

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021년 5월 6일 (06.05.2021)



(10) 국제공개번호
WO 2021/085818 A1

- (51) 국제특허분류:
C08J 3/075 (2006.01) *C08L 89/00* (2006.01)
C08H 1/00 (2006.01) *C07K 14/78* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/011037
- (22) 국제출원일: 2020년 8월 19일 (19.08.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2019-0138136 2019년 10월 31일 (31.10.2019)KR
- (71) 출원인: 경희대학교 산학협력단 (**UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY**) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 권일근 (**KWON, Il Keun**); 02757 서울시 성북구 월계로 36길 27, 104동 1705호, Seoul (KR). 이재서 (**LEE, Jae Seo**); 02451 서울시 동대문구 이문로 13길 18,

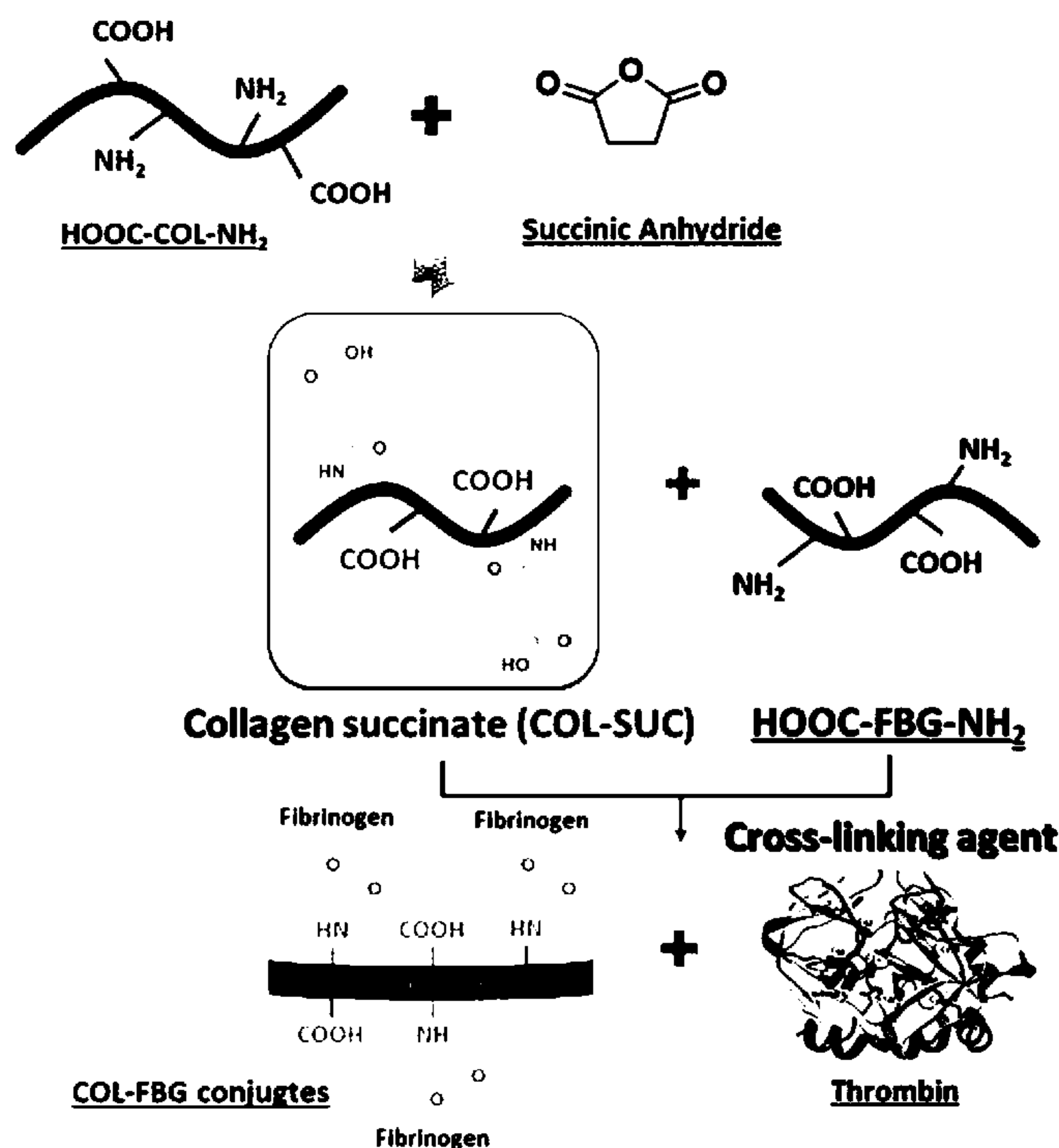
301호, Seoul (KR). 나하람 (**NAH, Ha Ram**); 10374 경기도 고양시 일산서구 강선로 187, 1006동 701호, Gyeonggi-do (KR). 허동녕 (**HEO, Dong Nyoun**); 02760 서울시 성북구 한천로 713, 506동 2101호, Seoul (KR). 문호진 (**MOON, Ho Jin**); 05353 서울시 강동구 천중로 42길 68, 701호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 아이시스 (**ISIS IP LAW LLC**); 06160 서울시 강남구 테헤란로63길 14, 8층, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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,

(54) Title: METHOD FOR PREPARATION OF SUCCINYLATED COLLAGEN-FIBRINOGEN HYDROGEL

(54) 발명의 명칭: 숙신화 콜라겐-피브리노겐 하이드로젤의 제조방법



(57) Abstract: The present technique pertains to a method for preparation of a succinylated collagen-fibrinogen hydrogel and a succinylated collagen-fibrinogen hydrogel prepared thereby. The method for preparation of a succinylated collagen-fibrinogen hydrogel according to the present technique can produce a collagen-based bio-substance in a simple process, wherein collagen can be prevented from being entangled and an improvement can be brought about in hydrophilicity, cell growth rate, cell compatibility, and cell diffusion capability, whereby the bio-substance exhibits excellent biocompatibility in vivo.

[다음 쪽 계속]

SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(57) 요약서: 본 기술은 숙신화 콜라겐-피브리노겐 하이드로겔의 제조방법 및 이에 따라 제조된 숙신화 콜라겐-피브리노겐 하이드로겔에 관한 것으로, 본 기술에 따른 숙신화 콜라겐-피브리노겐 하이드로겔의 제조방법은 간단한 공정으로 콜라겐의 영김현상을 방지하고, 친수성, 세포 증식률, 세포 친화성 및 세포 확산 성능이 향상되어 생체 내 이용적합성이 우수한 콜라겐 기반의 생체 소재를 제조할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 숙신화 콜라겐-피브리노겐 하이드로겔의 제조방법 기술분야

- [1] 본 기술은 숙신화 콜라겐-피브리노겐 하이드로겔의 제조방법 및 이에 따라 제조된 숙신화 콜라겐-피브리노겐 하이드로겔에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 콜라겐은 동물의 뼈와 피부에 주로 존재하며 연골, 장기 막, 머리카락 등에도 분포되어 있는 경단백질로 물고기 비늘의 성분이기도 하다. 교원질이라고도 하며 섬유상 고체로 존재한다. 전자현미경으로 보면 복잡한 가로무늬 구조로 되어 있으며 물, 묽은 산, 묽은 알칼리에 녹지 않지만 끓이면 젤라틴이 되어 용해된다. 3 개의 폴리펩티드 사슬이 꼬여 있는 삼중나선형 구조로 특히 하이드로프롤린의 함량이 많은 단백질이다. 콜라겐의 아미노산 서열은 '글리신-프롤린-X'나 '글리신-아미노산-하이드록시프롤린'으로 주된 구성인 아미노산은 글리신, 하이드록시프롤린, 프롤린 등이다. 또한 트립신과 같은 단백질 분해효소에 의하여 분해되지 않고, 콜라게나아제에 의하여 분해된다. 조직으로부터 콜라겐을 분리하는 방법은 유기용매로 추출하여 산·알칼리 처리를 한 후 트립신·히알루로니다아제를 작용시키는 것이다. 이러한 과정을 통해 불용성 물질인 콜라겐을 얻는다.
- [3] 콜라겐은 대표적인 생분해성 고분자 물질로 조직공학에서 지지체로써 널리 사용되어왔다. 콜라겐은 불용성이지만 생체 성분으로 안정성이 뛰어나고, 동물 간에 상동성이 높기 때문에 면역 반응을 일으키기 어려운 등의 이점을 갖는다. 이 때문에, 콜라겐은 식품, 의약품, 화장품 분야에서 활발하게 이용되어 왔다. 그러나 콜라겐은 pH 5 이상에서는 잘 용해되지 않고, 침전하여 응집된다. 기존에는 주로 약한 산성 조건에서 콜라겐을 가용화하였으나 산성 상태에서 콜라겐을 용해시켜 가용화한 것을 그대로 사용하여 하이드로겔로 제조하고 이를 생체 소재로 사용할 경우 세포에 악영향을 미칠 수 있다.
- [4] 이와 관련하여 대한민국 등록특허 제10-0465015호는 효소처리를 통해 비콜라겐성 물질을 제거하고 면역성을 감소시킨 후 유기 용매를 이용해 지방성 불순물 및 불용성 콜라겐을 추출하여 제거함으로써 높은 순도의 제1형 콜라겐을 제조하는 방법에 대해 개시하고 있다. 그러나, 이와 같이 유기용매를 사용하는 경우에는 콜라겐의 변성이 있을 수 있고 인체에 유해한 유기용매의 사용은 분리된 콜라겐을 이용하여 하이드로겔을 제조할 경우 생체 적용 시 부작용을 일으킬 수 있다는 문제가 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 기술의 목적은, 간단한 공정을 통해 콜라겐에 숙신산을 결합시켜 친수성이

향상되고 생체 내 이용적합성이 향상된 숙신화 콜라겐을 제조하고, 이를 이용하여 생체 소재로 사용될 수 있는 숙신화 콜라겐-피브리노겐 하이드로겔을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

- [6] 본 기술의 다른 목적은 상기 방법에 따라 제조된 숙신화 콜라겐-피브리노겐 하이드로겔을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [7] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 기술은 콜라겐을 약산에 용해하고, 4-디메틸아미노피리딘(DMAP)을 첨가하면서 교반하는 단계; 상기 교반물에 숙신산 무수물(Succinic anhydride)를 실온에서 첨가하여 혼합하는 단계; 상기 혼합물을 교반하면서 NaOH를 첨가하여 pH 7 내지 8로 조절하여 반응시키는 단계; 상기 반응물을 투석시키고, 투석된 용액을 동결 건조하여 숙신화 콜라겐을 제조하는 단계; 상기 숙신화 콜라겐을 탈이온수에 용해시키는 단계; 상기 탈이온수에 용해된 숙신화 콜라겐에 탈이온수에 용해된 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 히드로클로라이드와 N-하이드록시석신이미드를 첨가하면서 교반하는 단계; 인산염 완충 식염수에 용해된 피브리노겐을 첨가하면서 교반하는 단계; 및 상기 교반물을 투석하고, 투석된 용액을 동결 건조하여 숙신화 콜라겐-피브리노겐 복합체를 제조하는 단계; 상기 콜라겐-피브리노겐 복합체를 인산염 완충 식염수에 용해시키는 단계; 상기 용해액에 인산염 완충 식염수에 용해된 트롬빈 용액 및 염화칼슘 용액을 혼합하는 단계; 및 열을 가하여 겔화시키는 단계;를 포함하는 콜라겐-피브리노겐 하이드로겔의 제조방법을 제공한다.
- [8] 또한, 본 기술은 상기 방법에 따라 제조된 숙신화 콜라겐-피브리노겐 하이드로겔의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [9] 본 기술에 따른 숙신화 콜라겐-피브리노겐 하이드로겔의 제조방법은 간단한 공정으로 콜라겐의 엉김현상을 방지하고, 친수성, 세포 증식률, 세포 친화성 및 세포 확산 성능이 향상되어 생체 내 이용적합성이 우수한 콜라겐 기반의 생체 소재를 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [10] 도 1은 본 기술에 따라 숙신화 콜라겐을 제조하고 숙신화 콜라겐에 피브리노겐을 결합한 숙신화 콜라겐-피브리노겐의 제조 과정을 나타낸 모식도이다.
- [11] 도 2는 (아텔로)콜라겐 및 본 기술에 따른 숙신화 콜라겐(COL-SUC)을 탈이온수에 각각 2% 농도로 용해시킨 결과를 비교한 사진이다.
- [12] 도 3은 본 기술에 따라 제조된 COL-SUC의 세포 증식 성능(생체 적합성)을 평가하기 위하여 콜라겐 플레이트 코팅 시험을 한 결과를 나타낸 것이다.
- [13] 도 4는 푸리에 변환 적외선 분광계(FT-IR, Thermo Scientific Nicolet 380

spectrometer, USA))를 사용하여 본 기술에 따른 COL-SUC 및 COL-FBG의 표면의 화학상태를 측정된 결과를 나타낸 것이다.

[14] 도 5는 본 기술에 따른 COL-SUC 및 COL-FBG의 열 중량 분석(TGA) 결과를 나타낸 것이다.

[15] 도 6은 본 기술에 따른 COL-FBG 하이드로겔의 유동성 실험 결과를 나타낸 것이다.

[16] 도 7은 본 기술에 따른 COL-FBG 하이드로겔의 생체 적합성을 평가시험 결과를 나타낸 것이다.

[17] 도 8은 본 기술에 따른 COL-FBG 하이드로겔의 알칼리성 포스파타제(ALP) 활성을 평가시험 결과를 나타낸 것이다.

[18] 도 9는 본 기술에 따른 COL-FBG 하이드로겔의 생체 내 이용가능성 평가시험 결과를 나타낸 것이다.

[19] 도 10은 2%의 COL-FBG 하이드로겔로 실험한 COL-FBG와 골 이식편의 혼합비율에 따른 ALP 활성 측정결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[20] 하나의 양태로 본 기술은 (a) 콜라겐을 약산에 용해하고, 4-디메틸아미노피리딘(DMAP)을 첨가하면서 교반하는 단계; (b) 상기 교반물에 숙신산 무수물(Succinic anhydride)를 실온에서 첨가하여 혼합하는 단계; (c) 상기 혼합물을 교반하면서 NaOH를 첨가하여 pH 7 내지 8로 조절하여 반응시키는 단계; (d) 상기 반응물을 투석시키고, 투석된 용액을 동결 건조하여 숙신화 콜라겐을 제조하는 단계; (e) 상기 숙신화 콜라겐을 탈이온수에 용해시키는 단계; (f) 상기 탈이온수에 용해된 숙신화 콜라겐에 탈이온수에 용해된 1-에틸-3-(3-디메틸 아미노프로필) 카르보디이미드 히드로클로라이드와 N-하이드록시석신이미드를 첨가하면서 교반하는 단계; (g) 인산염 완충 식염수에 용해된 피브리노젠을 첨가하면서 교반하는 단계; 및 (h) 상기 교반물을 투석하고, 투석된 용액을 동결 건조하여 숙신화 콜라겐-피브리노젠 복합체를 제조하는 단계; (i) 상기 콜라겐-피브리노젠 복합체를 인산염 완충 식염수에 용해시키는 단계; (j) 상기 (i) 단계의 용해액에 인산염 완충 식염수에 용해된 트롬빈 용액 및 염화칼슘 용액을 혼합하는 단계; 및 (k) 열을 가하여 겔화시키는 단계;를 포함하는 숙신화 콜라겐-피브리노젠 하이드로겔의 제조방법을 제공한다.

[21] 상기 (a) 단계의 약산은 pH 3 내지 6의 산일 수 있으며, 바람직하게는 아세트산일 수 있다.

[22] 상기 (b) 단계에서 숙신산 무수물은 반응의 적정성을 고려하여 콜라겐 100 중량부에 대하여 20 내지 50 중량부를 첨가하는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 25 내지 45 중량부, 보다 더 바람직하게는 30 내지 40 중량부를 첨가하는 것이 바람직하다.

- [23] 상기 (d) 단계의 투석은 제조되는 숙신산 콜라겐의 크기를 고려하여 3000 내지 3500Da의 투석 튜브를 사용하는 것이 바람직하다.
- [24] 상기 (h) 단계의 투석은 제조되는 숙신화 콜라겐-피브리노겐 복합체의 크기를 고려하여 10 내지 20kDa의 투석 튜브를 사용하는 것이 바람직하다.
- [25] 상기 (i) 단계는 상기 콜라겐-피브리노겐 복합체의 농도가 1 내지 5%의 농도가 되도록 인산염 완충 식염수에 용해시키는 것이 바람직하다.
- [26] 본 기술은 다른 하나의 양태로 상기 방법에 따라 제조된 숙신화 콜라겐-피브리노겐 하이드로겔을 제공한다. 본 기술에 따라 제조된 하이드로겔은 세포 진화성과 열적 안정성이 우수하며, 생체 내 이식 시, 세포 증식과 골 분화 성능이 뛰어나다.

[27]

[28] 이하, 도면을 참조하여 본 기술의 실시예의 구성 및 작용을 상세하게 설명한다.

[29]

[30] **실시예 1: 재료**

[31] 콜라겐은 다림 티센사(Dalim Tissen, 한국)의 타입 1 아텔로콜라겐(Type 1 Atelocollagen)을 사용하였다. 숙신산 무수물(SA: Succinic anhydride, > 99%), 4-디메틸아미노피리딘(DMAP: 4-dimethylaminopyridine, > 98%), 인간 혈장 50-70% 단백질 유래 피브리노겐, 인간 혈장 유래 트롬빈, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 히드로클로라이드(EDC: 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) 및 N-하이드록시석신이미드(NHS: N-hydroxysuccinimide)는 시그마-알드리치사(Sigma-Aldrich, 미국)에서 구입한 것을 사용하였다. 탈이온수(DW: Deionized water)는 초-순수 시스템(Puris-Ro800, Bio Lab Tech., Korea)을 이용하여 제조하였다. 아세트산(Acetic acid)은 준세이사(Junsei Chemical Co., Ltd., 일본)에서 구입하였다. 돌베코 인산염 완충 식염수(DPBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline, pH 7.4)는 기코사(Gibco, 미국)로부터 구입하였다. 인간 지방 조직 유래 MSC, 인간 지방 조직 유래 MSC 성장 배지 및 보충제(10% FBS, 0.02% 페니실린 및 스트렙토마이신)는 CEFO CO.(CEFOgro™ ADMSC)로부터 구입하였다. 48-웰 세포 배양 플레이트 및 세포 배양 디쉬(100mm x 20mm)는 코닝 인코포레이티드사(Corning Incorporated, USA)로부터 구입하였다. EZ-Cytox(en-hanced cell viability assay kit)는 도젠사(Dogen, 한국)에서 구입하였다. 모든 시약 및 용매는 추가적인 정제 없이 그대로 사용하였다.

[32]

[33] **실시예 2: 숙신화 콜라겐(COL-SUC) 제조**

[34] 도 1은 본 기술에 따라 숙신화 콜라겐을 제조하고 숙신화 콜라겐에 피브리노겐을 결합한 숙신화 콜라겐-피브리노겐의 제조 과정을 나타낸 모식도이다.

[35] 본 기술에 따른 숙신화 콜라겐(COL-SUC)은 산성조건에서 고리를 여는

중합반응(ring-opening polymerization)을 통하여 합성하였다.

아텔로콜라겐(500mg, 1당량)을 0.1M 아세트산에 0.3% 농도로 용해시키고 밤새 교반하였다. 이어서 촉매로 4-디메틸아미노피리딘(DMAP, 583.7mg, 5.8mmol)을 첨가하면서 1시간 동안 격렬하게 자기로 교반(magnetic stirring)하여 반응시켰다. 반응이 완료된 후, 상기 용액에 숙신산 무수물(SA, 145.9mg, 1.45mmol)를 3번 실온에서 1시간 동안 첨가하였다. 이후, 상기의 혼합물을 실온에서 교반하면서 1N NaOH를 이용하여 pH 7 내지 8로 조정하였다. 이때 반응 혼합물은 투명한 용액이었다. pH가 조정된 용액을 밤새 반응시킨 후, 3500Da 투석 튜브를 사용하여 반응 혼합물을 탈이온수(DW)에 대해 3일 동안 투석시켰다. 투석된 용액을 동결 건조하여 -70°C에서 보관하였다.

- [36] 도 2는 (아텔로)콜라겐 및 본 기술에 따른 숙신화 콜라겐(COL-SUC)을 탈이온수에 각각 2% 농도로 용해시킨 결과를 비교한 사진이다. 도 2에 도시된 바와 같이, 아텔로콜라겐(좌)의 경우 용해가 잘 이루어지지 않은 것으로 나타났으나, 본 기술에 따른 숙신화 콜라겐(COL-SUC)(우)의 경우 용해가 잘 이루어지는 것을 육안으로도 확인할 수 있다.

[37]

[38] **실시예 3: COL-SUC 세포 증식 평가**

- [39] 본 기술에 따라 제조된 상기 실시예 2의 COL-SUC의 세포 증식 성능(생체 적합성)을 평가하기 위하여 콜라겐 플레이트 코팅 시험을 하였다.

- [40] 0.1% 아텔로콜라겐(atellocollagen)(비교예) 및 COL-SUC(실시예)를 0.1M 아세트산에 용해시키고, 이와 별개로 0.1% COL-SUC를 탈이온수에 용해시켰다. 콜라겐 코팅을 위해 96-웰 플레이트(96-well plate)에 100 μ l 콜라겐 용액에 2시간 동안 실온에서 침지시켰다. 이 후, 96-웰 플레이트를 콜라겐 용액에서 꺼내 PBS로 3회 세척하고 후드 아래에서 공기 건조시켰다. 대조군(Control)으로는 아텔로콜라겐이나 COL-SUC을 코팅하지 않은 96-웰 플레이트를 사용하였다.

- [41] 인간 지방 조직 유래 MSC 세포(hADSC)를 상기에서 제조한 대조군, 비교예 및 실시예 각각의 96-웰 조직 배양 플레이트에 2x10⁴의 밀도로 시딩(seeding)하였다. hADSC를 인간 지방 조직 유래 MSC 성장 배지 및 보충제(10% FBS, 0.02% 페니실린 및 스트렙토 마이신)에서 성장시켰다. 모든 실험은 멸균된 PBS로 세척하고 배양 배지를 2일마다 교체하였다. 각각의 플레이트를 5% CO₂ 환경, 37°C에서 1, 3 및 7일간으로 기간을 달리하여 각각 배양한 후, 100 μ l의 CCK(Cell Counting Kit) 용액을 각각의 96-웰 조직 배양 플레이트에 첨가하고 2시간 동안 배양하였다.

- [42] 상기 인간 지방 조직 유래 MSC 세포(hADSC)가 배양된 96-웰 조직 배양 플레이트를 벤치마크 플러스 마이크로 플레이트 분광 광도계(Bio-Rad, BR170-6930)를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 3에 도시하였다.

- [43] 도 3에 나타낸 바와 같이, 아텔로콜라겐(비교예)에 비하여 본 기술에 따른

COL-SUC(실시예)가 코팅된 플레이트에서 배양된 세포의 활성이 더 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이는 배양 기간이 길수록 더 눈에 띄는 차이를 보였다. 현미경을 통한 이미지에서도 플레이트에 아무것도 처리하지 않은 그룹(control 그룹)과 아텔로콜라겐으로 코팅한 그룹(비교예)에 비하여 COL-SUC(실시예)에서 세포 증식이 더 활발하게 나타난 것을 확인할 수 있다.

[44]

[45] **실시예 4: 피브리노겐 접합 숙신화 콜라겐 복합체(COL-FBG) 제조**

[46] 본 기술에 따른 피브리노겐 접합 숙신화 콜라겐 복합체(COL-FBG)를 제조하였다.

[47] 상기 실시예 2에 따라 제조한 COL-SUC(30mg, 1 당량)을 15ml 탈이온수에 2시간 동안 용해시키고, 이와 별개로 피브리노겐(FBG, 680mg, 20 당량)을 20ml 인산염 완충 식염수(PBS, pH 7.4)에 10분 동안 용해시켰다. 또한 상기 용액과는 별개로 1-에틸-3-(3-디메틸 아미노프로필) 카르보디이미드 히드로클로라이드(EDC, 0.0776mg, 5 당량) 및 N-하이드록시석신이미드(NHS, 0.1151mg, 10당량)를 1ml 탈이온수에 용해시켰다. EDC 및 NHS를 상기 COL-SUC 용액에 첨가하면서 15분 간 격렬하게 자기 교반하였다. 이 후, FBG 용액을 천천히 첨가한 후, 반응 혼합물을 1시간 동안 교반하였다. 교반이 완결되면 반투명 용액이 얻어지는데, 이 용액을 14kDa 투석 튜브를 사용하여 PBS에 대해 3일 동안 투석하였다. 투석된 용액은 투명한 용액이고, 이를 동결 건조하고 -70°C에서 보관하였다.

[48]

[49] **실시예 5: COL-SUC 및 COL-FBG의 특성 평가**[50] **5-1. 적외선 분광계 측정**

[51] 상기 실시예 2에 따라 제조한 COL-SUC 및 실시예 4에 따라 제조한 COL-FBG의 적외선 분광 특성을 평가하였다. 도 4는 푸리에 변환 적외선 분광계(FT-IR, Thermo Scientific Nicolet 380 spectrometer, USA))를 사용하여 본 기술에 따른 COL-SUC 및 COL-FBG의 표면의 화학상태를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[52] COL-SUC에 피브리노겐을 합성하는 과정은 COL-SUC의 카복실 그룹과 피브리노겐의 아민 그룹이 만나 아마이드 그룹을 형성하여 이루어진다. 도 3에 나타난 바와 같이, 아마이드 I(1644cm^{-1})과 아마이드 II(1536cm^{-1})의 피크를 통하여 합성이 잘 이루어졌음을 확인할 수 있다.

[53]

[54] **5-2. 열 중량 분석**

[55] 상기 실시예 2에 따라 제조한 COL-SUC 및 실시예 4에 따라 제조한 COL-FBG의 열 중량 분석(TGA: Thermogravimetric analysis)을 실시하였다.

[56] 도 5는 본 기술에 따른 COL-SUC 및 COL-FBG의 열 중량 분석(TGA) 결과를 나타낸 것이다. TGA는 TA Instruments 2960 SDT V3.0F를 사용하여 수행되었다.

TGA는 복합체의 합성 여부, 열 안정성, 피브리노겐의 결합량을 확인하기 위한 것이다.

[57] 실시예 2에 따라 제조한 COL-SUC 및 실시예 4에 따라 제조한 COL-FBG를 포함하여 다양한 샘플들을 2~6mg의 양으로 반응로(furnace) 내의 백금 팬에 넣었다. 샘플을 질소 흐름 하에서 10°C/min의 가열 속도로 10°C에서부터 800°C까지 가열하였다.

[58] 도 5에 나타난 바와 같이, 본 기술에 따른 COL-SUC의 경우 순수한 콜라겐(COL)과 비교하여 열 안정성이 약 25°C 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 본 기술에 따른 COL-FBG의 경우 순수한 피브리노겐(FBG)과 비교하여 열 안정성이 약 10°C 증가한 것을 확인할 수 있었다. 또한 COL-FBG에서 FBG가 결합한 양을 계산한 결과, COL-FBG에서 FBG가 88.8% 결합되어 있는 것을 확인할 수 있다(FBG 45% 대비 COL-FBG에 붙은 비율 40%).

[59]

[60] **실시예 6 - COL-FBG 하이드로겔 제조**

[61] 실시예 4에 따라 제조된 COL-FBG를 이용하여 COL-FBG 하이드로겔을 제조하였다. COL-FBG는 PBS에 용해시켜 각각 2%와 4% 농도로 준비하였다. 이와 별개로 가교제를 제조하기 위해 먼저 트롬빈(TRB)을 1000IU/mL의 농도로 실온에서 2분 동안 교반하면서 PBS에 용해시켰다. 또 50mM 농도의 염화칼슘 용액도 준비하였다. 이 후 트롬빈 용액과 염화칼슘 용액이 1:1의 비율이 되도록 첨가하여 가교제를 제조하였다. 상기 가교제 용액을 미리 준비한 COL-FBG 용액에 첨가하여 98:2의 부피비(COL-FBG 용액:가교제 용액)로 혼합하여 혼합물이 균질해질 때까지 교반하였다. 독립된 겔이 형성될 때까지 인큐베이터에서 온도를 37°C로 증가시켜 COL-FBG 겔화를 유도하였다. 이어서 피브리노겐을 피브린으로 중합시키기 위하여 10IU/mL의 트롬빈 용액에서 배양하여 COL-FBG 하이드로겔을 제조하였다.

[62]

[63] **실시예 7: COL-FBG 하이드로겔의 특성 평가**

[64] **7-1. 유동성 실험**

[65] 상기 실시예 6에서 제조된 본 기술에 따른 COL-FBG 하이드로겔의 유동성(rheometer experiment)을 실험하였다. 도 6은 본 기술에 따른 COL-FBG 하이드로겔의 유동성 실험 결과를 나타낸 것이다.

[66] 유동성 실험은 실온(25°C) 및 37°C의 진동 모드에서, 평행판이 있는 레오미터(rotating rheomet)(Anton Paar, Austria)를 사용하여 수행되었다. 디스크 형태로 제조된 COL-FBG 하이드로겔을 8mm 직경의 플레이트-플레이트 지오메트리(plate-plate geometry) 및 1mm 갭을 갖는 회전식 레오미터로 주파수-의존 점탄성 거동(frequency-dependent viscoelastic behavior)을 측정하였다. 각 샘플의 저장 탄성률(G') 및 손실 탄성률(G'') 값은 다음 식 1을 이용하여 계산되었고, 주파수 스윕은 1%의 일정한 변형률에서 0.1~10Hz

범위에서 수행되었다.

[67] [식 1]

$$[68] \quad G' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \cos \delta, \quad G'' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \sin \delta$$

[69] 도 6에 나타난 바와 같이, 2%와 4%의 경우 모두 37°C에서 좀 더 높은 유동성을 가지는 것을 확인할 수 있다. 이는 37°C에서 콜라겐이 자연적으로 겔화되며, 피브리노겐이 37°C를 기점으로 피브린으로 전환되어 졸-겔 전환이 되기 때문이다. 기존에 시판되고 있는 콜라겐젤이나 피브린 젤은 강도가 100Pa정도인데 반해, 실시예 6의 COL-FBG 하이드로겔은 2%에서는 400Pa, 4%에서는 강도가 850Pa정도로 나타났다. 이는 COL-FBG 하이드로겔이 더 단단하게 겔화되었기 때문이다. 따라서 본 기술에 따른 실시예 6의 COL-FBG 하이드로겔이 생체 내에서 이용되기에 더 적합한 강도의 유동성을 가지는 것을 알 수 있다.

[70]

[71] 7-2. 생체 적합성 평가

[72] 상기 실시예 6에서 제조된 본 기술에 따른 COL-FBG 하이드로겔의 생체 적합성을 평가시험을 수행하였다. 생체 적합성 평가를 위한 세포는 인간 지방 조직 유래 MSC 세포(hADSC)를 96-웰 조직 배양 플레이트에 2×10^4 의 밀도로 캡슐화하였다. hADSC를 인간 지방 조직 유래 MSC 성장 배지 및 보충제(10% FBS, 0.02% 페니실린 및 스트렙토 마이신)에서 성장시켰다. 모든 실험에서, 하이드로겔을 멸균된 PBS로 세척하고 배양 배지를 2일마다 교체하였다. 5% CO₂ 환경, 37°C에서 1, 3 및 7일간 배양한 후, 100 μ l의 CCK 용액을 각 웰에 첨가하고 플레이트를 2시간 동안 인큐베이션 하였다. 흡광도는 벤치마크 플러스 마이크로 플레이트 분광 광도계(Bio-Rad, BR170-6930)를 사용하여 측정하였다. 그 결과로도 7에 나타내었다.

[73] 도 7에 도시된 바와 같이, 하이드로겔의 농도를 2%, 4%로 하여 세포 독성을 평가하고, F-actin으로 염색하여 세포의 증식률을 형광 현미경으로 확인하였다. 세포 독성 평가와 현미경 관찰결과, 2% 하이드로겔의 세포 증식률이 더 좋은 것으로 확인되었다. 상대적으로 4% 하이드로겔의 경우에는 내부가 너무 조밀하여 세포가 잘 증식하지 못하는 것을 확인할 수 있다. 일반적으로 하이드로겔 내부에서는 세포가 증식하여 뚫어 나가는 경우가 적으나, 실시예 6에서 제조된 본 기술에 따른 COL-FBG 하이드로겔은 세포에 친화적인 콜라겐과 피브린이 포함하고 있어 이와 같은 증식이 가능한 것이다. 도 7에서 대조군(control)은 플레이트(plate)에 2D로 배양한 것이다.

[74]

[75] 7-3. 알칼리성 포스파타제(ALP) 활성을 평가

[76] 상기 실시예 6에서 제조된 본 기술에 따른 COL-FBG 하이드로겔의 알칼리성

포스파타제(ALP: alkaline phosphatase) 활성 평가시험을 수행하였다. 인간 지방 조직 유래 MSC 세포(hADSC)를 48-웰 조직 배양 플레이트에 2×10^4 의 밀도로 캡슐화하고, 성장 배지에 1일간 배양한 후 배지를 골 형성(osteogenic) 배지로 변경하였다. 세포 배양은 5, 10 및 15일 에 각각 채취하여 샘플로 사용하였다. ALP 활성 분석을 위해, 배양된 hADSC를 DPBS로 세척하고 4°C에서 1시간 동안 3X RIPA 완충액으로 용해시켰다. 용해된 hADSC를 10,000rpm에서 10분 동안 원심분리하고, 상청액을 37°C 인큐베이터에서 p-니트로페놀포스페이트(pNPP: p-nitrophenolphosphate, Sigma Aldrich)와 30분 동안 반응시켰다. p-니트로페놀 생산량은 405nm 파장에서 ELISA 판독기를 사용하여 측정되었다. 그 결과를 도 8에 나타내었다.

- [77] 도 8에 도시한 바와 같이, COL-FBG 하이드로겔을 염색하여 알칼리성 포스파타제 활성을 확인하였다. 하이드로겔 내부가 더 조밀한 4%의 하이드로겔보다 2%의 하이드로겔 내에서 골분화가 잘 이루어지는 것을 확인할 수 있다. 도 8에서 NC는 플레이트(plate)에 2D로 증식 배지를 이용하여 배양(culture)한 것이고, PC는 플레이트(plate)에 2D로 골분화 배지를 이용하여 배양(culture)한 것이다.

[78]

[79] 7-4. 생체 내 이용가능성 평가

- [80] 상기 실시예 6에서 제조된 본 기술에 따른 COL-FBG 하이드로겔의 생체 내 이용가능성 평가시험을 수행하였다. 시험을 위해 동결 건조된 2%의 COL-FBG를 실온에서 PBS에 용해시켰다. COL-FBG가 용해된 용액을 이용하여 골 이식편(bone graft)을 COL-FBG : 골 이식편이 2:1, 1:2, 1:8 및 1:16의 비율이 되도록 각각 제조하였다.

- [81] 혼합된 용액에 동일한 백분율의 트롬빈 용액을 첨가하고 1mm의 겹을 갖는 2개의 유리 슬라이드 사이에 부었다. 혼합 후 혼합물을 실시예 6에서의 COL-FBG 하이드로겔과 동일한 조건으로 가교시켰다.

- [82] 가교된 복합체는 추가 실험을 위해 직경이 6mm가 되도록 절단하였다. 세포 배양과 흡광도 측정은 상기 실시예 7-2.의 생체 적합성 평가시험과 동일하게 준비하여 측정하였다. 하이드로겔 농도 2로 하여 실험을 수행하였다. 이어서, 세포 독성 평가를 수행하고, F-actin으로 염색하여 세포의 증식률을 형광 현미경으로 확인하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.

- [83] 도 9에 나타난 바와 같이, 2% 하이드로겔을 대조군으로 두고 비교하였을 때 하이드로겔 내에 COL-FBG의 비율이 더 높고 골 이식편이 가장 적게 들어간 그룹(2:1)에서 세포 생존률이 가장 높게 나타났고, 골 이식편이 많이 포함(1:16)될수록 생존률이 낮게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이로부터 COL-FBG의 비율이 높을수록 제조되는 하이드로겔의 COL-FBG가 주변 환경에 더 친화적으로 작용하여 세포의 생존률을 높이는 것을 확인할 수 있다. 도 9에서 대조군(control)은 플레이트(plate)에 2D로 배양한 것이다.

[84] 도 10은 2%의 COL-FBG 하이드로겔로 실험한 COL-FBG와 골 이식편의 혼합비율에 따른 ALP 활성 측정결과를 나타낸 것이다. 도 10에 나타난 바와 같이, 골 이식편이 적게 포함될수록 골분화가 더 잘되는 것을 확인할 수 있다. 도 10에서 NC는 플레이트(plate)에 2D로 증식 배지를 이용하여 배양(culture)한 것이고, PC는 플레이트(plate)에 2D로 골분화 배지를 이용하여 배양(culture)한 것이다.

[85]

[86] 이상 실시예를 통해 본 기술을 설명하였으나, 본 기술은 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 실시예는 본 기술의 취지 및 범위를 벗어나지 않고 수정되거나 변경될 수 있으며, 본 기술분야의 통상의 기술자는 이러한 수정과 변경도 본 기술에 속하는 것임을 알 수 있을 것이다.

산업상 이용가능성

[87] 본 기술에 따라 친수성, 세포 증식률, 세포 친화성 및 세포 확산 성능이 우수한 하이드로겔을 제조할 수 있으므로, 본 기술은 골 충전재, 약물 전달체 등 다양한 생체 적합성 소재의 개발에 활용될 수 있다.

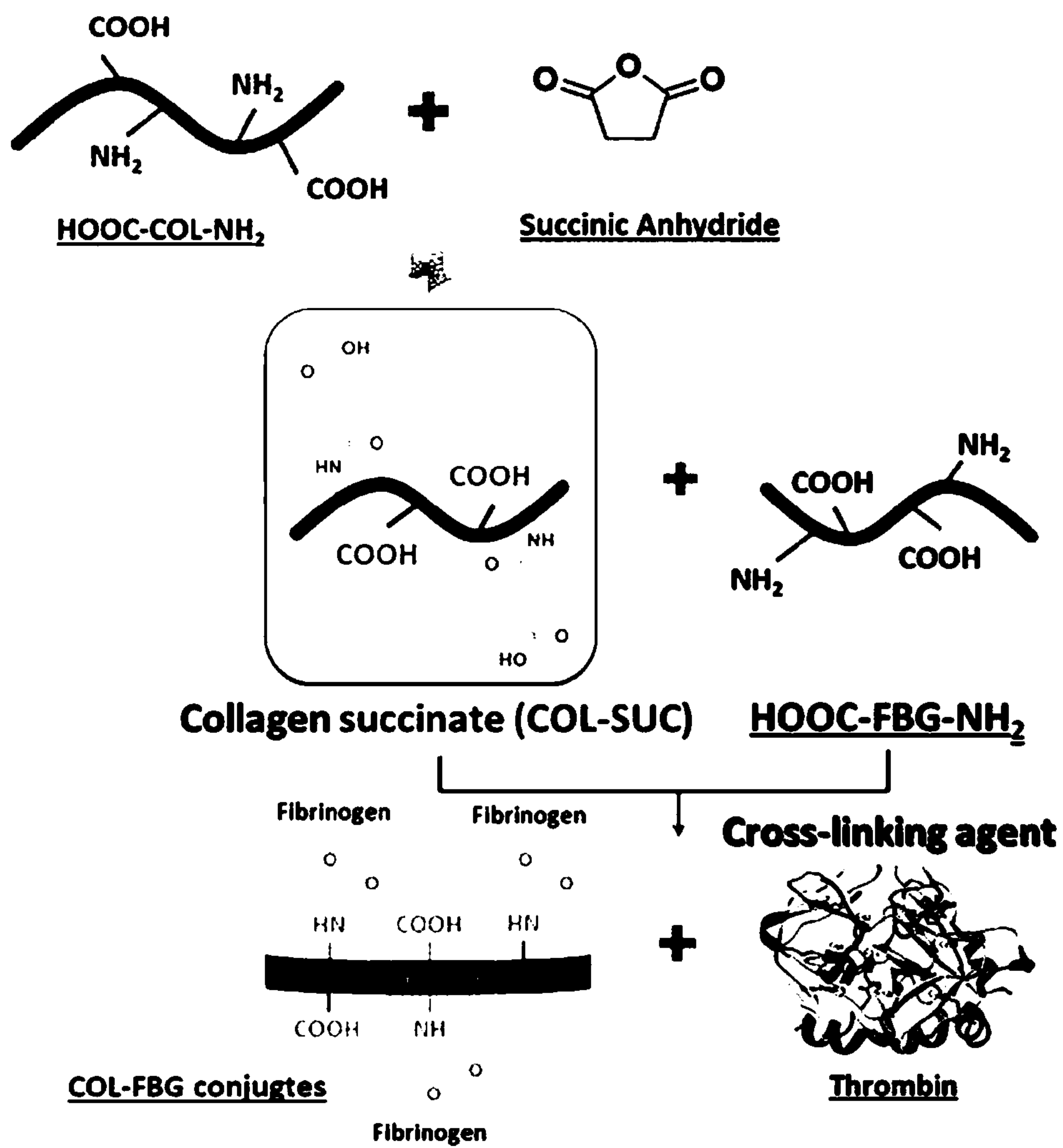
청구범위

- [청구항 1] (a) 콜라겐을 약산에 용해하고, 4-디메틸아미노피리딘(DMAP)을 첨가하면서 교반하는 단계;
 (b) 상기 교반물에 숙신산 무수물(Succinic anhydride)를 실온에서 첨가하여 혼합하는 단계;
 (c) 상기 혼합물을 교반하면서 NaOH를 첨가하여 pH 7 내지 8로 조절하여 반응시키는 단계;
 (d) 상기 반응물을 투석시키고, 투석된 용액을 동결 건조하여 숙신화 콜라겐을 제조하는 단계;
 (e) 상기 숙신화 콜라겐을 탈이온수에 용해시키는 단계;
 (f) 상기 탈이온수에 용해된 숙신화 콜라겐에 탈이온수에 용해된 1-에틸-3-(3-디메틸 아미노프로필) 카르보디이미드 히드로클로라이드와 N-하이드록시석신이미드를 첨가하면서 교반하는 단계;
 (g) 인산염 완충 식염수에 용해된 피브리노겐을 첨가하면서 교반하는 단계;
 (h) 상기 교반물을 투석하고, 투석된 용액을 동결 건조하여 숙신화 콜라겐-피브리노겐 복합체를 제조하는 단계;
 (i) 상기 콜라겐-피브리노겐 복합체를 인산염 완충 식염수에 용해시키는 단계;
 (j) 상기 (i) 단계의 용해액에 인산염 완충 식염수에 용해된 트롬빈 용액 및 염화칼슘 용액을 혼합하는 단계; 및
 (k) 열을 가하여 겔화시키는 단계;를 포함하는 숙신화 콜라겐-피브리노겐 하이드로겔의 제조방법.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
 상기 (a) 단계의 약산은 아세트산인 것을 특징으로 하는 숙신화 콜라겐-피브리노겐 하이드로겔의 제조방법.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서,
 상기 (b) 단계에서 콜라겐 100 중량부에 대하여 숙신산 무수물 20 내지 50 중량부를 첨가하는 것을 특징으로 하는 숙신화 콜라겐-피브리노겐 하이드로겔의 제조방법.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서,
 상기 (d) 단계의 투석은 3000 내지 3500Da의 투석 튜브를 사용하는 것을 특징으로 하는 숙신화 콜라겐-피브리노겐 하이드로겔의 제조방법.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서,
 상기 (h) 단계의 투석은 10 내지 20kDa의 투석 튜브를 사용하는 것을 특징으로 하는 숙신화 콜라겐-피브리노겐 하이드로겔의 제조방법.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서,

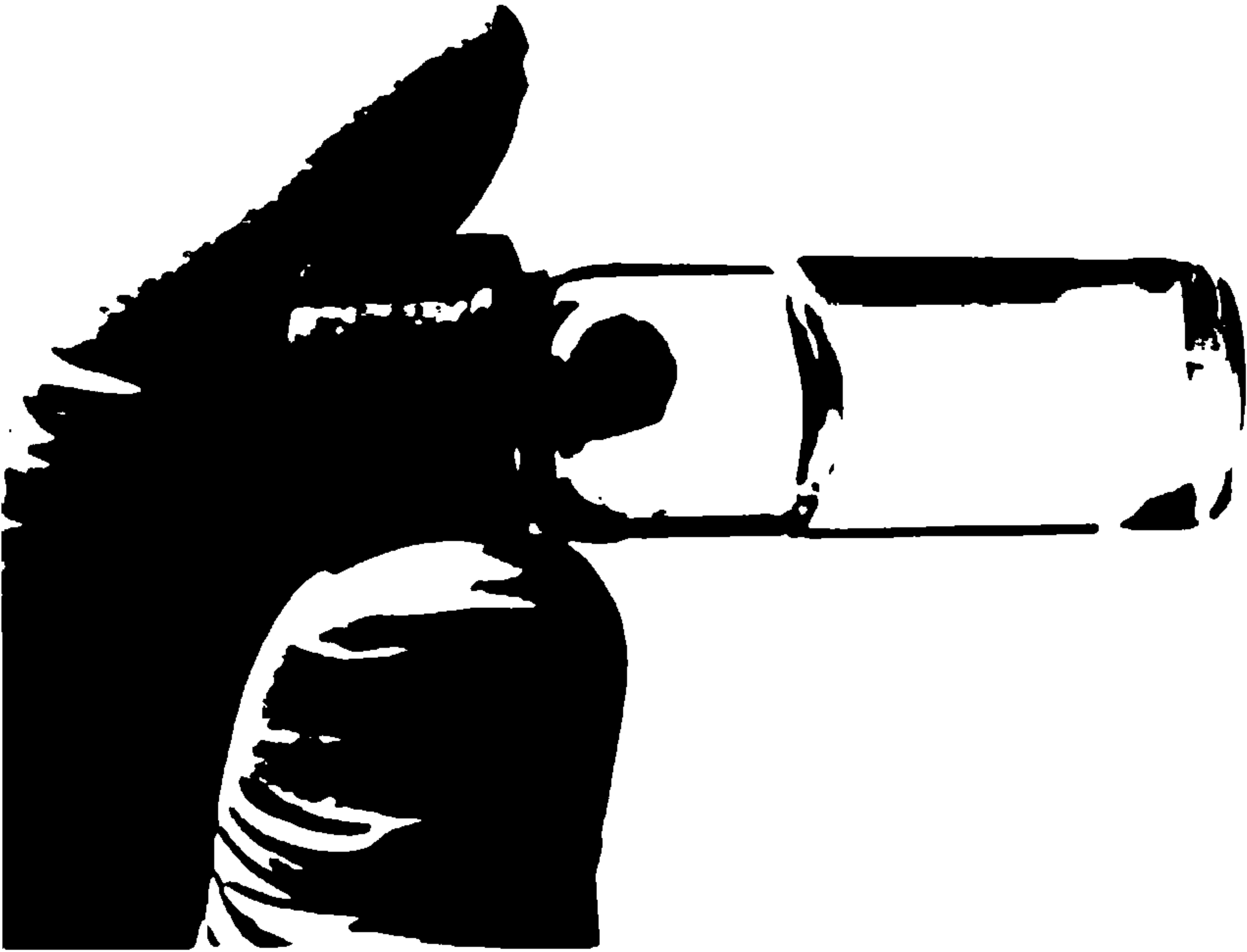
상기 (i) 단계는 상기 콜라겐-피브리노겐 복합체의 농도가 1 내지 5%의 농도가 되도록 인산염 완충 식염수에 용해시키는 것을 특징으로 하는 숙신화 콜라겐-피브리노겐 하이드로겔의 제조방법.

[청구항 7] 제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 따라 제조된 숙신화 콜라겐-피브리노겐 하이드로겔.

[도1]

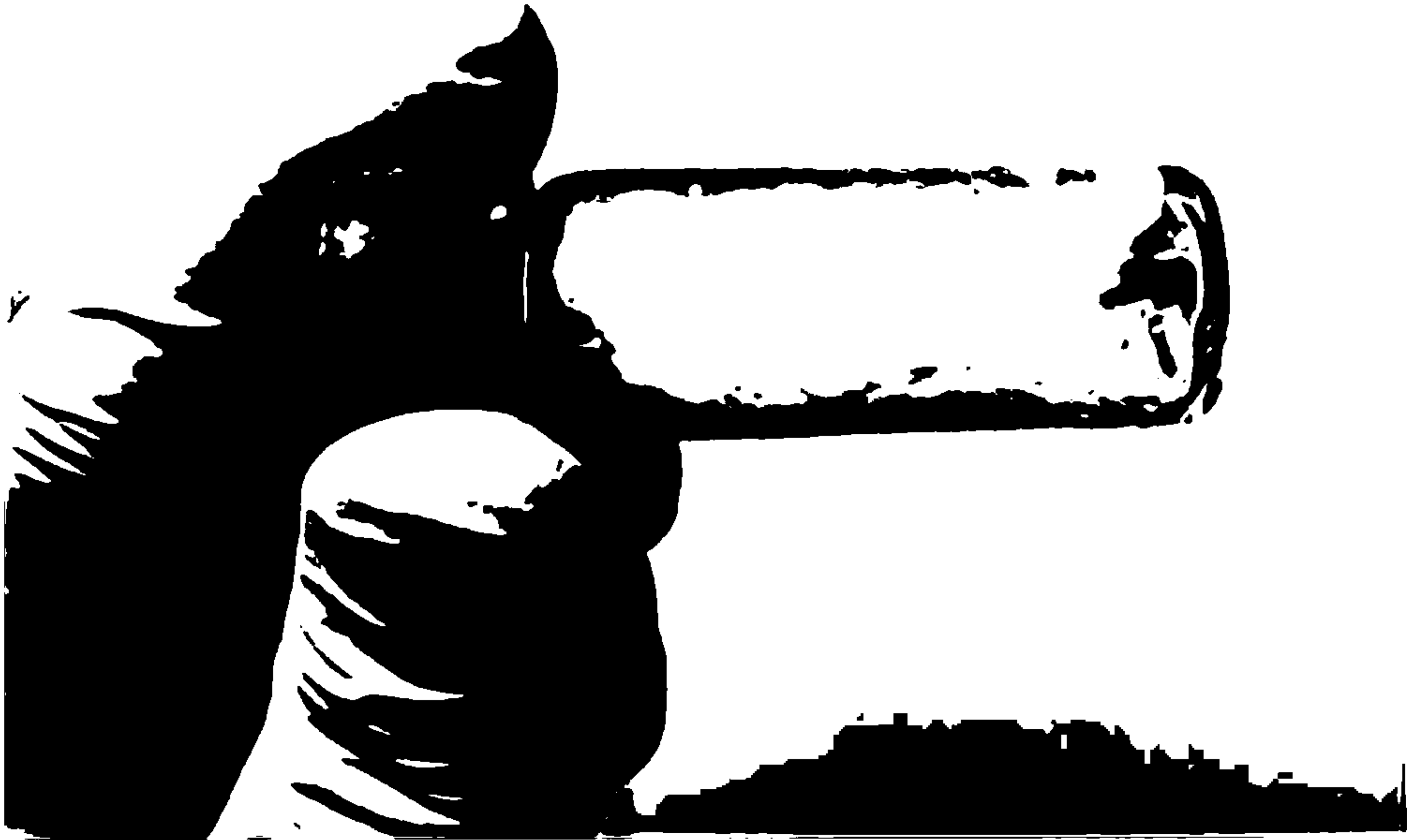


[도2]



Transparent

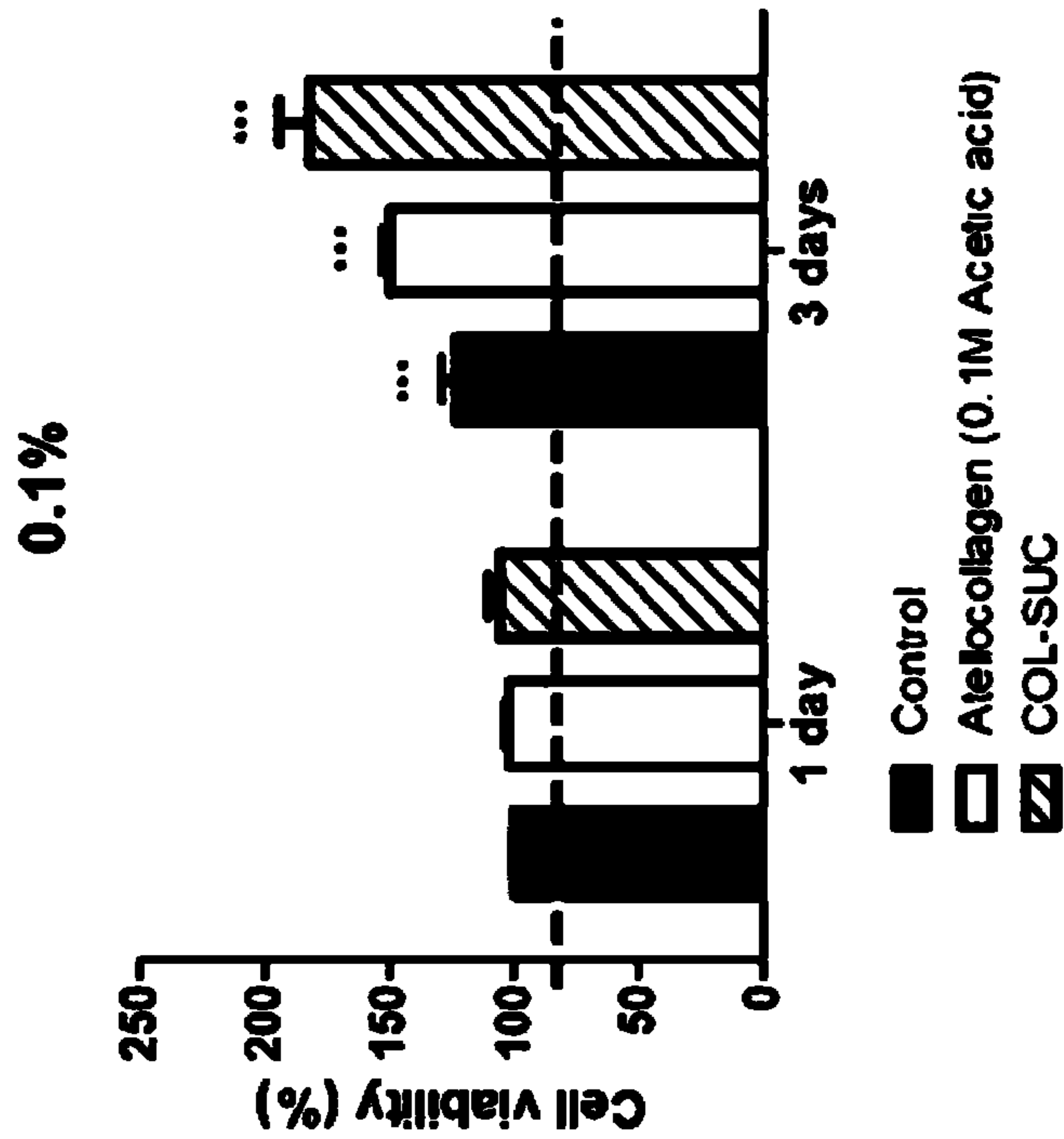
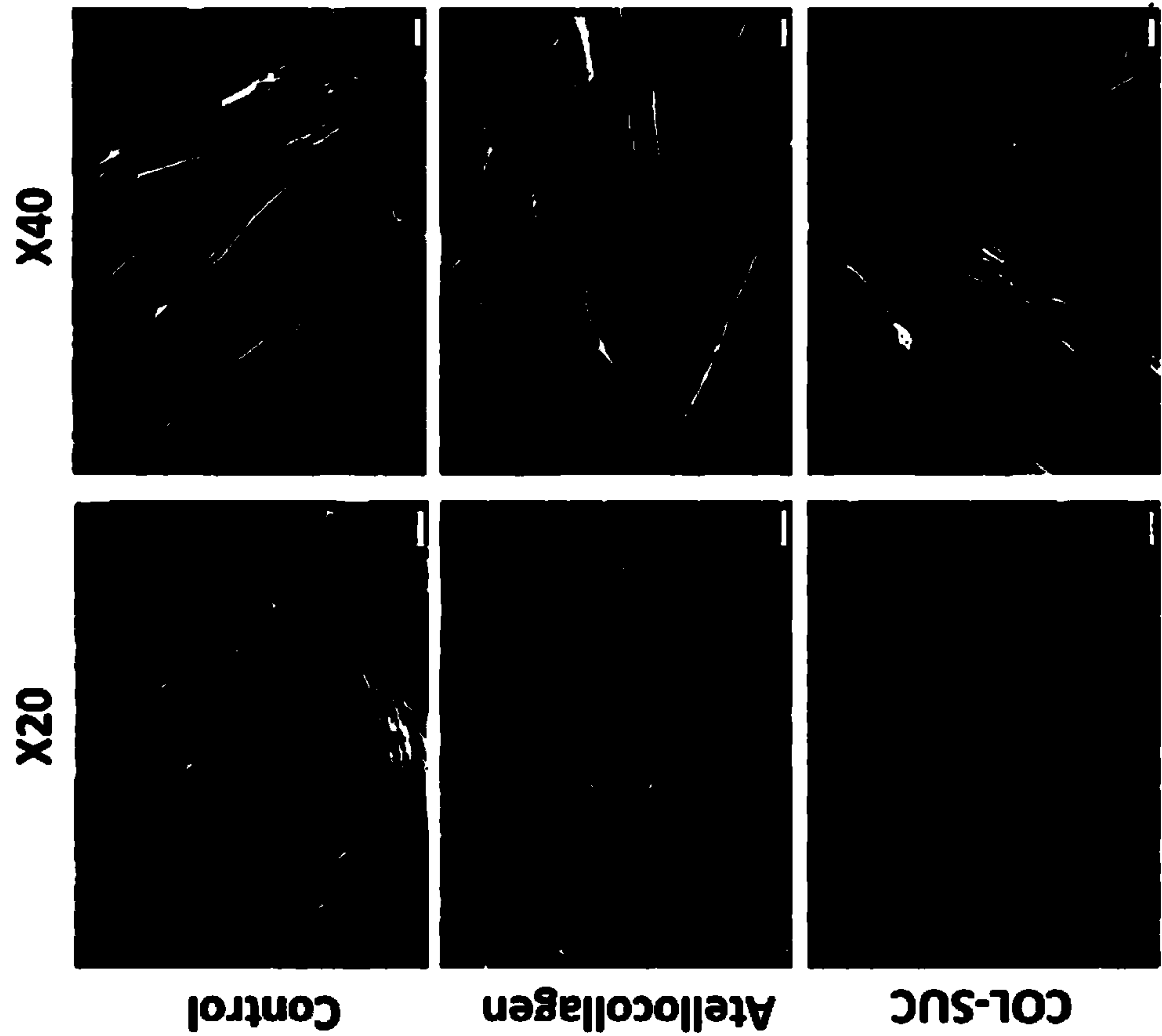
2% COL-SUC was dissolved in DW.



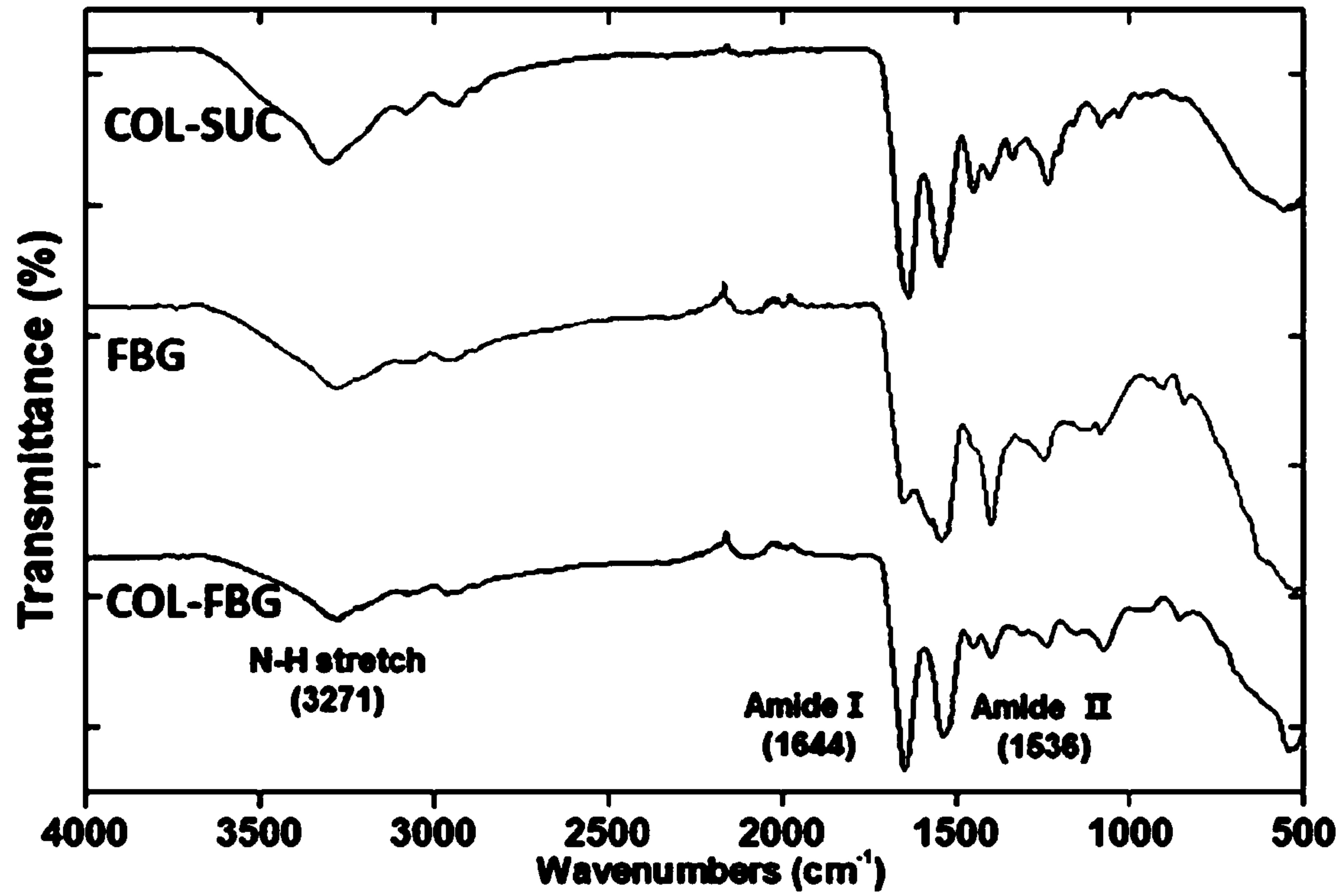
Opaque

2% Atelocollagen was dissolved in DW.

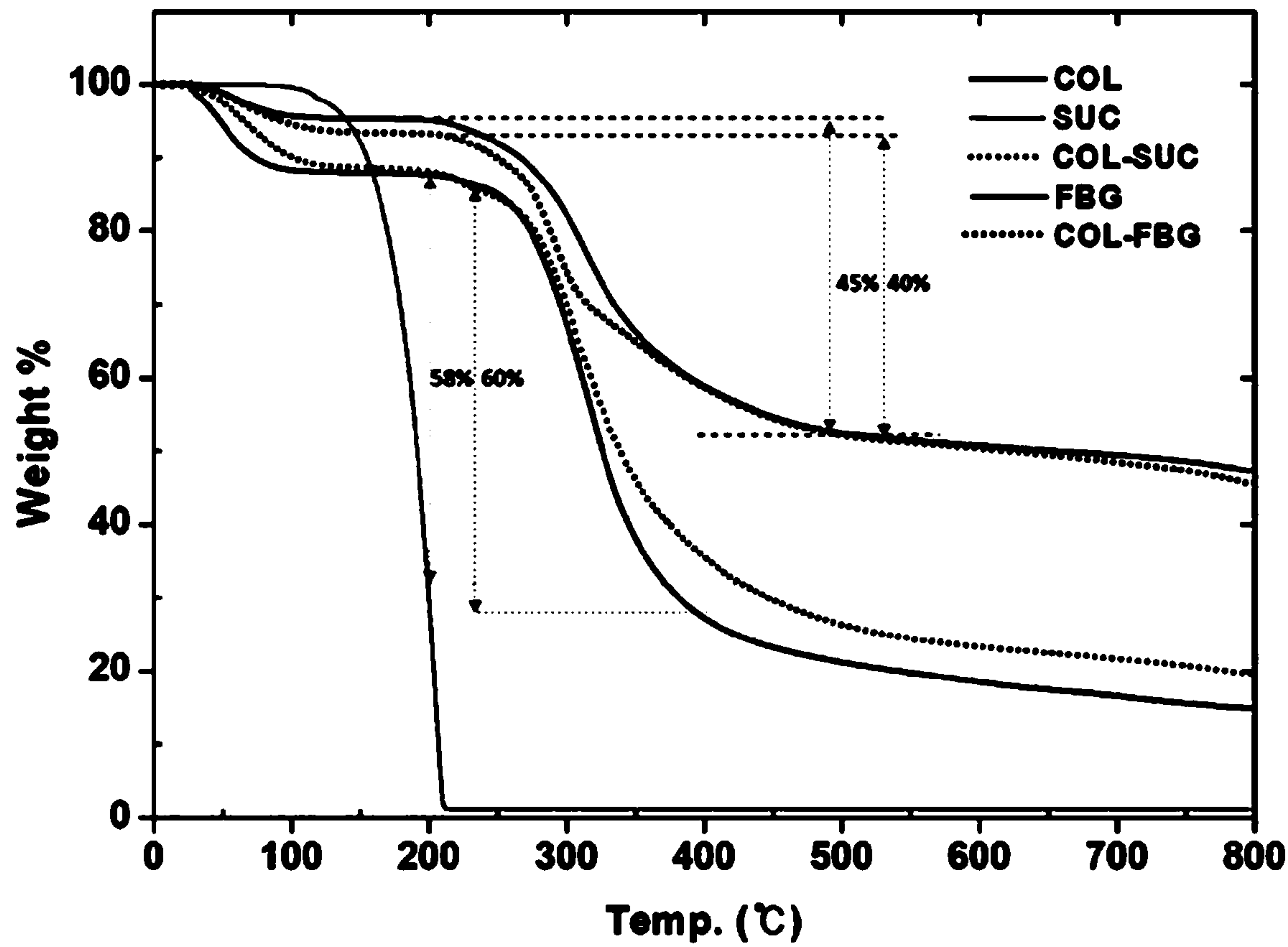
[도3]



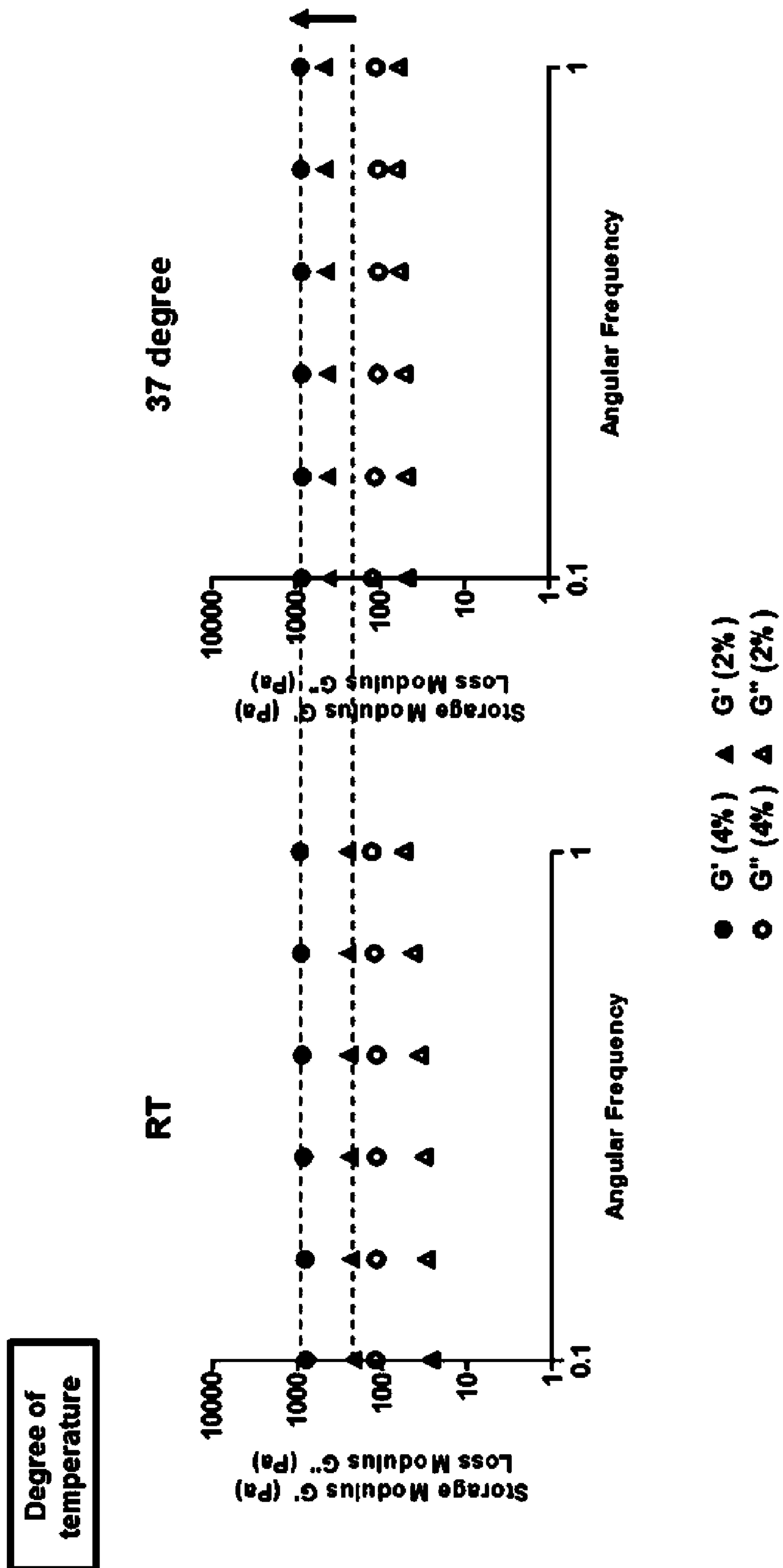
[도4]



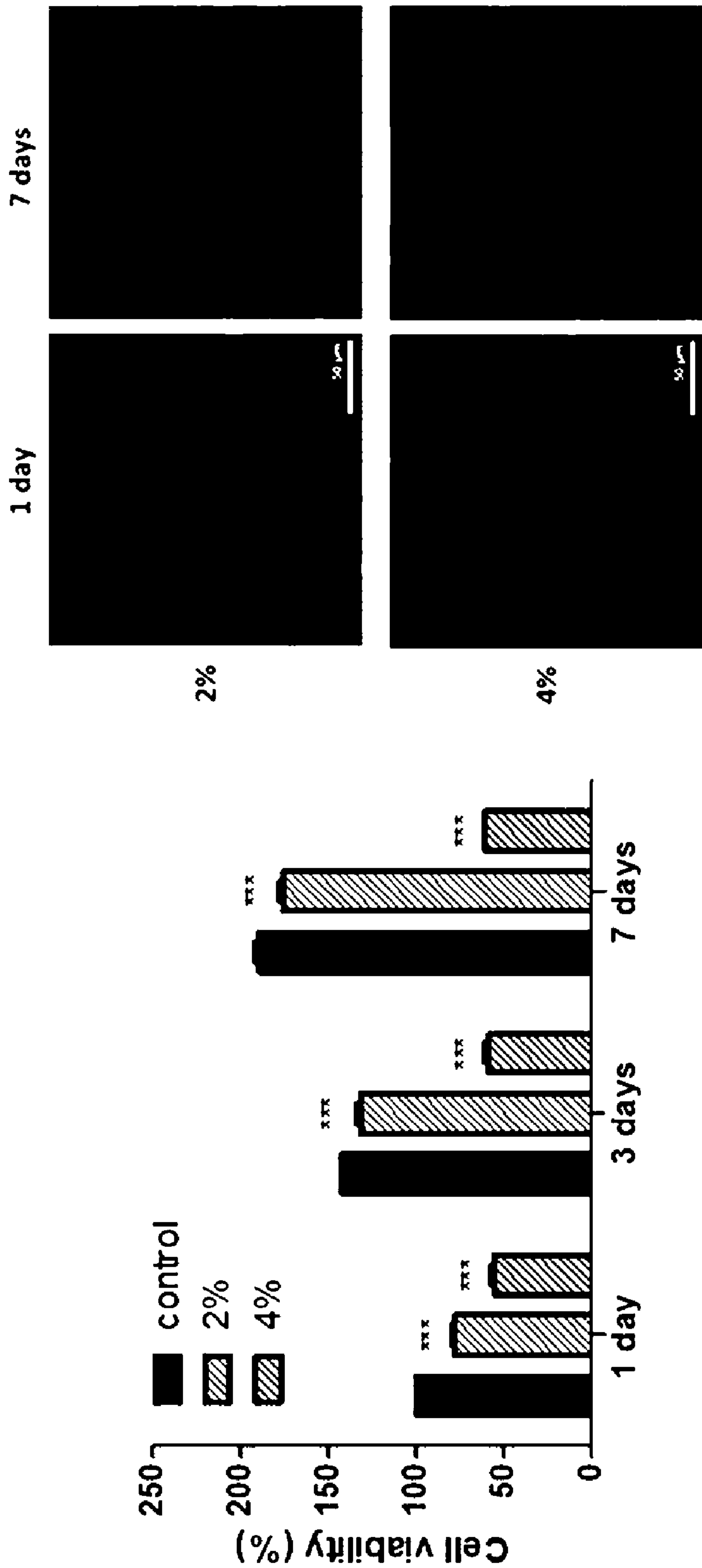
[도5]



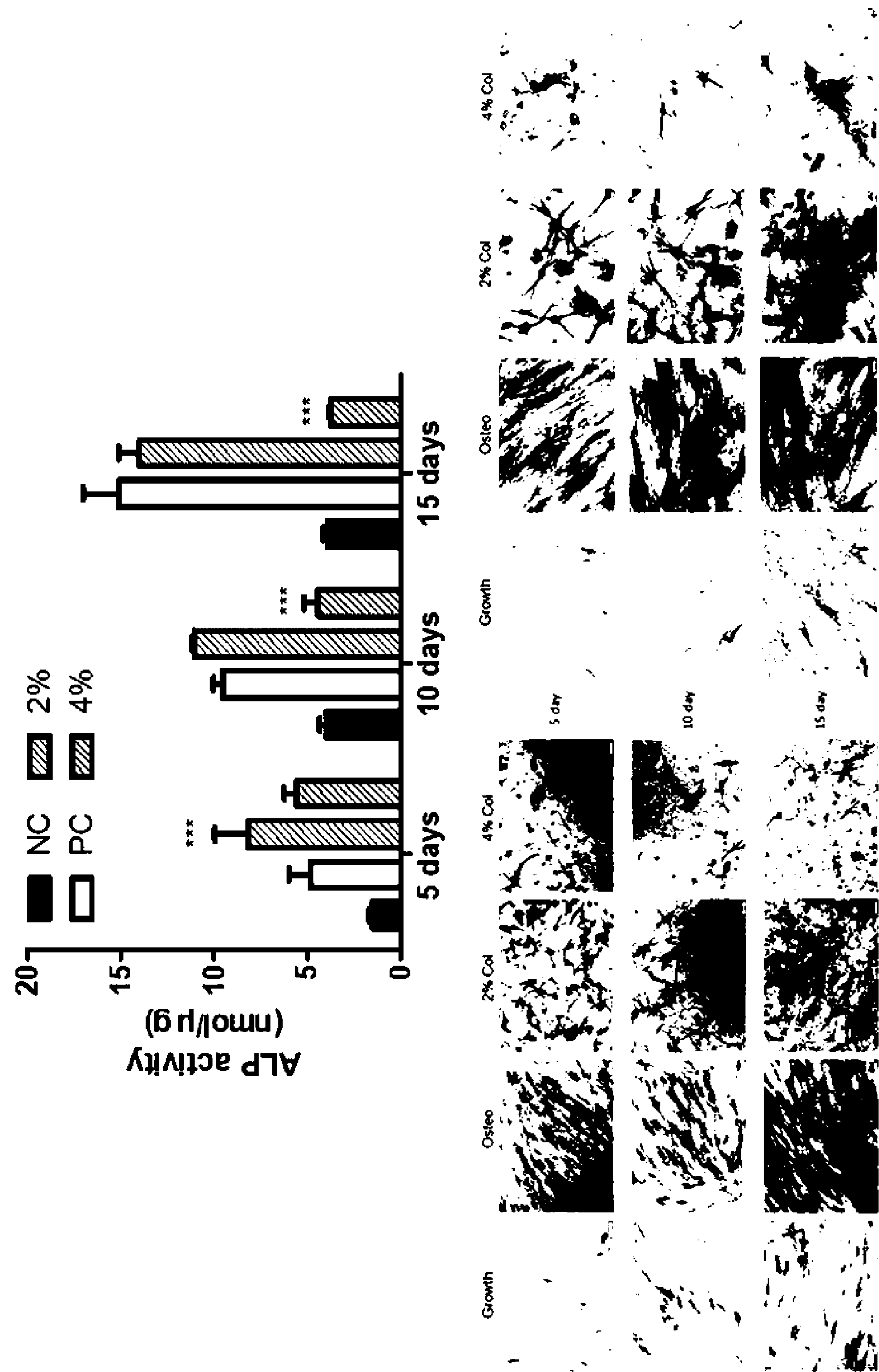
[도6]



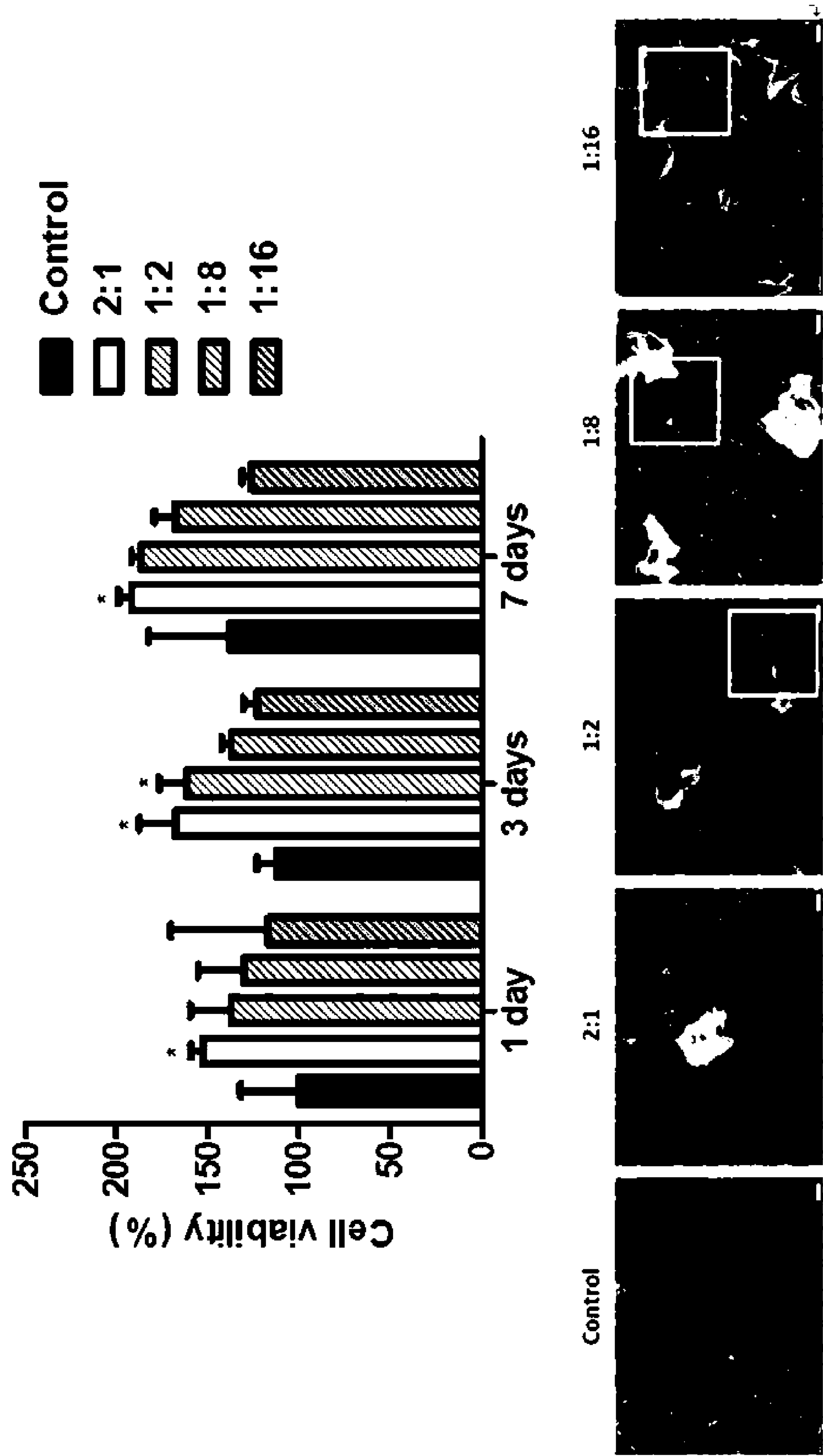
[도7]



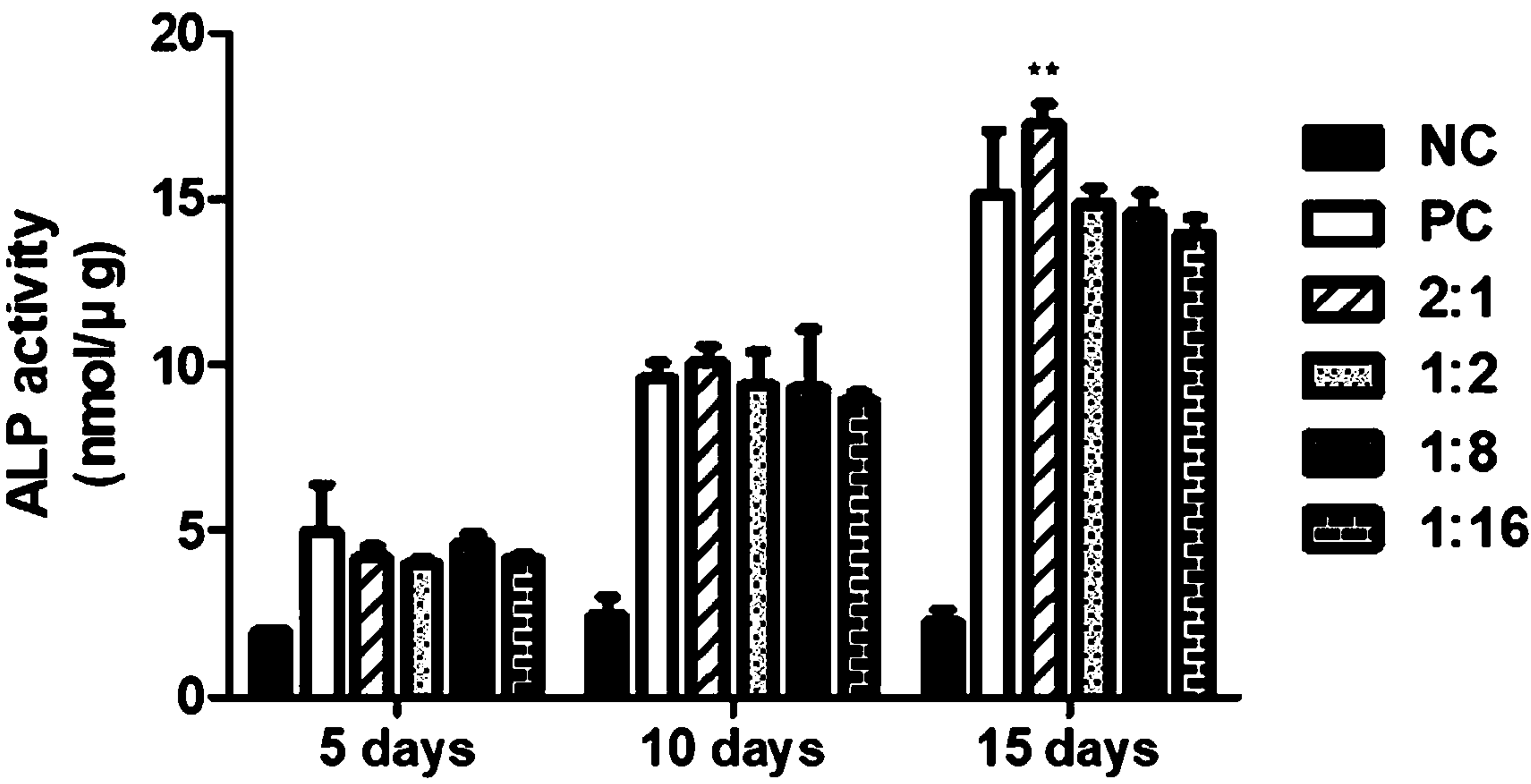
[도8]



[도9]



[도10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/011037

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08J 3/075(2006.01)i; C08H 1/00(2006.01)i; C08L 89/00(2006.01)i; C07K 14/78(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)

C08J 3/075; A61K 31/407; A61K 35/12; A61K 38/43; A61K 47/36; A61K 8/44; A61K 8/65; A61K 9/06; A61L 27/00; C08G 85/00; C08L 89/00; C08H 1/00; C07K 14/78

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

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

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 하이드로겔(hydrogel), 콜라겐(collagen), 피브리노겐(fibrinogen), 숙신산 무수물(succinic anhydride), 디메틸아미노피리딘(dimehtylaminopyridine), 하이드록시석신이미드(hydroxysuccinimide), 트롬빈(trombin)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-1522462 B1 (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 21 May 2015. See claim 1; and paragraphs [0033] and [0079]-[0087].	1-7
A	US 9884121 B2 (UTECHT, Ronald E. et al.) 06 February 2018. See paragraphs [0129]-[0139].	1-7
A	JP 2007-217699 A (INCEPT LLC) 30 August 2007. See paragraphs [0103]-[0105].	1-7
A	KR 10-0828494 B1 (DALIM TISSEN) 13 May 2008. See claims 1-3.	1-7

☒ 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
“D” document cited by the applicant in the international application
“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

11 December 2020

Date of mailing of the international search report

11 December 2020

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/011037

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2010-510212 A (ABBOTT CARDIOVASCULAR SYSTEMS INC.) 02 April 2010. See paragraphs [0022] and [0023].	1-7
PX	KR 10-2119693 B1 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 05 June 2020. See entire document. This document is a published earlier application that serves as a basis for claiming priority of the present international application.	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/011037

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-1522462	B1	21 May 2015	KR	10-2014-0037757	A	27 March 2014
				US	2015-0250890	A1	10 September 2015
				US	9844610	B2	19 December 2017
				WO	2014-046415	A1	27 March 2014
US	9884121	B2	06 February 2018	AU	2008-211083	B2	01 August 2013
				AU	2008-211083	A1	07 August 2008
				BR	PI0807065	A2	21 March 2017
				CA	2676919	A1	07 August 2008
				CA	2676919	C	29 January 2013
				EP	2425816	A3	30 April 2014
				EP	2114370	A2	11 November 2009
				EP	2114370	B1	03 October 2012
				EP	2425816	A2	07 March 2012
				JP	5541926	B2	09 July 2014
				JP	2010-516814	A	20 May 2010
				JP	2014-129408	A	10 July 2014
				KR	10-2009-0108723	A	16 October 2009
				MX	2009008170	A	12 August 2009
				US	2018-0344858	A1	06 December 2018
				US	2018-0344859	A1	06 December 2018
				US	2016-0175449	A1	23 June 2016
				US	2008-0207561	A1	28 August 2008
				US	2008-0200948	A1	21 August 2008
				US	9855337	B2	02 January 2018
				US	8252771	B2	28 August 2012
				WO	2008-094675	A2	07 August 2008
				WO	2008-094675	A3	26 November 2009
				WO	2008-094659	A2	07 August 2008
				WO	2008-094659	A3	14 May 2009
JP	2007-217699	A	30 August 2007	AT	502670	T	15 April 2011
				AU	4648697	A	14 April 1998
				AU	5560899	A	06 March 2000
				AU	2009-202751	A1	28 January 2010
				AU	2009-202751	A8	15 April 2010
				AU	2009-202751	A9	22 April 2010
				AU	1999-55608	A1	06 March 2000
				AU	2000-27075	A1	26 June 2000
				AU	2707500	A	26 June 2000
				CA	2671115	A1	08 January 2010
				CA	2340381	A1	24 February 2000
				CA	2340381	C	13 January 2009
				CA	2353642	A1	15 June 2000
				CA	2353642	C	10 November 2009
				EP	1104324	A1	06 June 2001
				EP	1104324	A4	20 February 2002
				EP	1104324	B1	23 March 2011
				EP	1104324	B8	22 June 2011
				EP	1137373	A1	04 October 2001
				EP	1137373	A4	19 May 2004
				EP	2196193	A1	16 June 2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

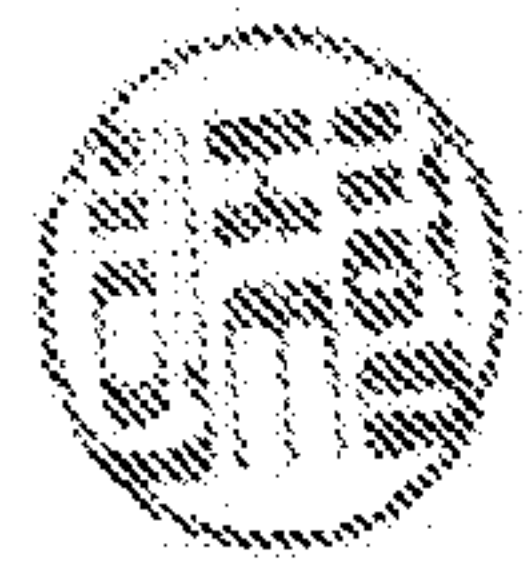
International application No.
PCT/KR2020/011037

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
				EP	2196193	B1	23 September 2015
				ES	2363922	T3	19 August 2011
				GB	2354340	A	21 March 2001
				GB	2333163	A	14 July 1999
				JP	2010-017548	A	28 January 2010
				JP	4159254	B2	01 October 2008
				JP	2001-500987	A	23 January 2001
				JP	2002-522177	A	23 July 2002
				JP	2002-531217	A	24 September 2002
				US	106165201	A	26 December 2000
				US	6179862	B1	30 January 2001
				US	6179862	B2	30 January 2001
				US	6566406	B1	20 May 2003
				US	6673093	B1	06 January 2004
				US	6887974	B2	03 May 2005
				US	7009034	B2	07 March 2006
				US	7057019	B2	06 June 2006
				US	7211651	B2	01 May 2007
				US	7332566	B2	19 February 2008
				US	7347850	B2	25 March 2008
				US	7592418	B2	22 September 2009
				US	7605232	B2	20 October 2009
				US	8003705	B2	23 August 2011
				US	8535705	B2	17 September 2013
				US	8557535	B2	15 October 2013
				US	2002-0114775	A1	22 August 2002
				US	2003-0012734	A1	16 January 2003
				US	2003-0077272	A1	24 April 2003
				US	2003-0108511	A1	12 June 2003
				US	2003-0162841	A1	28 August 2003
				US	2004-0002456	A1	01 January 2004
				US	2004-0023842	A1	05 February 2004
				US	2006-0147409	A1	06 July 2006
				US	2007-0197776	A1	23 August 2007
				US	2008-0095736	A1	24 April 2008
				US	2008-0114092	A1	15 May 2008
				US	2008-0214695	A1	04 September 2008
				US	2008-0260802	A1	23 October 2008
				US	2009-0324721	A1	31 December 2009
				US	2010-0069613	A1	18 March 2010
				WO	98-12274	A1	26 March 1998
				WO	00-33764	A1	15 June 2000
				WO	98-12660	A1	26 March 1998
				WO	00-09199	A1	24 February 2000
KR	10-0828494	B1	13 May 2008	None			
JP	2010-510212	A	02 April 2010	EP	2101831	A2	23 September 2009
				EP	2452699	B1	20 April 2016
				EP	2452699	A1	16 May 2012
				EP	2109469	B1	04 June 2014
				EP	2109469	A2	21 October 2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2020/011037

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		JP 5313154 B2	09 October 2013
		JP 5542449 B2	09 July 2014
		JP 2010-516349 A	20 May 2010
		US PP19162 P3	26 August 2008
		US 8741326 B2	03 June 2014
		US 9005672 B2	14 April 2015
		US 9775930 B2	03 October 2017
		US 2008-0119385 A1	22 May 2008
		US 2008-0184434 P1	31 July 2008
		US 2009-0022817 A1	22 January 2009
		US 2014-0348800 A1	27 November 2014
		US 2015-0017265 A9	15 January 2015
		US 2015-0209473 A1	30 July 2015
		US 2017-0258961 A9	14 September 2017
		WO 2008-089452 A3	06 August 2009
		WO 2008-063418 A2	29 May 2008
		WO 2008-063418 A3	26 March 2009
		WO 2008-089452 A2	24 July 2008
KR 10-2119693 B1	05 June 2020	None	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C08J 3/075(2006.01)i, C08H 1/00(2006.01)i, C08L 89/00(2006.01)i, C07K 14/78(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C08J 3/075; A61K 31/407; A61K 35/12; A61K 38/43; A61K 47/36; A61K 8/44; A61K 8/65; A61K 9/06; A61L 27/00; C08G 85/00; C08L 89/00; C08H 1/00; C07K 14/78 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 하이드로젤(hydrogel), 콜라겐(collagen), 피브리노겐(fibrinogen), 숙신산 무수물(succinic anhydride), 디메틸아미노피리딘(dimehtylaminopyridine), 하이드록시석신이미드(hydroxysuccinimide), 트롬빈(trombin)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-1522462 B1 (아주대학교산학협력단) 2015.05.21 청구항 1; 단락 [0033], [0079]-[0087]	1-7
A	US 9884121 B2 (UTECHT, RONALD E. 등) 2018.02.06 단락 [0129]-[0139]	1-7
A	JP 2007-217699 A (INCEPT LLC) 2007.08.30 단락 [0103]-[0105]	1-7
A	KR 10-0828494 B1 ((주)다림티센) 2008.05.13 청구항 1-3	1-7
A	JP 2010-510212 A (ABBOTT CARDIOVASCULAR SYSTEMS INC.) 2010.04.02 단락 [0022], [0023]	1-7
PX	KR 10-2119693 B1 (경희대학교 산학협력단) 2020.06.05 전체 문헌 위 문헌은 본 국제출원의 우선권주장의 기초가 되는 선출원의 공개된 공보임	1-7
☐ 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 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2020년 12월 11일 (11.12.2020)		국제조사보고서 발송일 2020년 12월 11일 (11.12.2020)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373 

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1522462 B1	2015/05/21	KR 10-2014-0037757 A	2014/03/27
		US 2015-0250890 A1	2015/09/10
		US 9844610 B2	2017/12/19
		WO 2014-046415 A1	2014/03/27
US 9884121 B2	2018/02/06	AU 2008-211083 A1	2008/08/07
		AU 2008-211083 B2	2013/08/01
		BR PI0807065 A2	2017/03/21
		CA 2676919 A1	2008/08/07
		CA 2676919 C	2013/01/29
		EP 2114370 A2	2009/11/11
		EP 2114370 B1	2012/10/03
		EP 2425816 A2	2012/03/07
		EP 2425816 A3	2014/04/30
		JP 2010-516814 A	2010/05/20
		JP 2014-129408 A	2014/07/10
		JP 5541926 B2	2014/07/09
		KR 10-2009-0108723 A	2009/10/16
		MX 2009008170 A	2009/08/12
		US 2008-0200948 A1	2008/08/21
		US 2008-0207561 A1	2008/08/28
		US 2016-0175449 A1	2016/06/23
		US 2018-0344858 A1	2018/12/06
		US 2018-0344859 A1	2018/12/06
		US 8252771 B2	2012/08/28
		US 9855337 B2	2018/01/02
		WO 2008-094659 A2	2008/08/07
		WO 2008-094659 A3	2009/05/14
		WO 2008-094675 A2	2008/08/07
		WO 2008-094675 A3	2009/11/26
JP 2007-217699 A	2007/08/30	AT 502670 T	2011/04/15
		AU 1999-55608 A1	2000/03/06
		AU 2000-27075 A1	2000/06/26
		AU 2009-202751 A1	2010/01/28
		AU 2009-202751 A8	2010/04/15
		AU 2009-202751 A9	2010/04/22
		AU 2707500 A	2000/06/26
		AU 4648697 A	1998/04/14
		AU 5560899 A	2000/03/06
		CA 2340381 A1	2000/02/24
		CA 2340381 C	2009/01/13
		CA 2353642 A1	2000/06/15
		CA 2353642 C	2009/11/10
		CA 2671115 A1	2010/01/08
		EP 1104324 A1	2001/06/06
		EP 1104324 A4	2002/02/20
		EP 1104324 B1	2011/03/23
		EP 1104324 B8	2011/06/22

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		EP 1137373 A1	2001/10/04
		EP 1137373 A4	2004/05/19
		EP 2196193 A1	2010/06/16
		EP 2196193 B1	2015/09/23
		ES 2363922 T3	2011/08/19
		GB 2333163 A	1999/07/14
		GB 2354340 A	2001/03/21
		JP 2001-500987 A	2001/01/23
		JP 2002-522177 A	2002/07/23
		JP 2002-531217 A	2002/09/24
		JP 2010-017548 A	2010/01/28
		JP 4159254 B2	2008/10/01
		US 106165201 A	2000/12/26
		US 2002-0114775 A1	2002/08/22
		US 2003-0012734 A1	2003/01/16
		US 2003-0077272 A1	2003/04/24
		US 2003-0108511 A1	2003/06/12
		US 2003-0162841 A1	2003/08/28
		US 2004-0002456 A1	2004/01/01
		US 2004-0023842 A1	2004/02/05
		US 2006-0147409 A1	2006/07/06
		US 2007-0197776 A1	2007/08/23
		US 2008-0095736 A1	2008/04/24
		US 2008-0114092 A1	2008/05/15
		US 2008-0214695 A1	2008/09/04
		US 2008-0260802 A1	2008/10/23
		US 2009-0324721 A1	2009/12/31
		US 2010-0069613 A1	2010/03/18
		US 6179862 B1	2001/01/30
		US 6179862 B2	2001/01/30
		US 6566406 B1	2003/05/20
		US 6673093 B1	2004/01/06
		US 6887974 B2	2005/05/03
		US 7009034 B2	2006/03/07
		US 7057019 B2	2006/06/06
		US 7211651 B2	2007/05/01
		US 7332566 B2	2008/02/19
		US 7347850 B2	2008/03/25
		US 7592418 B2	2009/09/22
		US 7605232 B2	2009/10/20
		US 8003705 B2	2011/08/23
		US 8535705 B2	2013/09/17
		US 8557535 B2	2013/10/15
		WO 00-09199 A1	2000/02/24
		WO 00-33764 A1	2000/06/15
		WO 98-12274 A1	1998/03/26
		WO 98-12660 A1	1998/03/26
KR 10-0828494 B1	2008/05/13	없음	

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2010-510212 A	2010/04/02	EP 2101831 A2	2009/09/23
		EP 2109469 A2	2009/10/21
		EP 2109469 B1	2014/06/04
		EP 2452699 A1	2012/05/16
		EP 2452699 B1	2016/04/20
		JP 2010-516349 A	2010/05/20
		JP 5313154 B2	2013/10/09
		JP 5542449 B2	2014/07/09
		US 2008-0119385 A1	2008/05/22
		US 2008-0184434 P1	2008/07/31
		US 2009-0022817 A1	2009/01/22
		US 2014-0348800 A1	2014/11/27
		US 2015-0017265 A9	2015/01/15
		US 2015-0209473 A1	2015/07/30
		US 2017-0258961 A9	2017/09/14
		US 8741326 B2	2014/06/03
		US 9005672 B2	2015/04/14
		US 9775930 B2	2017/10/03
		US PP19162 P3	2008/08/26
		WO 2008-063418 A2	2008/05/29
		WO 2008-063418 A3	2009/03/26
		WO 2008-089452 A2	2008/07/24
		WO 2008-089452 A3	2009/08/06
KR 10-2119693 B1	2020/06/05	없음	