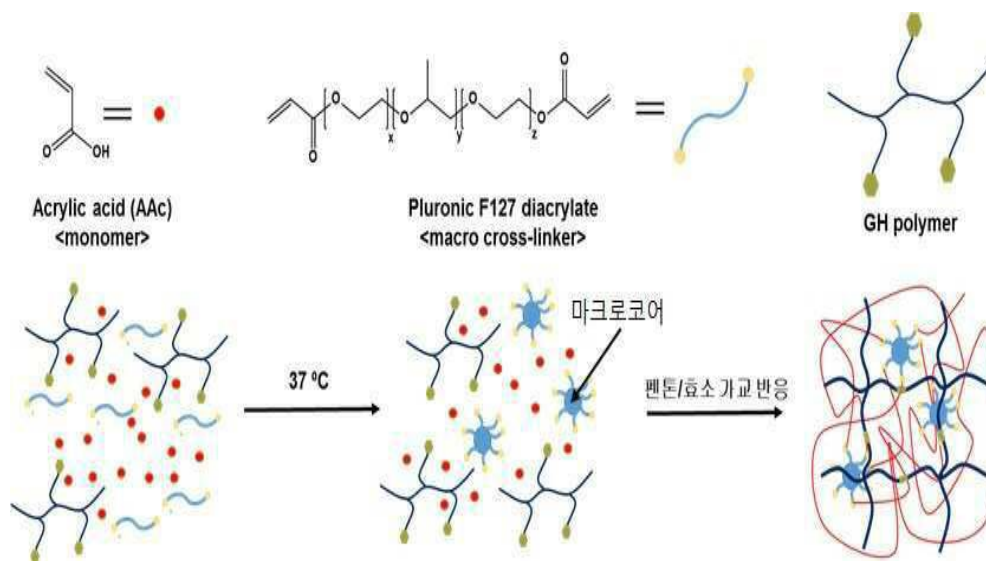
도면10



도면11



도면12



도면13

