



- (51) 국제특허분류:
A61K 9/06 (2006.01) A61K 47/30 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01) A61K 38/43 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/008202
- (22) 국제출원일: 2013년 9월 11일 (11.09.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2012-0103893 2012년 9월 19일 (19.09.2012) KR
10-2013-0107937 2013년 9월 9일 (09.09.2013) KR
- (71) 출원인: 아주대학교산학협력단 (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 443-749 경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동), Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 박기동 (PARK, Ki Dong); 137-772 서울시 서초구 서초동 신동아아파트 3-710, Seoul (KR). 배진우 (BAE, Jin Woo); 441-741 경기도 수원시 권선구 권선동 1270 벽산아파트 402-205, Gyeonggi-do (KR). 박경민 (PARK, Kyung Min); 430-751 경기도 안양시 만안구 석수 1동 푸르지오아파트 104-102, Gyeonggi-do (KR). 이윤진 (LIH, Eu Gene); 120-832 서울시 서대문구 연희

1동 618번지, Seoul (KR). 김배영 (KIM, Bae Young); 502-756 광주광역시 서구 유촌동 버들주공 1단지아파트 101-102, Gwangju (KR). 이윤기 (LEE, Yun Ki); 463-400 경기도 성남시 분당구 삼평동 봇들마을 휴먼시아 407-301, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 153-803 서울시 금천구 가산디지털1로 151 이노플렉스 1차 601호, Seoul (KR).

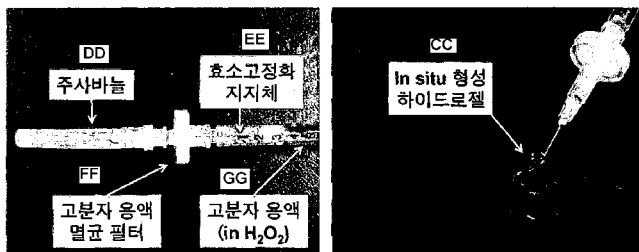
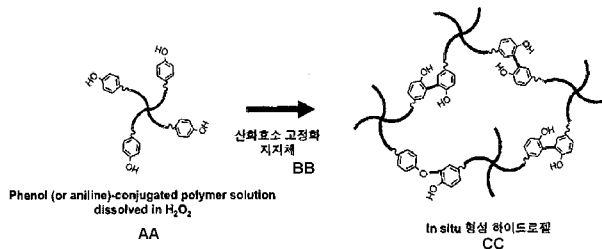
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR PREPARING *IN SITU*-FORMED HYDROGEL USING ENZYME-IMMOBILIZED SUPPORT, AND BIOMEDICAL USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 효소 고정화 지지체를 이용한 *IN SITU* 형성 하이드로젤의 제조방법 및 이의 생의학적 용도



AA ... Phenol (or aniline)-conjugated polymer solution dissolved in H_2O_2
BB ... Oxidase-immobilized support
CC ... *In situ*-formed hydrogel
DD ... Needle
EE ... Enzyme-immobilized support
FF ... Polymer solution sterilization filter
GG ... Polymer solution (in H_2O_2)

(57) Abstract: The present invention relates to a method for preparing a hydrogel, comprising the steps of: preparing an enzyme-immobilized support; making contacting with a polymer having a phenol or aniline functional group at a side chain and the support in the presence of hydrogen peroxide to cross-link the same; and obtaining a hydrogel by separating the enzyme-immobilized support. According to the present invention, a hydrogel is formed by cross-linking a polymer having a phenol or aniline functional group at a side chain through an enzyme-immobilized support, and thus a hydrogel containing no enzymes is obtained. Therefore, the biomedical application range of a hydrogel can be expanded since it is possible to overcome an *in vivo* stability problem such as an immune reaction caused by an enzyme.

(57) 요약서: 본 발명은 효소가 고정화된 지지체를 제조하는 단계; 측쇄에 페놀 또는 아닐린 관능기를 갖는 고분자와 상기 지지체를 과산화수소 존재 하에서 접촉시켜 가교시키는 단계; 및 상기 효소가 고정화된 지지체를 분리하여 하이드로젤을 수득하는 단계;를 포함하는 하이드로젤의 제조방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, 지지체에 고정화된 효소에 의해 측쇄에 페놀 또는 아닐린 관능기를 갖는 고분자가 가교되어 하이드로젤이 형성되며, 이에 따라 효소를 포함하지 않는 하이드로젤이 얻어진다. 따라서 효소로 인한 면역 반응과 같은 체내 안전성 문제점을 극복할 수 있어 하이드로젤의 생의학적 적용 범위를 확장시킬 수 있다.



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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 효소 고정화 지지체를 이용한 IN SITU 형성 하이드로젤의 제조방법 및 이의 생의학적 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 효소가 고정화된 지지체를 사용하여 향상된 생체 안전성을 갖는 in situ 형성 하이드로젤의 제조방법, 이의 생의학적 용도 및 상기 효소가 고정화된 지지체를 포함하는 하이드로젤 제조용 주사기에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 하이드로젤은 그의 생체 적합성, 높은 수분 함량 및 영양분과 대사 산물의 우수한 투과성으로 인해 삽입물, 약물 및 세포 전달 담체와 같은 약학 및 생물 의학적 응용을 위한 재료로서 널리 연구되었다. 이러한 하이드로젤은 천연 및 합성 고분자를 이용하여 제조가 가능하며, 다양한 화학적 및 물리적 교차-결합을 통하여 하이드로젤 형성이 가능하다. 지난 10년간 연구 관심은 고분자 용액을 체내에 주입하여 체내에서 하이드로젤을 형성하는 in situ 형성 하이드로젤 형태로 개량화 되었다.
- [3] 이러한 in situ 형성 하이드로젤은 생체 주입형 하이드로젤 시스템으로 사용이 가능하다. 생체 주입형 하이드로젤 시스템은 최소 침투 기술을 기반으로 환자에게 편안함을 부여하는 용이한 형태의 응용이 많은 주목을 받아 왔다.
- [4] 이들 시스템들은 원하는 조직, 기관 또는 체강 내에서 응고되기 전에 최소 침투 방식으로 신체 내에서 하이드로젤을 형성할 수 있는 주입형 유동체이다.
- [5] 예를 들어, 생체 주입형 하이드로젤 시스템은 이식을 위한 외과적 수술을 필요로 하지 않고, 많은 치료 약물의 단순한 혼합을 통해 통합될 수 있다. 이들 생체 주입형 하이드로젤을 이용하여 결합 또는 체강 함몰 부위를 충전시키는 것이 가능하다. 하이드로젤 시스템은 기계적 물성이 낮은 반면, 높은 세포 분주 효율, 생리활성 약물 예를 들어, 펩타이드, 단백질 및 DNA 등의 전달용 담체, 및 세포 및 생성물로의 우수한 영양물 운송과 같은 여러 장점을 지니고 있다.
- [6] 하지만 온도나 UV 조사 등을 통해 개발된 기존의 주입형 하이드로젤은 고분자 수용액 제조시 시간이 많이 소요되거나, 높은 용액점도 및 느린 상전이 시간과 같은 문제점들을 가지고 있다. 최근에는 이러한 기존 in situ 형성 하이드로젤의 문제점을 개선하기 위하여 효소 반응을 이용한 in situ 하이드로젤들이 많이 개발되고 있다.
- [7] 이러한 하이드로젤은 호스라디시 퍼록시데이즈(horseradish peroxidase, HRP)와 과산화수소(H_2O_2)의 존재 하에 효소 산화반응을 통하여 in situ 형성 하이드로젤 시스템으로 개발되었고 이는 화학적 가교반응에 의해 제조되는 기존의 하이드로젤의 단점인 기계적 강도와 체내 안정성 등을 향상시킬 수 있다.
- [8] 현재 개발되어 있는 효소 감응성 in situ 형성 하이드로젤의 종류는 다음과 같다.

테트로닉-타이라민 (Tet-TA) (Park et al., Biomacromolecules 2010/2012, Soft Matter 2011), 젤라틴-폴리에틸렌 글라이콜-타이라민(GPT) (Park et al., Journal of Materials Chemistry 2011), 텍스트란-타이라민(dec-TA)(Jin et al., Biomaterials 2007), 히알루론산-타이라민(HATA)(Kurisawa et al., Chem. Commun. 2005), 젤라틴-하이드록시프로피오닉산(GHPA)(Wang et al., Biomaterials 2009), 젤라틴-타이라민(GTA)(Sakai et al., Biomaterials 2009), 알긴산-하이드록시페닐아세트산(AHPA)(Sakai et al., Acta Biomaterialia 2007) 등이 이에 속한다.

- [9] 상기 효소 감응성 하이드로젤은 고분자 사슬 내 페놀유도체를 포함하고 있으며, 이 페놀유도체가 HRP 매개 커플링 반응을 통하여 오르토(ortho) 위치에서의 탄소-탄소 결합 또는 오르토 위치의 탄소와 페녹시산소 사이의 탄소-산소 결합을 통해 하이드로젤이 형성하게 된다. 또한 하이드로젤의 젤형성 시간, 기계적 강도, 생분해성 등의 물리화학적 특성은 HRP와 H_2O_2 의 농도 조절에 의해 쉽게 조절할 수 있으며, 다양한 생리활성물질 및 약물, 세포를 하이드로젤 내에 쉽게 담지할 수 있는 장점이 있다. 하지만 이러한 효소 감응성 하이드로젤은 형성된 하이드로젤 내부에 동식물 유래의 HRP와 같은 효소들을 함유하고 있어 체내에 주입되었을 때 면역 반응 등과 같은 생체 안전성과 관련된 문제를 야기할 수 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 따라서 본 발명은 효소가 함유되지 않도록 하이드로젤을 제조하는 방법을 제공하고자 한다.
- [11] 또한 본 발명은 상기 방법으로 제조된 하이드로젤 및 이의 생의학적 용도를 제공하고자 한다.
- [12] 또한 본 발명은 상기 하이드로젤 제조시 사용되는 하이드로젤 제조용 주사기를 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [13] 상기 과제의 해결을 위하여, 본 발명은 효소가 고정화된 지지체를 제조하는 단계; 측쇄에 페놀 또는 아닐린 관능기를 갖는 고분자와 상기 지지체를 과산화수소 존재 하에서 접촉시켜 가교시키는 단계; 및 상기 효소가 고정화된 지지체를 분리하여 하이드로젤을 수득하는 단계;를 포함하는 하이드로젤의 제조방법 및 상기 방법에 의해 제조된 효소를 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 하이드로젤을 제공한다.
- [14] 또한 본 발명은 상기 하이드로젤을 포함하는 조직재생 및 충전용 임플란트 소재를 제공한다.
- [15] 또한 본 발명은 상기 하이드로젤을 포함하는 생리활성 물질 또는 약물 전달용 담체를 제공한다.

- [16] 또한 본 발명은 내공간을 갖는 실린더에 피스톤이 내장되고 피스톤의 슬라이드 작동에 의하여 배출력을 발생시켜 주사바늘을 통하여 약액을 배출토록 되는 주사기에 있어서, 실린더의 주사바늘쪽 내부에 효소가 고정화된 지지체가 구비되며, 측쇄에 페놀 또는 아닐린 관능기를 갖는 고분자가 실린더에 충전된 것을 특징으로 하는, 하이드로젤 제조용 주사기를 제공한다.

발명의 효과

- [17] 본 발명에 따르면, 지지체에 고정화된 효소에 의해 측쇄에 페놀 또는 아닐린 관능기를 갖는 고분자가 가교되어 하이드로젤이 형성되며, 이에 따라 효소를 포함하지 않는 하이드로젤이 얻어진다. 따라서 효소로 인한 면역 반응과 같은 체내 안전성 문제점을 극복할 수 있어 하이드로젤의 생의학적 적용 범위를 확장시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 효소 고정화된 지지체는 재사용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [18] 도 1은 도파 유도체로 도파(3,4-디하이드록시페닐알라닌), DHCA를 사용하여 HRP 효소를 유리입자상에 표면 고정화시키는 방법의 모식도이다.
- [19] 도 2는 실란화 반응 이후에 카르복실기를 도입하고 EDC/NHS 를 이용하여 유리입자 표면 위에 HRP를 고정화하는 방법에 대한 모식도이다.
- [20] 도 3은 철화합물과 에폭시기를 가지는 단량체를 공중합시켜 철입자 함유 미세 고분자입자를 제조하고 지지체 표면위에 HRP를 고정화하는 방법의 모식도이다.
- [21] 도 4는 측쇄에 페놀 관능기를 갖는 고분자인 테트로닉-타이라민 (Tet-TA)의 합성 모식도이다.
- [22] 도 5는 측쇄에 페놀 관능기를 갖는 고분자인 젤라틴-하이드록시페닐아세트산(GHPA)의 합성 모식도이다.
- [23] 도 6는 측쇄에 페놀 관능기를 갖는 고분자인 키토산-하이드록시페닐아세트산(CHPA)의 합성 모식도이다.
- [24] 도 7은 측쇄에 페놀 관능기를 갖는 고분자인 젤라틴-폴리(에틸렌글리콜)-타이라민(GPEG-TA)의 합성 모식도이다.
- [25] 도 8은 측쇄에 페놀 관능기를 갖는 고분자인 키토산-폴리(에틸렌글리콜)-타이라민(CPTA)의 합성 모식도이다.
- [26] 도 9은 측쇄에 페놀 관능기를 갖는 고분자인 히알루론산-폴리(에틸렌글리콜)-타이라민 (HA-PEG-TA)의 합성 모식도이다.
- [27] 도 10은 측쇄에 페놀 관능기를 갖는 고분자인 카르복시메틸 셀룰로스-폴리(에틸렌글리콜)-타이라민 (CMC-PEG-TA)의 합성 모식도이다.
- [28] 도 11은 측쇄에 페놀 관능기를 갖는 고분자인 알지네이트-폴리(에틸렌글리콜)-타이라민 (ALG-PEG-TA)의 합성 모식도이다.
- [29] 도 12는 본 발명의 실시예에서 사용한 주사기 및 젤 형성 모식도이다.
- [30] 도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 주사기의 단면을 도식화한 하이드로젤의 제조 모식도이다.

- [31] 도 14는 본 발명의 일실시예에 따른 하이드로젤의 세포 독성 실험 결과이다.
- [32] 도 15는 본 발명의 일실시예에 따른 하이드로젤의 성장인자 방출능 검토 실험 결과이다.
- [33] 도 16은 본 발명의 일실시예에 따른 하이드로젤의 조직 접착 강도 실험 결과이다.
- [34] 도 17은 본 발명의 일실시예에 따른 미세 입자의 하이드로젤 형성 재사용능에 관한 실험 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [35] 본 발명은 효소가 고정화된 지지체를 제조하는 단계; 측쇄에 페놀 또는 아닐린 관능기를 갖는 고분자와 상기지지체를 과산화수소 존재 하에서 접촉시켜 가교시키는 단계; 및 상기 효소가 고정화된 지지체를 분리하여 하이드로젤을 수득하는 단계;를 포함하는 하이드로젤의 제조방법을 제공한다.
- [36] 효소는 특이적 반응성 및 높은 선택성, 그리고 우수한 반응효율로 인해 다양한 분야의 화학반응 촉매로서 이용되어 왔다. 하지만 효소의 대량합성 및 정제가 어렵고 가격이 비싸며, 반응조건과 보관에 따른 효소활성의 저하가 지적되어 왔다. 이를 개선하기 위해 효소를 나노/마이크로 미립구 등 다양한 형태 및 종류의 지지체 표면에 화학적으로 고정화하여 응용목적에 따른 화학반응에 이용하는 기술에 관한 연구가 많이 진행되었다. 효소의 표면 고정화를 통해 제조된 효소-지지체(enzyme immobilized substrates)는 화학반응 후 쉽게 분리가 가능하고 재활용이 가능하며, 효소의 활성을 유지하는 동시에 저장 안정성을 높일 수 있다고 보고되어 있다. 따라서 본 발명의 발명자들은 이러한 효소의 표면 고정화 기술을 통해 하이드로젤을 제조하는 방법에 대해 연구하던 중, 측쇄에 페놀 또는 아닐린 관능기를 갖는 고분자와 효소가 고정화된 지지체를 과산화수소 존재 하에서 반응시킨 후 지지체를 분리하면 효소가 포함되지 않은 in situ 형성 하이드로젤을 제조할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [37] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 지지체에 고정화되는 효소는 호스래디시 퍼록시데이즈(horseradish peroxidase), 글루타치온 퍼록시데이즈(glutathione peroxidase), 할로머록시데이즈(haloperoxidase), 미엘로퍼옥시데이즈(myeloperoxidase), 카탈라아제(catalase), 헤모프로틴(hemoprotein), 퍼록사이드(Peroxide), 퍼록시레독신(peroxiredoxin), 동물 헴-의존적 퍼록시데이즈(animal heme-dependent peroxidases), 티로이드 퍼록시데이즈(thyroid peroxidase), 바나듐 브로모퍼록시데이즈(vanadium bromoperoxidase), 락토퍼록시데이즈(lactoperoxidase), 티로시네이즈(tyrosinase), 및 카테콜 옥시데이즈(catechol oxidase)로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상일 수 있으며 이에 제한되는 것은 아니다.
- [38] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 지지체는 미세 입자, 다공성 스폰지 또는 다공성 시트 형태일 수 있으며, 미세 입자형 지지체는 비다공성 또는 다공성

형태이며, 유리입자, 금속입자, 고분자입자 및 이들의 혼합입자로 이루어진 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[39] 상기 혼합입자는 금속이 함유된 고분자입자일 수 있으며, 상기 금속이 함유된 고분자입자는 철을 함유할 수 있다.

[40] 또한, 상기 철이 함유된 고분자 입자는 에폭시기를 갖는 단량체와 철화합물을 공중합하여 제조한 것이다.

[41] 본 발명의 일실시예에서, 상기 효소는 크로마토그래피와 면역분석법 분야에서 알려진 기술을 이용하여 고상(solid phase)에 고정화될 수 있으며, 보다 구체적으로, 상기 효소가 고정화된 지지체를 제조하는 단계는, 지지체의 표면을 개질하여 관능기를 도입하는 표면개질 단계; 및 상기 관능기에 효소를 결합시키는 단계를 포함하며, 이때 상기 관능기는 카르복실기, 아민기, 하이드록실기, 알데히드기, 에폭시기, 티올기, 말레이미드기, 카보네이트 에스터기, 시아노기, 아크릴기, 아세틸렌기 또는 디아조기일 수 있다.

[42] 상기 표면개질은 3,4-디하이드록시 하이드로신남산, 도파민, 클로로아세틸카테콜, 아미노메틸카테콜, 디옥시에피네프린, 디하이드록시벤조히드라지드, 카페익산 펜에틸에스터 및 히루테논으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 카테콜 유도체를 사용하여 관능기를 도입할 수 있지만, 상기 열거된 카테콜 유도체와 구조적으로 유사한 화합물을 사용할 경우 화학적 결합의 동일함에 비취볼 때 이에 한정하는 것은 아니다.

[43] 또한, 상기 표면개질은 3-아미노프로필 트리에톡시실란, 트리메톡(7-옥텐-1-일)실란, 비닐트리메톡시실란, 3-트리메톡시실릴-1-프로판티올, 3-아미노프로필 트리메톡시실란, 아미노에틸 트리메톡시실릴 프로필아민, 트리에톡시비닐실란, 이소시아네이트프로필 트리에톡시실란, 시아노에틸 트리에톡시실란, 머캅토프로필 트리에톡시실란 및 트리에톡시실릴프로필 디에탄올아민으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 실란 유도체를 사용하여 관능기를 도입할 수 있지만, 상기 열거된 실란 유도체와 구조적으로 유사한 화합물을 사용할 경우 화학적 결합의 동일함에 비취볼 때 이에 한정하는 것은 아니다.

[44] 그러나, 이미 표면에 상기 관능기를 포함하고 있는 고분자 비드인 폴리스티렌 비드, SiO₂ 비드 등의 미세 지지체를 사용하는 경우에는 상기 별도의 표면개질 단계 없이 효소의 결합이 가능함은 당업자에게 자명하다 할 것이다.

[45] 본 발명의 이하 실시예에서, 미세 입자형 지지체로는 유리입자가 사용되고, 상기 표면개질은 3,4-디하이드록시 하이드로신남산 (실시예 1, 도 1 참조) 또는 3-아미노프로필 트리에톡시실란 (실시예 2, 도 2 참조)을 사용하여 수행된 바 있고, 이때, 3,4-디하이드록시 하이드로신남산의 도입으로 인해 카르복실 관능기가, 3-아미노프로필 트리에톡시실란의 도입에 의해 아미노 관능기가 도입된다. 이외에도 화학기상증착법, 플라즈마 처리 기법 등 종래의 표면개질 기술을 통한 관능기의 도입이 가능함은 당업자에게 자명하다 할 것이다.

- [46] 상기 도입된 관능기는 EDC(N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride), NHS(N-hydroxysuccinimide), 글루타르알데히드(glutaraldehyde), 이소티오시아네이트(diisothiocyanate), 이소시아네이트(isocyanate), 디하이드록시숙시이미드(dihydroxysuccinimide) 및 아비딘/바이오틴(avidin/biotin)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 커플링제(coupling agent)를 사용하여 활성화될 수 있으며, 상기 활성화된 관능기에 효소가 결합하여 효소가 미세 입자형 지지체에 고정화된다.
- [47] 또한 본 발명의 실시예에서, 절입자가 함유된 고분자입자의 경우 표면에 에폭시 관능기가 존재하여 추가적인 과정없이 효소를 바로 첨가함으로써 효소가 화학적으로 표면 고정화된 고분자입자가 제조된다.
- [48] 본 발명의 다른 일실시예에서, 상기 고정화된 효소의 농도는 효소농도가 0.001 ~ 10 mg/g, 0.1 내지 10 mg/g, 또는 0.5 내지 7 mg/g 일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [49] 이때, 상기 결합한 효소의 활성을 높이기 위하여 다관능기를 포함하는 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 폴리에틸렌이민(PEI), 폴리비닐알콜(PVA) 또는 폴리아크릴산(PAA)이 스페이서(spacer)로 사용될 수 있다.
- [50] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 본 발명에 사용되는 고분자는 테트로닉, 다관능성 폴리에틸렌글리콜, 젤라틴, 키토산, 히알루론산, 헤파린, 셀룰로스, 덱스트란, 덱스트란 설페이트, 콘드로이틴 설페이트, 케라탄 설페이트, 더마탄 설페이트, 알지네이트, 콜라겐, 알부민, 피브로넥틴, 라미닌, 엘라스틴, 비트로넥틴 및 피브리노겐으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상의 고분자일 수 있다. 상기 본 발명에 사용되는 고분자는 측쇄에 페놀 또는 아닐린 관능기를 갖는 고분자로, 상기 페놀 관능기의 도입을 위해 티라민, 하이드록시페닐아세트산, 하이드록시프로피온산 및 이의 유도체로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상이 사용될 수 있고, 상기 아닐린 관능기의 도입을 위해 하이드록시에틸아닐린, 아미노에틸아닐린, 아미노벤질알콜 및 이의 유도체로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상이 사용될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [51] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 측쇄에 페놀 또는 아닐린 관능기를 갖는 고분자와 효소가 고정화된 지지체간의 접촉 및 분리는 효소가 고정화된 지지체 일방에 존재하는 고분자에 압력을 가하여 고분자를 지지체의 타방으로 통과시키는 방법으로 수행될 수 있으며, 보다 구체적으로 상기 방법은 주사기 키트(syringe kit) 또는 상기 주사기 끝에 스프레이 가능하도록 한 스프레이 키트(spray kit)를 통해 수행될 수 있다.
- [52] 보다 더 구체적으로, 상기 주사기 키트 또는 스프레이 키트 내부의 고분자가 효소가 고정화된 지지체를 통과하며 in situ 가교되어 압출되는 것일 수 있다.
- [53] 본 발명의 일실시예에서, 과산화수소는 측쇄에 페놀 또는 아닐린 관능기를

갖는 고분자와 함께 존재하거나, 이중 주입식 주사기 키트 또는 스프레이 키트를 사용하여 고분자와 별도로 존재할 수 있다.

[54] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 주사기 키트 또는 스프레이 키트와 테프론 성형(teflon mold)을 이용하여 쉬트 또는 디스크 형태의 하이드로젤을 제조할 수 있다.

[55] 상기 방법을 위해, 본 발명은 또한 내공간을 갖는 실린더에 피스톤이 내장되고 피스톤의 슬라이드 작동에 의하여 배출력을 발생시켜 주사바늘을 통하여 약액을 배출토록 되는 주사기에 있어서, 실린더의 주사바늘쪽 내부에 효소가 고정화된 지지체가 구비되며, 측쇄에 페놀 또는 아닐린 관능기를 갖는 고분자가 실린더에 충전된 것을 특징으로 하는, 하이드로젤 제조용 주사기를 제공한다.

[56] 상기 방법에 의해 제조된 하이드로젤은 이하의 실시예 6에서 확인할 수 있는 바와 같이 효소를 포함하지 않는다. 따라서 효소로 인한 면역 반응과 같은 체내 안전성 문제점을 극복할 수 있어 하이드로젤의 생의학적 적용 범위를 확장시킬 수 있다. 따라서 본 발명은 상기 방법에 따라 제조된 효소를 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 하이드로젤, 상기 하이드로젤을 포함하는 조직재생 및 충전용 임플란트 소재 및 상기 하이드로젤을 포함하는 생리활성 물질 또는 약물 전달용 담체를 제공한다.

[57] 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 적용될 수 있다.

[58] 또한 하이드로젤이 생리활성 물질 또는 약물 전달용 담체의 용도로 사용되는 경우, 상기 생리활성물질 또는 약물은 펩타이드 또는 단백질 의약품, 항균제, 항암제 및 항염증제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상일 수 있다.

[59] 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 작동약(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 선택될 수 있다.

[60] 상기 항균제는 미노싸이클린, 테트라싸이클린, 오픈록사신, 포스포마이신, 머게인, 프로플록사신, 암피실린, 페니실린, 독시싸이클린, 티에나마이신, 세팔로스포린, 노르카디신, 겐타마이신, 네오마이신, 가나마이신, 파로모마이신, 미크로 노마이신, 아미카신, 토브라마이신, 디베카신, 세포탁신, 세파클러, 에리스로마이신, 싸이프로플록사신, 레보플록사신, 엔옥사신, 반코마이신, 이미페넴, 후시덕산 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[61] 상기 항암제는 파클리탁셀, 텍소터어, 아드리아마이신, 엔도스타틴, 엔지오스타틴, 미토마이신, 블레오마이신, 시스플레틴, 카보플레틴, 독소루비신, 다우노루비신, 이다루비신, 5-플로로우라실, 메토트렉세이트, 액티노마이신-D 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[62] 상기 항염증제는 아세트아민펜, 아스피린, 이부프로펜, 디크로페낙, 인도메타신, 피록시캄, 페노프로펜, 플루비프로펜, 케토프로펜, 나프록센, 수프로펜, 톡소프로펜, 시녹시캄, 테녹시캄 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[63] 본 발명의 일실시예에서, 고분자 주사슬로 테트로닉을 사용하며, 이에 티라민을 통해 페놀 유도체를 결합시켜 테트로닉-티라민(Tet-TA)를 합성하였으며, H_2O_2 존재 하에서 HRP가 고정화된 미세입자와 접촉 후 분리시켜 상기 고분자로부터 하이드로젤을 제조하였다. 이렇게 제조된 하이드로젤은 내부에 효소가 검출되지 않았으며, 젤 형성 시간, 기계적 강도 향상 및 체내 안전성이 향상된 것을 알 수 있었다. 또한, 도입된 성장인자를 서방형으로 방출하는 것을 확인할 수 있어, 생리활성 물질 또는 약물 전달용 담체의 용도로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[64] 본 발명에 따른 하이드로젤은 조직공학용 주입형 골격; 단백질, DNA, 성장인자, 세포 등과 같은 약물의 서방형 약물 전달체; 조직 충전제; 상처 치료; 및 장유착 방지 등의 다양한 생의학적 응용이 가능하다.

[65] 보다 상세하게는, 본 발명에 따른 하이드로젤은 조직공학용 유효 골격(scaffold)으로서의 인공 세포외 매트릭스로 사용될 수 있다.

[66] 이때, 하이드로젤의 분해 속도는 젤 내부에 있는 세포의 분화 및 성장에 매우 중요한 역할을 하므로, 적절한 분해 속도 조절이 필수적이다. 예를들어, 젤라틴은 세포가 분해하는 매트릭스 메탈로프로테나제(MMP) 특히, MMP-2, 9에 의하여 특이적으로 분해된다.

[67] 또한, 조직공학용 유효 골격으로 사용되는 하이드로젤의 매트릭스 경직도(stiffness) 역시 젤 내부에 있는 세포의 성장과 분화에 많은 영향을 미친다. 또한 각 세포마다 적절한 매트릭스 경직도가 요구된다. 예를 들어 골세포는

경직도가 딱딱한 매트릭스에서 잘 성장하는 것으로 나타났으며, 연조직 세포 예를들어, 섬유아세포, 근육모세포 등은 부드러운 매트릭스에서 잘 성장하는 것으로 알려지고 있다. 효소 반응을 이용한 시스템에서는 과산화수소의 양을 조절함으로써 쉽게 하이드로젤의 가교를 조절할 수 있으며, 따라서 하이드로젤의 경직도를 쉽게 조절할 수 있다.

- [68] 또한, 본 발명에 따른 하이드로젤은 약물 전달용 유효 골격(scaffold)으로서의 인공 세포외 매트릭스로 사용될 수 있다. 예를 들어, 다양한 성장인자들과 물리적 결합을 잘하는 헤파린에 티라민을 도입하여 성장인자를 효과적으로 담지하고 서방형 방출 거동을 가능하게 할 수 있다(성장 인자 결합 사이트). 페놀이 결합되어 있는 세포 접착 펩타이드 또는 단백질 예를들어, **RGDY** 또는 **YIGSR**를 이용하여 하이드로젤 매트릭스 내부의 세포 접착력을 향상시킬 수 있다. 효과적인 세포의 성장과 분화에 필요한 이러한 성분들을 효소 기작을 이용하여 *in situ* 형태로 인공 ECM을 만들 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [69] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [70] <실시예 1> 도파 유도체를 이용한 **HRP**의 표면 고정화
- [71] 도파(3,4-디하이드록시페닐알라닌) 유도체에 존재하는 두 개의 페놀릭 하이드록실기는 퀴논 형태로 산화하여 다양한 재료 표면에 강하게 결합하는 것으로 알려져 있으며, 이를 이용하여 유리입자를 포함한 고분자 및 금속입자 표면에 효소의 화학적 고정화를 위한 관능기를 도입할 수 있고 커플링 에이전트를 사용하여 **HRP**를 고정화할 수 있다.
- [72] 도파 유도체로 도파(3,4-디하이드록시페닐알라닌), **DHCA**를 사용하여 **HRP** 효소를 유리입자상에 표면 고정화시키는 방법의 모식도를 도 1에 나타내었다. 상세한 과정은 다음과 같다.
- [73] 먼저 **DHCA** (3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid)를 트리스(Tris) 버퍼용액(10 mM, pH 8.5)에서 상온 12시간 동안 반응을 보내어 **DHCA**가 결합된 유리입자(직경 212-300 μm) 표면을 얻었다. 카르복실기가 도입된 유리입자는 **MES**(2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) 버퍼(0.1 M, pH 4.5)에서 **EDC**(N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride)와 **NHS**(N-hydroxysuccinimide)를 이용하여 2시간 동안 활성화시킨 다음 과량의 **EDC**와 **NHS**를 **PBS**와 증류수로 세척하여 제거하였다.
- [74] 그 다음 활성화된 유리입자를 sodium phosphate (0.1M, pH 7.2)에 분산시키고 **HRP**용액을 첨가하여 상온에서 6시간 동안 반응시키고 잔존하는 **HRP**와 유리입자 표면에 흡착된 **HRP**를 과량의 **PBS**와 증류수로 세척하여 제거하고

건조시켜 HRP가 고정화된 유리입자를 얻었다.

[75] <실시예 2> 실란화 반응을 이용한 **HRP**의 표면 고정화

[76] 도 2는 실란화 반응 이후에 카르복실기를 도입하고 EDC/NHS를 이용하여 유리입자 표면 위에 HRP를 고정화하는 방법을 나타내고 있다. 상기와 같은 반응으로 이용하고자 하는 화학반응에 따라 APTES 외의 다양한 실란 커플링 에이전트들이 사용될 수 있으며, 실란화 반응 이후에 HRP표면 고정화를 위해 다양한 화학적 관능기가 도입되며, 이에 따라 글루타르알데히드(glutaraldehyde), 이소티오시아네이트(diisothiocyanate), 디하이드록시숙시이미드(dihydroxysuccinimide), 아비딘/바이오틴(avidin/biotin) 등 다양한 커플링 에이전트들이 사용될 수 있다. 이때 HRP의 효소활성을 높이기 위해 폴리에틸렌글리콜(PEG, polyethylene glycol)을 스페이서(spacer)로 사용할 수 있다.

[77] 가. EDC/NHS를 통한 **HRP** 고정

[78] 도 2는 실란화 반응 이후에 카르복실기를 도입하고 EDC/NHS를 이용하여 유리입자 표면 위에 HRP를 고정화하는 방법을 나타내고 있으며, 이의 상세한 과정은 다음과 같다.

[79] 먼저 피라냐(piranha) 용액(황산:과산화수소=3:1)을 이용하여 유리입자를 세척하고 질소로 건조시킨 후, 세척된 유리입자를 톨루엔을 사용하여 제조된 2 vol%의 APTES(3-aminopropyl triethoxysilane)용액에 첨가하고 상온에서 5시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 톨루엔으로 세척하고 110 °C에서 1시간 동안 베이킹(baking)을 하여 아민기가 도입된 유리입자를 얻었다. 이후 5wt% 썬시닉 안하이드라이드(SA, succinic anhydride) 용액에서 상온에서 24시간 반응시켜 카르복실기가 도입된 유리입자를 얻은 후, 과량의 PBS와 증류수로 세척하여 잔존하는 SA를 제거하였다.

[80] EDC와 NHS를 함유한 MES버퍼에 유리입자를 넣어 2시간 동안 반응시킨 후, 세척하여 카르복실기가 활성화된 유리입자를 얻고 마지막으로 HRP를 6시간 반응시켜 HRP가 고정화된 유리입자를 얻었다.

[81] 나. 글루타르알데히드(glutaraldehyde)를 통한 **HRP** 고정

[82] 글루타르알데히드를 처리하여 알데히드기가 도입된 유리입자를 얻기 위해 상기 APTES를 통해 아민기가 도입된 유리입자 1 g에 2.5 wt% 글루타르알데히드용액을 넣고 12시간 동안 상온에서 교반시켰다. 알데히드로 표면이 활성화된 유리입자를 PBS와 증류수로 세척하고 분리한 다음, 나트륨 포스페이트 버퍼(0.05 M, pH 7)에 유리입자를 넣고 HRP를 추가하여 4 °C에서 12시간 동안 반응시켰다. 반응 후, HRP가 고정화된 유리입자를 PBS와 증류수로 세척하고 건조하였다.

[83] <실시예 3> 철 이온이 포함된 지지체를 이용한 **HRP**의 표면 고정화

[84] 도 3은 에폭시(epoxy)기능기를 가지는 단량체와 염화철을 공중합하여 얻은 지지체에 HRP를 고정화하는 방법을 나타내고 있다. 상기와 같은 공중합체에

포함된 철이온은 하이드록실라디칼 생성을 직접 유도하거나 HRP 효소의 역할을 돕는 상승 효과를 유도할 수 있으며, 상기 단량체는 이용하고자 하는 화학반응에 따라 에폭시 기능기 이외의 다양한 기능기들의 사용이 가능하다. 상세한 방법은 아래와 같다.

- [85] 염화철 분자와 에폭시 기능기를 가지는 비닐(vinyl)계의 단량체인 글리시딜 메타크릴레이트(Glycyl methacrylate(GMA)) 와 메틸메타크릴레이트(Methyl methacrylate(MMA)) 그리고, 가교제로서 에틸렌그리콜디메타크릴레이트(Ethylene glycol dimethacrylate(EGDMA))를 사용하여, 약 80 °C 에서 3시간 동안 교반하였다. 생성물을 에탄올과 증류수로 세척하고 건조하여 철이온이 포함된 고분자 입자를 얻었다.
- [86] 상기 제조된 입자에 포함된 에폭시 기능기와 HRP 효소의 아민 기능기의 결합을 통해 쉽게 고정화가 가능하다. 1g의 입자를 PBS에 30분 가량의 교반시켜 분산시킨 후, HRP 용액을 첨가하여 상온에서 2시간 동안 반응시키고 잔존하는 HRP와 지지체 표면에 흡착된 HRP를 과량의 PBS와 증류수로 세척하여 제거하고 건조시켜 HRP가 고정화된 지지체를 얻었다.
- [87] <실시예 4> 고정화된 HRP 정량화
- [88] 상기 실시예 1 및 실시예 2에 따른 고정화 방법 및 HRP 사용농도에 따른 HRP 고정화량을 micro BCA 분석방법을 이용하여 정량 분석하였으며 그 방법은 다음과 같다.
- [89] 0.1 g 의 HRP 고정화 입자 샘플을 튜브에 넣고 1 mL PBS용액에서 1시간 동안 프리웨팅(pre-wetting)시킨 후, 1 mL의 BCA 용액을 넣고 60 °C 에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 562 nm 에서 1 mL 상층액의 UV 흡광도를 측정하고 표준용액인 알부민 농도에 따른 흡광도를 분석하여 HRP 의 농도를 확인하였다.
- [90] 결과는 아래 표 1 내지 3과 같다. 표 1은 실시예 1에 따른 HRP 고정화 결과, 표 2는 실시예 2의 ‘가’에 따른 HRP 고정화 결과, 표 3은 실시예 2의 ‘나’에 따른 HRP 고정화 결과, 표 4는 실시예 3에 따른 고정화 결과이다.

[91] 표 1

[Table 1]

유리입자 양 (g)	HRP 사용 농도(mg/mL)	HRP 고정화량 (μg)
1	0.5	387
1	2.5	655
1	5	805

[92]

[93] 표 2

[Table 2]

유리입자 양 (g)	HRP 사용 농도(mg/mL)	HRP 고정화량 (μg)
1	0.5	51
1	2.5	80
1	5	114

[94]

[95] 표 3

[Table 3]

유리입자 양 (g)	HRP 사용 농도(mg/mL)	HRP 고정화량 (μg)
1	0.5	72
1	2.5	105
1	5	146

[96]

[97] 표 4

[Table 4]

철 함유 고분자입자양 (g)	HRP 사용 농도(mg/mL)	HRP 고정화량(μg)
1	0.5	369
1	2.5	821
1	5	1103

[98]

[99] <실시예 5> 페놀이 결합된 합성 공중합체의 제조

[100] 1. 테트로닉-타이라민(Tet-TA)의 합성

[101] 도 4은 페놀이 결합된 합성 공중합체인 테트로닉-타이라민 (Tet-TA)의 합성 모식도를 나타낸 것이다. 이의 상세한 과정은 다음과 같다.

[102] 테트로닉 30 g(1.67 mmol) 을 디옥산 300 ml 에 용해시킨 후 이 용액에 4-디메틸아미노피리딘(DMPA) 1.018 g(8.33 mmol)과 트리에티아민(TEA) 0.843 g(8.33mmol)을 디옥산 40 ml 에 용해시킨 용액과 p-니트로페닐클로로 메이트(PNC) 1.679 g(8.33 mmol)을 디옥산 50 ml 에 용해시킨 용액을 순차적으로 혼합하였다.

[103] 테트로닉 : 숙신산 무수물 : DMAP : TEA 의 몰비율은 1:5:5:5이다. 이때 반응온도는 30 °C 이며, 질소 분위기에서 24 시간 반응을 진행하였다. 반응 종료 후 용액을 여과기를 이용하여 잔존하는 시약들을 제거한 후 회전식 증발

농축기를 이용하여 반응 용액을 농축시키고 차가운 에테르 1600 ml 에 서서히 떨어뜨려 침전물을 생성시키고 이 침전물을 여과기를 이용하여 여과하여 생성물을 수득하였다. 수득된 생성물은 잔여 유기용매를 제거하기 위해 진공 오븐에 24시간 방치한 후 결과적으로 백색의 분말 형태의 생성물(테트로닉-PNC)을 수득하였다.

[104] 이후 상기 테트로닉-PNC 20 g(1.11 mmol)을 테트라하이드로푸란(THF) 200 ml 에 용해시킨 용액에 티라민(TA) 0.761 g(5.55 mmol)을 THF 150 ml 에 용해시킨 용액을 첨가하여 반응을 진행하였다. 테트로닉-PNC : TA 의 몰비율은 1 : 5이다. 이 때 반응 온도는 30 °C 이며 질소분위기에서 24시간 반응을 진행하였다.

[105] 반응 종료 후 반응 용액을 아세톤을 이용하여 멤브레인 투석(3500 Da 분자량 차단)을 통하여 반응하지 않은 TA를 제거하였다. 투석이 완료된 후 용액을 여과하고 회전식 증발농축기를 이용하여 용액을 농축시킨 후 차가운 에테르 1600 ml 에 침전물을 생성시켰다. 생성된 침전물은 여과기를 통하여 여과하고, 여과된 침전물을 진공오븐에 24시간 방치한 후 백색의 분말 생성물(비분해성 테트로닉-TA)을 수득하였다.

[106] 2. 젤라틴-하이드록시페닐아세트산(GHPA)의 합성

[107] 도 5는 젤라틴-하이드록시페닐아세트산(GHPA)의 합성 모식도를 나타낸 것이다. 이의 상세한 과정은 다음과 같다.

[108] 10 g 의 젤라틴을 0.1 M 2-(N-모르폴리노)에탄설펜산(MES) 200 ml 에 용해시켜 용액 A를 제조하였다. 4-하이드록시페닐아세트산(HPA) 0.609 g(4 mmol)을 0.1 M MES 50 ml 에 용해시켜 용액 B를 제조하였다.

1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보다이미드(EDC) 0.92 g (4.8 mmol)와 N-히드록시숙신이미드(NHS) 0.276 g (2.4 mmol)을 각각 5 ml 의 0.1 M MES에 용해시켰다. 그 후 EDC 용액과 NHS 용액을 용액 B에 15분 간격으로 순차적으로 가하였다. 15분 후 EDC/NHS가 포함된 용액 B를 용액 A에 혼합하여 반응을 시작하였다.

[109] 이때 반응 온도는 40 °C 이며, 반응 시간은 24시간 이었고, 반응 종료 후 반응 용액을 주사기 필터(450 nm)를 사용하여 여과하였다. 그 후 증류수에서 3~4일 동안 멤브레인 투석(3500 Da 분자량 차단)을 시행하였다. 투석이 완료된 용액은 동결 건조를 통하여 백색 분말 형태의 GHPA를 수득하였다.

[110] 3. 키토산-하이드록시페닐아세트산(ChPA)의 합성

[111] 도 6는 키토산-하이드록시페닐아세트산(ChPA)의 합성 모식도를 나타낸 것이다. 이의 상세한 과정은 다음과 같다.

[112] 디아세틸레이션 75 - 85 % 의 저분자량 키토산 0.644 g 에 증류수 80 ml 를 첨가하고 1N HCl을 이용하여 용액의 산도를 pH 3으로 낮춰 용해시켰다. HPA 0.404 g(2.6 mmol)을 첨가한 후 0.1 M NaOH를 이용하여 용액의 산도를 pH 5로 맞추었다. EDC 0.768 g (4 mmol)을 첨가하고, 반응 온도 30 °C 에서 24시간 동안 반응을 진행하였다.

- [113] 반응 종료 후, 반응 용액을 증류수에서 멤브레인 투석(3500 Da 분자량 차단)하여 반응하지 않은 HPA를 제거하였다. 투석이 완료된 용액은 동결 건조를 통하여 반투명의 부직포(non-woven fabric) 형태의 CHPA를 수득하였다.
- [114] 4. 젤라틴-폴리(에틸렌글리콜)-티라민(GPEG-TA)의 합성
- [115] 도 7은 젤라틴-폴리(에틸렌글리콜)-티라민(GPEG-TA)의 합성 모식도를 나타낸 것이다. 이의 상세한 과정은 다음과 같다.
- [116] 1) 폴리(에틸렌글리콜)-(p-니트로페닐 클로로포메이트)(PEG-PNC) 합성
- [117] PEG 10 g(2.9 mmol)을 메틸렌 클로라이드(MC) 100 ml 에 용해시킨 후 이 용액에 DMAP 0.779 g(6.38 mmol)과 TEA 0.645 g(6.38 mmol)을 MC 10 ml 에 용해시킨 용액과 PNC 1.286 g(6.38 mmol)를 MC 50 ml 에 용해시킨 용액을 순차적으로 혼합하였다. 이때 PEG : DMAP : TEA : PNC의 몰비율은 1 : 2.2 : 2.2 : 2.2 이었고, 반응 온도는 30 °C 이며, 질소 분위기에서 24시간 동안 반응을 진행하였다.
- [118] 반응 종료 후 용액을 여과기를 이용하여 잔존하는 시약들을 제거한 후 회전식 증발 농축기를 이용하여 반응 용액을 농축시켰다. 농축 용액을 차가운 에테르 1600 ml 에 한 방울씩 떨어뜨려 침전을 생성시키고 이 침전물을 여과기를 이용하여 여과하여 생성물을 수득하였다. 수득된 생성물은 잔여 유기 용매를 제거하기 위해 진공 오븐에 24시간 방치한 후 결과적으로 백색의 분말 형태의 생산물(PEG-PNC)을 수득하였다.
- [119] 2) GPEG-TA의 합성
- [120] PEG-PNC 5 g(1.471 mmol)을 DMSO 100 ml 에 용해시킨 용액에 TA 0.202 g(1.471 mmol)을 DMSO 50 ml 에 용해시킨 용액을 첨가하여 반응을 진행하였다. PEG-PNC : TA의 몰비율은 1 : 1 이며 반응 온도는 30 °C 이고, 질소 분위기에서 6시간 반응을 진행하였다. 6시간 후, 젤라틴 용액(1 g/200 ml in DMSO)을 혼합하여 30 °C 질소 분위기에서 24시간 동안 반응을 진행하였다.
- [121] 반응 종료 후, 반응 용액을 물에서 멤브레인 투석(6000 - 8000 Da 분자량 차단)하여 반응하지 않은 PEG-TA를 제거하였다. 투석이 완료된 후, 용액을 동결 건조하여 백색의 분말 생성물(GPEG-TA)을 수득하였다.
- [122] 5. 키토산-폴리(에틸렌글리콜)-티라민(CPTA)의 합성
- [123] 도 8은 키토산-폴리(에틸렌글리콜)-티라민(CPTA)의 합성 모식도를 나타낸 것이다. 이의 상세한 과정은 다음과 같다.
- [124] PEG-PNC 5 g(1.25 mmol)을 DMSO 100 ml 에 용해시킨 용액에 TA 0.174 g(1.25 mmol)을 DMSO 50 ml 에 용해시킨 용액을 첨가하여 반응을 진행하였다. PEG-PNC : TA의 몰비율은 1 : 1이며, 반응 온도는 30 °C 이고, 질소 분위기에서 6시간 동안 반응을 진행하였다. 6시간 후, 아세트산(70 중량%)을 포함하는 DMSO 50 ml 에 키토산 0.5 g 가 용해된 용액을 반응 플라스크에 혼합하여 반응 온도 30 °C 의 질소 분위기에서 24시간 동안 반응을 진행하였다.
- [125] 반응이 종료된 용액을 물에서 멤브레인 투석(6000 - 8000 Da 분자량 차단)하여

반응하지 않은 PEG-TA를 제거하였다. 투석이 완료된 용액을 동결 건조하여 백색 분말 형태의 생성물(CPTA)를 수득하였다.

- [126] 6. 히알루론산-폴리(에틸렌글리콜)-티라민 (HA-PEG-TA)의 합성
- [127] 도 9는 히알루론산-폴리(에틸렌글리콜)-티라민 (HA-PEG-TA)의 합성 모식도를 나타낸 것이다. 이의 상세한 과정은 다음과 같다.
- [128] 1) 아미네이티드 폴리(에틸렌글리콜)-티라민 (PTA)의 합성
- [129] PEG-PNC 5 g(1.25 mmol)을 MC 100 ml에 용해시킨 용액에 TA 0.174 g(1.25 mmol)을 MC 50 ml에 용해시킨 용액을 첨가하여 반응을 진행하였다. PEG-PNC : TA의 몰비율은 1 : 1이며, 반응 온도는 30 °C 이고 질소 분위기에서 6시간 동안 반응을 진행하였다. 6시간 후, 에틸렌디아민 2.254 g(37.5 mmol)을 MC 50 ml에 용해시킨 용액을 혼합하여 30 °C 질소 분위기에서 24시간 동안 반응을 진행하였다. 이때 PEG-PNC : 에틸렌디아민의 몰비율은 1 : 30 이었다.
- [130] 반응이 종료된 용액은 여과기를 이용하여 잔존하는 시약들을 제거한 후 회전식 증발 농축기를 이용하여 반응 용액을 농축시켰다. 농축 용액을 차가운 에테르 1600 ml에 한 방울씩 떨어뜨려 침전을 생성시키고 이 침전물을 여과기를 이용하여 여과하여 생성물을 수득하였다. 수득된 생성물은 잔여 유기 용매를 제거하기 위해 진공 오븐에 24시간 방치한 후 결과적으로 백색의 분말 형태의 생산물(PTA)을 수득하였다.
- [131] 2) HA-PEG-TA 합성
- [132] 히알루론산 1 g을 증류수 300 ml에 용해시킨 용액에 EDC 1.307 g(6.82 mmol)과 NHS 0.392 g(3.41 mmol)을 각각 15분 간격으로 순차적으로 가하였다. 이후 반응 플라스크에 PTA 2.5 g(0.625 mmol)을 증류수 100 ml에 용해시킨 용액을 혼합하여 30 °C에서 24시간 동안 반응을 진행하였다.
- [133] 반응이 종료된 용액은 여과기를 이용하여 잔존하는 시약들을 제거한 후, 증류수에서 3~4일 동안 멤브레인 투석(6000 - 8000 Da 분자량 차단)을 시행하였다. 투석이 완료된 용액은 동결 건조를 통하여 백색 분말 형태의 생성물 (HA-PEG-TA)을 수득하였다.
- [134] 7. 카르복시메틸 셀룰로스-폴리(에틸렌글리콜)-티라민 (CMC-PEG-TA)의 합성
- [135] 도 10은 카르복시메틸 셀룰로스-폴리(에틸렌글리콜)-티라민 (CMC-PEG-TA)의 합성 모식도를 나타낸 것이다. 이의 상세한 과정은 다음과 같다.
- [136] 카르복시메틸 셀룰로스 1 g을 증류수 300 ml에 용해시킨 용액에 EDC 1.307 g(6.82 mmol)과 NHS 0.392 g(3.41 mmol)을 각각 15분 간격으로 순차적으로 가하였다. 이후 반응 플라스크에 PTA 2.5 g(0.625 mmol)을 증류수 100 ml에 용해시킨 용액을 혼합하여 30 °C에서 24시간 동안 반응을 진행하였다.
- [137] 반응이 종료된 용액은 여과기를 이용하여 잔존하는 시약들을 제거한 후, 증류수에서 3~4일 동안 멤브레인 투석(6000 - 8000 Da 분자량 차단)을 시행하였다. 투석이 완료된 용액은 동결 건조를 통하여 백색 분말 형태의 생성물(CMC-PEG-TA)을 수득하였다.

- [138] 8. 알지네이트-폴리(에틸렌글리콜)-티라민 (ALG-PEG-TA)의 합성
- [139] 도 11은 알지네이트-폴리(에틸렌글리콜)-티라민 (ALG-PEG-TA)의 합성 모식도를 나타낸 것이다. 이의 상세한 과정은 다음과 같다.
- [140] 알지네이트 1 g 을 증류수 300 ml 에 용해시킨 용액에 EDC 1.307 g(6.82 mmol)과 NHS 0.392 g(3.41 mmol)을 각각 15분 간격으로 순차적으로 가하였다. 이후 반응 플라스크에 PTA 2.5 g(0.625 mmol)을 증류수 100 ml 에 용해시킨 용액을 혼합하여 30 °C 에서 24시간 동안 반응을 진행하였다.
- [141] 반응이 종료된 용액은 여과기를 이용하여 잔존하는 시약들을 제거한 후, 증류수에서 3~4일 동안 멤브레인 투석(6000 - 8000 Da 분자량 차단)을 시행하였다. 투석이 완료된 용액은 동결 건조를 통하여 백색 분말 형태의 생성물 (ALG-PEG-TA)을 수득하였다.
- [142] <실시예 6> HRP 고정화 입자를 이용한 주입형 하이드로젤의 제조 및 HRP 정량 결과
- [143] 상기 실시예 4에서 합성된 페놀 관능기 함유 고분자화합물(실시예 5-1 내지 실시예 5-8) (10 %)과 0.1 % 과산화수소의 혼합 수용액(500 μ L)을 각기 다른 양의 HRP가 고정화된 유리 및 철 함유 입자를 충전한 주사기에 넣고 압출하였다. 각각의 입자 간의 물리화학적 특성 비교를 위해 고정화된 HRP의 양이 동일한 미세 입자를 정량하여 젤을 형성시킨 후 분석을 진행하였다.
- [144] 상기 젤 형성에 사용한 주사기 및 젤 형성 모식도를 도 12 및 도 13에 나타내었다. 도 12은 본 발명의 실시예에서 사용한 주사기에 관한 것으로, 실린더의 주사바늘쪽 내부에 효소가 고정화된 지지체가 구비되며, 페놀 함유 고분자화합물(실시예 5-1 내지 실시예 5-8) (10%)과 0.1 % 과산화수소의 혼합 수용액(500 μ L)이 실린더에 충전되어 있다. 이후 피스톤의 슬라이드 작동에 의하여 상기 혼합 수용액은 효소고정화지지체를 통과하고, 이를 통해 주사바늘 외부로 배출시 *in situ* 가교된 하이드로젤이 형성되게 된다.
- [145] 도 13는 상기 주사기의 단면을 도식화한 본 발명의 하이드로젤 제조 모식도이다. 상기 방법으로 형성된 하이드로젤의 HRP 함량을 마이크로 BCA 분석방법을 이용한 정량 결과는 아래 표 5, 표6과 같다.
- [146] 표 5

[Table 5]

형성된 하이드로젤의 HRP 정량값 (mg/mL)	유리입자 양(g)(146ug of HRP/g of bead)		
	0.5	1.0	2.0
Tet-TA(실시예 4-1)	N.D.	N.D.	N.D.
GHPA(실시예 4-2)	N.D.	N.D.	N.D.
CHPA(실시예 4-3)	N.D.	N.D.	N.D.
GPEG-TA(실시예 4-4)	N.D.	N.D.	N.D.
CPTA(실시예 4-5)	N.D.	N.D.	N.D.
HA-PEG-TA(실시예 4-6)	N.D.	N.D.	N.D.
CMC-PEG-TA(실시예 4-7)	N.D.	N.D.	N.D.
ALG-PEG-TA(실시예 4-8)	N.D.	N.D.	N.D.
N.D.: 검출되지 않음.			

[147]

[148] 표 6

[Table 6]

형성된 하이드로젤의 HRP 정량값 (mg/mL)	철 함유 고분자입자 양(g)(369ug of HRP/g of bead)		
	0.2	0.4	0.8
Tet-TA(실시예 4-1)	N.D.	N.D.	N.D.
GHPA(실시예 4-2)	N.D.	N.D.	N.D.
CHPA(실시예 4-3)	N.D.	N.D.	N.D.
GPEG-TA(실시예 4-4)	N.D.	N.D.	N.D.
CPTA(실시예 4-5)	N.D.	N.D.	N.D.
HA-PEG-TA(실시예 4-6)	N.D.	N.D.	N.D.
CMC-PEG-TA(실시예 4-7)	N.D.	N.D.	N.D.
ALG-PEG-TA(실시예 4-8)	N.D.	N.D.	N.D.
N.D.: 검출되지 않음.			

[149]

[150] 상기 표 5와 표 6를 참조하면, 효소는 지지체에 고정되어 있고 주사바늘 외부로 배출되지 않으며, 이에 따라 효소를 포함하지 않는 하이드로젤이 얻어짐을 알 수 있었다.

- [151] <시험예 1> 젤형성 시간/기계적 강도 검토
- [152] HRP가 고정화된 미세 입자를 동량의 HRP가 주사기 내에 존재하도록 정량하여 충전하고 0.1% 과산화수소를 함유한 10 % 의 상기 실시예 5에서 합성된 페놀 관능기 함유 고분자화합물(실시예 5-1 내지 실시예 5-8) 수용액 500 μ L 를 상기 주사기에 넣고 압출하였을 때 HRP 고정화 미세 입자양에 따른 하이드로젤의 형성 시간 및 기계적 강도는 아래 표 6와 같다.
- [153] 표 7

[Table 7]

	유리입자 양 (g)146ug of HRP/g of bead	하이드로젤형성시 간(초)	하이드로젤기계적 강도(KPa)
Tet-TA	0.5	70	8.6
	1.0	44	9.3
	2.0	20	10.5
GHPA	0.5	41	3.1
	1.0	29	7.9
	2.0	< 5	11.2
CHPA	0.5	95	0.7
	1.0	66	1.9
	2.0	38	3.5
GPEG-TA	0.5	62	6.1
	1.0	40	8.6
	2.0	16	9.8
CPTA	0.5	50	1.2
	1.0	32	3.0
	2.0	10	4.2
HA-PEG-TA	0.5	62	8.9
	1.0	36	10.5
	2.0	15	12.5
CMC-PEG-TA	0.5	145	5.1
	1.0	71	5.9
	2.0	42	6.2
ALG-PEG-TA	0.5	81	2.7
	1.0	39	3.1
	2.0	18	7.3

[154]

[155] 표 8

[Table 8]

	철 함유 고분자입자 양 (g)369ug of HRP/g of bead	하이드로젤형성시 간(초)	하이드로젤기계적 강도(KPa)
Tet-TA	0.2	52	10.2
	0.4	21	11.9
	0.8	10	13.2
GHPA	0.2	26	5.3
	0.4	11	9.2
	0.8	< 5	13.4
CHPA	0.2	62	1.3
	0.4	42	3.1
	0.8	20	5.7
GPEG-TA	0.2	39	8.1
	0.4	17	10.1
	0.8	6	11.9
CPTA	0.2	34	2.0
	0.4	17	3.3
	0.8	< 5	5.1
HA-PEG-TA	0.2	39	10.1
	0.4	16	11.4
	0.8	6	13.8
CMC-PEG-TA	0.2	83	6.2
	0.4	44	7.5
	0.8	24	8.0
ALG-PEG-TA	0.2	52	3.7
	0.4	22	5.1
	0.8	12	8.3

[156]

[157] 시험예 2> 세포 독성 실험

- [158] 세포 독성 평가를 위하여, 실시예 5-1의 테트로닉-타이라민(Tet-TA) 고분자를 사용하여 실시예 6에 개시된 방법으로 하이드로젤을 제조 한 후, 제조된 하이드로젤 내부에 섬유아세포(fibroblast)를 배양하여 세포독성을 평가하였다. 실험에 사용된 세포의 농도는 1×10^5 cells/well 이었으며, 배양된 세포는 live/dead 분석 키트로 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다.
- [159] 결과를 도 14에 나타내었다. 도 14을 참조하면, 우수한 세포의 부착 및 증식을 확인되는 바, 본 발명을 통해 제조된 하이드로젤의 우수한 세포 적합성을 확인할 수 있었다.
- [160] <시험예 3> 생리활성 물질 방출능 검토
- [161] 효소 고정화 방법을 통해 제조된 in situ 형성 하이드로젤을 이용하여 성장인자 방출 거동 평가를 수행하였다. 실험을 위하여 실시예 5-1의 테트로닉-타이라민(Tet-TA) 고분자를 사용하여 실시예 6에 개시된 방법으로 하이드로젤을 제조하였으며, 도입된 성장인자(bFGF)의 농도는 300 ng/mL 이며 방출 거동 확인은 1 주일 동안 진행하였다.
- [162] 그 결과, 도 15와 같이 효소 고정화 방법을 통해 제조된 in situ 형성 하이드로젤에서 성장인자가 서방형으로 방출되는 것을 확인하였다. 또한, 과산화수소 또는 고분자 농도 조절을 통하여 하이드로젤 경화도 조절이 가능함으로 경화도를 높이면 기계적 물성이 높아져(H) 약물 방출 거동이 느려지고 반대로, 경화도를 낮추면 기계적 물성이 낮아져(L) 약물 방출 거동을 빠르게 할 수 있어 약물 방출 속도 조절이 가능하였다.
- [163] 이러한 결과를 통하여 효소 고정화 방법을 통해 제조된 본 발명의 in situ 형성 하이드로젤을 성장인자와 같은 생리활성 물질 전달체로 효과적으로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.
- [164] <시험예 4> 조직 접착력 검토
- [165] 유압식 만능 재료 시험기 (universal testing machine, UTM)를 이용하여 하이드로젤의 접착 강도를 비교 평가하였다. 실험의 대조군으로는 현재 가장 많이 사용되고 있는 피브린 글루 (fibrin glue) 이용하였다. 결과를 도 16에 나타내었다.
- [166] 도 16을 참조하면, 효소 고정화 방법으로 제조된 본 발명의 Tet-TA(10 wt%) 하이드로젤은 45~83 KPa의 접착 강도를 나타내며 대조군인 피브린 글루와 비교하여 약 3~6배 증가된 접착 강도를 보였다. 또한, 철 입자를 이용한 경우에 유리 입자와 비교하여 52~95 KPa의 더 높은 접착 강도를 나타내었으며, 미세 입자의 경우, 과산화수소의 양(L: 0.016 wt%, M: 0.063 wt%, H: 0.25 wt%)을 조절함으로써 조직 접착력을 조절할 수 있는 성질을 확인하였다.
- [167] <시험예 5> 재사용능 검토
- [168] 라디칼 생성능 및 산화반응 유도능을 확인할 수 있는 ABTS (2,2'-azobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) 시약을 이용하여, 젤 형성 주사횟수에 따른 고정화된 HRP의 재사용능을 확인하였다. 실험을 위하여, 5-1의

테트로닉-타이라민(Tet-TA) 고분자를 사용하여, 실시예 6에 개시된 방법으로 하이드로젤을 제조하였으며, 젤 형성 후 주사기 내부의 미세 입자를 PBS를 이용하여 충분한 시간동안 세척한 후, 재사용능을 확인하는 실험을 진행하였다.

[169] 그 결과, 도 17과 같이 입자에 고정화된 HRP의 재사용능은 미세 입자의 종류에 따라 재사용 횟수가 증가하여도, 약 40-60 % 가량 활성도를 가짐을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 본 발명의 다양한 형태의 미세 입자를 이용한 젤 형성 주사제로서 지속적인 사용이 가능함을 알 수 있었다.

[170]

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

산업상 이용가능성

[172] in suit 형성 하이드로젤은 생체 주입형 하이드로젤 시스템으로 사용이 가능한데, 원하는 조직, 기관 또는 체강 내와 같은 신체 내에서 하이드로젤을 형성하여 생체내 결합 또는 체강 함몰 부위를 충전시킬 수 있다. 또한 많은 치료 약물의 단순 혼합을 통하여 생리활성약물로 펩타이드, 단백질 및 DNA 등의 전달용 담체로 이용될 수 있으며, 세포 및 생성물의 우수한 영양물 운송에 이용될 수 있다.

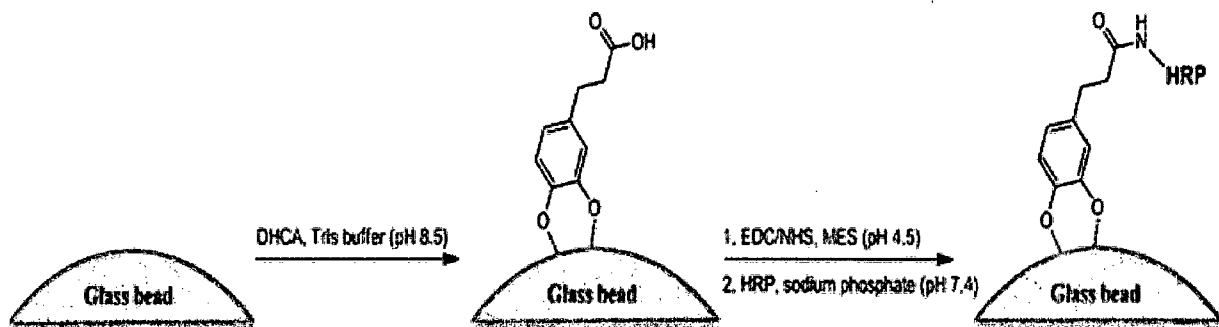
청구범위

- [청구항 1] 효소가 고정화된 지지체를 제조하는 단계; 측쇄에 페놀 또는 아닐린 관능기를 갖는 고분자와 상기 지지체를 과산화수소 존재 하에서 접촉시켜 가교시키는 단계; 및 상기 효소가 고정화된 지지체를 분리하여 하이드로젤을 수득하는 단계;를 포함하는 하이드로젤의 제조방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 효소는 호스래디시 퍼록시데이즈(horseradish peroxidase), 글루타치온 퍼록시데이즈(glutathione peroxidase), 할로퍼록시데이즈(haloperoxidase), 미엘로퍼옥시데이즈(myeloperoxidase), 카탈라아제(catalase), 헤모프로틴(hemoprotein), 퍼록사이드(Peroxide), 퍼록시레독신(peroxiredoxin), 동물 헴-의존적 퍼록시데이즈(animal heme-dependent peroxidases), 티로이드 퍼록시데이즈(thyroid peroxidase), 마나덤 브로모퍼록시데이즈(vanadiumbromoperoxidase), 락토퍼록시데이즈(lactoperoxidase), 티로시네이즈(tyrosinase), 및 카테콜 옥시데이즈(catechol oxidase)로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상인 하이드로젤의 제조방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 지지체는 미세 입자, 다공성 스폰지 또는 다공성 시트 형태인 하이드로젤의 제조방법.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 미세 입자형 지지체는 비다공성 또는 다공성 형태이며, 유리입자, 금속입자, 고분자입자 및 이들의 혼합입자로 이루어진 군에서 선택된 것인 하이드로젤의 제조방법.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 혼합입자는 금속이 함유된 고분자입자인 것인 하이드로젤의 제조방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 금속이 함유된 고분자입자는 철이 함유된 고분자입자인 것인 하이드로젤의 제조방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 철이 함유된 고분자입자는 에폭시기를 갖는 단량체와 철화합물을 공중합하여 제조한 것인 하이드로젤의 제조방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 효소가 고정화된 지지체를 제조하는 단계는, 지지체의 표면을 개질하여 관능기를 도입하는 표면개질 단계; 및 상기 관능기에 효소를 결합시키는 단계를 포함하며, 상기 관능기는 카르복실기, 아민기, 하이드록실기, 알데히드기, 에폭시기, 티올기, 말레이미드기, 카보네이트 에스터기, 시아노기, 아크릴기, 아세틸렌기 및 디아조기로 이루어진 군에서 선택된

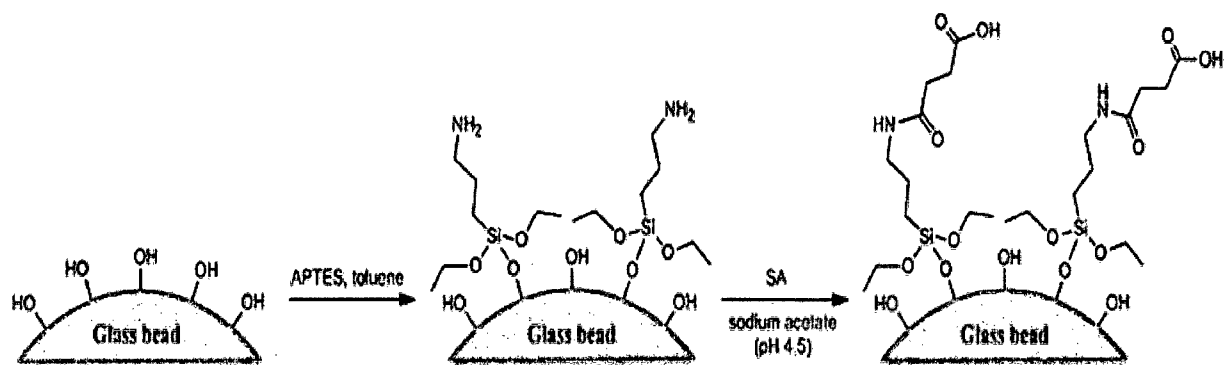
- 것인 하이드로젤의 제조방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 표면개질 단계는 3,4-디하이드록시 하이드로신남산, 도파민, 클로로아세틸카테콜, 아미노메틸카테콜, 디옥시에피네프린, 디하이드록시벤조히드라지드, 카페익산 펜에틸에스터 및 히루테논으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 카테콜 유도체를 사용하여 관능기를 도입하는 것인 하이드로젤의 제조방법.
- [청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 표면개질 단계는 3-아미노프로필 트리에톡시실란, 트리메톡(7-옥텐-1-일)실란, 비닐트리메톡시실란, 3-트리메톡시실릴-1-프로판티올, 3-아미노프로필 트리메톡시실란, 아미노에틸 트리메톡시실릴 프로필아민, 트리에톡시비닐실란, 이소시아네이트프로필 트리에톡시실란, 시아노에틸 트리에톡시실란, 머캡토프로필 트리에톡시실란 및 트리에톡시실릴프로필 디에탄올아민으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 실란 유도체를 사용하여 관능기를 도입하는 것인 하이드로젤의 제조방법.
- [청구항 11] 제8항에 있어서, 상기 관능기에 효소를 결합시키는 단계에서 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 폴리에틸렌이민(PEI), 폴리비닐알콜(PVA) 및 폴리아크릴산(PAA)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 고분자를 스페이서(spacer)로 도입하는 단계를 추가로 포함하는 하이드로젤의 제조방법.
- [청구항 12] 제8항에 있어서, 상기 관능기에 효소를 결합시키는 단계에서 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 폴리에틸렌이민(PEI), 폴리비닐알콜(PVA) 및 폴리아크릴산(PAA)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 고분자를 스페이서(spacer)로 도입하는 단계를 추가로 포함하는 하이드로젤의 제조방법.
- [청구항 13] 제1항에 있어서, 상기 접착 및 분리는 효소가 고정화된 지지체 일방에 존재하는 고분자에 압력을 가하여 고분자를 지지체의 타방으로 통과시키는 방법으로 수행되는 것인 하이드로젤의 제조방법.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 방법은 주사기 키트(syringe kit) 또는 스프레이 키트(spray kit)를 통해 수행되는 것인 하이드로젤의 제조방법.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 주사기 키트 또는 스프레이 키트 내부의 고분자가 지지체를 통과하며 in situ 가교되어 압출되는 것인 하이드로젤의 제조방법.

- [청구항 16] 제14항에 있어서, 상기 주사기 키트 또는 스프레이 키트와 테프론 성형(teflon mold)을 이용하여 하이드로젤을 쉬트 또는 디스크 형태로 제조하는 것인 하이드로젤의 제조방법.
- [청구항 17] 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따라 제조된, 효소를 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 하이드로젤.
- [청구항 18] 제17항에 따른 하이드로젤을 포함하는 조직재생 및 충전용 임플란트 소재.
- [청구항 19] 제17항에 따른 하이드로젤을 포함하는 생리활성 물질 또는 약물 전달용 담체.
- [청구항 20] 내공간을 갖는 실린더에 피스톤이 내장되고 피스톤의 슬라이드 작동에 의하여 배출력을 발생시켜 주사바늘을 통하여 약액을 배출토록 되는 주사기에 있어서, 실린더의 주사바늘쪽 내부에 효소가 고정화된 지지체가 구비되며, 측쇄에 페놀 또는 아닐린 관능기를 갖는 고분자가 실린더에 충전된 것을 특징으로 하는, 하이드로젤 제조용 주사기.

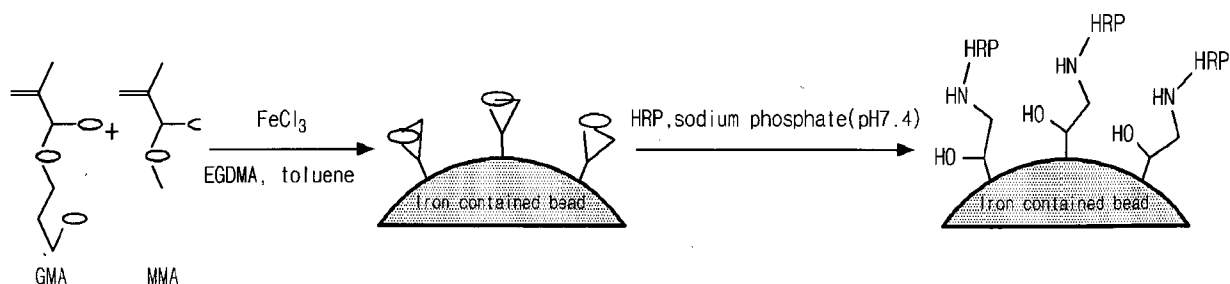
[Fig. 1]



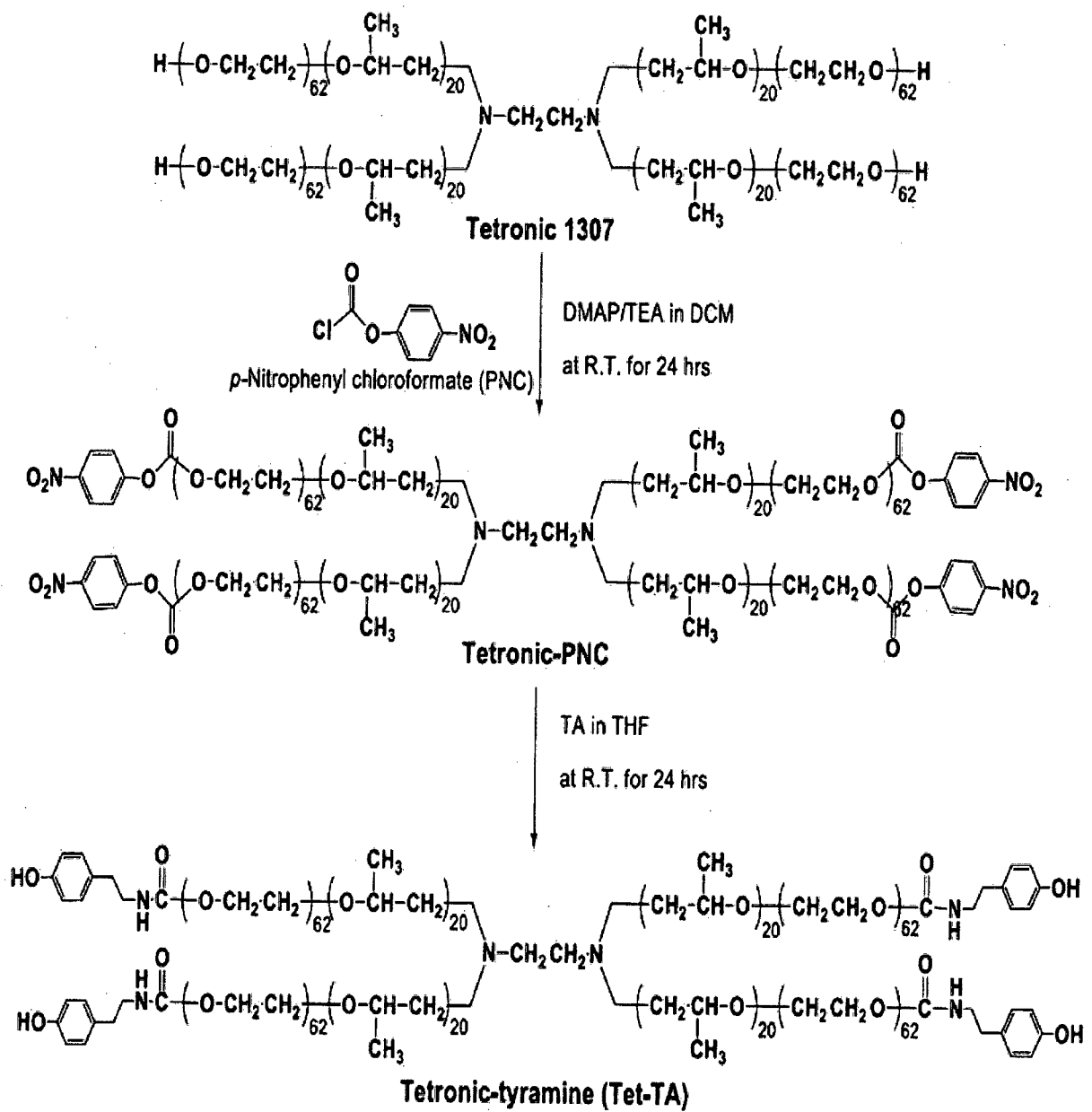
[Fig. 2]

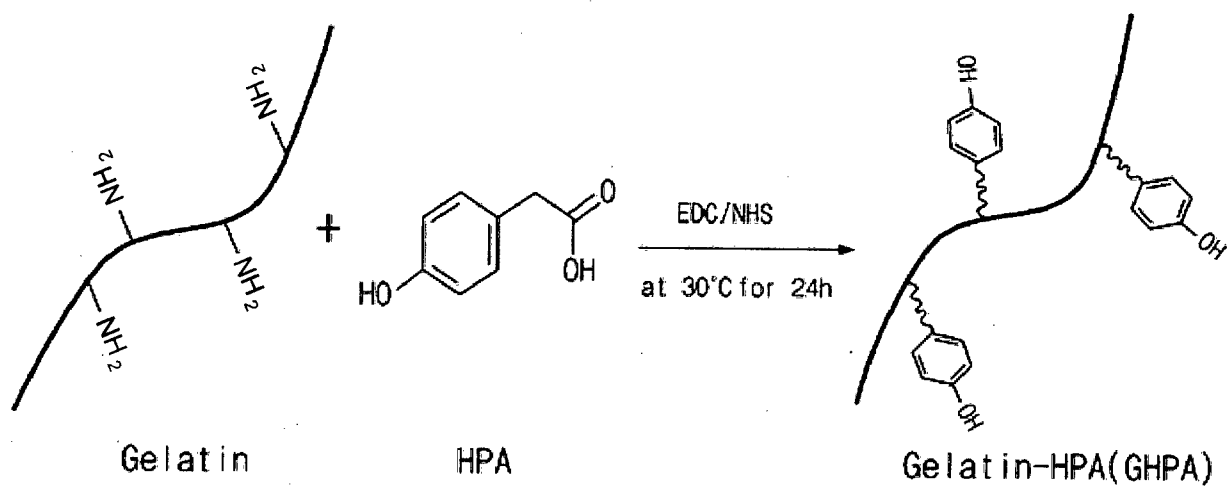
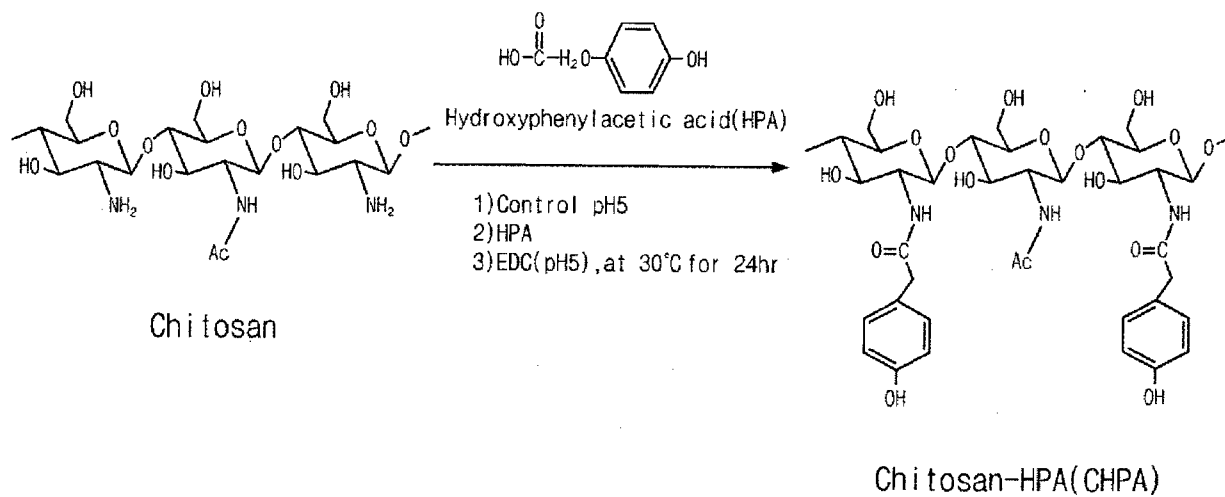


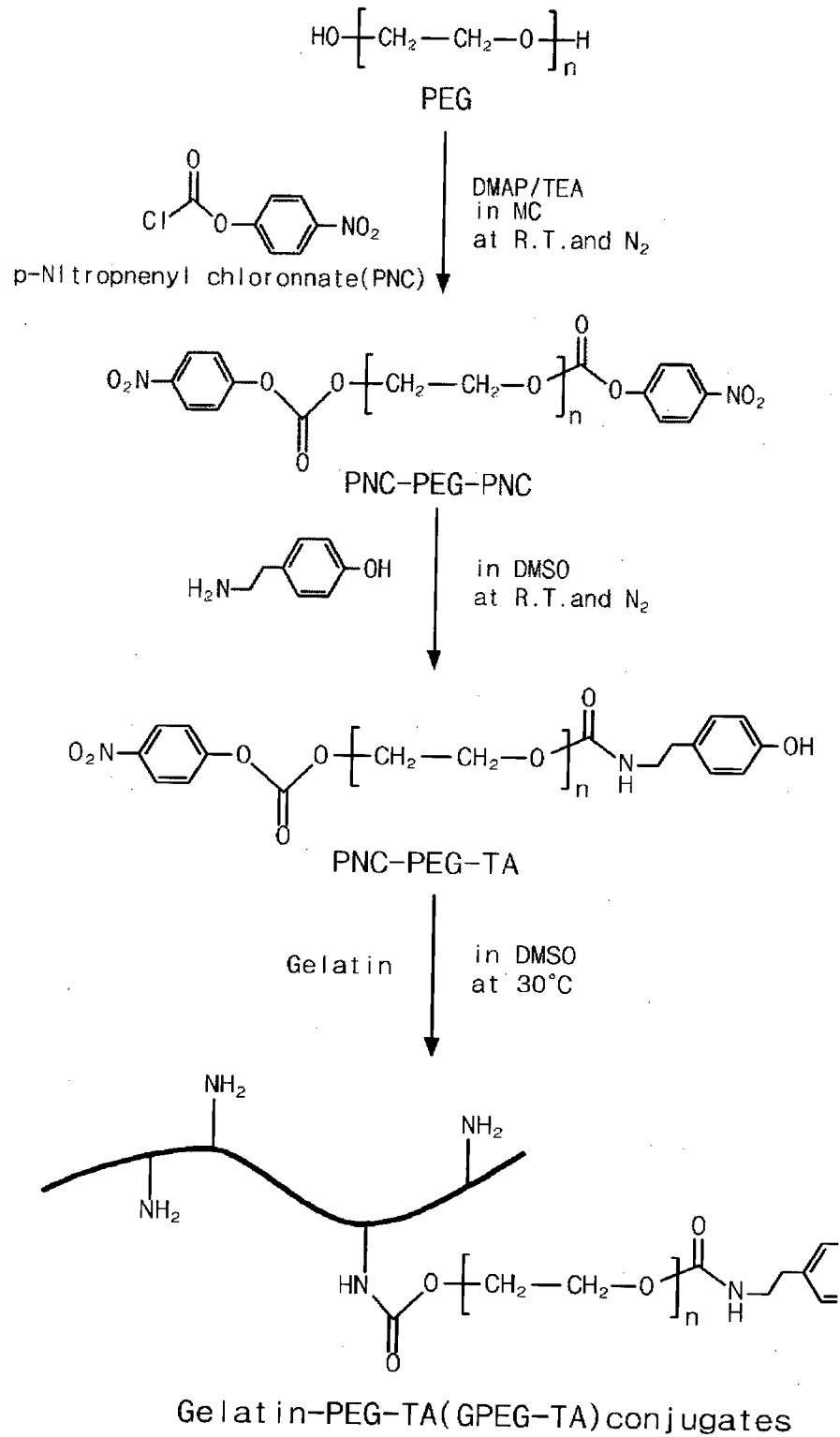
[Fig. 3]

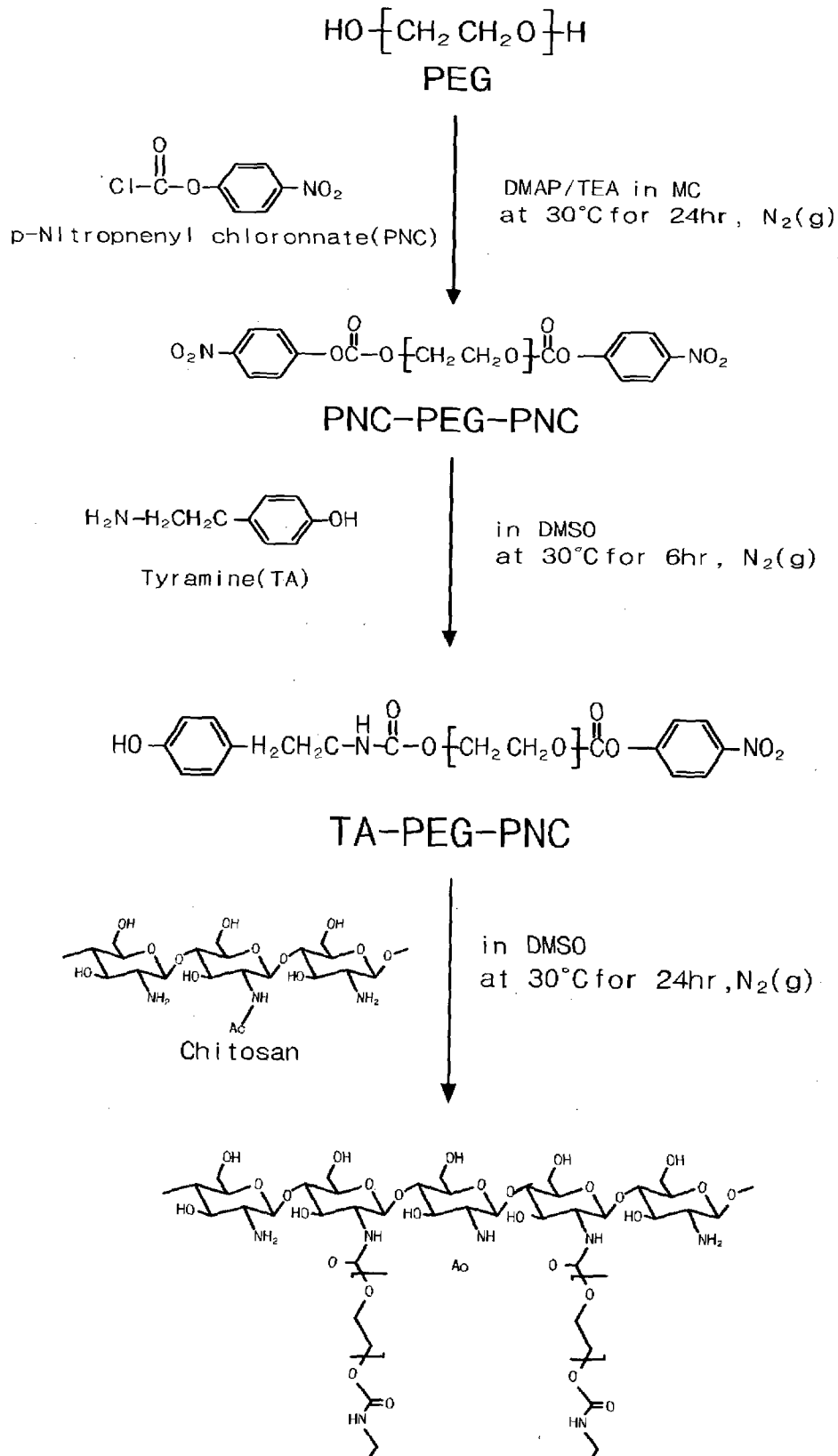


[Fig. 4]

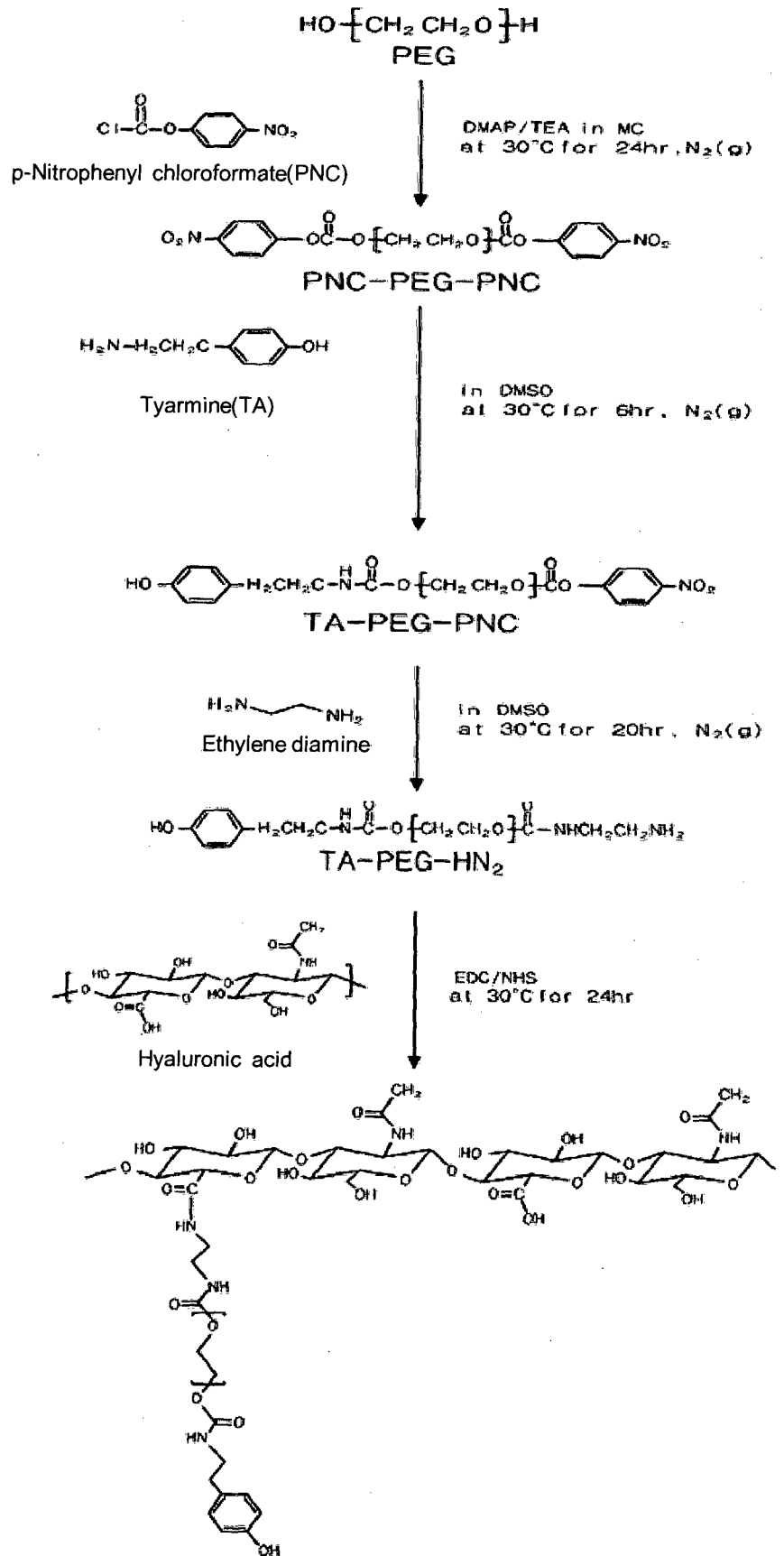


[Fig. 5]**[Fig. 6]**

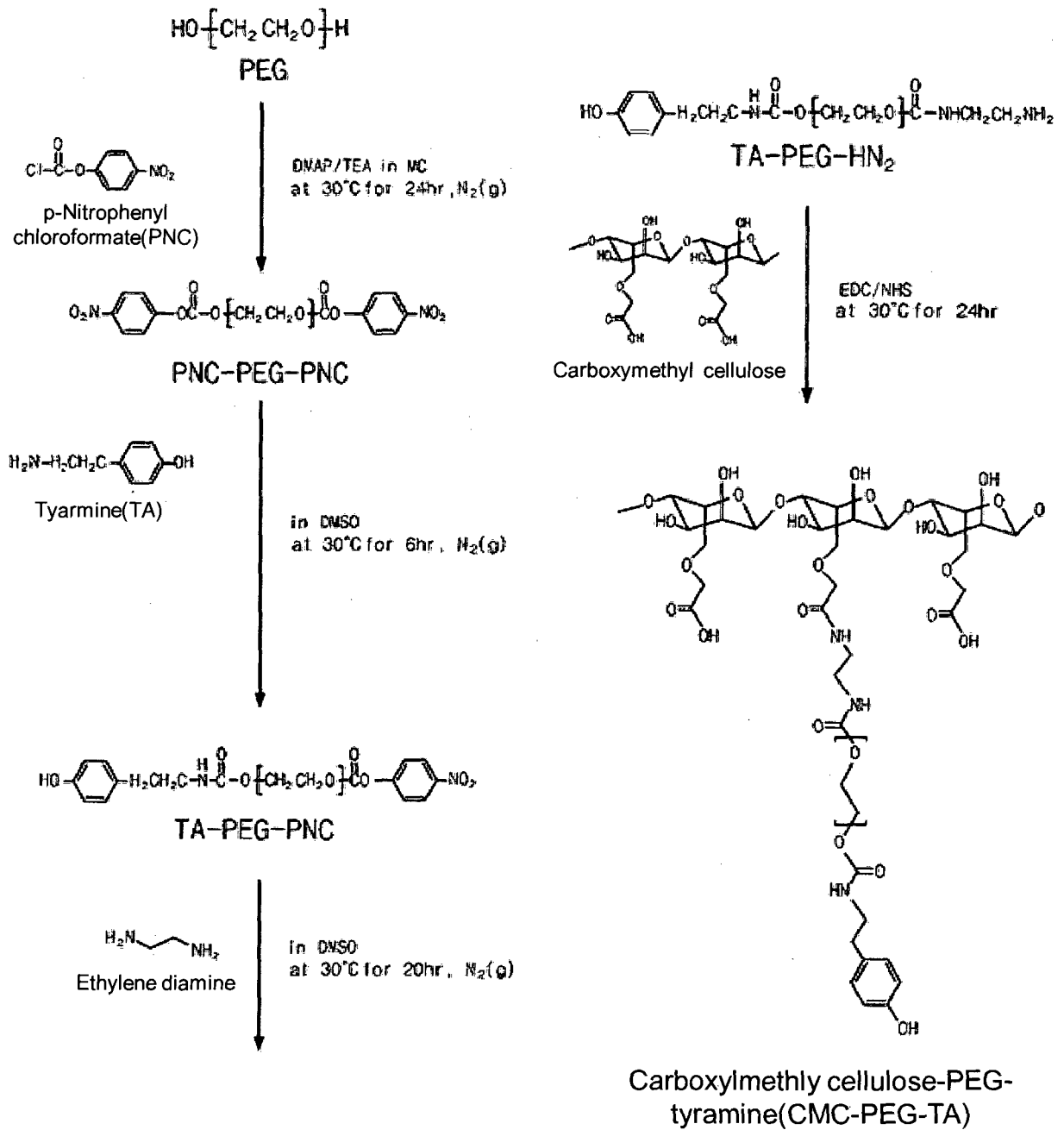
[Fig. 7]

[Fig. 8]

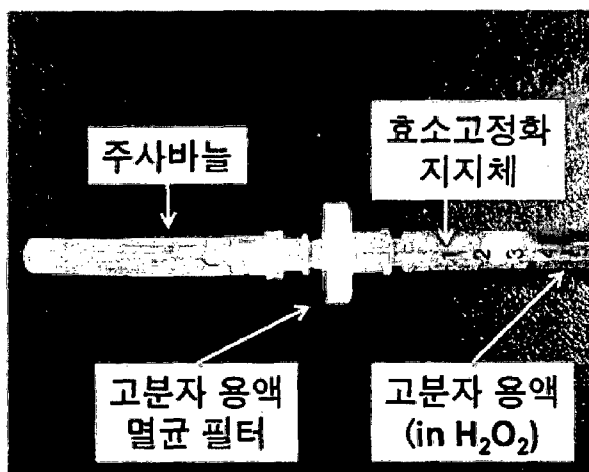
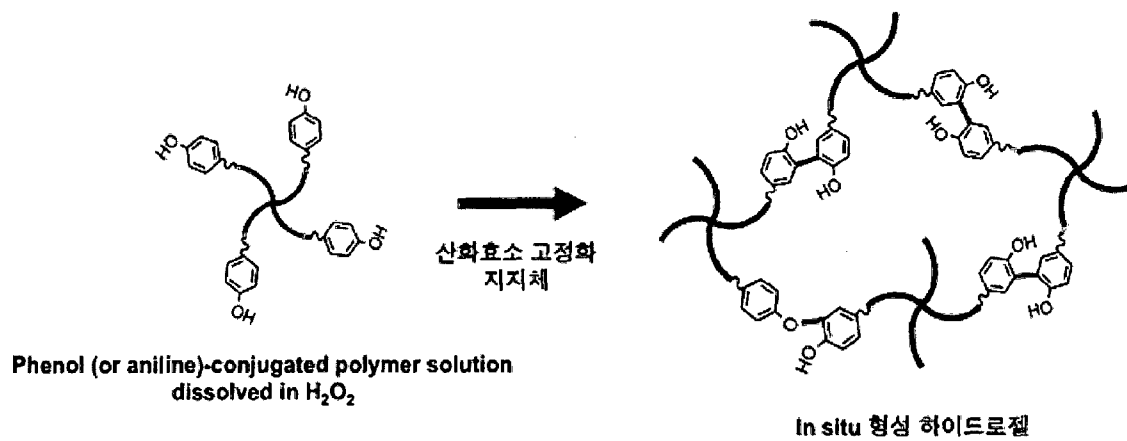
[Fig. 9]



Hyaluronic acid-PEG-tyramine(HA-PEG-TA)

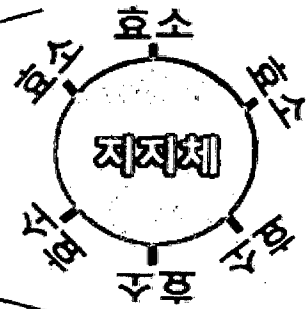
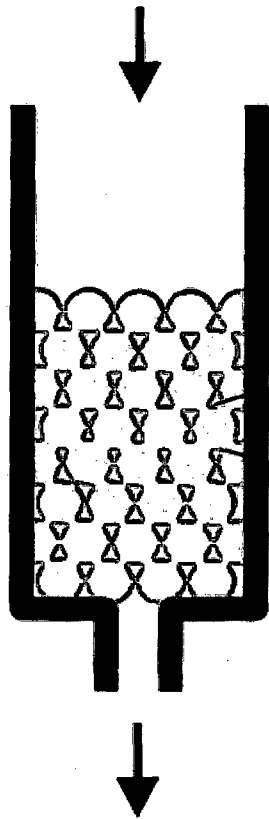
[Fig. 10]

[Fig. 12]



[Fig. 13]

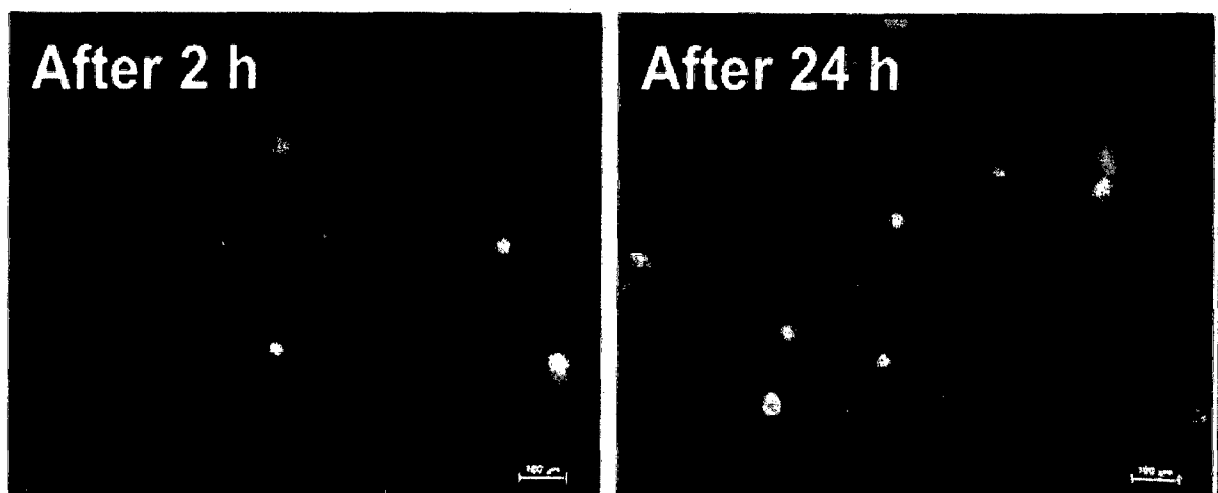
페놀 또는 아닐린 함유
고분자 수용액 + 과산화수소



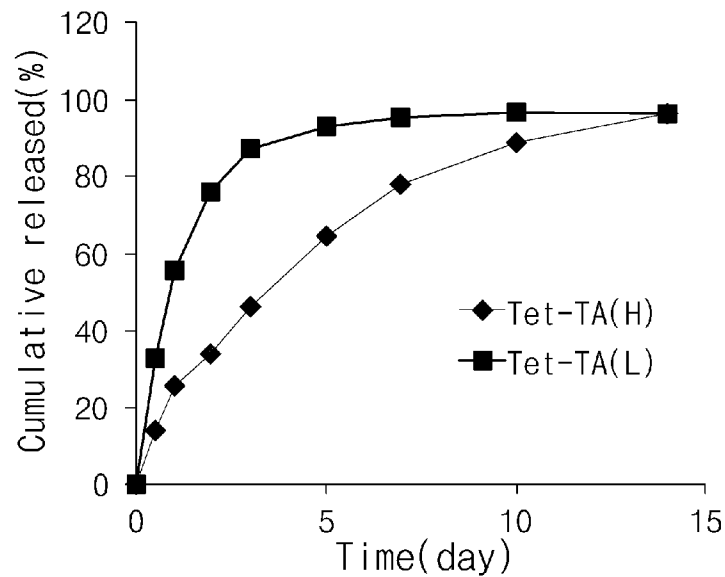
산화효소가 표면 고정화된
지지체

효소 미포함
in situ 가교 하이드로젤

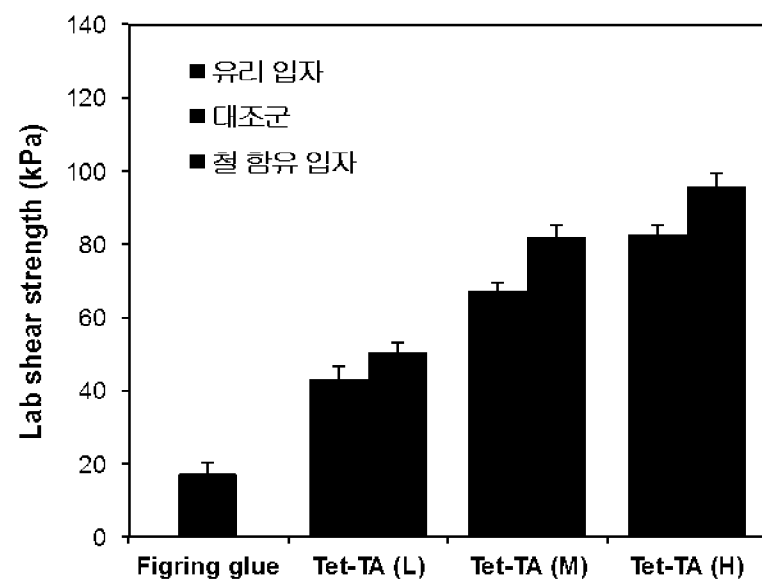
[Fig. 14]



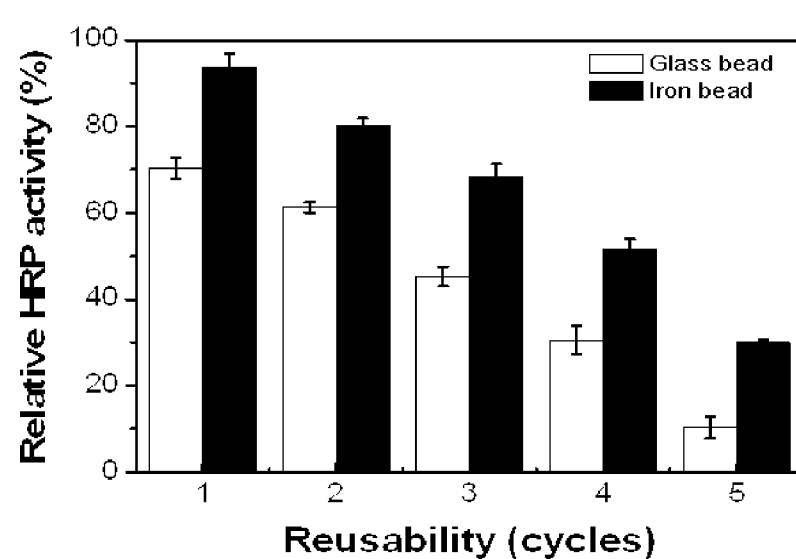
[Fig. 15]



[Fig. 16]



[Fig. 17]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/008202**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 9/06(2006.01)i, A61K 9/16(2006.01)i, A61K 47/30(2006.01)i, A61K 38/43(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)

A61K 9/06; C08J 3/075; C08J 3/02; A61L 27/14; A61L 27/52; A61K 9/16; A61K 47/30; A61K 38/43

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), PubMed, NCBI, Esp@snet, PAJ, USPTO, Google

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2011-0025530 A (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 10 March 2011	17-19
A	See abstract, paragraphs [0025], [0063]-[0067], claim 1	1-16,20
A	KR 10-2010-0076173 A (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 06 July 2010 See the entire document	1-20
A	EUNJI JANG et al., Fabrication of poly(ethylene glycol)-based hydrogels entrapping enzyme-immobilized silica nanoparticles. Polymers Advanced Technologies. 26 May 2009, 21(7), pages 476-482 See the entire document	1-20
A	KIM, Young-Jin et al., Enzymatic Synthesis of Phenolic Polymers and Their Applications, Polymer Science and Technology, October 2009, vol. 20, no. 5, pages 465-471 See the entire document	1-20



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

24 JANUARY 2014 (24.01.2014)

Date of mailing of the international search report

27 JANUARY 2014 (27.01.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/008202

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0025530 A	10/03/2011	CN102596275 A	18/07/2012
		EP 2473210 A2	11/07/2012
		JP 2013-503688A	04/02/2013
		US 2012-0156164 A1	21/06/2012
		WO 2011-028031 A2	10/03/2011
		WO 2011-028031 A3	14/07/2011
KR 10-2010-0076173 A	06/07/2010	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 9/06(2006.01)i, A61K 9/16(2006.01)i, A61K 47/30(2006.01)i, A61K 38/43(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 9/06; C08J 3/075; C08J 3/02; A61L 27/14; A61L 27/52; A61K 9/16; A61K 47/30; A61K 38/43 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(KIPO internal), PubMed, NCBI, Esp@net, PAJ, USPTO, Google		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2011-0025530 A (아주대학교산학협력단) 2011.03.10. 요약, 단락 [0025], [0063]-[0067], 청구항 1항 참조	17-19
A		1-16, 20
A	KR 10-2010-0076173 A (아주대학교산학협력단) 2010.07.06. 문서 전체 참조	1-20
A	EUNJI JANG 외 6명, Fabrication of poly(ethylene glycol)-based hydrogels entrapping enzyme-immobilized silica nanoparticles. Polymers Advanced Technologies, 2009.05.26., 21(7), 476-482쪽 문서 전체 참조	1-20
A	김영진 외 2명, 효소촉매를 이용한 페놀계 고분자의 중합과 응용, 고분자과학과 기술, 2009.10., 제20권 제5호, 465-471쪽 문서 전체 참조	1-20
☐ 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 2014년 01월 24일 (24.01.2014)		국제조사보고서 발송일 2014년 01월 27일 (27.01.2014)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 김범수 전화번호 +82-42-481-5412 

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2013/008202

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0025530 A	2011/03/10	CN102596275 A EP 2473210 A2 JP 2013-503688A US 2012-0156164 A1 WO 2011-028031 A2 WO 2011-028031 A3	2012/07/18 2012/07/11 2013/02/04 2012/06/21 2011/03/10 2011/07/14
KR 10-2010-0076173 A	2010/07/06	없음	