(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl. [6]
A61K 9/50

(45) 공고일자 2002년07월27일
(11) 등록번호 10-0323043
(24) 등록일자 2002년01월21일

(21) 출원번호 10-1994-0703035
(22) 출원일자 1994년08월29일
번역문 제출일자 1994년08월29일
(86) 국제출원번호 PCT/US1993/01776
(86) 국제출원출원일자 1993년03월01일
(65) 공개번호 특1995-0700054
(43) 공개일자 1995년01월16일
(87) 국제공개번호 1993/16687
(87) 국제공개일자 1993년09월02일

(81) 지정국 국내특허 : 오스트레일리아, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 캐나다, 헝가리, 일본, 북한, 대한민국, 스리랑카, 마다가스카르, 몽고, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 루마니아, 슬로바키아, 우크라이나,
AP ARIPO특허: 말라위, 수단,
EA 유라시아특허: 러시아,
EP 유럽특허: 핀랜드,

(30) 우선권주장
843485 1992년02월28일 미국(US)
870540 1992년04월20일 미국(US)
958870 1992년10월07일 미국(US)

(73) 특허권자
보드 오브 리전츠, 더 유니버시티 오브 텍사스 시스템
미국 78701 텍사스주 오스틴 웨스트 7번 스트리트 201

(72) 발명자
후벨,제프리,에이.
미합중국,텍사스78703,오스틴,베벌리로오드3006
페탁,챈드라셰크하르,피.
미합중국,매사츄세츠02154,왈탐,스테언즈힐로오드3102
소니,아마프리트,에스.
미합중국,매사츄세츠02158,뉴톤,처치스트리트148
데사이,네일,피.
미합중국,캘리포니아90036,로스앤젤리스,알란델애비뉴847
힐,제니퍼,엘.
미합중국,텍사스78741,오스틴,엔오.#821,윅커스햄레인2501
호사이니,시에드,에프.,에이.
미합중국,텍사스78751,오스틴,#105,스피드웨이3812

(74) 대리인
문창화

심사관 : 윤경애

(54) 생물학적물질의캡슐화를위한고분자겔

요약

수용성 매크로머는 탄소-탄소 이중결합 또는 삼중결합을 가진 자유라디칼 중합기의 첨가에 의해 변형되며, 조직, 세포 또는 생물학적 활성물질을 캡슐화하기 온화한 조건하에서 중합될 수 있다. 이러한 고분자성 물질은 특히 조직의 점착제, 혈관을 포함하는 조직강의 코팅제, 랑게르한스섬과 같은 세포의 코팅제, 코팅제, 플러그, 지지체 또는 신체와 같은 생물학적 물질과의 접촉을 위한 기질, 및 생물학적 활성분자의 약물송달수단으로 유용하다.

대표도

도 1

색인어

캡슐화, 고분자 겔, 기질.

명세서

기술분야

본 발명은 수용성 고분자의 가교화된 망상구조로 표면과 3차원적 형상을 코팅 및 /또는 캡슐화하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

마이크로캡슐화 기술은 의약의 여러분야에서 활용되고 있는데 예를 들어, 그 중요한 적용으로 당뇨병치료를 위한 세포의 캡슐화(Lim, F., Sun, A.M." 생물학적 인공 내분비 췌장으로서의 마이크로캡슐화된 섬" ,(1980)Science 210, 908-910), 적혈구 대용을 위한 헤모글로빈의 캡슐화 및 약물의 방출제어를 들 수 있다. 그러나, 종래의 방법을 사용하면 캡슐화된 물질들이 종종 열, 유기용매, 및 비생리학적 PH를 포함하는 제조조건에 노출되어 생물학적 활성이 소실될 수 있다.

또한, 세포들이 상기 제조조건에서 생존한다 하더라도, 생체적합성, 화학적 안정성, 면역학적 보호 및 세포의 발육과잉에 대한 저항성 등에 관한 엄격한 요구가 종래 방법의 적용을 제한하고 있다.

예를 들어, 폴리리신 또는 폴리오르니틴(폴리캐티온)을 이용한 알기네이트(폴리애니온의 이온 가교화에 기초한 캡슐화 방법(구센,(1985)생명공학 및 생체공학 27:146)은 비교적 온화한 캡슐화 조건을 제공하지만, 이러한 이온적으로 가교화된 고분자의 경우 장기간의 기계적 · 화학적 안정성에는 의문이 남게 된다. 더우기, 이러한 고분자들은 생체에 이식될 때 세포의 발육과잉에 대해 많은 영향을 받게 되는데(McMahan, at al.,(1990)J.Nat. Cancer Inst.,82(22), 1761-1965), 이러한 발육과잉은 주위의 영양소, 대사물질 및 수송단백질에 대한 마이크로 캡슐의 투과성을 장기간 제한하게 되며, 이는 캡슐화된 랑게르한스섬을 기아 및 사멸에 이르게 한다(O'Shea, G. M, et al(1986)Diabetes, 35: 943-946).

따라서, 비교적 온화한 세포캡슐화방법을 제공하여 캡슐화 고분자의 특성과 수율을 제어하고, 선택적이고, 화학적으로 안정적이며, 매우 높은 생체적합성을 갖춘 세포존재하의 투과막을 생성할 필요가 있다.

이는 생물학적 물질과 접촉하는 물질뿐만 아니라 세포와 조직외의 다른 생물학 물질의 캡슐화를 위해서도 필요하다.

만약, 물질이 환원특이체액 또는 세포면역응답 중 한쪽에서 이끌어내거나 또는 물질이 유도된 기능을 수행하는 것을 방해하는 비특이적 외부물질을 이끌어 내지 않는 것 또는 물질이 섭취나 주입함에 있어 유독성이 없다면, 물질들은 생체적합성이 있다고 여겨진다. 상기 물질은, 만약 혈액과 접촉하는 여초혈전증과 같은 특이적 반응을 끌어내지 않는다.

폴리(하이드록시에틸 메타크릴레이트)(폴리(HEMA)), 수불용성폴리아크릴레이트 및 아가로우스와 같은 하이드로겔을 형성키 위해 물에 부푼 중합체로 제조된 겔들이 섬들과 다른 동물적조직을 캡슐화하는데 유용한 것으로 알려졌다.(Iwata, et al.(1989)Diabetes, 38:224-225; Lambert; et al.(1984)Appl, Biochem. Biotech., 10:101-105(1984)).

그러나, 상기 겔들은 바람직하지 못한 물성들을 가지고 있다. 아가로우스는 약한 겔을 형성하고, 유기 촉매로부터 침전되는 폴리아크릴레이트는 잠재적으로 세포독성이 있다. Dupuy, et al(1988)는 폴리아크릴 아미드 겔들을 형성하기 위한 아크릴아미드의 중합에 의해 섬(islets)의 마이크로 캡슐화를 보고하였다. 그러나 중합과정은 아크릴아미드와 가교화제와 같은 독성 모노머가 요구되고, 완결될 수 있도록 급히 진행시킨다면 국부적 열을 발생시킨다.

알기네이트와 폴리(L-리신)의 코아세르베이션에 의해 형성된 마이크로캡슐은 예를 들면 O'Shea, et al., 1986에 묘사된 바와 같이, 면역보호기능(immunopro-tective)이 있다고 보여주고 있다.

그러나, 이런 캡슐의 심한 조직발육과잉은 다음 이식(implantation)에서 관측되어진다(McMahon, et al, 1990; O'Shea, et al., 1986).

생체적합성(biocompatibility)을 증가시키기 위해 폴리(에틸렌 옥사이드)(PEO)를 사용한 내용은 문헌상에 잘 기재되어 있다.

알긴-폴린(L-리신)마이크로 캡슐의 생체적합성은 마이크로캡슐의 표면위에 pLL와 PEO의 그라프트 공중합체를 함유시킴으로써 향상된다고 보고되어 왔다(Sawhney, et al., " 폴리(L-Lysine)-알긴산염 마이크로캡슐투과막의 생체적합성을 향상시키기위한 폴리(에틸렌옥사이드)-그라프트-폴리(L-Lysine)공중합체" (1991)Biomaterials, B, 863-870)

PEO사슬은 높은 수용성과 유연성을 지닌다.

PEO사슬은 물에서 궁극적으로 높은 고유 운동성을 가지고, 근본적으로 비이온성구조이다.

표면위에 PEO의 고정은 PEO측면사슬을 가지는 그라프트 중합체의 합성에 의해 주로 수행되어 왔다(Sawhney, et al.; Miyama, et al., 1988; Nagoaka, et al). 이러한 과정은 각각의 적용을 위한 단량체와 중합체의 통상적(custom)합성을 포함한다. 그라프트 공중합체의 사용은 고분자에 의해 보여지는 표면이 완전히 PEO로 구성되어 있는 것을 여전히 보장하지 못하고 있다.

전자빔 가교화는 PEO 하이드로겔들을 합성하는데 사용되어져 왔는데, 이는 Sun., et al.,(1987)polymer preprl., 28:294; Dennision, K. A.,(1986)ph. P. Thesis Massachusetts Institute of Technology.,에 의해 비혈전화(non-thrombogenic)된다고 보고되어졌다.

그러나 전자빔의 사용은 방사가 세포독소인 관계로 중합체에 어떤 살아 있는 조직을 포함시키는 것을 금지한다.

상기 방법에 의해 제조된 망(network)은 전자빔에 의해 유도된 비특이적 가교화로 인해 특징을 지우기 어렵다.

단파장 자외선광 개시하에서 PEG 디아크릴레이트의 광중합은 효모세포를 발효와 화학적 전환을 시키기위해 포획(entrap)하는데 사용되어 왔다(Kimura, et al.(1980)," 뉴클레오티드의 발효 부인산반응에서 효모의 비이동적인 당분해작용(glycolysis)의 특성들" Eur. J. Appl. Microbio Blotechnol., 11:78-80; Omata et al.,(1981), " 유기용매에서 겔-entrapped 로도토룰라 미누타 LIZr 텍세시시 세포에 의해 디메틸 호박산염의 스텔로셀렉틱 가수분해" Eur. J.

Appl. Microbial Biotechnol. 11:199-204, Okada, T. et al., 펩티드 분비계에 대한 Entrapped 성장 효모세포의 응용" Appl. Microbiol. Biotechnol., Vo., 26, pp 112-116(1987).

단파장인 자외선 방사로 광중합되는 물질내에 세포들의 캡슐화하는 또다른 방법은 미생물세포에 대해 사용해 왔다(Kimuro, et al., 1981; Omata, et al., 1981; Okada, et al., 1987; Tanka, et al., 1987; Omata, et al., 1979a; Omata, et al., 1979b; Chun, et al., 1981; Fukul, et al., 1976; Fukui, et al., 1984).

그러나, 효모세포와 어떤 미생물 세포들은 포유동물의 세포와 인간조직보다도 해로운 환경, 높은 온도 및 단파장 자외선 방사에 내구력이 강하고 저항력이 있다.

상기 방법 및 / 또는 물질들에는 몇가지 문제점들이 있는 바, 물질들은 생체내에서 트롬보제닉(thrombogenic)혹은 불안정하거나, 살아 있는 포유동물의 조직 또는 생물학적으로 활동분자들을 예를 들면, 단파장 자외선 방사, 파괴하는 경향이 있는 중합조건들을 필요로 한다는 점이다.

인간 또는 다른 포유동물에서 이식배양을 하기위해 살아있는 조직을 캡슐화하기위해, 중합조건은 살아있는 조직을 파괴해서는 안되고, 합성 중합체-피복된 세포는 생체적으로 적합해야 한다.

영양소나 가스가 투과하면서도 강하고 비면역성인 매우 얇은 층내에 물질을 캡슐화해야 할 필요가 있다.

예를 들면, 랑게르한스섬의 이식인 경우, 직경이 100 200㎛ 인 상기섬은 예전에 직경이 400 1000 ㎛ 인 마이크로스피어내에 캡슐화되어 왔다. 이렇게 큰 직경은 결과적으로 영양소의 확산을 늦추고 큰 이식부피를 초래할 수 있다.

생체적합성에 적합한 세포나 조직 또는 생체학적으로 활성분자들을 캡슐화하는데 사용되어지는 물질과 이 물질을 사용하는 방법이 필요하지만, 이 물질이 특이적 또는 비 특이적 면역반응들을 유도해 내지 못하고, 이 물질은 매우 짧은 시간 및 매우 얇은 층내에서 세포가 다치거나 사멸없이 살아 있는 세포 또는 조직과 접촉하여 중합될 수 있다.

생체내에서 상기 물질들을 사용하는 중요한 점은 이 물질들이 짧은 수술건행시간애에 또는 흩어진 것들을 캡슐화하기 위한 물질이 손상을 입거나 사멸되기 전에 중합되어야 한다는 점이다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 목적은 살아있는 세포 및 조직과 접촉하여 매우 짧은 시간내에 중합될 수 있는 고분자 물질을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 특정 시간 동안 생체적합성 및 분해저항성이 있는 고분자물질을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 영양소와 가스에 대한 투과성이 있으면서도 다른 세포들의 생체내 공격으로부터 세포와 조직들을 보호해 주는 고분자물질을 제공하는 것이다.

[발명의 요약]

본 발명에서는 신속하고 온화한 중합조건하에서, 세포, 조직 또는 운반체들의 표면에 적합한 고분자 코팅으로 살아 있는 조직을 직접 또는 간접적으로 캡슐화 또는 코팅시키기 위하여 가시광선 또는 장파장 자외선 광(low UV light, 320 nm 또는 그 이상)을 사용하는 매크로머의 중합방법이 개시된다. 본 발명에서 매크로머(macromer)로 칭하며 수용성 또는 실질적으로 수용성이며 코팅되는 세포내로 확산되기에는 너무 큰 비독성 프리폴리머로부터 고분자가 형성된다. 예를 들어, 매크로머는 생체에 매우 적합하며 상온 또는 생리학적 온도 및 생리학적 pH에서 유독성 중합개시제의 사용없이 산소가 존재하거나 또는 존재하지 않는 상태에서 빠르게 형성될 수 있는 PEG 하이드로겔을 포함한다. 중합은 메틸렌 블루 또는 에오신 같은 비독성 염료를 사용하여 개시되며 가시광선 또는 낮은 UV광으로 광중합된다. 에틸에소신 같

은 세포내로 확산되지만 비독성인 다른 염료들 역시 사용될 수 있다. 상기 과정은 적절한 발색기(chromphore)가 없는 상태에서는 세포에 의해 광이 거의 흡수되지 않기 때문에 세포독성이 없다. 세포들은 대부분 이러한 빛에 대해 투명한데, 이는 세포단백질과 핵산에 의해 강하게 흡수되고 세포독성일 수 있는 단파장 자외선 방사에 대한 것과는 반대이다. 대부분의 매크로머는 5 50mW정도의 저준위 방사이고 백만초 내지 수초사이체 중합을 유도하기에 충분하다 세포독성이 없는 두번째 이유는 중합영역이 세포내로 확산되지 않기 때문이다.

이러한 결과 만들어진 고분자들은 반투과막, 조직지지체, 점착제, 플러그(plug), 다른 세포 혹은 조직과의 상호작용을 막는 장벽, 및 생물학적 영역에 대한 운반체로서 작용할 수 있다. 기하학적으로 다른 형태를 가진 다양한 넓은 표면들은 이러한 고분자물질의 가교화된 3차원 망구조로 코팅될 수 있다. 이러한 고분자들은 단백질, 다당류, 약리활성이 있는 유기화합물 및 핵산을 포함하는 생물학적 활성 물질의 송달을 위해 매트릭스로 만들어질 수 있다.

본 발명의 바람직한 1 실시예에서는, 혈관강 표면의 혈전과 염증반응을 방지하기 위한 구조적인 지지를 위해 및 /또는 혈관으로 치료약제를 송달하기 위해, 상기 고분자가 혈관강의 안쪽에 층을 형성하는 데 사용된다. 또 다른 바람직한 실시예에서는, 영양소, 가스, 작은 세포산물을 자유롭게 통과시키는 한편, 면역글로불린 분자 또는 세포가 통과되는 것을 막음으로써 세포를 보호하기 위해, 상기 고분자가 랑게르한스섬과 같은 세포주위에 반투과성 장벽을 만드는데 사용된다. 이렇게 처치된 랑게르한스섬은 대사과정의 결핍으로 인한 질병치료 또는 생물학적 조절분자의 불충분한 농도로 야기되는 당뇨 같은 질병들의 치료에 유용하다.

발명의 상세한 설명

개시된 바와 같이, 생체 적합성 고분자는 생물학적 활성물질이나 세포 및 조직과 병행해서 사용하기 위한 것이고, 적어도 두개의 중합가능 치환체를 가지는 생체적합성 수용성 매크로머를 자유라디칼 중합하여 제조된다. 이들 중합코팅물은 효모중합체, 공중합체 또는 블럭 공중합체일 수 있다.

여기에서, 중합체는 10보다 더 큰 중합도를 갖는 단위체이고, 올리고머는 2 10의 중합도를 가지며, 중합도란 구조에서 반복단위체수를 의미한다. 적어도 2개의 중합가능치환체를 가지고 있는 성분의 중합은 겔화와 동일하고, 중합이 진행되면 3차원 가교화 겔을 형성한다.

겔을 제조하는데 유용한 프리폴리며(매크로머)

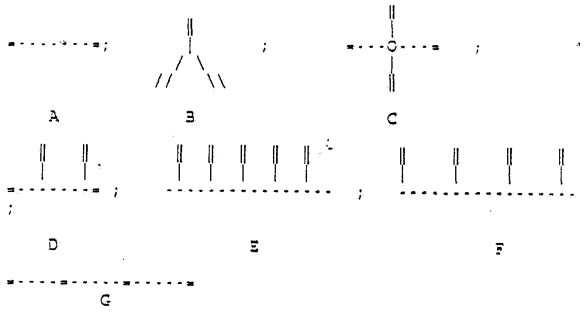
생물학적 물질 또는 세포와 접촉하여 중합되어지는 프리폴리머에 대한 일반적인 기준(본 발명에서는 매크로머로 인용됨)은 상기 프리폴리머는 수용성이거나 실질적으로 수용성이고, 라디칼중합에 의해 중합화되거나 가교화되며, 비독성인 한편 세포내로 확산되기에는 너무 크다는 점(즉, 분자량 200보다 더크다)에 있다.

실질적으로 수용성은 여기서는 물과 유기용매의 혼합물에 녹는다는 의미로 정의하는 바, 물은 용매들의 대다수의 혼합물로 제조된다.

상기한 바와 같이, 매크로머들은 자유라디칼 광개시제와 같은 개시제와 촉매의 존재하에 또는 광 만으로 광중합되어야 하는데, 역시 광은 가시광선 영역 또는 장파장 자외선 영역, 즉 320nm이나 그 이상의 영역을 말한다. 만약 상기 반응조건들이 캡슐화되는 조직의 생존성에 해로운 영향을 주지 않는다면, 상기 반응조건들은 자유라디칼 중합작용을 촉진시키는데 적절하다. 상기 매크로머들은 중합되는 동안에 살아있는 조직에 독성있는 열 수준이나 생성물을 발생시키지 않아야 된다. 촉매 또는 자유라디칼 개시제는 역시 사용조건하에서 독성이 있어서는 안된다.

실질적으로 수용성인 매우 다양한 고분자가 존재하는데, 이들 중 몇개는 아래에서 개략적으로 설명된다.

(-)는 실질적으로 중합체의 수용성 영역을 표시하고,(=)는 자유라디칼 중합종을 표시한다. 실시예들은 하기사항을 포함한다.;



실시예중 A는 PEG 디올(diol)에서부터 PEG 디아크릴 레이트(diacrylate)를 포함하고, B는 PEG트리올(triol)로부터 형성된 PEG 트리아크릴레이트(triaclylate)를 포함하며, C는 PEG를 사이클로덱스트린 중심링에 그라프트 시키고 아크릴산염화함으로 인해 형성된 PEG-사이클로덱스트린(cyclodextrin)테트라아크릴레이드를 포함하고, D는 2개의 PEG 디올을 비스 에폭시드(bis epoxide)에 그라프트시키고 아크릴산 염화함으로 인해 형성된 PEG테트라아크릴레이드를 포함하고, E는 PEG를 히알우로닉산 쇄(hyaluronic acid chain)의 많은 부위를 아크릴산염화함으로 인해 형성된 히알우로닉산 메타크릴레이트(methactylate)를 포함하며, F는 PEG를 히알우로닉산에 그라프트시키고 아크릴산염화함으로 인해 형성된 PEG-히알우로닉-멀티아크릴레이트(multiacrylate)를 포함하고, G는 PEG다이올을 불포화성 2가산(diacid)으로 에스테르화함으로 인해 형성된 PEG-불포화성 2가산 에스테르를 포함한다.

다당류는 알기네이트, 히알우로닉, 콘드로이틴(chonroitin)설페이트(sulfate), 덱스트란(dextrane), 텍스트란설페이트, 헤파린(heparin), 헤파린 설페이트, 헤파란 설페이트, 키토산(chitosan), 겔란 검(gellan gum), 크산탄검(xanta n gum), 구아르검(guar gum), K-카라게난(carrageenan)을 포함한다.

광중합되는 치환물건들은 아크릴레이트, 디아크릴레이트, 올리고 아크릴레이트, 디메타크릴레이트, 또는 올리고메쏘아크릴레이트를 포함하는 한편, 생리학적으로 광중합기를 받아들일 수 있는 다른 물질도 포함한다.

합성 고분자 매크로머

수용성 매크로머는, 폴리(에틸렌 옥사이드)(PEO), 폴리(에틸렌 글리콜(glycd)(PEG), 폴리(비닐 알콜)(PVA), 폴리(비닐피롤리돈(Vinylpyrrolidone)(PVP), 폴리(에틸렌옥사졸린)(PEOX)폴리아미노산, 슈도폴리아미노산(Pseudop olyamino acids) 및 폴리에틸옥사졸린을 포함하는 수용성 고분자로 부터 유도될 수 있으나 이들에 한정되지 않고, 콘주게이트(conjugate)가 수용성이라면 이들간 또는 이들과 더불어 다른 수용성 고분자와의 공중합체를 포함한다. 수용성 콘주게이트의 한 예는 폴리에틸렌글리콜 및 폴리프로필렌 옥사이드의 블력공중합체이고, 상업적으로는 Pluronic 표면 활성제(surfactant)로 이용된다.

다당류 매크로머

다당류에 히드록실(hydroxls)또는 아민과 반응함으로 인해 결합하는 알킬레이트, 히알우론산, 콘드로이틴 설페이트, 덱스트란, 덱스트란 셀페이트, 헤파린, 헤파린설페이트, 헤파란설페이트, 키토산, 젤란검, 키산탄검, 구아르검, 수용성 셀룰로오스(cellulose)유도체 및 카라게난은 역시 매크로머 용액을 형성하는데 사용된다.

단백질 매크로머

자연적 또는 재결합원천으로부터 생성된 젤라틴, 콜라겐, 엘라스틴, 제인(zein) 및 알부민(albumin)과 같은 단백질은 아크릴레이트, 디아크릴레이트, 메타크릴레이트, 에타크릴레이트, 2-페닐 아크릴레이트, 2-클로르(chloro)아클릴레이트, 2-브롬아크릴레이트, 이타코네이트(itaconate), 올리고 아크리레이트(oligoacrylate), 디메타크릴레이트, 올리고메타크릴레이트, 아크릴아미드, 메타크릴아미드, 스티렌기 및 생리학적으로 중합기를 받아들일 수 있는 다른 물질들을 포함하여, 카본-카본 2중 또는 3중 결합이 포함된 일부의 첨가에 의해 라디칼중합으로 형성되어지고, 매크로머용액을 형성시키는데 사용될 수 있다.

염료-감수성(dve-sensitized)중합

염료-감수성 중합은 화학문헌에 잘 알려져 있다.

예를 들면 개시화를 촉진시키는 트리에탄올아민과 같은 키산틴염료와 전자공급체의 존재하에서 아르곤 이온 레이저(514nm)로부터 나오는 광이 반응혼합물에 아크릴기의 라디칼중합을 유도하는데 도움이 된다(Neckers, et al.(1980)polym. Maerials sci. Eng., 60:15; Fouassier, et al.,(1991)Macromol. chem., 192:245-260). 레이저광을 흡수한 후, 염료는 삼중선(triplet)상태로 여기된다. 상기 삼중선상태는 중합반응을 개시화하는 자유라디칼을 생성하는 트리에탄올아민과 같은 제3급 아민(tertiary amine)과 반응한다. 중합작용은 대단히 빠르고, 매크로머의 기능과 농도, 광세미, 및 염료와 아민의 농도에 의존한다.

광개시성 염료

320nm와 900nm 간의 주파수를 가진 광을 흡수하는데 사용되는 어떤 염료는 자유라디칼을 형성할 수 있고, 적어도 부분적으로는 수용성이며, 중합하기 위해 사용된 농도에서 생리학적 물질에는 유독성이 없다.

에틸에소신, 에오신 와이, 플루오레스신(fluorescein), 2,2-디메소시(dimethoxy)-2-페닐 아세토페논, 2-메소시, 2-페닐아세토페논, 캄포르키논(camphorquinone), 로우즈벵갈(rose bengal), 메틸렌 블루, 에리트로신(erythrosin), 필록심(phloxine), 시오닌(thionine), 리보플라빈(riboflavin), 메틸렌그린, 아크리딘오렌지, 키산틴염료, 및 시오키산틴 염료와 같이 중합을 광학적으로 개시하는데 사용될 수 있는 다수의 감광성 염료가 있다.

개시제 염료는 수용액내에서의 스펙트럼특성 때문에 에틸에오신이 바람직하다.

(흡수 최대=528nm, 흡수계수=$1.1\times 10^{5} M^{-1} Cm^{-1}$, 형광 최대 - 547nm, 양자방출량=0.59)에틸에오신을 사용한 반응도는 실시예 1로서 제1도에 도시되어 있다. 상기염료는 무색인 생성물로 아민과 반응 및 조사후 표백되어지고, 반응계내로 광투과를 허용한다.

공촉매(cocatalyst)

광개시제와 함께 유용한 공촉매는 자유라디칼반응을 자극할 수 있는 질소염기성분들이다. 제1차, 제2차, 제3차 또는 제4차 아민들과 같이 질소를 가지는 전자가 많은 분자가 공촉매로 적합하다. 공촉매들은 아래의 성분들을 포함하지만 이에 한정되지는 않는데, 상기 공촉매들은 트리 에탄올아민, 트리에틸아민, 에탄올아민, N-메틸디에탄올아민, N, N-디메틸벤질아민, 디벤질아민, 테트라메틸, 에틸렌디아민, 포타습퍼설페이트, 테트라메틸에틸렌디아민, 리진(lysin), 오르니틴(ornitine), 히스티딘 및 아르기닌을 포함한다.

몇몇 경우에서, 염료는 아민과 같은 어떤 개시제(initiator)의 추가없이도 광을 흡수 및 중합작용을 개시할 수 있다. 이들 경우에서, 염료와 매크로머는 중합을 초기화시키는데 광에 노출될 필요가 있다. 자유라디칼의 발생은 레이저광이 제거될때 끝나게 된다. 2,2-디메소시-2-페닐아세토페논과 같은 몇개의 광개시제들은 광중합을 유도하기 위해 어떤 보조아민이 필요없고, 이들 경우에는 염료, 매크로머와 함께 적절한 파장을 갖는 광만이 요구된다.

중합수단

광중합

상술한 광원천은 약 320 800nm의 파장, 가장 바람직하게는 365nm 또는 514nm 파장을 갖는 아래에서 설명되는 바와 같은 여러 램프와 레이저를 포함한다. 이 광은 수은 램프, 장파 UV램프, He-Ne 레이저, 또는 아르곤 이온 레이저, 또는 광섬유와 같은 요망되는 방사를 발생시킬 수 있는 적절한 원천에 의해 공급된다.

다른 중합수단

광과 다른 수단이 중합에 사용될 수 있다. 그 예로 트리에탄올아미드를 갖거나 또는 없는 벤졸페록시드(peroxide), 테트라메틸에틸렌디아미드를 갖거나 또는 없는 포타습 퍼설페이트 및 소디움 비설페이트(bisulfate)를 갖는 암모늄과 같은 적정 온도에서 자유라디칼을 형성하는 열 개시제에서 의한 개시를 들 수 있다.

생물학적 활성물질의 삽입

수용성 매크로머는 분자 또는 중합된 주변의 세포, 조직, 세포내 세포질 성분 또는 다른 세포내 구성성분에 대한 송달체계를 형성하기 위하여, 생물학적 활성분자주위에서 중합될 수 있다. 또한, 수용성 매크로머는 조직을 캡슐화하는 것은 물론, 박테리아의 성장에 대한 저항성 또는 염증반응의 감소와 같은 부가적인 특성을 고분자에 나누어 주기 위해, 생물학적 활성분자가 삽입되도록 중합될 수 있다. 단백질, 펩티드(peptides), 다당류(polysaccharides), 유기 또는 비유기 약제, 핵산(nucleic acids), 당, 세포 및 조직을 포함하는 다양한 생물학적 물질이 캡슐화 또는 함유될 수 있다.

캡슐화될 수 있는 세포에는 변환세포를 포함하여, 설정된 세포 라인 뿐만 아니라 1차적 배양물도 포함된다. 이는 췌장 섬세포, 사람포피섬유아세포, 중국 햄스터 난소세포(chinese hamster ovary cells), 베타 세포 인슐로마스(beta cell insulomas), 임파구종 백혈병세포(lympohoblastic), 생쥐 3T3 섬유아세포, 도파민을 분비하는 복부 중뇌세포, 신경아세포세포(neuroblasttoid cells), 아드레날 골수세포(adrenal medulla cells) 및 T-세포를 포함하고, 이것들에 한정되는 것이 아니다.

상기 부분적 목록으로 부터 알 수 있는 바와 같이, 원종 뿐만 아니라 피부, 뉴트럴(neural), 혈액, 기관(organ), 근육(muscle), 글렌듈러(glandular), 생식(reproductive) 및 면역계 세포를 포함한 모든 형태의 세포들이 상기 방법에 의해 성공적으로 캡슐화될 수 있다. 단백질의 예들은 아데노신 데아미나제, 효소(enzyme), 혈액응고인자, 억제제와 같은 스트렙토키나아제(streptokinase)와 조직 플라스미노겐(plasminogen)활성화제, 면역성 항원(antigens)과 같은 약제를 분해시키는 클로트(clot) 및 유전자요법(gene therapy)에 대한 바이러스(viruses), 비타민, 공동인자(cofactors) 및 RNA 종양비루스(refro viruses)를 포함한 안티센스(antisense), 박테리아 및 다른 미생물 유기체(microbial organisms)와 같은 헤파린, 올리고뉴클레오티드, 호르몬, 다당류는 이런 기술로 캡슐화될 수 있다.

생리학적 물질은 먼저 다당류겔과 같은 구조내로 함유될 수 있다(Lim, U.S.P.N. 4,352,883; Lim, U.S.P.N, 4,409,331; Tsang, et al., U.S.P.N. 4,633,286; Goosen et al., U.S.P.N. 4,673,556; Goosen et al., U.S.P.N. 4,689,

293, Gooseu et al., U.S.P.N. 4,806,355; Rha et al. U.S.P.N. 4,744,933; Rha et al., U.S.P.N. 4,749,620)참고 자료에 의해 여기에서 구체화되어진다. 그러한 겔은 투과-선택도의 제2수준 뿐만 아니라 물질에 첨가된 구조보호를 제공해 준다.

중 합

매크로머는 개시제와 바람직하게 혼합되어 중합되어질 물질과 위치에 적용되어지며, 광 또는 열과 같은 개시제에 노출되어 진다.

바람직한 방법에서, 광개시제는 수용성혼합물을 형성하기 위해 중합가능매크로머의 수용액에 첨가되고, 생리학적 활성물질이 첨가되며, 수용액에 광이 방사된다.

매크로머는 광중합가능치환체를 갖는 수용성중합체로 형성되는 것이 바람직하다. 염료/개시제계에 의한 광흡수는 중합을 개시화하는 자유라디칼을 형성시킨다.

바람직한 제 2방법에서, 매크로머는 동물내에 이식하기 위한 생리학적 기관 또는 합성기질의 3차원 물질의 표면에 코팅된다. 수용성 매크로머는 수용성혼합물을 형성하기 위해 광개시제와 혼합되고, 상기 혼합물은 표면이 코팅될 수 있도록 표면에 가해지며, 상기 코팅된 표면에는 매크로머중합을 개시하기 위해 광이 방사되어진다.

변형된 실시예에서, 합성기질은 친수성마이크로캡슐, 마이크로캡슐 또는 구슬(bead)이다. 상기 친수성 마이크로캡슐들은 수용액을 형성하기 위해 광개시제계와 결합하여 수용성 매크로머액과 혼합된다; 마이크로캡슐은 오일 현탁(oil suspension)을 형성하기 위해 오일내의 매크로머와 교반하여 현탁 되고, 상기 마이크로캡슐은 광으로 방사된다.

또다른 실시예에서, 감광성 염료는 치료되는 조직 표면에 흡수되어지고, 비흡수된 염료는 조직에 희석되거나 세척되며, 상기 매크로머용액이 염료결합(coupled)표면에 적용되고 중합개시되어 계면 중합이 이루어진다.

중합은 벌크 중합(bulk)또는 계면중합을 이용한 적어도 5가지 방법에 의해 영향을 받는다. 추가적인 실시예들은 중합과정 및 중합물질의 특정응용에 관하여 아래에서 설명될 것이다.

벌크중합

벌크중합에서 코팅된 물질은 매크로머용액, 광개시제 및 임의의 공촉매와 접촉하는 위치에 배치되고, 중합은 예를 들면 방사에 노출됨으로 인해 유도된다. 벌크 중합의 세가지 실시예는 아래와 같다.

물질의 캡슐화를 위한 벌크 서스펜션 중합방법

캡슐화되는 생리학적 물질은 매크로머, 동촉매, 임의의 엑셀러레이트 및 개시제를 포함하여 수용성 매크로머 용액에 혼합된다. 구형체, 완형체(ovoid)또는 직사각형과 같은 작은 공 모양(globular)의 기하학구조들은 오일, 미네랄오일과 같은 혼합되기 어려운 물질 또는 공기에 수용액의 동시분출에 의하거나, 작은 물방물을 형성시키는 오일상과 같은 혼합되기 어려운 상과 접촉하는 수용액상을 교반함으로 인해 형성된다.

혈구(globules)에서 매크로머는 방사노출량에 의해 중합된다.

매크로머와 개시제가 혈구로 제한되기때문에 중합으로 부터 생기는 구조는 생리학적 물질이 동봉된 캡슐이다.

이는 혈구의 전체 수용성부분이 세포물질주위에 두꺼운막을 형성하기 위해 중합하는 " 현탁중합(suspension polymerizataion)" 이다.

마이크로 캡슐 현탁 중합 방법

벌크현탁방법의 변화에 있어서, 마이크로캡슐화 물질은 매크로머가 현탁중합반응에 중합되는 것에 의해 코어로서 사용된다. 생물학적 물질은 마이크로스피어 마이크로로캡슐 또는 마이크로입자, 예를 들면 알긴산염마이크로캡슐내에 첫째로 캡슐화된다. 마이크로캡슐은 매크로머액과 개시제와 혼합되고 중합된 매크로머액과 혼합된다.

이 방법은 특히 PEG 매크로머의 극도의 친수성을 이용하여 PEG 매크로머의 사용하기에 매우 적합하고, 특히 알긴산염-폴리(L-리신)과 같은 하이드로겔 마이크로캡슐에 사용하기에 매우 적합하다. 마이크로스피어는 물에서 부풀어오른다. 촉매 또는 개시제, 액셀러레이터를 포함하는 매크로머용액이 미네랄오일과 같은 소수성매체에서 상(phase)을 분리하도록 할때, PEG 매크로머용액이 알긴네이트 마이크로캡슐의 친수성표면위에 머무른다. 상기 현탁액이 방사되어질때, PEG 매크로머는 마이크로스피어 주위에 얇은 중합층, 비수용성겔을 형성하는 중합 및 겔화의 과정을 밟는다.

바람직하게는, 상기 기술된 작은 물방울들이 혼합되지 않는 미네랄오일과 같은 용액안에 떨어지는 작은 물방울들을 형성하기 위해 물에 혼합되지 않는 공기 또는 액체와 접촉하는 용액, 매크로머용액, 개시제에 마이크로캡슐의 동분출(co extrusion)을 포함하는 것이 바람직하다.

혼합되기 어려운 액체는 작은 물방울을 형성시키기위해 선택되어진다. 부가적으로 만약, 얇은 막이 캡슐화된 물질이 동물내에 주입되거나 또는 이식된다면 나머지 물질들은 비유독성이고 비면역유전자이어야 한다. 미네랄오일은 혼합되기 어려운 액체가 바람직하다. 작은 물방울들은 혼합되기 쉬운 액체에 접촉됨으로써 중합화되어진다.

상기 동분출기술로는 50미크론 두께보다 더 큰 교차결합 중합체 코팅이 일어난다. 선택적으로, 마이크로캡슐은 오일상과 같은 혼합되기 어려운 상과 접촉하여 교반되는 매크로머와 개시제용액에 현탁되어질 것이다. 합성유제(emulsion)는 마이크로캡슐 주위에 50마이크론 두께보다 더 큰 중합체 코팅을 형성하기 위해 중합되어진다.

조직의 점착을 위한 벌크 중합방법

중합물들은 조직을 점착하는데에도 사용될 수 있다.

광개시제와 결합된 수용성 중합가능 매크로머는 조직점착이 요구되는 조직표면에 적용되고, 조직표면은 점착될 조직과 접촉되어 접합되고, 이 조직 접합은 매크로머가 중합될때까지 광으로 방사된다.

바람직한 실시예에서, 이는 초단위 또는 분단위 기간내에 이루어지나 초단위 기간내에 이루어지는 것이 가장 바람직하다.

바람직한 실시예에서, 매크로머 혼합물은 PEG 400 디아크릴레이트 또는 PEG 18.5K 테트라아크릴레이트수용액과 같은 수용액이다. 이 용액이 조직을 보호하는 점액 또는 유체의 습기층을 갖는 조직과 접촉할 때, 조직상의 습기와 혼합된다.

조직위의 점액층은 궁극적으로 세포표면에 접촉하는 수용성 다당류를 포함한다.

상기는 번갈아 글리코프로테인과 프로테오글리칸안에 풍부하다. 이리하여 물리적혼합과 균열에 침투하므로 인해 표면얽힘은 가교화후 조직표면에 PEG겔의 점착되게하는 몇개의 힘들이다.

점착물에 대한 특정 응용성을 혈관 접합, 연질 조직재결합, 유출화상드레싱(drainable burn dressings) 및 망막재부착을 포함한다.

조직장벽을 형성하기 위한 벌크중합

PEG겔이 조직과 떨어져 중합되어진다면, 물질의 큰 하이드로필릭(hydrophilic)특성으로 인해 세포와 조직에 비점착된 표면이 나타난다.

상기 특성은 코팅된 조직으로 세포의 접근을 형성하는데 이용될 수 있다.

상기 응용예들은 벌크중합(매크로머에 혼합된 중합개시체)에 의하거나 계면중합(표면에 흡수된 계시체)에 의해 혈전증(thrombosis)또는 혈관경련(vasospram)또는 혈관허탈(vessel collapse)을 예방하기 위해 혈관루멘(lumen)또는 랑게르한스섬상에 장벽을 형성하는 것을 포함한다.

계면중합

계면중합인 경우, 자유라디칼 개시체는 코팅된 물질표면에 흡착되어지고, 흡착되지 않은 개시체는 린싱용액을 사용하거나 매크로머용액의 적용에 의해 희석되거나 세척되어지며, 임의적으로 동촉매를 포함하는 매크로머용액은 중합되어진다. 계면중합의 그 실시예들은 아래와 같다.

마이크로캡슐 계면중합 방법

생물학적 물질 또는 마이크로캡슐의 표면에 얇은 막을 형성하기 위해 계면중합을 이용하지만 생물학적 물질은 현탁중합에 의해 상기에서 설명한 바와 같아. 캡슐화되어진다. 이는 매크로머용액에 생물학적물질 또는 마이크로캡슐을 현탁시키는 것과 방사에 의해 신속하게 중합시키는 것과 광개시체에 생물학적물질 또는 마이크로캡슐을 코팅하는 것을 포함한다. 50마이크론 두께보다 적은 얇은 중합체코팅(외막)은 광개시체와 마이크로캡슐표면에만 존재하고, 매크로머용액안으로 깊이 확산되기에는 불충분한 시간을 주기때문에 생물학적물질 또는 마이크로캡슐 주위에 형성된다.

대부분의 경우에 염료같은 개시체는 표면에 대한 흡수 뿐만 아니라 생물학적물질의 내부로 스며든다.

트리에탄올아민같은 동촉매를 포함하는 매크로머용액이 표면에 적용되고 레이저광 같은 개시제에 노출시킬때, 필수적인 모든 반응성분들이 생물학적물질 또는 마이크로캡슐 및 매크로머용액의 계면과 그 안쪽에만 존재한다.

전형적으로 약 100msec내에서 일어나는 중합 및 겔화는(만약 다기능의 매크로머가 사용된다면)최초에는 계면에서만 일어나고, 계면 근처 및 계면과 떨어진 장소에서 일어난다. 장시간 방치한다면 개시제는 마이크로스피어의 내부코어에서 부터 용액안으로 확산되기 시작하고 이와 유사하게 매크로머는 코어내부로 확산되기 시작하며 두꺼운 고분자층이 형성된다.

직접 계면 중합방법

조직표면에 직접 얇은 막을 형성시키는 계면 중합으로서, 조직은 개시제로 직접코팅되고, 과잉개시제는 제거되며, 매크로머용액은 조직에 바르거나 중합된다.

고분자의 투과성 제어

코팅의 투과성은 분자량 및 중합체의 교차결합에 의해 부분적으로 결정된다. 예를 들면 교차결합들 사이인 짧은 PEG 고리의 경우에 그물망에서 생성된 " 기공(pore)" 은 비교적 고정된 경계를 가지고 있고, 비교적 작아서 이 겔을 통해 확산하려는 분자가 시범효과(sieving effect)에 의해 현저하게 구속을 받는다. 만약, 교차결합간 고리길이가 길면, 고리는 접을 수 있고, 높은 이동도를 갖고 주위를 이동하므로써 확산고분자는 시빙효과 뿐만 아니라 자유체적 축출효과(free volume exclusion effect)를 경험하게 될 것이다.

상기 두개의 대조효과로 인해 확산에 대한 임계분자량과 출발 올리고머(oligomer)의 분자량사이의 올바른 관계는 완전하게 정의가 안된다.

펩티드(peptide)같은 특별한 단백질 또는 약제에 대한 만족할만한 방출도는 교차결합밀도 및 PEG 조각의 길이를 조절함으로 인해 이루어진다. 이와 부합되게, 만족할만한 단백질 투과성도는 이식된 세포 또는 조직을 보호하기 위해 겔내에 세포의 유입과 함께, 항체와 보충단백질(complement)같은 면역조절기의 확산을 제한하는동안 영양소, 산소, 카본디옥시드, 노폐물, 호르몬, 성장인자, 수송단백질등의 확산을 허용한다.

3차원 교차결합된 공유결합중합망은 장기간동안 생체내 적용에서 화학적으로 안정하다.

얇은 막을 가로질러 항체의 통과를 막으면서 신진대사에 필수적인 영양소의 통과를 허용하는 방법으로 세포와 조직을 캡슐화시키기 위하여 상술한 출발매크로머 크기는 10,000D 와 18,500D 사이이고, 가장 바람직하게는 18,500D이다. 더 작은 매크로머는 더 작은 흡수광을 가지면서 높은 밀도의 중합체 막에서 생긴다.

중합체층의 두께 및 구조

막두께는 선택적투과성, 강성률(rigidity) 및 막크기를 포함하여 여러 매개변수들에게 영향을 준다. 두께는 반응성분들 및 /또는 반응조건들의 선택에 따라 변화된다. 예를 들면, 매크로머농도는 매크로머에 따라 몇 퍼센트에서 100%까지 변화된다.

더 강한 조사 및 긴조사는 조사를 더 약하게 또는 짧게 할때보다 두꺼운 막을 형성한다.

액셀레이터(accelerators)는 두께를 조절하기위해 변화하는 농도에 첨가된다. 예를 들면, N-비닐피롤리디논(vinylpyrrolidinone)는 모든 조건들이 동일한 상태에서 단 낮은 농도보다 두꺼운 층을 형성하는 높은 농도에서 액셀레이터로 첨가된다. 예를 들면, N-비닐피롤리디논 농도는 0에서 0.5% 까지 이른다.

계면중합방법에서, 중합시간은 형성된 중합막 두께를 조절함에 따라 변화된다. 막두께와 방사시간사이의 상기 상호관계는 광개시제가 확산이 계속적으로 일어나는 과정에서 일정비율로 확산되기 때문에 일어난다. 따라서 방사시간이 더 길수록 더 많은 광개시제가 매크로머 혼합물 내에서 중합개시하고 더 많은 매크로머가 중합되며 더 두꺼운 막이 형성된다.

막 두께에 영향을 주는 다른 인자로는 매크로머당 반응기의 수와 매크로머용액에 액셀레이터의 농도가 있다.

이 기술은 광개시제가 처음에 생물학적 물질의 표면의 매우 얇은 층에 존재하고 중합은 개시제가 존재하는 곳에서만 일어나기 때문에 얇은 막을 형성할 수 있게한다.

현탁 중합방법에서, 두꺼운 막은 현탁방법에서 중합이 매크로머용액을 거쳐 일어남에 따라 계면 중합방법보다 더 두껍게 형성된다.

상기 현탁방법에 의해 형성된 막두께는 매크로머용액의 점성과 상기 매크로머용액에서 매크로머농도, 현탁액의 유체역학적환경 및 상기 현탁액에서 표면활성화약제에 의해 부분적으로 결정된다.

이 막들은 50 300마이크론 사이의 두께로 변한다.

비생물학적 표면

매크로머용액 및 개시제는 생물학적 환경에 접촉되는 비생물학적 표면에 적용될 수도 있다. 표면들은 예를 들면 유관속조직(vascular grafts), 콘택트렌즈, 안내렌즈(intraocular lenses), 초여과(ultrafiltration membranes) 및 생물학적 물질에 대한 콘테이너(containers)를 포함한다. 크게 다른 물리화학적인 특성을 갖는 중합체들 사이에서 좋은 점착(adhesion)을 이룬다는 것은 어렵다.

표면물리학적으로 스며드는 망의 개념을 Desil와 Hubbel에 의해 발표되었다(N.P.Desai et al.(1992)).

어떤 고분자의 표면속으로 상당히 다른 물성을 지닌 고분자의 코팅을 함유시키기 위한 이 방법은 베이스 고분자와 코팅 고분자의 상호용제 또는 팽윤용액에서 변형될 고분자(베이스 고분자)의 표면을 팽윤시키는 것을 포함한다.

침투중합체는 기본 중합체의 표면안으로 확산된다. 이 계면은 비용매용액(bath)에 배치함에 따라 표면이 빠르게 침전하거나 재팽윤(deswelling)되므로 인해 안정되어진다. 이는 베이스 고분자의 표면에서 침투고분자와의 얽힘이 있거나 표면물리침 투망이라고 불리는 구조를 초래한다.

이러한 방법은 팽창상태에서 기본중합체의 표면위에 침투중합체를 광중합함으로 인해 개선된다. 이로인해 이전 방법의 것보다 안정성이 향상되고, 이 물질들에 대한 생물학적 반응이 향상된다. 침투제는 화학적으로 프리폴리머 매크로머로 변화된다. 즉, 자체가 중합될 수 있다.

이 중합은 가시광선, 자외선, 감마선, 또는 전자광 방사, 또는 플라즈마조건에 노출됨으로 인해 또는 열적으로 시작된다. 상대적으로 비특이적 감마선 또는 전자빔 방사 반응의 경우에 특히 반응장소의 화학적 통합은 필요하지 않다.

폴리에틸렌 글리콜(glycol)(PEG)은 세포점착의 결핍의 바람직한 생물의학에 응용하는데 침투중합체로 특히 유용하다. 이전 연구는 화학적 교차결합없이 18,500D의 분자량에서 최적의 성과를 얻었다. PEG 전중합체들은 종착점(termini) 또는 고리안에서 하이드록실기의 아크릴레이션(acrylation)에 의해 쉽게 형성된다. 이 중합체들은 쉽게 중합된다.

이 중합체의 광개시된 중합이 특히 간편하고 빠르다. 특이적인 광화학적으로 반응염료에 따라 광흡수에 의해 개시된 가시광과 자외선이 개시된 여러 반응들이 있다. 이와 같은 방법은 폴리(N-비닐피롤리디논), 폴리(N-이소프로필아크릴아미드), 폴리(에틸옥사졸린) 및 기타와 같은 다른 수용성 중합체에 사용된다.

고분자물질의 형성 방법

중합물질은 이 분야에 숙련자라면 알 수 있는 표준기술에 의해 소정의 형상으로 형성되는데 그 물질에는 촉매 및 개시제를 포함하는 매크로머 용액이 형성되고, 그리고 나서 중합된다.

예를 들면, 평면 위에 캐스팅되어 슬라브가 형성되고, 원판형 용기속에 캐스팅되어 원판형 형상이 형성된다. 실린더와 튜브는 압출에 의해 만들어 질 수 있다. 구형은 에멀젼 오일에 오일과 공압출에 의해 또는 공기, 다른 가스나 증기와 공압출에 의해 형성된다. 그리고 나서 상기 매크로머는 방사와 같은 조건에 노출되어 중합이 개시된다.

매크로머는 내부의 또는 외부의 지지조직에 대한 관계에서 형상화 될 수 있다.

내부지지조직은 안정성 또는 퇴화된 폴리머 또는 비독성금속의 스크린 네트워크를 포함한다.

외부조직은 예를 들면, 실린더의 내부표면이 약제물질을 포함하는 겔과 직렬되도록 겔을 실린더내에 캐스팅하는 것을 포함한다.

표면 코딩 방법

이러한 물질들은 초정밀여과, 헤모다이얼리시스 및 동물섬-유의 마이크로캡슐화되지 않은 면역고립화등과 같은 대형 캡슐의 표면처리에 적용될 수 있다.

이 경우의 마이크로캡슐은 대개 70,000Da 이하의 분자량을 가진 미공성물질이다. 그것은 마이크로캡슐의 표면은 엉킴없는 비트롬보겐, 세포비부착표면과 같은 폴리머를 사용하여 수정될 수 있다.

피복을 하면 생체융화성을 높여주고 면역보호성을 제공하는데 도와준다. 이런 방식으로 수정될 수 있는 물질은 폴리설폰스, 셀룰로오스박막, 폴리카보네이트, 폴리아미드, 폴리미드, 폴리벤지미다졸, 나이론, 폴리(아크치로니트릴-코-비닐클로라이드)코포리머, 폴리우레탄, 폴리스틸렌, 폴리(스티렌 코 아크리로니트릴), 콜리(비닐 클로라이드), 및 폴리(에틸렌 테레프탈레이트)을 포함한다.

생체융화성 피복을 형성시키기 위해서는 여러가지 방법이 적용될 수 있는데, 그것은 표면의 물리적 화학적 성질에 달려있다.

하이드로필 표면은, 염료와 아민의 적당량을 함유한 PEG 디아크릴레이트와 같은 중합체용액의 얇은 층(예를들면, 50에서 300미크론 사이의 두께)을 바름으로써 피복될 수 있다.

소수성표면은 처음에 가스플라즈마 방전처리에 의해 친수성으로 될 수 있다. 그리고, 그 결과 생성표면은 마찬가지로 피복될 수 있거나 그것들은 PES 디 아크리리에트 용액처리 전이나 중에 표면 활성제로 처리될 수 있다. 예를들면, 소수성 폴리스티렌 표면은 처음에 O_2 플라즈마나 N_2 플라즈마에 노출하여 처리될 수 있다. 이것은 각각 산소함유 또는 질소함유 표면종을 생기함으로써 표면을 더욱더 친수성으로 만들어 주게 되는 것이다.

이들 종류는 표면결합자유기 종류를 생성시킬 수 있는 아크릴오일 클로라이드와 같은 물질과 반응에 의해 처리될 수 있었다. 또다른 방법으로 소수성 폴리스트렌 표면을 폴리(에틸렌 옥사이드)-폴리(프로필렌 옥사이드)블록 코폴리머 등과 같은 펴면활성제로 처리하고, 상기 표면활성제들은 아크릴레이트 될 수 있다.

그러한 처리들은 친수성 피복층과 처리될 소수성 물질사이의 접착성을 증가시키게 될 것이다.

직조 물질 및 하이드로겔의 처리

어느 정도 표면에 조직을 가진 물질의 표면, 즉 직조된 다크론, 파크론 벨로아, 연장된 폴리(테트라플로트-에틸렌)박막은 하이드로겔로 처리될 수 있다. 직조되고, 다공성인 표면은 PEG 겔을 물질표면에 더 잘 부착되게 해주고, PTFE 및 폴리(에틸렌테레파레이트)와 같은 비교적 소수성 물질을 피복할 수 있게 한다.

하이드로겔(예를 들어 폴리(HEMA), 결합폴리비닐 알콜 및 폴리비닐 피롤리돈)을 가진 효소 및 이온반응 전극과 같은 이식물질은 그 표면위에 염료흡수 및 중합기술(이러한 기술은 알기네이트-PLL-중심체에 사용된다.)에 유사한 방법으로 생체융화성이 큰 PEO 겔로 피복된다.

조밀한 물질의 처리

젠 코팅은 PET, PTFE, 폴리카보네이트, 폴리아미드, 폴리스폰, 폴리우레탄, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리스틸렌, 유리 세라믹을 포함하는 중합체와 같이 조밀한(예; 무늬없거나 비겔상)물질의 표면에 적용된다. 소수성표면은 처음에 표면을 친수성으로 만들기 위해 가스플라즈마 방전 또는 계면활성제로 처리된다. 이러한 것들은 겔피복의 점착성을 향상시키게 해준다.

또, 결합제들이 점착성을 증가시키는데 사용된다. 이것은 폴리머 합성 및 표면 개량의 기술에 익숙한 사람에게는 분명한 것이다.

혈관내 및 다른 조직위의 계면중합 박막 코팅

이상에서 기술된 방법은, 혈구와 혈관벽 사이의 상호작용을 변경하고, 효소 및 다른 단백질, 하이아루로닉산과 같은 폴리사카라이드, 안티센스 및 리보자임과 같은 핵산 및 다른 유기 및 무기치료제와 같은 테라포틱을 전달하기위하여 혈관에 질이 떨어지지 않는 중합체 얇은 피막을 광중합시키는데 사용될 수도 있다.

혈관내의 폴리머 중합화의 즉각적인 효과는 상처난 혈관표면의 트롬보겐 형성을 감소시켜 주는 것이라 이와같은 혈관의 트롬보겐 형성화를 감소시켜주고 팽창에 의해 생성되는 손상을 줄여 줌으로써, 혈관형성술의 결과를 개선시키는데에 분명히 유용하다. 또다른 효과는 부드러운 근육비대화를 줄여 줄 수 있다는 것이다. 이것에는 2가지 이유가 예상된다.

첫째는, 혈소판은 유력한 성장인자, 혈소판-유도성장인자(PDGF),(이들 인자는 후-혈관 비대 형성에 관련 있는 것으로 예상된다)를 포함하고 있다. PDGF 자체의 전달방해는, 혈소판에 의해 전달되는 약제가 방해를 받는다는 점에서, 생약학적인 조정이 필요하게 된다. 혈전증은 트롬빈 생성을 낳고 이것이 알려진 근육세포 미토겐이다.

트롬빈 생성의 방해 및 혈관으로의 전달도 생약학적 조정이 필요하다. 더우기 플라즈마에 잘 녹는 다른 성장인자가 있는데 이것이 연성근육세포 미토겐이다. 겔층은 섬유표면위에 선택적투과성 장애물이 있고, 따라서 겔층은 혈관형성후 비대현상을 감소시킬 것으로 예상된다. 특히, 겔은 혈관이 트롬빈과 같은 혈관압착제에 노출되는 것을 막아줌으로써 혈관 경련을 줄여 줄 수 있다. 그리고 재폐쇄의 빈도를 줄여 줄 수 있다.

계면 중합화 제한은 아주 중요한 잇점이다.

혈관 내의 질병의 병변은 형태가 아주 불규칙적이다. 그래서, 풍서노가 같이 예비형상의 물질을 혈관에 인접한 중합제를 함유하게 되는 형태로 하기위해 사용하기란 아주 어렵다. 세포가 섬유질과 상호 반응하거나 벌크나 계면 중합화에 의해 유사한 방해물을 생성하는 것을 컨트를 할 필요가 있는 다수의 다른 기관이 있다.

이러한 방법은, 세포형 캡슐이나 여러가지 물질대사 결함 및 질병 치료용 효소와 같은 생체적 활성물질뿐만 아니라 다른 기관에 대해서도 똑같이 적용될 수 있다.

(ⅰ). 신경전달물질 방출세포의 캡슐화

보통 파킨슨씨 병이라 불리는 마비 아지탄스는 그 특성이 뇌의 스트리아툼 내에 뉴로 트랜스미터 도파민 결핍증이다.

중뇌, 뉴로블라스트이드 세포선이나 아드레날 메듈라에서 추출된 세포아 같은 도파민 분비세포는 여기에서 기술된 방법이나 물질을 사응하여 캡슐화될 수 있다.

유전공학에 의해 만들어진 세포를 포함하여, 뉴로트랜스미트, 아고니스트, 특별한 뉴로트랜스미터나 아날로그의 미량 또는 유도물질에 대한 선구물질을 분비하는 세포도 캡슐화 될 수 있다.

(ⅱ). 합성 에리트로사이트를 위한 헤모글로빈의 캡슐화

자유형태로된 헤모글로빈은 PEG 겔안에 캡슐화 될 수 있고, PEG사슬길이 선택 및 확산을 막아주는 교차결합밀도에 의해 유지될 수 있다.

겔에서 헤모글로빈이 확산되는 것이, 폴리헤모글로빈 사용때문에 방해 받을 수 있는데, 이 폴리헤모글로빈은 헤모글로빈이 교차결합된 한 형태이다.

플리헤모글로빈 분자는 너무 커서 PEG 겔에서 확산될 수 없다. 원래의 헤모글로빈이나 교차결합된 헤모글로빈 중 어느 것이나 캡슐화하면 합성에리트로 사이트를 제조할 수 있게 된다.

생체 융화성이 높은 물질의 직경이 5미크론 이하의 작은 구형으로된 헤모글로빈의 고정은, 교차결합된 헤모글로빈 혹은 리포조옴 캡슐화된 헤코글로빈에 비해 순환시간을 증가시켜주게 될 것이다.

(ⅲ). 대사성 질환의 교정 및 화학요법을 위한 효소의 고정

효소 카탈라아제의 선천성 결핍은 무카탈라아제증을 일으킨다. PEG 겔 네트워크에 카탈라아제 고정은 이 질병을 치료하기 위하여 효소교체방법을 제공할 수 있었다.

글루코시다아제의 고정은 마찬가지로 고셰병(Gaucher's disease)을 치료하는데 사용될 수 있다.

우라아제를 고정해주는 중심체의 PEG 겔은 요소를 암모니아로 바꾸기 위해 체내 혈액에 사용될 수 있다, 아스파라기나아제와 같은 효소는 종양세포에 필요한 아미노산을 퇴화시킬 수 있다.

이 효소의 면역원성은 화학요법으로 직접 사용되는 것을 막아준다. 그러나 PEG 안의 상기 효소의 고정은 성공적인 화학요법을 보조할 수 있다.

적당한 량은 효소의 완만한 방출이나 무방출 어느 쪽의 경우에도 적용될 수 있다. PBS의 카탈라아제는 아래의 정량으로 프로폴리머와 혼합된다.

(iv). 항-HIV(Anti-Human Immunodeficiency Virus)약물의 생체내 평가를 위한 세포 마이크로 캡슐화

HIV에 전염되거나 비전염 인간 T-림포블라스토이드 세포는 상기 다른 세포에 대해 기술된 바와 같은 PEG 겔 속으로 캡슐화 될 수 있다. 이 마이크로캡슐화는 동물안에 이식되어 항 HIV 약제용 시험체계를 만들 수 있다.

그리고 나서 AZT나 DDI와 같은 시험약제로 처리되었다. 처리후 마이크로캡슐은 수확될 수 있고, 그 마이크로캡슐화된 세포는 플루오레신 디아세테이트/에티디움 브로마이드 살아 있는/죽은 세포 분석을 사용하여 세포생육성 및 기능적 상태를 위해 점검되었다. 전염된 세포의 생존은 약제의 성공적인 작용을 나타낸다. 생체융합성의 부족은 약제평가에 대한 이 접근방식이 가진 문제점이지만, 여기에서 기록된 높은 생체융화성의 겔이 이 문제점을 해결하여야 한다.

(v). 혈관 및 다른 조직강내의 구조적 코팅 중합

아주 얇은 혈관내의 피복층이 혈관내에서 중합될 수 있으므로 조직적으로 한층 더 얇은 겔층도 혈관내에 중합될 수 있다.

이러한 것은 갑작스러운 혈관폐쇄를 감소시키고, 혈관 벽 분리를 저지해 주며, 혈관 경련을 저지하고 또는 연질 근육세포의 배대 현상을 줄여 주는데 사용될 수 있다. 이 겔들은 벌크나 인터페이스적 중합에 의해 제조될 수 있고 그 물질의 교차결합 밀도가 두껍고 높을수록 혈관벽내의 조직이 강해진다. 이러한 과정은 신체의 많은 기관 내에서 또는 위에서 수행될 수 있었다.

도면의 간단한 설명

제 1도는 중합이 시작된 에틸에오신의 반응도.

제 2도(가)는 가교화된 알긴산염 마이크로스피어 주위에 PEG층의 염료개시 중합을 도시한 상태도.

제 2도(나)는 제 2(가)도에 설명된 염료결합방법을 사용하여 PEG 18.5K 테트라아크릴레이트(하이드로 겔로 코팅된 사람의 랑게르한스섬을 포함한 아기네이트/폴리리신마이크로캡슐의 현미경사진.

제 3도는 광물성 기름에 매달린 알기네이트/ 폴리리신마이크로캡슐위에 PEG코팅의 광중합상태도.

제 4도는 PEG 18.5K 4가 테트라아크릴레이트 하이드로겔에 캡슐화한 인간의 췌장으로 부터 분리된 랑게르한스섬의 현미경 사진.

제 5도는 레이져 중합을 이용한 마이크로캡슐에 사용되는 동시압출장치의 설명도.

제 6도는 세포주위에 PEG 400 디아크릴레이트의 레이저 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐의 현미경 사진.

제 7도(가)는 쥐에 i.p. 이식한지 3일후에 회복되는 알기네이트-PLL 마이크로캡슐의 현미경사진.

제 7도(나)는 제 1도에 도시된 염료확산방법을 사용하여 PEG 18.5K Da 테트라아크릴레이트를 코팅한 알기네이트-PLL 마이크로캡슐의 현미경사진.

제 8도는 PEO 코팅겔 구성 성분과 쥐의 복막강 세척으로 부터 얻어진 비결합 세포에 대한 세포수와 겔구성비의 관계그래프;

a-18.5K; b-10% 0.5K, 90% 18.5K; c-50% 18.5K, 50% 0.4K; d-10% 0.4K, 90% 35K, e-50% 0.4K, 50% 35K f-알기네이트-폴리-L-리신 대조표준.

제 9도는 PEO 18.5K 4가 테트라아크릴레이트 겔을 통한 소혈청알부민(빈정사각형), 사람IgG(삼각형), 사람피브리노겐 확산인 경우, 시간(분당)대 방출되는 단백질 농도(%)의 관계 그래프.

제 10도는 PEO 400 디아크릴레이트(빈 정사각형)과 PEG 18.5K 테트라아크릴레이트(삼각형)겔을 통한 소혈청 알부민의 확산과 시간 관계 그래프.

제 11도(가)는 아민과 에틸에오신 개시제를 사용한 트리메틸올프로판의 log(시간)(ms)대 아르곤 이온 레이저 유도 중합에 의해 제조된 겔 길이(mm)의 관계 그래프.

제 11도(나)는 지속기간동안에 에톡시레이티드 트리메틸올프로판 트리아크릴레이트에 대한 67mms, 125ms, 250ms, 500ms, 및 1Sec 동안의 레이저 방사 결과로 형성된 스파이크(spike)의 현미경 사진.

제 12도(가)는 PEG 18.5K-테트라 아크릴레이트겔이 코팅된 커버글라스위에 6시간동안 배양된 사람 포피섬유아세포의 현미경 사진.

제 12도(나)는 PEG가 코팅되지 않은 글라스위에 6시간동안 배양된 사람포피 섬유아세포의 현미경 사진.

제 13도는 쥐에 이식하였다가 4일후 외식한 PEG 18.5K 테트라아크릴레이트 마이크로스피어겔의 현미경사진으로서, 섬유질의 과도한 발육이 거의 나타나지 않음을 나타낸 사진.

제 14도(가) (다)는 PEG 디아크릴레이트와 테트라아크릴레이트 겔에 대한 이동곡선으로서, 시험과 회복부하는 횡좌표아래에 주어졌다;

A-1K; B-6K, C-18.5K PEG겔

실시예

하기의 실시예는 본 발명의 바람직한 구체화일 뿐이며 본 발명을 제한하고자 함이 아니다.

실시예 1 : PEG 6K 디아크릴레이트 합성

분자량이 400Da 및 1,000Da인 PEG 아크릴레이트는 각각 Sartmer와 Dajac Inc.,로부터 구입할 수 있다. 250ml 둥근바닥플라스크내의 디클로로메탄 200ml에 PEG 6K 디올 20g을 녹였다. 플라스크를 0℃로 냉각시키고 1.44ml의 트리메탈아민과 1.3ml의 마크릴로일 클로리드 1.3ml를 질소하에서 가하면서 계속 교반하였다.

반응혼합물은 상온으로 만들고 질소하에서 12시간동안 교반하였다. 여과를 하고 여과물을 과량의 핵산에 가하여 침전시켰다. 조악한 모노머를 디클로로메탄에 녹이고 핵산에서 침전시켜 정제하였다. 수율은 60%였다.

실시예 2 : PEG 18.5K 테트라아크릴레이트 합성

테트라히드록시 수용성 PEG(분자량 18,500)(PEG 18.5K) 30g을 Polyscience Inc.로부터 구입하였다. PEG를 벤젠에 녹이고 물-벤젠아제오트로포를 증발시키므로써 건조시켰다. PEG 18.5K 59g을 500ml 플라스크내의 300ml 벤젠에 용해시켰다. 여기에 3.6ml의 트리메탈아민과 2.2ml의 아크릴로일 클로리드를 질소하에서 가하고 혼합물을 2시간동안 환류시켰다.

냉각시키고 하룻밤동안 교반하였다. 여과하여 트리메틸아민히드로클로리드를 분리하고 과량의 핵산속에서 침전시켜 여과물로부터 공중합체를 회수하였다. 고분자를 메틸렌클로리드에 용해시키고 핵산속에서 재결정시켜 정제하였다. 하룻동안 50℃ 진공하에 건조시켰다. 수율은 68%였다.

실시예 3 : 표면염료흡착에 의한 이스렐(Islet)함유

알기나이트-PLL 마이크로스피어의 코팅 소형캡슐계면중합방법으로 이스렐(Islet)을 함유한 알기나이트-PLL 소형캡슐 둘레에 막을 형성하였다. 각각 한개 또는 두개의 인간 판크레아틱 이스렐을 함유하고 있는 알기나이트-PLL 코아세르베이트와 소형캡슐을 1.1% $CaCl_2$ 용액속에 현탁시키고 과량의 용액이 존재하지 않도록 흡출(aspiration)시켜서 조밀한 마이크로스피어 플러그(plug)를 얻었다.

1.1% CaCl2 용액속에서 에틸에오신(0.04% w/v)용액을 만들고 이를 0.45㎛ 여과기로 여과하여 여과 살균하였다. 마이크로스피어 플러그를 10ml의 에오신 용액속에서 2분간 현탁시켜 염료가 흡수되게 하였다. 마이크로스피어를 신선한 1.1% $CaCl_2$ 로 네차례 세척하여 과량의 염료를 제거하였다. 마이크로 스피어 0.5ml에 히드록시에 필피페라진 에탄술포닉산(HEPES)완충염수액의 3.5% w/v 트리에탄올아민용액 100㎕를 함유하고 있는 PEG 18.5 테트라아크릴레이트 용액 2ml(23% w/v)를 가했다.

마이크로스피어를 아르곤 이온 레이저광에 30초 동안 노출시키면서 주기적으로 흔들어주었다. 그동안 마이크로스피어 현탁물을 빛으로 고르게 주사하였다. 다음에 마이크로스피어를 칼슘용액으로 세척하고 과정을 반복하여 코팅을 한층 살균하였다. 상기 기술에 의해 코팅된 이스렐 함유 알기나이트/PLL 마이크로스피어를 제 2도(나)에 나타내었다. PEG 겔로 코팅된 마이크로스피어내에 캡슐화 된 이스렛에 대해 정적 글루코스 자극시험(statick glucose stimulation test; SGS)를 행하였고 이러한 자극에 응답하는 인슐린 분비 데이타를 표1에 나타내었다.

디티존(dithizone)염색에 의해 상기 이스렛은 가능성이 있는 것으로 보였다. SGS 시험데이타는 이스렛이 존속성과 가능성을 확인시켜주었다.

표1 : 캡슐화 이스렐 세포의 기능

	SGS 글루코스 농도(mg%)		
	최초		후속
	60	300	60
	인슐린/이스렐/hr(μU/ml)*		
확산 오버코우트	1.0	10.04± 3.56	2.54± 0.76
(overcoat)방법			
광물성 기름	1.0	10.23± 3.28	1.02± 0.78
오버코우트 방법			
자유이스렐 조절	1.0	3.74± 1.4	1.9± 0.17

*평균 ± S. D. 값

최초 60㎎%에 비교하여 모두 노멀라이즈(normalize)된 것이며, 300㎎ 글루코스처리된 후 상기 이스렛들은 최초값으로 재처리되었다.

PEG 디아크릴레이트 매크로머는 본 실시예에 묘사된 PEG 테트라아크릴레이트와 동일하게 중합될 수 있다.

실시예 4 : 현탁중합에 의한 이스렛 함유 알기나이트-PLL마이크로스피어의 코팅

이 방법은 PEC 모노머의 친수성 성질을 이용하는 것이다. 각각 하나 또는 두개의 인간 판크레아틱 이스렛을 함유하는 알기나이트/PLL 마이크로스피어 2ml를 50ml 투명원심분리튜브속에서 PEG 테트라아크릴레이트 마크로머 용액(염수중 PEG 분자량 18.5KD 23%용액)과 혼합하였다.

0.1M 트리에탄올아민 및 0.5mM 에틸에오신을 매크로머용액과 혼합하였다. 과량의 매크로머 용액을 제거하고 튜브에 미네랄 오일 20ml를 가한 후 반응혼합물을 5분동안 소용돌이 교반하였다. 상기 합성에서 실리콘 오일도 충분히 성공적일 수 있으나 이월이 있는 경우는 빈약한 보조특성을 가질 수 있다. 오일상으로는 물과 섞이지 않는 다른 어떤 액체도 가능할 수 있다. 허용되는 트리에탄올아민의 농도는 1mM 100mM이고, 허용되는 에틸에오신농도는 0.01mM부터 10mM이상까지이다.

비드들은 매크로머/염료용액의 엷은 코팅으로 말미암아 엷은 붉은 색조를 보였고 아르곤 레이저(50-500mW 전력)으로 20 50초간 조사되었다. 붉은 에틸에오신 색조가 표백되면 반응이 완성되었음을 암시한다. 비드를 광물성 기름으로부터 분리한 후 염수로 몇차례 세척하였다. 모든 과정은 살균조건하에서 수행되었다. 제 3도는 오일에서의 마이크로스피어 코팅과정을 간략하게 나타내고 있다. 알기나이트/폴리리신 캡슐은 pH12의 소디움 시트레이트에서 용해된다. 이들 코팅된 마이크로스피어를 pH12의 소디움시트레이트와 접촉시키면 내부 알기나이트/폴리리신 코아세르베이트는 용해되고, PEG 고분자성 막은 여전히 남아있다(가교화된 PEG 겔은 물과 pH12의 소디움시트레이트를 포함하는 모든 용액에 실질적으로 불용성이다.)코팅되지 않은 조절마이크로스피어는 같은 용액속에서 급속히 용해된다.

정적 글루코스 시험이 실시예 3에서와 같이 행하여졌고 표 1에 그 결과를 나타냈다.

이스렛은 존속성이 있고 기능적이었다.

실시예 5 : 랑게르한스섬의 캡슐화

이 실시예는 직접계면중합을 이용한다.

인간의 판크레아로부터 랑게르한스섬을 분리하고 PEG 테트라아크릴레이트 매크로머 겔속에 캡슐화 하였다. 500개의 섬을 10% 태아소 혈청을 포함하고 있는 RPMI 1640 매질에 현탁시키고, 3분동안 100g에서 원심분리하여 펠렛(pellet)으로 만들었다.

상기 펠렛을 HEPES 완충 염수내의 PEG 18.5K 테트라아크릴레이트 매크로머 23% W/V 용액 1ml속에서 재현탁시켰다.

비닐피롤리돈내 에틸에오신용액 5㎕(0.5%농도)를 염수속 5M 트리에탄올아민 100㎕와 함께 상기 용액에 가하였다. 격렬하게 흔들어서 200-500㎛ 방울이 분산되어 있는 튜브내로 광물성기름 20ml를 가하였다. 상기 분산물을 250mW 전력으로 514nm를 방출하는 아르곤 레이저에 30초 동안 노출시켰다.

다음에 마이크로스피어를 안정화하여 고아물성기름을 분리하고, 그 결과로 생긴 마이크로스피어를 포스페이트 완충 염수(PBS)로 두번, 핵산으로 한번 그리고 매질고 세번 세처하였다.

제 4도는 PEG-테트라아크릴레이트겔속에 캡슐화된 랑게르한스섬을 보여준다. 섬의 존속성은 아크리넌 오렌지 및 프로피디움 이오다이드 염색방법과 디티존염색으로 확인되었다. 기능성 시험을 위해서는 상기 섬에 SGS 시험을 행하였다. 캡슐화된 섬의 반응은 배양액 속의 캡슐롸되지 않은 섬의 것과 같은 시간동안 비교되었다. SGS 시험을 하기 전에 모든 섬은 1주일간 배양액중에 그대로 두었다.

그 결과는 표 2에 요약되었다.

캡슐화된 섬은 되지 않은 것보다 훨씬 많은($P< 0.5$)인슐린을 분비하였음을 볼 수 있다. PEG-테트라아크릴레이트 겔 캡슐화 과정은 섬의 기능을 손상시키지 않고 오히려 캡슐화되지 않은 것에 비해 배양액속에서 그들의 기능을 유지하도록 도와주었다.

표 2 : 랑게르한스섬으로부터 인슐린의 분비 글루코스 농도(mg%)

	글루코스 농도(mg%)		
	60	300	60
	인슐린/섬/hr(μU/ml)		
비캡슐화섬	1.0	3.74± 1.40	1.9± 0.17
캡슐화섬	1.0	20.81± 9.36	2.0± 0.76

※평균 ± S.D. 값

초기 600mg% 글루코스를 기준으로 노멀라이즈(normalize)된 것]

실시예 6 : 동물세포의 마이크로캡슐화

다양한 분자량을 가지는 PEG 디아크릴레이트를 실시예 1에서와 같이 아크릴로일 클로리드와 PEG를 반응시켜 합성하였다.

20 30% 매크로머용액을 제 5도에 도시한 공압출 공기유동(coextrusion air flow)장치를 통해 레이저광에 노출시키기전 세포 현탁물 및 에틸에오시놔 트리에탄올아민 개시시스템과 혼합하였다.

공기의 환상 흐름에 의해 매크로머 흐름이 분무되는 공기분무방법에 의해 마이크로스피어를 제조하였다. 사용된 공기의 유속은 1600cc/min이었고 매크로머 유속은 0.5ml/min이었다.

상기 방울은 광물성 기름을 담고 있는 테트리 접시로 떨어지게 하고 각각 0.15초 동안 레이저 빛에 노출되도록하여 마이크로스피어를 중합하여 수불용성이 되게 하였다. 마이크로스피어를 기름으로부터 분리하여 PBS 완충액으로 완전히 세척하여 반응하지 않은 매크로머와 남아있는 개시제를 제거하였다. 마이크로스피어의 크기 및 형태는 압축속도(0.05 0.1ml/min)와 압출관직경(18Ga 내지 25Ga)에 따라 달랐다. 중합시간은 개시제 농도(5μM의 에틸에오신 농도), 비닐피롤리돈 농도(0.0% 내지 0.1%), 트리에탄올아민(10mW 내지 1W) 및 매크로머 농도(10% W/V)에 의존하였다.

분자량 400Da의 PEG 디아크릴레이트 매크로머가 0.1M 트리에탄올아민을 공축매로서 포함하고 0.5mM 에틸에오신을 광개시제로 포함하고 있는 PBS내 30% 용액으로 사용되었다.

본 방법으로 제조된 구형체(sphere)를 제 6도에 나타내었다. 중합은 공기 존재하의 생리적 pH에서 행하여졌다. 이것이 중요한 이유는 라디칼중합은 산소의 존재에 의해 영향을 받을 수 있는데 아크릴레이트 중합은 효과적으로 진행될 정도로 빠르기 때문이다.

상기 과정은 더욱 낮은 온도에서도 가능하다.

세포성 캡슐화를 위해서는 공기 분무기술에 사용된 개시 및 중합조건과 함께 PEG 아크릴레이트 23% 용액이 사용되었다.

캡슐화에 뒤이은 세포의 존속성은 트라판 블루 배척(trypan blue exclusion)분석으로 점검하였다. 인간표피 섬유아세포(HFF), 중국햄스터 난소세포(CHOKI) 및 베타세포 도선종 라인(RiN5F)가 캡슐화후 95%를 초과하는 존속성을 보였다. PEG테트라아크릴레이트 매크로머가 가능하듯이 10%를 초과하는 넓은 범위의 PEG 디아크릴레이트 농도가 똑같이 유효하게 사용될 수 있다.

실시예 7 : 표면 염료 흡착에 의한 동물세포 함유 알기나이트-PLL 마이크로스피어와 개별세포의 코팅

동물세포를 포함하고 있는 알기나이트-PLL 코아세르베이트화된 마이크로스피어를 1.1% $CaCl_2$ 용액중에 현탁시키고 과량의 용액을 흡출(aspiration)하여 조밀한 마이크로스피어 플러그(plug)를 얻었다. 마이크로스피어 플러그를 10ml에 오신용 액중에서 2분간 현탁시켜 염료가 흡수되도록 하였다.

마이크로스피어 0.5ml에 HEPES 완충염수내의 3.5W/V 트리에탄올아민 용액 100μℓ를 함유하고 있는 PEG 18.5 테트라아크릴레이트 용액 2ml(23%W/V)를 가하였다. 마이크로스피어를 아르곤 이온 레이저에 30초 동안 노출시키면서 주기적으로 흔들어 주었다. 그동안 마이크로스피어 현탁물을 레이저로 고르게 주사하였다. 다음에 마이크로스피어를 칼슘용액으로 세척하고, 과정을 한 번 더 반복하여 안정된 코팅을 얻었다.

코팅작업후 세포 생존을 확인하기 위하여 알기나이트-PLL 마이크로캡슐화되지 않을 현탁물내 세포같은 중합조건에 노출시켰다. 임파구 백혈병 세포(RAJI)(5×10^5)1ml를 300g에서 3분간 원심분리하였다. 여과살균된 0.04% 에틸에오신용액 1ml에 현탁시키고, 포스페이트 완충 염수(PBS)를 가하고 펠렛(pellet)을 재현탁시켰다.

세포를 염료에 1분간 노출시키고 PBS로 두번 세척한 후 펠렛으로 만들었다. 0.1M 트리에탄올아민 10μℓ를 펠렛에 가하고 튜브를 소용돌이 교반하여 세포를 재현탁시켰다. 현탁액에 PEG 18.5K 테트라아크릴레이트 매크로머 0.5ml를 섞고 그 혼합물을 45초 동안 아르곤 레이저(514nm, 50mW)에 노출시켰다.

다음에 세포를 10ml 염수로 2회, 매질(10% FCS와 1% 항생물질, 안티마이코틱(antimycotic)과 RPMI 1640)로 1회 세척하였다. 세포 각각의 주위에는 엷은 PEG-테트라아크릴레이트겔 막이 형성되는 것이 관찰되었다.

트리판 블루 배척에 의해서는 대조군(93% 존속성)과 처리 셀(95% 존속성)사이에 존속성의 큰 차이가 나타나지 않았다.

세포존속성과 기능분석을 위해서는 RAJI 세포에 MTT-포르마간분석(MTT-Formazan assay)을 행하였다.

그 결과 90%를 초과하는 생존을 보였다.

다른 두가지 모델 셀라인에 대해 비슷한 분석을 하였다.

중국 햄스터 난소세포(CHO-KI)는 MTT-포르마간 분석에 의해 평가할 때 대사 기능에 있어서는 큰 차이가 없었다.($P< 0.05$), 3T3 쥐 도선종 역시 대사활동에서의 심각한 감소는 보이지 않는다.($P> 0.50$)

실시예 8 : 현탁중합방법에 의한 동물세포 포함 알기나이트-PLL 마이크로스피어의 코팅

실시예 4의 방법으로 알기나이트-PLt 마이크로스피어 내에 캡슐화된 RAJI 세포를 PEG 18.5K 테트라아크릴레이트 고분자성 막으로 코팅하였다.

이들 세포의 생존성을 트리판 블루 배척방법으로 점검한 결과 95% 이상의 생존성을 보였다.

실시예 9 : 표면 염료 흡착에 의한 랑게르한스 섬의 코팅

실시예 7의 방법으로 에틸에오신을 섬의 표면에 흡착시키고 트리에탄올아민과 함께 PEG 매크로머용액을 염료 코팅된 세포에 적용시키고 세포를 아르곤 이온레이저 빛에 노출시켜서 섬의 표면에 두꺼운 PEG 고분자성 막을 형성하였다.

섬의 존속성은 프로피디움 이오다이드에 의한 염색이 되지 않는 것으로 확인하였다.

실시예 10 : 마이크로스피어에 대한 PEG의 생체 적합성

실시예 7 및 실시예 8에서 제조된 중심체에 대해 염증반응을 일으킬 정도의 값이 쥐의 복강에 이식됨으로써 평가되었다.

약 0.5ml 정도의 마이크로스피어는 염수로 완충된 중성 HEPES 5ml내에 현탁되었다.

이 현탁액 2.5ml는 흰쥐의 복강내에 주입되었다. 그 마이크로스피어는 5ml의 10μ 헤파린/ml PBS로 복강의 세척에 의해 4일 후 회수되었다.

회수세척용액내에 존재하는 미부착 세포의 수는 콜터 계측기를 사용하여 측정되었다.

제 7A도에는 4일후에 회수된 알긴산-폴리L-리신 마이크로스피어의 사진이 도시되어 있고 제 7B도는 이식되기전에 염료 확산과정에 의해 PEG 겔로 피복된 마이크로스피어가 도시되어 있다.

예상한 바와 같이 2겹구조 알긴산 폴리리신 캡슐로서 외부에 알긴산층을 포함하지 않은 캡슐은 PLL 표면의 세포 고점착성 때문에 세포로 완전히 덮혀졌고, 반면에 상기 PEG가 피복된 마이크로스피어는 부착된 세포가 없었다.

폴리리신은 그 표면에 아미노기를 가지고 있고, 양전하를 띤 표면의 아민은 세포 표면의 프로테오글리칸과 상호 작용할 수 있으며, 세포성장을 보조할 수 있기 때문에 알긴산-폴리(L-리신)이 거의 완전히 피복될 것으로 예상되었다.

(로베니 외 기타(1983), 생물공학, 생체공학, 25:469-480).

도면 7B의 사진은 고전하로 되고 점착성 있는 PLL의 표피가 PEG겔의 안정된 층으로 덮여있는 것을 나타내고 있다.

이들 마이크로스피어의 세포점착 경향은 세포의 이상성장으로 덮여져 있는 것으로 보이는 마이크로스피어 총면적의 퍼센트로써 평가되었다. 이들 결과는 표 3에 요약되어 있다.

표3 : 4일동안 복강내에 이식에 의해 세포이상 증대가 있는 마이크로스피어 피복

PEG 겔의 조성	세포 피복율(%)
18.5K	<1
18.5K 90% : 0.4K 10%	<1
18.5K 50% : 0.4K 50%	<1
35K 90% : 0.4K 10%	5-7
35K 50% : 0.4K 50%	<1
알긴산-폴리(L-리신)	60-80

세포수가 증가하는것은, inter leukins과 같은 화학인자를 분비하고 비 잔류 대식세포를 이식 장소로 이동하도록 유도하는, 잔류대신 세포의 활성화 때문이다.

또한 상기 인자들은 콜라겐 합성을 위해 반응하는 결합조직 형성세포를 자극하게 된다.

상기 피복층의 화학적 조성물 상에서 세포수의 변동이 제 8도(A-F)에 나타나 있다. 제 8도에서 보면 PEG가 피복된 모든 영역은 실질적으로 세포수가 감소되었음을 알 수 있다. 이것은 PEG 피복이 일반적으로 복강내에서 염증을 일으키지 않는 것과 일치한다.

그러나 피이지 조성은 생체 적합성에 있어서 차이점이 있고 분자량의 증가는 세포수의 감소와 관계한다. 어느 긴 사슬 길이에 기인하는, 높은 구조적 반발가능성을 가진 고분자량의 올리고머로부터 겔이 만들어지기 때문일 수 있다.

실시예 11 : PEG 겔의 투과성

보빈 세륨 알부민, 인간 IgG 또는 인간의 피브리노오겐 200㎎은 PBS안에 있는 테트라아크릴레이트로서 소중합체의 PEG 18.5K가 포함된 용액 23% W/V의 2ml에서 용해되었다.

이 용액은 중합되어 2Cm × 2Cm × 0.5Cm 크기의 겔을 생성시켰다. 보빈 세륨 알부민, 인간 IgG 및 인간 피브리노오겐(각각 66KDa, 150KDa, 350KDa 몰)의 확산은 전단백질 분석시약(바이로레드)을 사용하여 상기 겔의 2Cm × 2Cm면을 통해 분석되었다.

PEG 18.5K 겔의 전형적인 방출 곡선이 제 9도에 도시되어 있다. 이 겔은 알부민을 천천히 수송되도록 해주지만, IgG 및 피브리노오겐은 확산하도록 해주지는 않는다.

이러한 사실은 이 겔들이 면역성 보호 장애물로서 사용될 수 있음을 나타내고 있다. 이것은 동물조직 미세 캡슐화 물질에 반드시 필요한 물질인 것이다.

상기 방출곡선은 상기 단량체의 폴리에틸렌 글리콜 세그먼트의 가교화밀도 및 분자량의 함수임이 밝혀졌다.

제 10도는 보빈 세륨 알부민(BSA)이, 0.4K의 PEO 디 아크릴레이트와 18.5K의 테트라아크릴레이트의 23%용액으로부터 만들어진 겔을 통하여 방출되는 것을 보여준다. 이것을 보면 분명히 0.4K 겔이 알부민의 확산을 제한하는 반면에 18.5K에서는 자유롭게 알부민이 투과할 수 있음을 알 수 있다.

이들 겔로 부터 어떤 물질이 방출하느냐는 망사구조의 가교밀도 및 망사구조안의 PEG 세그먼트의 운동성에 달려있다. 이 효과는 또한 매크로머의 기능에 달려있다.

예를들면, PEG 18.5K의 테트라아크릴레이트 겔의 투과성은 PEG 20K 디아크릴레이트 겔의 투과성 보다 적다.

실시예 12 : 생체 적합성을 향상시키는 PEG 겔층을 형성시키기 위한 실리콘 고무의 처리

의약품 등급의 실리콘 고무 2Cm × 2Cm 조각을 23% 0.4K PEG 디 아크릴레이트와 0.5% 2, 2-디메톡시-2-페닐 아세토피논을 함유한 벤젠에 1시간 동안 담궜다.

그리고 그 팽창한 고무에 장파의 UV 램프(365㎚)를 15분동안 조사하였다.

조사후 상기 샘플을 벤젠으로 세척하고 건조하였다. 물밑에서 실리콘 고무의 공기 접촉각은 처리 전후에 측정되었다.

처리안된 실리콘 고무에 있어서의 최초 접촉각이 63 ° 인데 비해, 처리후 감소된 접촉각 50 °는 고무표면위에 PEG 겔이 존재함으로써 증가된 친수성을 보여준다.

이러한 기술은 매크로머 중합화가 중합체 표면을 변화시켜 생체 적합성을 증가시키는데 사용될 수 있음을 입증하는 것이다. 예를 들면, 폴리우레탄 카테터는 PEG로 피복된 이식장치를 얻기위해 이 방법으로 처리될 수 있다.

상기 PEG는 폴리우레탄 카테터의 표면에 견고히 고착되었는데 이는 상기 매크로머(macromer)가 광중합화 전에 물담금 중 카테터 표면을(1-2미크론깊이까지)침투할 수 있기 때문이다.

염증을 일으키면 PEG와 폴리우레탄이 교차관통하는 망사구조가 생겨나게 된다. 따라서 PEG는 풀수 없을 정도로 폴리우레탄과 엉키게 되었다.

실시예 13 : 중합율

전형적인 반응의 동력학은 레이저로 개시되는 다기능 아크릴 단량체들의 중합화로 겔화가 신속하게 되도록 되어 있다.

트리메티롤 프로필 트리아크릴레이트,(광 개시제로서 5×10^{-4} M)의 에틸에오신이 보조 촉매제로써 트리에탄올아민 0.1M과 매크로머 ml당 10μ 몰의 N-비닐 피롤리돈속에 함유된)에 500mW 아르곤 이온 레이저(514nm 파장, 3.05 $\times 10^{5}$ W/㎡ 동력 1㎜ 빔 직경, 1㎜ 평균 겔 직경)가 조사되었다.

제 11A도는 레이저 방사 시간에 대해 레이저 빔이 겔속으로 투과됨으로써 형성되는 겔 스파이크 길이를 나타내고 있다.

제 11B도는 매크로머 속으로 레이저 빛이 투과되어 일어나는 결과로 형성되는 스파이크를 보이고 있다.

개시제용액(2,2 디 메톡시-2-페녹시 아세토피논 300㎎/ml와 N-비닐피롤리돈) 3μℓ를 함유한 HEPES 완충염수안에 다양한 매크로머 포함한 23%W/W용액의 100μℓ를 커버유리위에 두고 저밀도 장파장 UV(LW UV)램프로 방사시켰다.

겔화가 일어나는데 필요한 시간은 표4에 주어져있고 이 시간은 대개 10초 범위내에 있다.

표 4 : 방사된 폴리머의 겔화시간

폴리머 사이즈	겔화시간(초) (평균 ± S.D.)
0.4K	6.9 ± 0.5
1K	21.3 ± 2.4
6K	14.2 ± 0.5
10K	8.3 ± 0.2
18.5K	6.9 ± 0.1
20K	9.0 ± 0.4

300㎛ 직경의 방울을 겔화하는데 약 10 100mS의 시간이면 충분하고, 상기 방울 크기는 미세캡슐화 기술에 사용되는 겔의 전형적인 크기이다.

이러한 신속한 겔화가 매크로머의 적당한 선택과 관련하여 사용되면 3차원적으로 공유 결합된 폴리머 망사구조 속에 살아있는 세포를 포착하게 할 수 있다.

적당한 다파장이 없으면 단파장 레이저광은 세포에 흡수되지 않을 것이고, 파장이 약 400nm 이상이면 해롭지 않을 것이다.

360nm 이상의 장파장의 자외선은 적당한 강도 및 기간이라면 해롭지 않다.

매크로머의 중합화율은 매크로머의 농도, 개시제의 농도, 매크로머의 기능성, PEG 디 아크릴레이트, 또는 PEG 테트라 아크릴레이트의 다기능성 및 물질의 아크릴레이션 정도 등에 달려있다.

실시예 14 : PEG 겔 상호작용

HFF(인체 포피 피브로 브라스트)세포의 생체 적합성을 다음과 같이 밝혀졌다.

HFF 세포는 10% 어린송아지 혈청을 포함하는 이글 배양액 속에서 밀도가 18,000 cells/㎠ 인 PEG 18.5 테트라 아크릴레이트겔에서 배양되어졌다. 그 겔은 5% CO_2 조건에서 4시간동안 37℃로 배양되었다. 그후 그 겔은 PBS로 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거해내고 200 X 배율에서 상대비 현미경으로 관찰하였다.

제 12도(가)는 전형적인 PEG 겔 위에서 이들세포의 성장을 보여주고 있으며, 이는 제 12도(B)의 유리표면에서 세포 성장과 대비된다.

겔표면에서의 단위면적(㎠)당 세포의 수가 510± 170 인데 반하여 대비군인 유리표면에서의 그 수는 13,200±3,910에 이르고 있다. 겔위의 세포는 둥근형을 띠고 있으며, 통상의 퍼진 형태로는 보이지 않았는데 이는 이들 겔이 셀 부착을 촉진하지 않음을 나타내고 있는 것이다.

마이크로스피어 위의 생체 적합성은 다음과 같이 입증되었다. 제 13도는 실시예 10에서와 같이 생쥐에서 외식한 마이크로스피어의 사진을 보여주고 있으며, 4일후에는 섬유질 성장은 거의 없는 것으로 보인다. 단백질 흡착에 대한 PEG 사슬의 저항 및 그에 따른 세포 성장은 잘 증명되어 있다.

표 5는 여러가지 PEG 디아크릴레이트 겔이 4일동안 복강에 이식된 후 형성된 마이크로스피어상에 보여진 세포성장의 정도를 보여주고 있다.

표 5 : 세포성장의 겔 범위에 대해 겔 PEG 디아크릴레이트 위의 세포 성장 정도(몰 증량, 달톤)

400	5-10%
1,000	15-25%
5,000	3-5%
6,000	2-15%
10,000	10-20%
18,500	4-10%

실시예 15 : PEG 겔의 특성화 및 기계적 분석

비닐-2-피롤리돈 안에 2,2-디메톡시-2-페닐 아세토리논 30㎎/ml를 함유한 개시제 용액 10ml가 ml당 PEG 디아크릴레이트 23% W/V 용액(0.4K, 6K, 10K) 및 PEG 테트라 아크릴레이트(18.5K)에 첨가되었다. 겔화를 위해 매크로머를 함유한 개시제 용액을 4.0×1.0×0.5㎝ 모을드 안에 두고 장파장 자외선 램프(365nm)로 약 10초 동안 투사하였다.

샘플은 분석전에 1주일동안 인산염 완충염수(pH 7.4)속에서 평행에 이르도록 했다.

일련의 " 개뼈" 샘플(양쪽선단은 넓고 중간부분은 좁고 긴 부분으로 된; 소위 개뼈형상으로 슬라브에서 절취된 샘플)은 최고 인장 강도 시험에서 절단되었다.

상기 샘플의 두께는 절취되는 샘플의 두께에 의해 정해졌다. 글 두께범위는 약 0.5㎜에서 1.75㎜ 사이이다. 그 샘플은 길이가 20㎜이고 폭이 " 목" 부분에서 2㎜이다.

상기 응력시험은 4초당 4%의 율로 길이 조정하면서 이루어진다. 각각의 시험후 단면적이 결정되었다. 표 6에서는 최고 인장강도 데이터가 기재되어 있다.

이 표에서 보면 일반적으로 매크로머의 분자량이 작으면 작을수록 더 강도가 센겔이 생김을 알 수 있고, 그 겔은 분자량이 더 큰 매크로머를 사용하여 만들어지는 겔에 비해 신축성이 적음을 알 수 있다. PEG 18.5K 테트라아크릴레이트 겔은 이 시리즈에서는 변칙적인 것으로 보이는데 이것은 매크로머의 다기능성 및 이에 따른 대응교차 결합밀도가 높음으로써 생기는 결과로 보인다.

이와 같은 강도 강화 결과는 아크릴레이트기와 같이 4개의 자유기를 가진 매크로머로부터도 얻어질 수 있었다.

표 6 : 겔 강도 시험

	PEG 0.4K	아크릴레이트 6K	선구물질 10K	분자량 18.5K
응력(Kpa)	168+/-51	98+/-15	33+/-7	115+/-56
변형률(%)	8+/-3	71+/-13	110+/-9	40+/-15
기울기*	22+/-	1.32+/-0.31	0.27+/-0.04	2.67+/-0.55

* 값은 평균치 +/- S.D.

크리이프 시험을 위해, 0.2 × 0.4 × 2㎝의 8개 시료를 염수 용액속에 담궈놓고 하중을 걸었다. 일정하고 특정된 소정 하중을 1시간동안 걸어서 시험을 하였고 10분간 회복하중을 걸었다. 1K, 6K, 10K의 PEC 디아크릴레이트에서 만들어진 겔들과 18.5K PEG 분자량의 PEG 테트라아크릴레이트가 이 연구에 사용되었다. 10K 시험은 한계에러(시료가 하중 프레임의 경로를 넘어서 늘어났다.)때문에 종결되었다.

1K시료는 10g의 하중과 0.2g의 회복하중을 걸었다. 6K 시료는 0.5g의 회복하중을 가진 13g의 하중을 걸었다. 18.5K 시료는 0.2g 회복하중과 13g의 하중으로 시험되었다.

시료에 대한 하중의 선택은 1차 및 2차 영역을 가진 전형적인 크리이프 곡선을 형성시켰다. 1K, 6K, 18.5K 시료에 대한 크리이프 곡선이 제 14도(가)내지(다)에 각각 도시되어 있다.

실시예 16 : PEG 겔의 수분 함유

여러가지 매크로머의 용액은 위에서 기술된 대로 만들어졌다. 디스크 형의 겔은 모울드를 사용하여 만들었다. 각 디스크마다 400㎕의 용약이 사용되었다.

그 용약은 완전한 겔화를 위해 2분동안 방사되었다. 디스크형의 겔은 분리되고 60℃ 진공하에서 2일동안 건조하였다. 그 디스크를 중량측정하였고(W1), 클로로포름으로 1일간 추출하였다. 다시 그 디스크를 건조하고 중량측정을 하였다(W2). 겔비는 W2/W1으로 계산되었다. 이 자료는 표 7에 나타나있다.

추출후에 상기 디스크들을 6시간동안 HBS와 평형을 이루게 하였고, 과잉수분을 제거하고 난 후 중량을 측정하였다(W3). 총 수분 함유량은(W3 - W2)×100/W3으로 계산하였다. 다음의 표는 겔 수분함유량에 대한 데이터를 요약기재한 것이다.

표 7 : 겔 수분 함유량에 대한 데이터

중합체코드	총수분(%)	겔 함유량(%)
0.4		99.8± 1.9
1K	79.8± 2.1	94.5± 2.0
6K	95.2± 2.5	69.4± 0.6
10K	91.4± 1.6	96.9± 1.5
18.5K	91.4± 0.9	80.3± 0.9
20K	94.4± 0.6	85.0± 0.4

실시예 17 : 이식후 PEG 겔의 기계적 안정성

PEG 디아크릴레이트(10K) 및 PEG 테트라아크릴레이트(몰중량 18.5K)는 실시예 15에 기재된 바와 같이 " 개뼈" 형상으로 만들어졌다. 2,2-디메톡시-2-페녹시아세토피논이 이 개시제로서 900ppm을 함유한 중성 HEPES 완충염수(HBS)(0.9%NaCl, 10mM HEPES, pH7.4)는 알미늄모울내에 주입되고 LW UV 램프(흑색빛)로 1시간동안 주사되었다. 이 겔들을 오븐 건조시킨 후 이 시료들의 최초 무게는 일정하였다.

그 시료들은 시험하기에 앞서 겔 기반(졸-제거)에서 반응하지 않은 예비중합체를 걸러내기 위해 메틸렌클로라이드로 36시간동안 속슬렛추출되었다. 그 추출공정은 건조된 겔이 일정한 중량을 가질 때까지 계속되었다.

생후 6 8주된 스위스 흰 생쥐의 수컷의 복강내에 소듐펜토바비탈을 주사하여 마취시킨다. 그 생쥐의 복부를 면도하고 베타딘을 바른다. 복부중간에 10-15㎜ 길이만큼 칼로 벤다. 중성의 PBS(인산염 완충염수)또는 HEPES 완충염수(석회화 연구용)안에서 완전히 수화된 중합체 시료를 절개부 속에 삽입시키고 상처부에서 떨어져 있는 장간막위에 둔다. 복강벽은 봉합실(4.0 실크, 에티콘)로 복개되었다.

피부는 스테인리스 스틸 피부스테이플로 덮었다. 국부항생제(퓨라신)를 절개부위에 처리했다. 세마리 동물이 각 시간 눈금용으로 사용되었다. 1개의 " 개뼈" 시료를 생쥐마다 각각 이식한 후 1주, 3주, 6주, 8주 끝에 외식했다.

외식된 겔은 HBS에서 두번 린스하고나서 부착된 세포와 섬유질을 제거하기위해 0.3㎎/ml의 프로나아제로 처리한다. 그리고나서 상기 시료들은 일정한 중량까지 오븐 건조시키고 위에서 기술한 바와 같이 재탈수시킨다. 인장강도-연신시험은 외식된 개뼈를 소형수평식 인스트론 같은 장치에 넣고 행했다. 상기 장치는 두개의 평행한 알루미늄 가이드 사이의 나무판위에 평평하게 설치된 2개의 클램프로 구성된 알미늄 플랫폼이다.

상부 클램프는 고정된 반면에 하부 클램프는 움직일 수 있도록 되어있다. 움직이는 클램프의 마찰면과 플랫트폼은 마찰저항을 최소화하기 위해 뒷쪽에 테프론처리된 알미늄으로 피복되었다. 움직이는 클램프는 하중을 점차적으로 증가시킬 수 있는 장치에 고정되어 있다. 전체 셋업은 해부 현미경하에 수평으로 놓여지고 시료의 연장은 비디오카메라를 사용하여 관찰된다. 카메라의 영상은 영상프로세서에 의해 얻어져서 모니터로 전송된다. 파단후 파단면의 단면이 절단되고 그 면적이 측정되었다. 파단시의 하중을 이단면적으로 나누어 최대인장응력을 구한다. 표8에는 다양한 시간 간격에서 외식된 PEG 테트라아크릴레이트(18.5K)하이드로겔의 파단시 응력이 기재되어있다.

인장강도에 중요한 변화는 없었음이 분명하다. 따라서, 생쥐내의 이식의 최대시간 프레임 내에서는 겔은 생체내에서 생체퇴화에 대한 기계적 안정성은 있는 것으로 보인다.

표 8 : 중합체 이식체의 퇴화에 대한 저항

이식된 시간	응력(Kpa) (평균± 오차*)	스트레인 평균 (평균± 오차*)
1 WK	52.8± 16.7	0.32± 0.19
3 WK	36.7± 10.6	0.37± 0.17
6 WK	73.3± 34.9	0.42± 0.26
8 WK	34.1#	0.30#
컨트롤	44.9± 5.3	0.22± 0.22

* 90% 신뢰한계 기초한 오차

* 단일 시료

실시예 18 : PEG겔의 석회화의 관찰

디스크형 PEG-테트라아크릴레이트 하이드로겔(몰중량. 18.5K)는 상기한 바와같이 1주, 3주, 6주 또는 8주 기간동안 생쥐안의 복강에 이식되었다. 외식된 겔은 HBS안에서 린스되고 세포와 그 부스러기를 제거하기위해 프로나제로 처리되었다.

다음으로 그 시료는 겔 기질에서 Ca^{++} 자유이온이 확산되도록 하기위해 HBS안에서 평행에 이르게 한다.

그리고나서 겔은 일정한 중량까지 오븐건조되고 산화알루미늄도가니(COORS, 내열성이 있는)로 옮겨졌다. 그것들은 700℃의 도가니안에서 최소한 16시간동안 태웠다. 완전소각을 위해 도가니를 체크했다. 만약 잔유물이나 부스러기가 보이면 12시간 추가로 소각했다. 계속하여 시료안의 Ca^{++} 염과 다른 미네랄을 용해시키기 위해 그 도가니에 0.5M HCl을 2ml 채웠다. 이 용액은 여과하여 칼슘함유물용 원자 흡수분광기로 분석되었다.

PEG-테트라아크릴레이트(몰중량, 18.5K)겔 이식체에 대한 석회화 데이터는 표 9에 주어져있다. 생쥐에 이식한 기간이 8주일때까지는 석회화의 주목할 만한 증가가 관찰되지 않았다.

표 9 : PEG- 테트라아크릴레이트(몰중량, 18.5K)

겔 이식체에 대한 석회화 데이타

시간 (일)	석회화(평균± 오차*) (칼슘mg/건조된 겔중량g)
7	2.33± 0.20
21	0.88± 0.009
42	1.08± 0.30
56	1.17± 0.26

실시예 19 : 절단신경 재결합용 점착제로서 PEG겔의 사용

PEG 테트라아크릴레이트(10%, 18.5K)의 공식화는 쥐의 좌골신경을 가로로 절개한 선단을 봉합하지 않고 병치한 것을 안정화시키기 위해 점착제로 사용되었다. 쥐는 멸균하에서의 외과시술중에 펜토바비탈 마취를 받았다. 그 좌골신경은 중간넓적다리높이에서 이두근 넓은 부분의 꼭대기를 구부려 측편으로 옮기면 드러난다.

좌골신경은 약 1㎝ 정도로 움직여 이리덱토미(iridectomy)가위로 약 3㎜로 절개되었다. 절단된 신경의 양선단 사이의

간격은 2 3㎜였다. 상처부위는 염수로 세척되고 과잉염수를 제거하기 위해 가볍게 물기를 닦았다. 멸균의 중합되지 않는 PEG 테트라아크릴레이트 용액을 상처부위에 발랐다. 외막과 신경초를 잡기위해 민감한 겸자를 사용함으로써 신경선단은 병치되었고, 광개시제로서 2,2-디메톡시-2-피녹스아세토피논을 함유한 매크로머 용액을 신경선단에 바른 다음 상처부위를 장파장 UV광(365nm)에 약 10초 동안 쪼인 후 점착제를 중합시켰다. 겸자를 조심스럽게 당겨내었다. 매크로머 용액이 두개의 신경근 사이로 흐르지 않도록 주의를 했다. 또다른 방법으로 신경근 연결부를 조명이 비추지 않도록 금속포일로 감싸서 뿌리사이에서 매크로머용액이 겔화되지 않도록 했다.; 이때 잔류매크로머 용액을 씻어냈다.

또다른 접근방식은 가로로 절단한 신경의 양선단을 1쌍의 접자로 잡을 수 있도록 했다. 겸자끝을 접착제와 반응하지 않도록 페트로라툼으로 얇게 발랐다.

중합반응된 점착제는 상처부위를 캡슐화하고, 신경을 그 피하근육에 점착하는 것을 도와준다. 신경선단의 망상구조는 결합부의 움직임을 막아주고 어느 정도 안정화를 보장한다. 근육과 피부를 봉합시켰다. 한달후 재검사 결과 동물의 활동을 제한하지 않고서도 절개된 신경이 다시 연결되는 것을 알 수 있었다.

실시예 20 : 외과적 점착

뉴질랜드산 흰토끼 암컷에서 채취한 복부근육플랩을 잘라내어 1㎝ × 5㎝ 크기의 조각으로 잘라내었다. 그 플랩은 약 0.5 0.8㎝ 두께였다, 그런 플랩 2조각을 겹쳐서 1㎝ × 1㎝의 겹침결합부를 만들었다. 0.4K(디-) 및 18.5K(테트라-), 2개의 서로다른 PEO 디- 및 테트라-아크릴레이트 매크로머 조직을 만들었다.

0.4K 조직은 점성의 액체였고 더이상 희석시키지 않고 사용되었다. 18.5K 조성은 HBS 안에서 23% w/w 용액으로 사용되었다. 상기 점착성 용액 ml당 트리에탄올아민 50ml와 함께 n-비닐피롤리돈(20㎎/ml)안에서 에틸에오신용액 125㎕를 첨가시켰다. 상기 겹친 플랩의 각각에 점착용액 100㎕를 발랐다.

그리고나서 그 플랩연결부에 2W 아르곤 이온 레이저를 30초 동안 스치면서 주사했다. 그 결과 연결부의 강도는 겹침연결부를 전단하는데 소요되는 힘을 측정하여 계산되었다. 겹침연결부의 한쪽단을 고정하고 다른 쪽 선단의 하중을 증가시켰다.

그리고 그것이 떨어질 때 까지 수평방향으로 그 결합부를 잡았다. 각 조직마다 4개의 결합부를 시험했다. 0.4K 결합부는 강도가 12.0± 6.9Kpa(평균치± S.D.)였고 18.5K의 결합부는 2.7± 0.5Kpa의 강도를 가졌다. 두께가 6-8㎜에 불과하지만 광융합과 상당한 결합강도를 얻을 수 있다는 것을 알았다. 514nm광을 사용하는 분광기측정은 그 근육섬유를 통해 1%이하의 전이를 보여주었다.

실시예 21 : 폴리비닐알콜의 변형(modification)

플리비닐알콜 2g(몰중량 100,000 110,000)을 뜨거운 DMSO 20ml안에 용해시켰다. 그 용액을 상온에서 냉각시키고, 트리메틸아민 0.2ml와 아크릴오일 클로라이드 0.2ml를 아르곤 하에서 세게 휘저으면서 섞였다.

이 반응 혼합물을 70℃로 2시간동안 가열한 후 냉각했다. 그 중합체를 아세톤에서 석출시키고 다시 뜨거운 물에서 재용해한 후 다시 아세톤에서 석출시켰다. 최종적으로 그것을 60℃에서 2시간동안 진공으로 건조시켰다. PBS와 이 중합체 용액 5-10% w/v을 UV 광개시제와 혼합시켰고 장파장 UV광을 사용하여 중합시켜 200 1,000미크론 크기의 마이크로스피어를 만들었다. 이 마이크로스피어들은 물속에서 고압을 걸더라도 안정되는데, 이는 겔이 공유결합으로 가교되어 있는 것을 나타내고 있다. 이 매크로머, 즉 PVA 멀티아크릴레이트는 PEG 디아크릴레이트 겔 속에서 대응하는 기계적 변화와 침투성을 가지고 결합밀도를 높이는데 사용될 수 있다.

돈, 폴리에틸옥사졸린, 폴리에틸렌옥사이드-폴리프로필렌 옥사이드코폴리머, 폴리사칸/리드 예를 들면 덱스트란, 알기네이트, 하이알루로닉산, 콘드로이틴 황산염, 헤파린, 헤파린황산염, 헤파란황산염, 구아검, 겔란검, 크산탄검, 카라기난검 및 단백질 알부민, 콜라겐, 그리고 겔라틴에서 선택된 수용해성중합체와 함께 화학적으로 변형된 어떤 수 만큼의 광중합체로 행해질 수 있다.

실시예 22 : 대체성 광중합 가능 성분의 사용

겔화할 수 있도록 많은 광중합기가 사용될 수 있다. 전형적인 또다른 합성을 설명하기위해 PEG 1K 우레탄 메타크릴레이트의 합성이 다음과 같이 설명된다; 250ml 둥근바닥 플라스크 안에서 PEG 1K 디올 10g 벤젠 150ml속에 용해시켰다. 2-이소시아나토에틸메타아크릴레이트 3.38g과 디부틸틴디로레이트 20㎕를 플라스크안에 천천히 부었다.

반응은 6시간동안 반복되고 냉각되며 1000ml 핵산속에 주입된다. 그리고나서 석출된 것은 걸러지고 진공속에서 60℃로 24시간동안 건조된다. 이 경우에 메티크릴레이트 자유기의 중합기를 아리록실클로라이드와 반응할 때 생기는 에스터링크보다 오히려 우레탄 링크를 거쳐 중합체에 부착시켰다.

실시예 23 : 알기네이트-PLL- 알기네이트 미세캡슐과 광중합폴리카티온의 형

알기네이트-폴리리신-알기네이트 미세캡슐은 겔화된 알기네이트 마이크로스피어 위에서 폴리리신 같은 포리카티온을 흡착 또는 코아세르베이팅함에 의해 만들어진다. 그 결과로 생긴 멤브레인은 상호반응에 의해 함께 유지되고 그리고나서 안정성을 제한했다. 이 안정성을 증가시키기 위해 폴리카티온은 탄소-탄소 이중결합의 부가에 의해 광중합화 될 수 있다. 이러한 것은 박막의 안정성을 증가시키키 위하여 광중합 PEG와 함께 반응시키는데 사용될 수 있다.

이러한 광중합 플리카티온의 합성을 설명하기 위해 폴리알릴아민 염산염 1g을 100ml의 유리 비이커로 중량을 측정하여 10ml 증류수(D.W.)에 용해시켰다. 중합체용액의 pH를 0.2M 소듐 하이드록사이드 용액을 사용하여 7로 조정하였다. 그리고 나서 그 중합체는 다량의 아세톤 속에서 석출시킴으로써 분리되었다. 그리고나서 10ml 증류수 안에서 재용해되었고 그 용액을 50ml짜리 둥근 바닥플라스크로 옮겼다.

0.2ml 글리시딜메타크릴레이트를 반응플라스크안으로 천천히 부어넣었다. 그리고 반응혼합물을 상온에서 48시간동안 교반시켰다. 그 용액을 200ml 아세톤 속에 넣고 여과시켜 석출시킨 것을 분리시킨 후 진공속에서 건조시켰다. 이 매크로머는 PEG 디아크릴레이트 같은 부가적인 중합체가 있던지 없던지 알기네이트-PLL-알기네이트를 광화학적으로 안정시키는데 유용하다. 또 알기네이트와 같은 물질안에 세포를 캡슐화 하는데 사용하기 위해 광중합폴리카티온은 세포, 세포집합체, 섬유질 및 폴리머 점착을 증가시켜주는 매개체로서 유용하다. 그런데 이와같은 것은 PEG 광중합성 겔에 결합된 광중합성폴리머의 흡수에 의한 것이다.

실시예 24 : 합성에리트로사이트용 헤모글로빈의 캡슐화

자유형태의 헤모글로빈은 PEG겔로 캡슐화될 수 있고 확산을 막아주는 PEG사슬길이와 결합밀도의 선택으로 유지될 수 있다. 겔에서 헤모글로빈이 확산되는 것은 헤모글로빈의 한 결합형태인 폴리헤모글로빈 사용으로 저지될 수 있다.

폴리헤모글로빈 분자량은 너무 커서 PEG 겔에서 확산될 수 없다. 헤모글로빈 또는 결합된 헤모글로빈 중 어느하나의 적당한 캡슐화가 합성에리트로사이트를 제조하는데 사용될 수 있다.

5미크론 이하의 생체 적합성 물질의 조그만 구안에 헤모글로빈을 넣으면 결합 헤모글로빈이나 리포조옴 캡슐화된 헤모글로빈에 대해 순환시간을 늘리도록 해야 한다. PBS안의 헤모글로빈은 프리폴리머와 아래 정량대로 2, 2-디메톡시-2-페닐 아세토피논과 함께 혼합된다.

헤모글로빈 량

PEG DA(MW 10000) 35%

PEG DA(MW 1000) 5%

PBS 60%

이 용액은 5파아트 미네랄 오일에 대해 1파아트 헤모글로빈/프리폴리머 용액의 비율로 미네랄 오일속에 넣고 믹서기로 급히 교반시킨 다음 에멀젼을 형성시킨다. 그리고 이 에멀젼은 장파장 자외선으로 5분간 조사되어 PEG프리폴리머를 결합시킴으로써 겔을 형성한다.

상기 프리폴리머의 분자량은 PEG 분자량이 작으면 작을수록 확산을 덜 시키므로 겔에서 헤모글로빈의 확산을 저지하도록 선택될 수 있다.

분자량 100,000의 PEG DA, 특히 PEG DA 100과 결합된 PEG DA는 헤모글로빈 확산을 제한하기 위해 적당한 선택 투과성을 가져야 한다. 그리고, 혈액내에서 순환하도록 적당한 생체 적합성을 가져야 한다.

실시예 25 : 대사성 질환의 교정 및 화학요법을 위한 효소의 고정

효소 카탈라아제의 선천성 결핍은 무카탈라아제증을 일으킨다. PEG겔 구조에 카탈라아제 고정은 이 질병을 치료하기 위하여 효소교체방법을 제공할 수 있었다. 글루코시다아제의 고정은 마찬가지로 고셰병(Gaucher's disease)를 치료하는데 사용될 수 있다.

우라아제를 고정해주는 마이크로스피어의 PEG겔은 요소를 암모니아로 바꾸기 위해 체외혈액에 사용될 수 있다. 아스파라기나아제와 같은 효소는 종양세포에 필요한 아미노산을 퇴화시킬 수 있다.

이 효소의 면역원성은 화학요법으로 직접 사용되는 것을 막아준다. 그러나 PEG 겔안의 상기 효소의 고정은 성공적인 화학요법을 보조할 수 있다. 적당한 량은 효소의 완만한 방출이나 무방출 어느 쪽의 경우에도 적용될 수 있다.

PBS의 카탈라아제는 아래의 정량으로 프리폴리머와 혼합된다.

카탈라아제 량은

PEG DA(MW 10000) 35%

PEG DA(MW 1000) 5%

PBS 60%

이고 2, 2-디메톡시-2-페닐아세토페논이 상기 용액 1.6%와 혼합된다. 이 용액을 5 파아트 미네랄 오일에 대한 1파아트 카탈라아제/프리폴리머 용액의 비율로 미네랄오일속에 넣고 믹서기로 급속히 교반시켜 에멀젼을 형성시킨다. PEG 프리폴리머를 결합시키기위해 상기 에멀젼을 장파장 자외선(360nm)으로 5분동안 비추어 겔을 형성시킨다. 상기 프리폴리머의 분자량은 PEG 분자량이 작으면 작을수록 확산을 덜 시키므로 겔에서 헤모글로빈의 확산을 저지하도록 선택될 수 있다.

분자량 100,000의 PEG DA 특히 PEG DA 106과 결합된 PEG DA는 헤모글로빈 확산을 제한하기 위해 적당한 선택투과성을 가져야 한다. 그리고, 혈액내에서 순환하도록 적당한 생체 적합성을 가져야 한다.

상기와 같은 방법으로 겔은 신체내 생체작용 매개체의 함유물에 사용된다. 그 활성매체(효소)는 크고 겔 내에 함유되어 있으며 그것이 작용하는 매체는 작고 공간이 큰 효소내로 확산될 수 있다. 그러나 활성매체는 신체나 대상신체구성부를 벗어나지 못하도록 되어있다. 이는 그것이 겔부분 바깥으로 확산될 수 없기 때문이다.

실시예 26 : 항 HIV(항인면역결핍성 바이러스)약제의 세포내 측정을 위한 마이크로캡슐화

HIV에 전염되거나 비전염인간의 T-림포블라스토이드 세포는 상기 다른 세포에 대해 기술된 바와 같은 PEG겔 속으로 캡슐화될 수 있었다. 이 미소캡슐화는 동물안에 이식되어 항 HIV약제용 시험체계를 만들 수 있다. 그리고나서 AZT나 DDI와 같은 시험약제로 처리되었다. 처리후 미소캡슐은 수확될 수 있고, 그 미소캡슐화된 세포는 플루오레신 디아세테이트/에티디움브로마이드 살아있는/죽은 세포분석을 사용하여 세포생존성 및 기능적 상태를 위해 점검되었다. 감염된 세포의 생존은 약제의 성공적인 작용을 나타낸다. 생체 적합성의 부족은 약제평가에 대한 이 접근방식이 가진 문제점이지만, 여기에서 기록된 겔을 사용하여 극복할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

a)다음의(ⅰ),(ⅱ),(ⅲ)을 혼합하는 단계; 및

(ⅰ) 비독성이고 분자량이 최소한 400이며 적어도 두개의 자유 라디칼 중합가능 말단기를 포함하는 수용성 생체적합성 매크로머

(ⅱ) 인간을 제외한 포유류의 세포, 인간을 제외한 포유류 세포의 구성성분, 인간을 제외한 포유류 세포의 집합체, 생물학적 활성분자 및 인간을 제외한 포유류의 조직으로 구성된 군으로부터 선택된 생물학적 물질

(ⅲ) 비독성 가시광 또는 장파장의 자외선-활성 자유라디칼 중합개시제 b) 10 이상의 중합으로 고분자 겔을 형성하기 위하여 매크로머의 중합을 유발하는 가시광 또는 장파장의 자외선에 상기 혼합물을 노출시키는 단계를 포함하는 생물학적 물질의 표면에 중합층을 형성하는 방법.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 생물학적 활성분자는 아미노산이 100개 미만인 펩타이드, 아미노산이 100개 또는 그 이상인 단백질, 다당류, 핵산, 유기약물 및 무기약물로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 자유라디칼 중합가능 말단기는 탄소-탄소 이중결합 또는 삼중결합을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4.

제1항에 있어서, 상기 혼합 단계에 비독성 촉매 또는 촉진제가 첨가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5.

제1항에 있어서, 상기 수용성 매크로머는 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리(에틸렌 옥시드), 폴리(비닐 알코올), 폴리(비닐 피롤리돈), 폴리(에틸 옥사졸린), 폴리(아미노산), 다당류, 단백질, 또는 둘이나 그 이상의 중합 가능 치환체를 포함하는 이들의 블록 또는 랜덤 공중합체로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.

제5항에 있어서, 상기 다당류는 알기네이트, 히알우론산(hyaluronic acid), 황산 콘드로이틴, 덱스트란, 황산 텍스트란, 헤파린, 황산 헤파린, 황산 헤파란(heparan sulfate), 키토산, 겔란검, 크산탄검, 구아검 및 K-카라기난으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7.

제5항에 있어서, 상기 단백질은 젤라틴, 콜라겐 및 알부민으로 구성된 군으로 부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8.

제1항에 있어서, 상기 자유라디칼 중합가능 말단기는 2 또는 그 이상의 아크릴레이트기를 포함하는 매크로머군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9.

제1항에 있어서, 상기 고분자는 아크릴레이트 말단 폴리(에틸렌 글리콜)을 포함하는 매크로머로부터 만들어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10.

제1항에 있어서, 상기 중합개시제는 에오신염료, 치환된 에오신염료, 리보플라빈, 아세토페논, 치환된 아세토페논, 플로오레센 염료, 치환된 플루오레센 염료, 캄포퀴논, 로즈뱅갈, 메틸렌 그린, 메틸렌 블루, 에오신 Y, 에틸 에오신, 아크리딘 오렌지, 크산틴 염료 및 티오크산틴 염료로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11.

제1항에 있어서, 상기 중합개시제는 에리트로신, 플록신(phloxine) 및 티오닌(thionine)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12.

제4항에 있어서, 상기 촉매 또는 촉진제는 아민인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13.

제12항에 있어서, 상기 아민은 트리에탄올아민, 트리에틸아민, 에탄올아민, N-메틸 디에탄올아민, N,N-디메틸 벤질아민, 디벤질아민, N-벤질 에탄올아민, N-이소프로필 벤질아민, 테트라메틸 에틸렌-디아민, 리신, 오르니틴, 히스티딘 및 아르기닌으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14.

제1항에 있어서, 상기중합은 800㎚ 미만의 파장을 가진 가시광에 의해서 개시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15.

제1항에 있어서, 상기 가시광은 514㎚의 파장을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16.

a) 생물학적 물질에 개시제를 결합시키기 위하여, 가시광선 또는 장파장 자외선-활성 자유라디칼 개시제, 열적활성 자유라디칼 개시제, 벤조일 퍼록사이드, 포타슘 퍼설페이트 및 암모늄 퍼설페이트로 구성된 군으로부터 선택되는 비독성 자유 라디칼 중합개시제 용액을 인간을 제외한 포유류의 세포, 인간을 제외한 포유류 세포의 구성 성분, 인간을 제외한 포유류세포의 집합체, 생물학적 활성분자 및 인간을 제외한 포유류의 조직으로 구성된 군으로부터 선택되는 생물학적 물질에 흡착시키는 단계;

b) 결합되지 않은 개시제를 희석 또는 세척하는 방법에 의해 제거하는 단계;

c) 상기 생물학적 물질에, 비득성이고 분자량이 최소한 400이며 적어도 두개의 자유 라리칼 중합가능 말단기를 포함하는 수용성 생체적합성 매크로머를 첨가하는 단계; 및

d) 10 이상의 중합으로 고분자 겔을 형성하기 위하여, 매크로머의 중합을 유발하는 상기 개시제의 활성화제에 상기 혼합물을 노출시키는 단계를 포함하는 생물학적 물질의 표면에 중합층을 형성하는 방법.

청구항 17.

제16항에 있어서, 상기 결합되지 않은 개시제는 오직 인간을 제외한 포유류의 세포, 인간을 제외한 포유류세포의 집합체, 인간을 제외한 포유류의 조직 표면에서만 중합이 일어나는 매크로머용액으로 희석됨으로써 제거되는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 18.

제1항에 있어서, 상기 매크로머용액은 형성된 다음에 중합되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19.

제1항에 있어서, 상기 겔은 지지구조를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20.

제1항에 있어서, 상기 고분자는 캡슐화된 물질이 소정의 투과성을 갖도록 선택되고 중합이 변형되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21.

제1항에 있어서, 상기 매크로머용액의 중합은 사람을 제외한 포유동물조직을 사람을 제외한 다른 포유동물조직 또는 세포에 부착시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22.

제1항에 있어서, 상기 생물학적 활성분자는 인간을 제외한 포유류의 조직또는 세포로 캡슐화 되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23.

제1항에 있어서, 분자 또는 물질에 대한 상기 겔의 부착성을 증가시키기 위하여, 캡슐화되는 상기 분자 또는 물질에 광중합가능 폴리케타이온(polycation)이 전흡착되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24.

제1항에 있어서, 상기 매크로머 용액은 조직강에 적용된 후 코팅 또는 지지체를 형성하기 위하여 조직강의 표면에서 중합되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25.

a) 다음의(ⅰ),(ⅱ),(iii)을 혼합하는 단계; 및

(ⅰ) 비독성이고 분자량이 최소한 400이며 적어도 두개의 자유 라디칼 중합가능 말단기를 포함하는 수용성 생체적합성 매크로머

(ⅱ) 마르크로스피어, 막조직, 직조성 매트리스, 기공성 매트리스, 보철이식체, 마이크로캡슐, 마이크로입자, 구슬(bead)또는 카테터(cathether)로 이루어지는 군으로부터 선택된 기질

(iii) 비독성 가시광 또는 장파장의 자외선-활성 자유라디칼 중합 개시제

b) 기질에 부착되는 10 이상의 중합으로 고분자 겔을 형성하기 위하여 매크로머의 중합을 유발하는 가시광 또는 장파장의 자외선에 상기 혼합물을 노출시키는 단계

를 포함하는 생체적합성 기질의 제조방법.

청구항 26.

제25항에 있어서, 상기 기질은 개시제로 처리되고, 상기 결합되지 않은 개시제는 제거되며, 상기 매크로머는 기질에 적용되어 중합된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27.

제16항에 있어서, 상기 개시제는 가시광에 노출됨으로써 활성화되는 광개시제 이고, 상기 수용성 매크로머는 폴리(알킬렌 글리콜), 폴리(알킬렌 옥시드),폴리(비닐 알코올), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(에틸옥사졸린), 폴리(아미노산), 다당류, 단백질, 또는 둘이나 그 이상의 중합가능 치환제를 포함하는 이들의 블록 또는 랜덤 공중합체로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28.

제 27항에 있어서, 상기 매크로머는 폴리(에틸렌 글리콜)과 탄소-탄소 이중결합을 포함하는 자유라디칼 중합가능 그룹인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29.

제16항에 있어서, 상기 매크로머 용액은 공촉매, 임의적으로 자유라디칼 반응을 촉진할 수 있는 질소화합물, 임의적으로 트리에탄올아민, 트리에틸아민, 에탄올아민, N-메틸디에탄올아민, N,N-디메틸 벤질아민, 디벤질아민, N-벤질 에탄올아민 N-이소프로필 벤질아민, 테트라메틸 에틸렌디아민, 포타시움 퍼셜페이트, 테트라메틸에틸렌디아민, 리신, 오르니틴, 히스티딘 및 아르기닌으로부터 임의로 선택된 1급, 2급, 3급 또는 4급 아민을 추가로 포함하며;

그리고 상기 광개시제는 에틸에오신, 에오신Y, 플로오레센, 2 2-디메톡시, 2.-페닐아세토페논, 2-메톡시, 2-페닐아세토페논, 캄포퀴논, 로즈뱅갈, 메틸렌블루, 에리트로신, 피롤린, 티오닌, 리보플라빈 및 메틸렌 그린으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30.

제16항에 있어서, 상기 생물학적 물질은 인간을 제외한 포유류의 조직, 인간을 제외한 포유류 세포의 프라이머리(primary)또는 이스테블리쉬드라인(established line)으로부터 선택되는 것으로서, 상기 인간을 제외한 포유류 세포는 췌장 섬세포, 포피 섬유아세포, 중국 햄스터 난소세포, 베타세포 도선종, 임파구성 백혈병세포, 마우스 3T3 섬유아세포, 도파민 분비 복측 중뇌세포, 신경아세포, 아드레날린성 수질세포 및 T세포, 세포내 세포질 성분 및 세포내 비세포질 성분으로부터 임의로 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31.

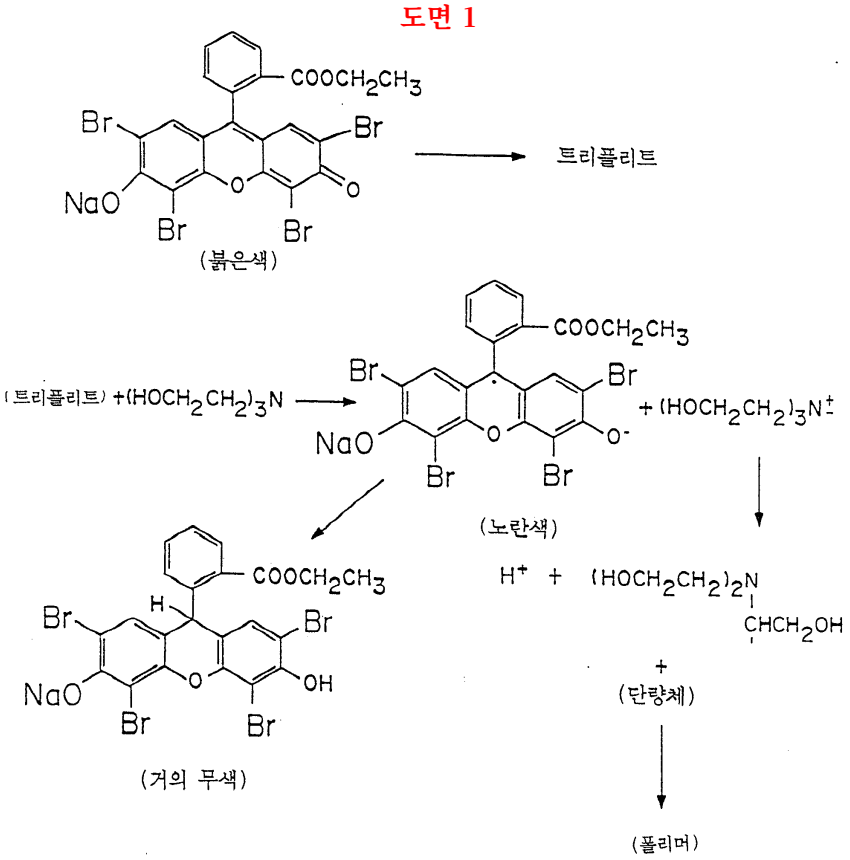
제16항에 있어서, 상기 생물학적 물질은 우선 마이크로 캡슐로 캡슐화되고, 이 마이크로캡슐은 이온응고성 또는 열응고성 고분자를 선택적으로 포함하여, 이들 고분자는 캡슐화된 물질에 대해 비독성이고 알기네이트, 키토산, 아가로즈, 젤라틴, 또는 이들의 혼합물을 임의로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32.

제16항에 있어서, 상기 매크로머용액은 중합반응을 촉진하기 위한 촉진제, 특히 알릴, 비닐 또는 아크릴레이트 그룹을 가지는 작은 분자, 특히 N-비닐피롤리디논, 2-비닐피리딘, 1-비닐이미다졸, 9-비닐카바졸, 아크릴산 및 2-알릴, 2-메틸, 1-3-시클로펜탄디온으로부터 선택되는 것을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

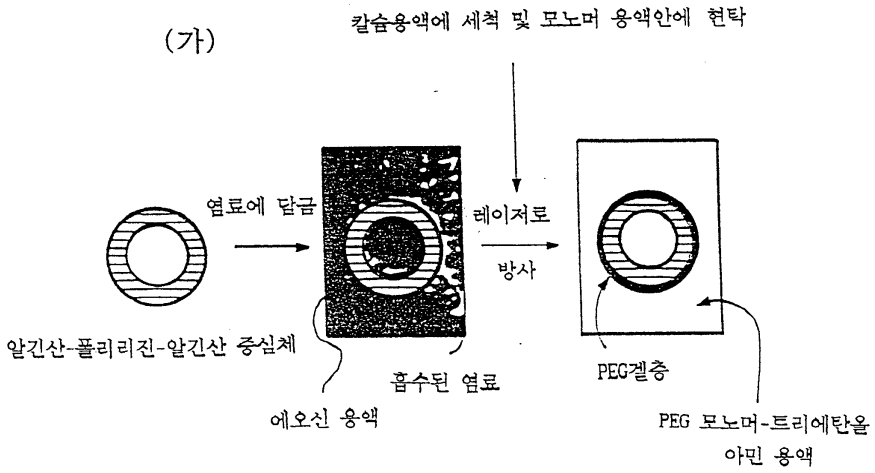
도면

도면 1

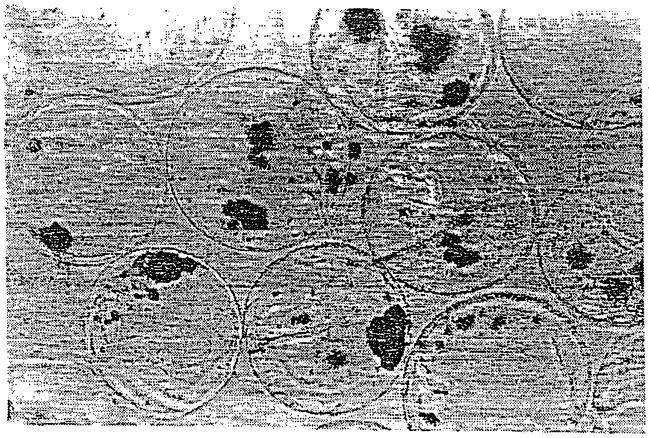

COOCH2CH3
Br
Br
NaO
O
O
Br
Br
(붉은색)
트리플리트
(트리플리트) +(HOCH2CH2)3N
COOCH2CH3
Br
Br
NaO
O
O-
Br
Br
+ (HOCH2CH2)3N+
(노란색)
H+ + (HOCH2CH2)2N
CHCH2OH
+
(단량체)
(폴리머)
COOCH2CH3
H
Br
Br
NaO
O
OH
Br
Br
(거의 무색)

도면 2

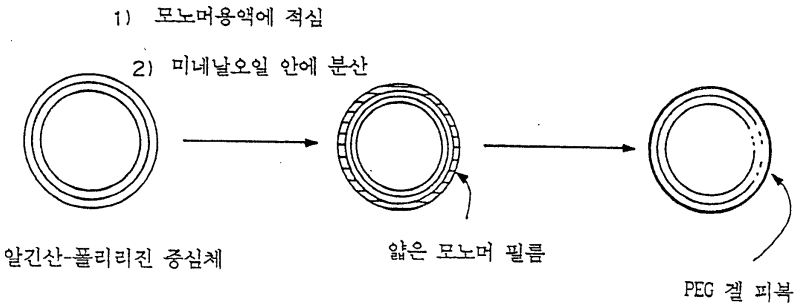
(가)


칼슘용액에 세척 및 모노머 용액안에 현탁
염료에 담금
레이저로
방사
알긴산-폴리리진-알긴산 중심체
흡수된 염료
PEG겔층
에오신 용액
PEG 모노머-트리에탄올
아민 용액

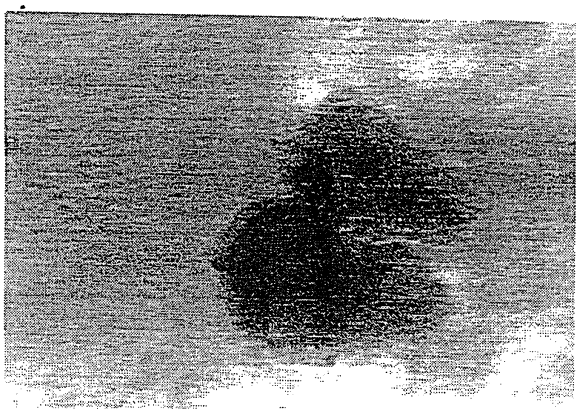
(나)



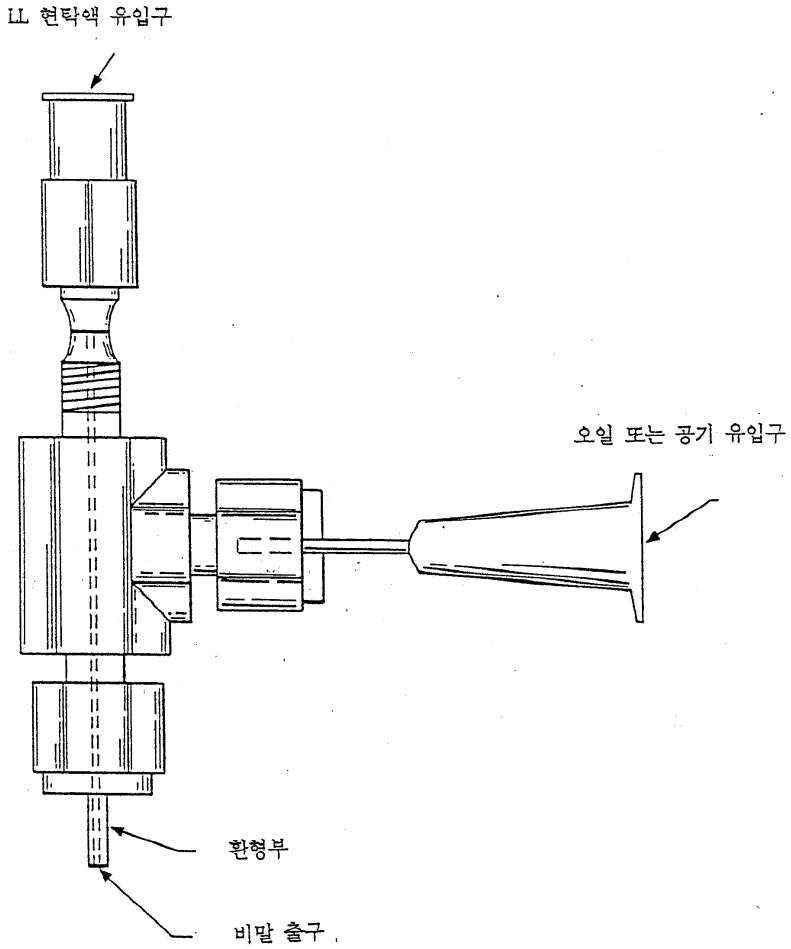
도면 3



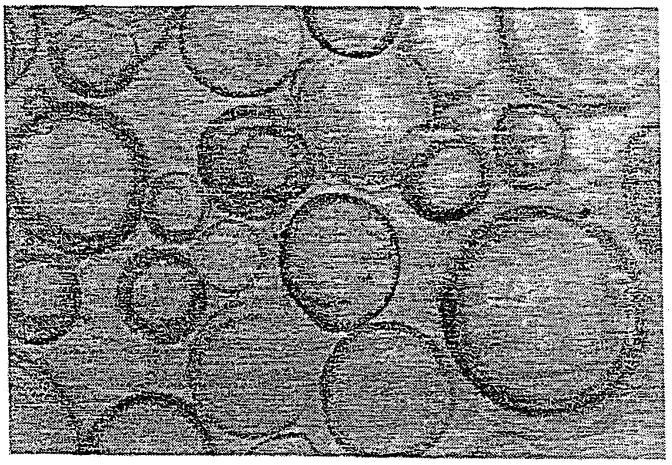
도면 4



도면 5

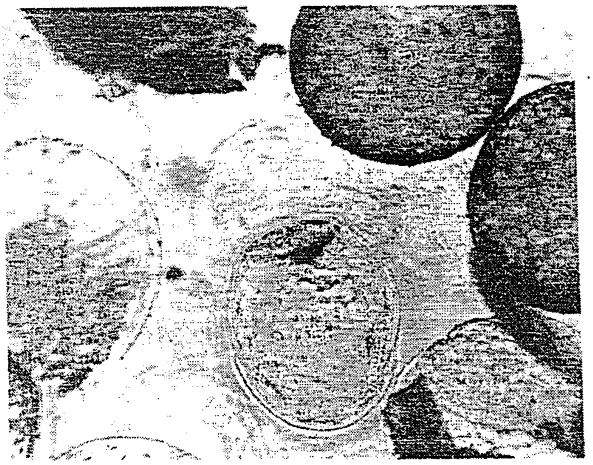


도면 6

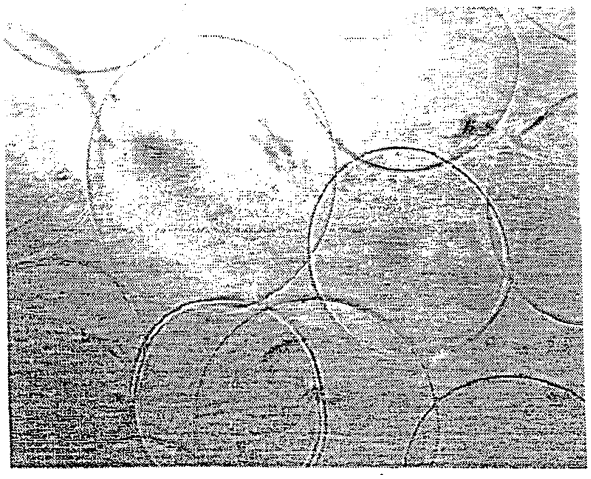


도면 7

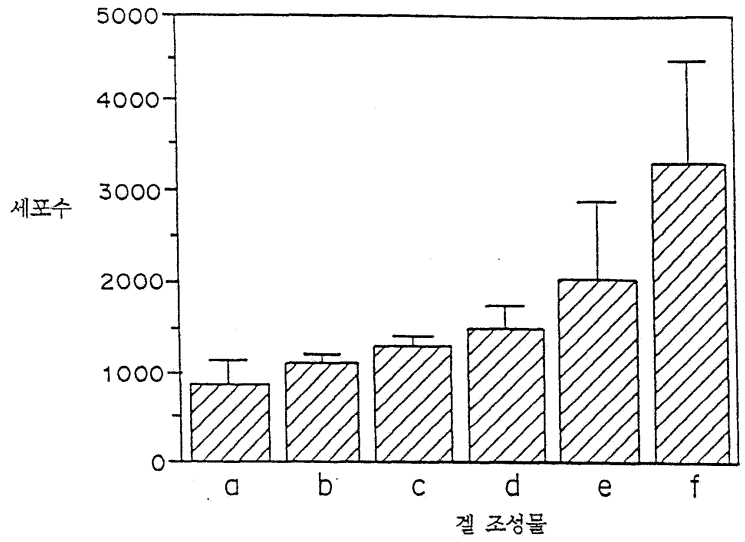
(가)



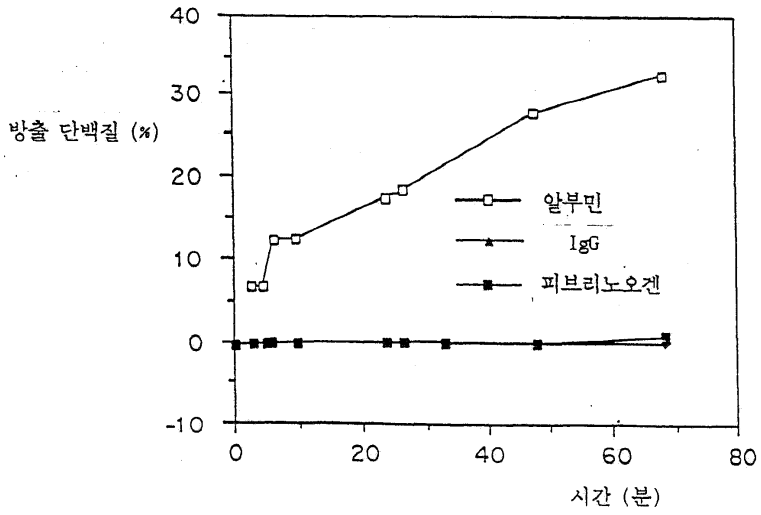
(나)



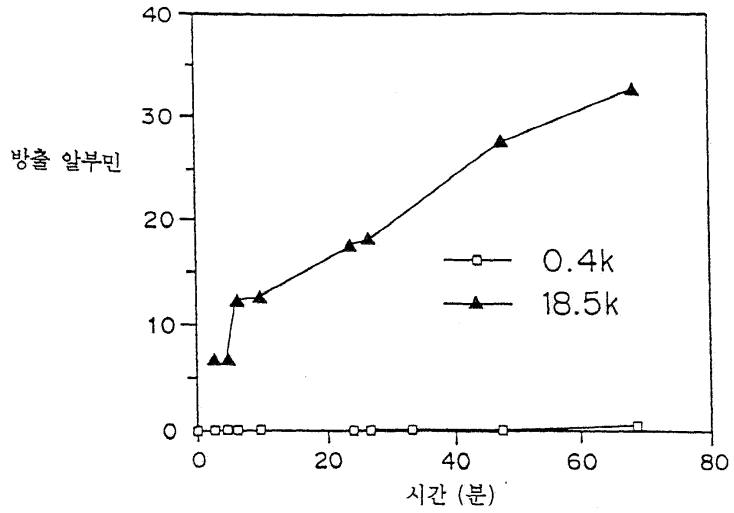
도면 8


5000
4000
3000
2000
1000
0
세포수
a
b
c
d
e
f
겔 조성물

도면 9

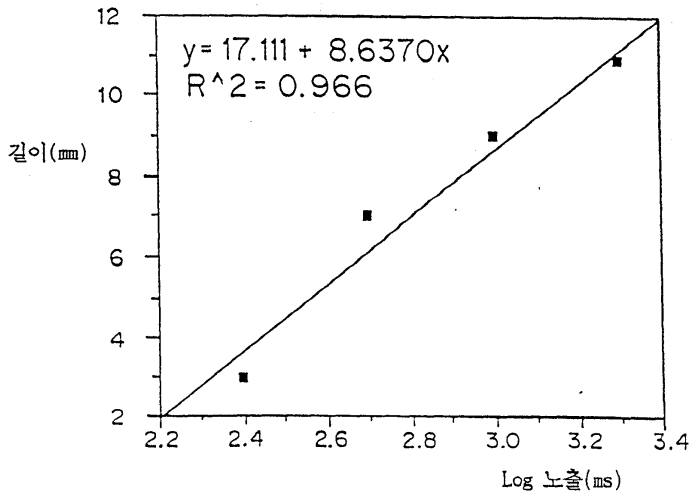

40
30
20
10
0
-10
방출 단백질 (%)
0
20
40
60
80
시간 (분)
알부민
IgG
피브리노오겐

도면 10

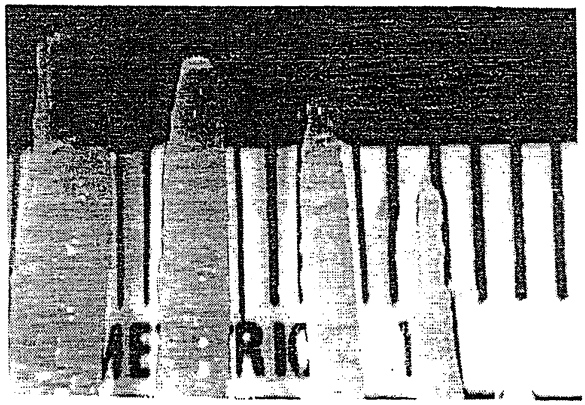


도면 11

(가)

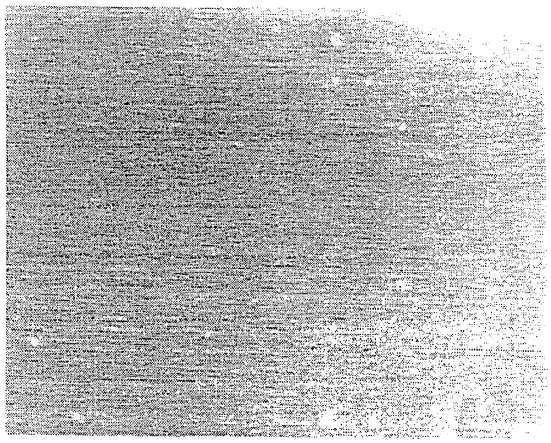


(나)

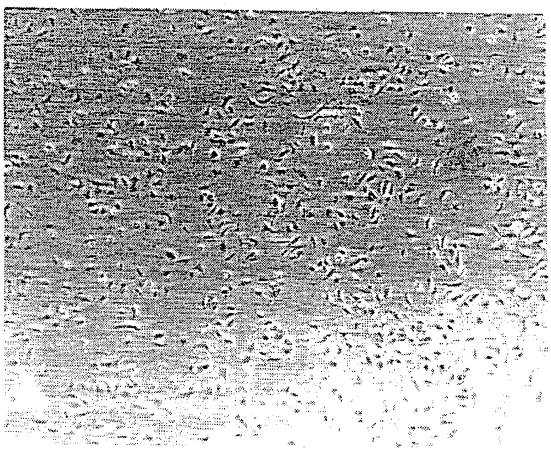


도면 12

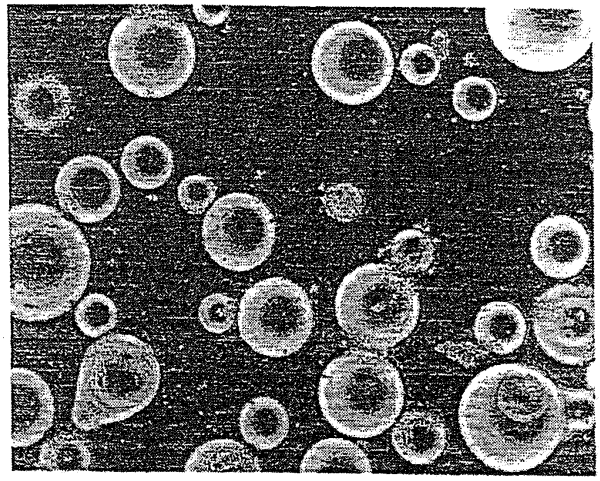
(가)



(나)

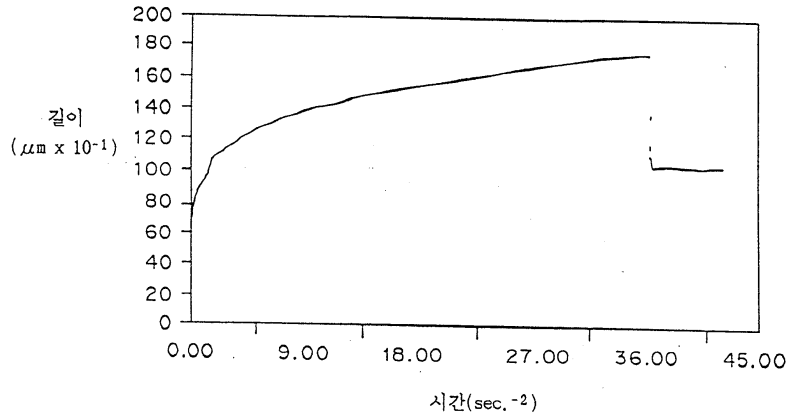


도면 13



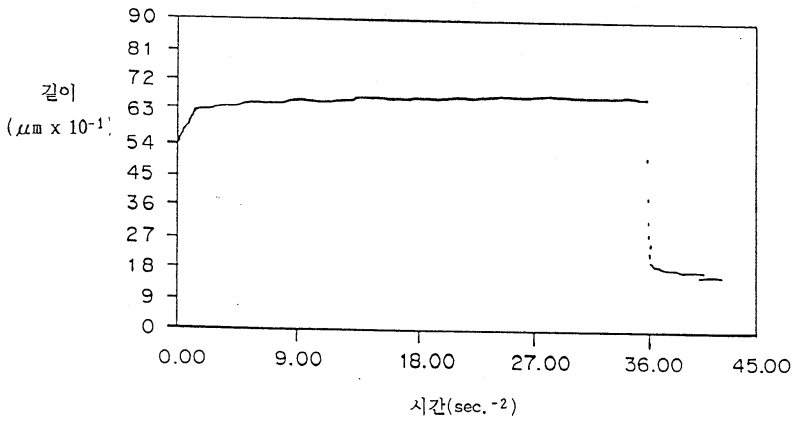
도면 14a

(가)


200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
길이
(㎛ x 10⁻¹)
0.00
9.00
18.00
27.00
36.00
45.00
시간(sec.⁻²)

도면 14b

(나)



도면 14c

(다)

