



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년04월30일
(11) 등록번호 10-1257996
(24) 등록일자 2013년04월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/34 (2006.01) A61L 27/54 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01) A61L 27/22 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0107782
(22) 출원일자 2010년11월01일
심사청구일자 2010년11월01일
(65) 공개번호 10-2012-0049419
(43) 공개일자 2012년05월17일
(56) 선행기술조사문헌
EP01357952 B1*
US05015677 A*
EP0244688 B1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
아주대학교산학협력단
경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)
(72) 발명자
박기동
서울특별시 서초구 서초동 신동아아파트 3동 710호
박경민
경기도 안양시 만안구 삼성산길 8, 대우푸르지오 아파트 104동 102호 (석수동)
정윤기
경기도 수원시 팔달구 중부대로223번길 54-13, 우만 주공아파트 2단지 202동 1214호 (우만동)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 정재철

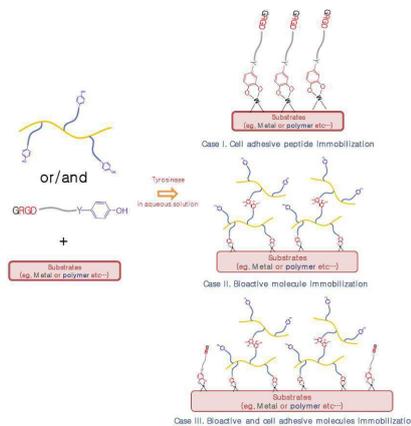
(54) 발명의 명칭 폴리페놀산화효소를 이용한 생리활성 물질의 표면 고정화 방법

(57) 요약

본 발명은 폴리페놀산화효소를 이용한 생리활성 물질의 표면 고정화 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 페놀 또는 카테콜 분자를 포함하는 생리활성 물질은 폴리페놀산화효소의 *in situ* 산화에 의하여 페놀 또는 카테콜 분자가 표면 접착력 갖는 도파 또는 도파 쿨논 형태로 변화되며, 이러한 도파 또는 도파 쿨논을 배위 결합을 통해 금속 또는 고분자 기재 표면에 단시간 내에 간단하면서도 안정적으로 고정화시킬 수 있는 생리활성 물질의 표면 고정화 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 생리활성 물질의 표면 고정화 방법은 의료용 금속 또는 고분자 소재 표면에 생리활성 물질을 간단한 방법으로 고정화할 수 있는 유용한 기술로서, 예를 들어, 정형외과 또는 치과용 임플란트 소재에 세포 부착 생리활성 물질을 쉽게 고정화하여 임플란트 후 빠른 골 조직 형성 유도에 효과적으로 사용될 수 있으며, 또한 스텐트 및 인공혈관과 같은 혈관계 의료용 소재에 항혈전성 생리활성 물질을 표면에 쉽게 고정화하여 혈액 적합성을 향상시키는 데에 효과적으로 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20100027776
 부처명 과학재단
 연구사업명 중견연구자지원사업
 연구과제명 상전이 하이드로젤 및 심장줄기세포 기반의 심근재생 세포치료기술 개발
 주관기관 아주대학교 산학협력단
 연구기간 2009.09.01 ~ 2012.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A09112010120000400
 부처명 보건복지가족부
 연구사업명 병원특성화 연구센터 사업
 연구과제명 연골 재생을 위한 생체 모방형 세포 지지체 개발
 주관기관 아주대학교 산학협력단
 연구기간 2009.05.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

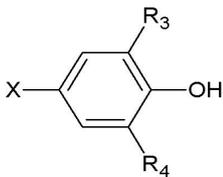
페놀 또는 카테콜 분자를 포함하는 생리활성 물질을 준비하는 단계(제1단계); 및

페놀 또는 카테콜 분자를 포함하는 생리활성 물질과 폴리페놀산화효소를 기재 표면에 처리하여 폴리페놀산화효소가 페놀 또는 카테콜 분자를 산화시켜 형성된 도파 또는 도파 퀴논을 배위 결합을 통해 기재 표면에 결합시키는 단계(제2단계)를 포함하여 이루어지며,

상기 페놀 또는 카테콜 분자를 포함하는 생리활성 물질은

수용성 고분자를 링커로 사용하여 아미노기, 하이드록실기 또는 카르복실기를 지닌 고분자 주사슬에 화학식 2로 표기되는 페놀 유도체 또는 카테콜 유도체를 아마이드, 우레탄, 우레아 또는 에스터 결합시켜 제조된 것을 특징으로 하는, 폴리페놀산화효소를 이용한 생리활성 물질의 표면 고정화 방법:

[화학식 2]



상기 화학식 2에서, R₃ 및 R₄는 하이드록실기 또는 수소이고, X는 카르복실기 또는 아민기임.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 고분자 주사슬은 헤파린, 하이알루론산, 콜라겐, 젤라틴, 키토산, 셀룰로스, 덱스트란, 덱스트란 설페이트, 콘드로이틴 설페이트, 케라탄 설페이트, 더마탄 설페이트, 알지네이트, 알부민, 피브로넥틴, 라미닌, 엘라스틴, 비트로넥틴 및 피브리노겐으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상인 것을 특징으로 하는, 폴리페놀산화효소를 이용한 생리활성 물질의 표면 고정화 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 고분자 주사슬은 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor; FGF), 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor; VEGF), 전환 성장인자(transforming growth factor; TGF), 골형성 성장인자(bone morphogenetic protein; BMP), 인간성장호르몬(hGH), 돼지성장호르몬(pGH), 백혈구성장인자(G-CSF), 적혈구성장인자(EPO), 대식세포성장인자(M-CSF), 종양 괴사 인자(TNF), 상피세포 성장인자(EGF), 혈소판유도성장인자(PDGF), 인터페론- α , β , γ , 인터루킨-2(IL-2), 칼시토닌, 신경성장인자(NGF), 성장호르몬 방

출인자, 엔지오텐신, 황체형성 호르몬 방출 호르몬(LHRH), 황체 형성 호르몬 방출 호르몬 작용약(LHRH agonist), 인슐린, 갑상선 자극 호르몬 방출 호르몬(TRH), 엔지오스테틴, 엔도스테틴, 소마토스타틴, 글루카곤, 엔도르핀, 바시트라신, 머게인, 콜리스티닌, 바시트라신, 단일 항체 및 백신류로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상인 것을 특징으로 하는, 폴리페놀산화효소를 이용한 생리활성 물질의 표면 고정화 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 고분자 주사슬은 항증식성, 항염증성 또는 항혈전성 활성제 중 어느 하나 또는 둘 이상으로서, 상기 항증식성 활성제는 실로리무스 (sirolimus: 라파마이신(rapamycin)), 에베로리무스 (everolimus), 피메크롤리무스 (pimecrolimus), 소마토스타틴 (somatostatin), 태크로리무스 (tacrolimus), 록시스로마이신 (roxithromycin), 듀나이마이신 (dunaimycin), 아스코마이신(ascomycin), 바필로마이신 (bafilomycin), 에리스로마이신 (erythromycin), 미데카마이신 (midecamycin), 조사마이신 (josamycin), 콘카나마이신 (concanamycin), 클래리스로마이신 (clarithromycin), 트로리안도마이신(troleandomycin), 폴리마이신 (folimycin), 세리바스타틴 (cerivastatin), 심바스타틴 (simvastatin), 로바스타틴 (lovastatin), 플루바스타틴 (fluvastatin), 로수바스타틴 (rosuvastatin), 아토바스타틴(atorvastatin), 프라바스타틴 (pravastatin), 피타바스타틴 (pitavastatin), 빈블라스틴 (vinblastine), 빈크리스틴 (vincristine), 빈데신 (vindesine), 비노렐빈 (vinorelbine), 에토포사이드 (etoposide), 테니포사이드 (teniposide), 니무스틴 (nimustine), 카르무스틴 (carmustine), 로무스틴 (lomustine), 시클로포스파미드 (cyclophosphamide), 4-히드록시시클로포스파미드 (4-hydroxycyclophosphamide), 에스트라무스틴 (estramustine), 멜팔란 (melphalan), 이포스파미드 (ifosfamide), 트로포스파미드 (trofosfamide), 클로람부실 (chlorambucil), 벤다무스틴 (bendamustine), 다크르바진 (dacarbazine), 부설햄 (busulfan), 프로카르바진 (procarbazine), 트레오설햄 (treosulfan), 테모졸로마이드 (temozolomide), 타이오테파 (thiotepa), 도노루비신 (daunorubicin), 독소루비신 (doxorubicin), 아클라루비신 (aclarubicin), 에피루비신 (epirubicin), 미톡산트론 (mitoxantrone), 이다루비신 (idarubicin), 블레오마이신 (bleomycin), 미토마이신 (mitomycin), 닥티노마이신 (dactinomycin), 메토티렉세이트 (methotrexate), 플루다라빈 (fludarabine), 플루다라-5'-디하이드로젠포스페이트 (fludarabine-5'-dihydrogenphosphate), 클라드리빈 (cladribine), 머캡토피린 (mercaptapurine), 티오구아닌 (thioguanine), 시타라빈 (cytarabine), 플루오로우라실 (fluorouracil), 쟈시타빈 (gemcitabine), 카페시타빈 (capecitabine), 도세탁셀 (docetaxel), 카르보플라틴 (carboplatin), 시스플라틴 (cisplatin), 옥살리플라틴 (oxaliplatin), 암사크린 (amsacrine), 이리노테칸 (irinotecan), 토포테칸 (topotecan), 히드록시카바마이드 (hydroxycarbamide), 밀테포신 (miltefosine), 펜토스타틴 (pentostatin), 알데스루킨 (aldesleukin), 트레티노인 (tretinoin), 아스파라기나제 (asparaginase), 페가스파르가제(pegaspargase), 아나스트로졸 (anastrozole), 엑스메스탄 (exemestane), 레트로졸 (letrozole), 포르메스탄 (formestane), 아미노글루테티마이드 (aminoglutethimide), 아드리아마이신 (adriamycin), 아지스로마이신 (azithromycin), 스피라마이신 (spiramycin), 세파란틴 (cepharantin), smc 증식 억제제-2w (smcproliferation inhibitor-2w), 에포틸론 A 및 B (epothilone A and B), 미톡산트론 (mitoxantrone), 아자티오프린 (azathioprine), 미코페놀아트모페틸 (mycophenolatmofetil), c-myc-안티센스 (c-myc-antisense), b-myc-안티센스 (b-myc-antisense), 베티린산 (betulinic acid), 캄토테신 (camptothecin), PI-88 (황화 올리고당), 멜라노사이트 자극 호르몬 (melanocyte stimulating hormone: α -MSH), 활성화된 단백질 C, IL-1 β 억제제, 티모신 α -1 (thymosine α -1), 푸마린산 (fumaric acid) 및 그 에스테르, 칼시포트리올 (calcipotriol), 타칼시톨(tacalcitol), 라파콜 (lapachol), β -라파콘 (β -lapachone), 포도필로톡신 (podophyllotoxin), 베티린 (betulin), 포도필산 2-에틸하이드라지드 (podophyllic acid 2-ethylhydrazide), 몰그라모스팀 (molgramostim:rhuGM-CSF), 페긴터페론 α -2b (peginterferon α -2b), 레노그라스팀 (lenograstim: r-HuG-CSF), 필그라스팀 (filgrastim), 마크로골 (macrogol), 다크르바진 (dacarbazine), 바실릭시맵 (basiliximab), 다클리주맵 (daclizumab), 셀렉틴 (selectin: 사이토카인 길항제 (cytokine antagonist), CETP 억제제, 카드헤라인 (cadherines), 사이토키닌 억제제 (cytokinin inhibitors), COX-2 억제제, NF κ B, 안지오펙틴 (angiopeptin), 시프로플록사신 (ciprofloxacin), 플루로블라스틴 (fluroblastin), 근육 세포 증식을 억제하는 모노클로날 항체 (monoclonal antibodies), bFGF 길항제, 프로부콜 (probuticol), 프로스타글란딘(prostaglandin), 1,11-디메톡시칸틴-6-온 (1,11-dimethoxycanthin-6-one), 1-히드록시-11-메톡시칸틴-6-온(1-hydroxy-11-methoxycanthin-6-one), 스코폴레틴 (scopoletin), 콜히친 (colchicine), 페타에리트리톨 테트라나이트레이트 및 신드노에이민 (syndnoimine)과 같은 NO 공여체 (NO donor), S-니트로소 유도체 (S-nitrosoderivatIVES), 타목시펜 (tamoxifen), 스트라우로스포린 (staurosporine), β -에스트라디올 (β -estradiol), α -에스트라디올 (α -estradiol), 에스트리올 (estriol), 에스트론 (estrone), 에thinyle스트라디올 (ethinylestradiol), 포스페스트

롤 (fosfestrol), 메드록시프로게스테론 (medroxyprogesterone), 시피온산에스트라디올 (estradiol cypionate), 안식향산에스트라디올 (estradiol benzoate), 트레닐라스트(tranilast), 암 치료에 적용되는 카메바카우린 (kamebakaurin) 및 기타 테르페노이드 (terpenoid), 베라파밀 (verapamil), 티로신 키나제 억제제 (tyrosine kinase inhibitors: 티포스틴 (tyrphostines)), 시클로스포린 A (cyclosporine A), 6- α -히드록시-파클리탁셀 (6- α -hydroxy-paclitaxel)과 같은 파클리탁셀 (paclitaxel) 및 그 유도체, 바카틴 (baccatin), 탁소테르 (taxotere), 천연 공급원 또는 합성하여 제조된 아산화탄소 (carbon suboxide)의 매크로시클릭 올리고머 (MCS) 및 그 유도체, 모페부타존 (mofebutazone), 아세메타신(acemetacin), 디클로페낙 (diclofenac), 로나졸락 (lonazolac), 덤손 (dapsone), o-카바모일페녹시아세트산(o-carbamoylphenoxyacetic acid), 리도카인 (lidocaine), 케토프로펜 (ketoprofen), 메페남산 (mefenamicacid), 피록시캠 (piroxicam), 멜록시캠 (meloxicam), 인산클로로퀸 (chloroquine phosphate), 페니실라민 (penicillamine), 톨스타틴 (tumstatin), 아바스틴 (avstin), D-24851, SC-58125, 히드록시클로로퀸 (hydroxychloroquine), 오라노핀 (auranofin), 금치오사과산나트륨 (sodium aurothiomalate), 옥사세프롤(oxaceprol), 셀레콕시브 (celecoxib), β -시토스테린 (β -sitosterin), 아데메티오닌 (ademetonine), 미르테카인 (myrtecaine), 폴리도카놀 (polidocanol), 노니바미드 (nonivamide), 레보멘톨 (levomenthol), 벤조카인 (benzocaine), 에스신 (aescin), 엘립티신 (ellipticine), D-24851 (칼비오캠 (Calbiochem)), 콜세미드(colcemid), 시토칼라신 A-E (cytochalasin A-E), 인다노신 (indanocine), 노코다졸 (nocodazole), S 100 프로틴 (S 100 protein), 바시트라신 (bacitracin), 비트로넥틴 수용체 길항제 (vitronectin receptor antagonist), 아젤라스틴 (azelastine), 구아니딜 사이클라제 자극제 (guanidyl cyclase stimulator), 금속 프로테이나아제-1 및 -2의 조직 억제제 (tissue inhibitor of metal proteinase-1 and -2), 유리 핵산, 바이러스 전달체 내로 통합된 핵산, DNA 및 RNA 단편, 플라스미노겐 활성화제 억제제-1 (plasminogen activator inhibitor-1), 플라스미노겐 활성화제 억제제-2, 안티센스 올리고뉴클레오티드 (antisense oligonucleotides), VEGF 억제제 및 IGF-1로 이루어진 군에서 선택되고; 상기 항염증성 활성화제는 세파드록실 (cefadroxil), 세파졸린 (cefazolin), 세파클러 (cefaclor), 세포탁심(cefotaxim), 토브라마이신 (tobramycin), 젠타마이신 (gentamycin), 디클록사실린(dicloxacillin), 옥사실린 (oxacillin), 레플루노미드 (leflunomide), 아나킨라 (anakinra), 에타너셉트 (etanercept), 설파살라진 (sulfasalazine), 에토포시드 (etoposide), 디클록사실린 (dicloxacillin), 테트라시클린 (tetracycline), 트리암시놀론 (triamcinolone), 뮤타마이신 (mutamycin), 프로카인아미드 (procainamid), D24851, SC-58125, 레티노산 (retinoic acid), 퀴니딘 (quinidine), 디소피라미드 (disopyramide), 플레카이니드 (flecainide), 프로파펜논 (propafenone), 소탈롤 (sotalol), 아미도론 (amidorone), 브리오릴린 A (bryophyllin A), 이노토디올 (inotodiol), 마퀴로시드 A (maquiroside A), 갈라키노시드 (ghalakinoside), 만소닌 (mansonine), 스트레블로시드 (strebloside), 하이드로코르티손 (hydrocortisone), 베타메타손 (betamethasone), 덱사메타손 (dexamethasone)과 같은 천연 및 합성되어 제조된 스테로이드, 페노프로펜 (fenoprofen), 이부프로펜 (ibuprofen), 인도메타신 (indomethacin), 나프록센 (naproxen), 페닐부타존 (phenylbutazone)과 같은 비-스테로이드계 물질 (non-steroidal substances: NSAIDS) 및 아시클로비르 (acyclovir), 간시클로비르 (ganciclovir) 및 지도부딘 (zidovudine), 클로트리마졸 (clotrimazole), 플루시토신 (flucytosine), 그리세오폴빈 (griseofulvin), 케토코나졸 (ketoconazole), 미코나졸 (miconazole), 니스타틴 (nystatin), 테르비나핀 (terbinafine), 클로로퀸 (chloroquine), 메플로퀸 (mefloquine), 퀴닌 (quinine)과 같은 안티프로조알 제제 (antiprozoal agent), 히포카데스쿨린 (hippocaesculin), 바링토게놀-C21-안젤레이트 (barringtogenol-C21-angelate), 14-디하이드로아그로스티스타친 (14-dehydroagrostistachin), 아그로스케린 (agroskerin), 아그로스티스타친 (agrostistachin), 17-히드록시아그로스티스타친 (17-hydroxyagrostistachin), 오바토디올리드 (ovatodiolid), 4,7-옥시시클로아니소멜산 (4,7-oxycycloanisomelic acid), 바카리노이드 B1, B2, B3 및 B7 (baccharinoids B1, B2, B3 and B7), 튜베이모시드 (tubeimoside), 브루세아놀 A, B 및 C (bruceanol A, B and C), 브루세안티노시드 C (bruceantinoside C), 야단지오시드 N 및 P (yadanziosides N and P), 이소데옥시엘레판토피 (isodeoxyelephantopin), 토멘판토피 A 및 B (tomenphantopin A and B), 코로나린 A, B, C 및 D (coronararin A, B, C and D), 우르솔산 (ursolic acid), 힛타틱산 A (hyptatic acid A), 제오린 (zeorin), 이소-이리도제르마날 (iso-iridogermanal), 메이텐폴리올 (maytenfoliol), 에퓨산틴 A (effusantinin A), 엑시사닌 A 및 B (excisaninin A and B), 롱기카우린 B (longikaurin B), 스컬포네아틴 C (sculponeatin C), 카메바우린(kamebaunin), 루카메닌 A 및 B (leukamenin A and B), 13,18-디하이드로-6- α -세네시오일록시카파린 (13,18-dehydro-6- α -seneciolyoxychapparrin), 탁사마이린 A 및 B (taxamairin A and B), 레게닐롤 (regenilol), 트립톨리드 (triptolide), 시마린 (cymarin), 아포시마린 (apocymarin), 아리스톨로크산 (aristolochic acid), 아노프테린 (anopterin), 히드록시아노프테린 (hydroxyanopterin), 아네모닌 (anemonin), 프로토아네모닌 (protoanemonin), 베르베린 (berberine), 첼리부린 클로라이드 (cheliburin chloride), 식톡신 (cictoxin), 시노코쿨린 (sinococuline), 밤브레스틴 A 및 B

(bombrestatin A and B), 큐드라이소플라본 A (cudraiso flavone A), 커큐민 (curcumin), 디 하이드로니티딘 (dihydranitidine), 니티딘 클로라이드 (nitidine chloride), 12-β-히드록시프레그나디엔-3,20-이온 (12-β-hydroxypregnadiene-3,20-dione), 빌로볼 (bilobol), 강크골 (ginkgol), 강크골산(ginkgolic acid), 헬레날린 (helenalin), 인디신 (indicine), 인디신-N-옥사이드 (indicine-N-oxide), 라시오카르핀 (lasiocarpine), 이노토디올 (inotodiol), 글리코시드 1a (glycoside 1a), 포도필로톡신 (podophyllotoxin), 저스티시딘 A 및 B (justicidin A and B), 라레아틴 (larreatin), 말로테린 (malloterin), 말로토크로마놀 (mallotochromanol), 이소부틸말로토크로마놀 (isobutyrylmallotochromanol), 마키로시드 A (maquiroside A), 마칸틴 A (marchantin A), 메이탄신 (maytansine), 리코리디신 (lycoridicin), 마르게틴 (margetine), 판크라티스타틴 (pancratistatin), 리리오테닌 (liriodenine), 옥소우신수닌 (oxoushinsunine), 아리스토틀락탐-AII (aristolactam-AII), 비스파르테놀리딘 (bisparthenolidine), 페리플로코시드 A (periplocoside A), 갈라키노시드 (ghalakinoside), 우르솔산 (ursolic acid), 디옥시프로스페르민 (deoxyprospermin), 사이코루빈 (psychorubin), 리신 A (ricin A), 상귀나린 (sanguinarine), 만우 췌 산 (manwu wheat acid), 메틸소르비폴린 (methylsorbifolin), 스파델리아크로멘 (sphatheliachromen), 스티조필린 (stizophyllin), 스트레블로시드 (strebloside), 아카게린 (akagerine), 디하이드러스암 바렌신 (dihydrousambarensine), 히드록시우삼바린 (hydroxyusambarine), 스트리크노펜타민(strychnopentamine), 스트리크노필린 (strychnophylline), 우삼바린 (usambarine), 우삼바렌신 (usambarensine), 다프노레틴 (daphnoretin), 라리시레시놀 (lariciresinol), 메톡시라리시레시놀 (methoxylariciresinol), 시린가레시놀 (syringaresinol), 움벨리페론 (umbelliferon), 아프로모손 (afromoson), 아세틸비스미온 B (acetylvismione B), 데사아세틸비스미온 A (desacetylvismione A), 비스미온 A 및 B (vismione A and B), 시스틴과 같은 황 포함 아미노산, 및 상기 언급한 활성제의 염 또는 그 혼합물로 이루어진 군에서 선택되고; 상기 항혈전성 활성제는 실폰아미드, 메트로니다졸 (metronidazol), 아르가트로반 (argatroban), 아스피린 (aspirin), 압식시맙 (abciximab), 합성 안티트롬빈 (syntheticantithrombin), 비발리루딘 (bivalirudin), 코우마딘 (coumadin), 에녹사파린 (enoxaparin), 탈황산화된 및 N-재아세틸화된 헤파린 (desulphated and N-reacetylated heparin)과 같은 항혈전제 (antithrombotic), 조직 플라스미노겐 활성화제 (tissue plasminogen activator), GpIIb/IIIa 혈소판 막 수용체 (GpIIb/IIIa platelet membrane receptor), Xa 인자 억제제 항체, 헤파린 (heparin), 히루딘 (hirudin), r-히루딘 (r-hirudin), PPACK, 프로타민 (protamin), 2-메틸티아졸리딘-2,4-디카르복실산의 나트륨염, 프로우로키나제 (prourokinase), 스트렙토키나제 (streptokinase), 와파린 (warfarin), 우로키나제 (urokinase), 디피라미돌 (dipyramidole), 트라피딜 (trapidil), 나이트로프루사이드 (nitroprusside), 트리아졸로피리미딘 (triazolopyrimidine) 및 세라민 (seramin)과 같은 PDGF 항체, 캡토프릴 (captopril), 실라자프릴 (cilazapril), 리시노프릴 (lisinopril), 에날라프릴 (enalapril), 로사탄(losartan), 티오-프로테아제 (thio-protease) 억제제, 프로스타시클린 (prostacyclin), 바피프로스트 (vapiprost), α, β 및 γ 인터페론, 히스타민 길항제 (histamine antagonist), 세로토닌 차단제 (serotonin blocker), 아포토시스 (apoptosis) 억제제, p65, NF-kB 또는 Bcl-xL 안티센스 올리고뉴클레오티드, 할로푸지논 (halofuginone), 니페디핀 (nifedipine), 토코페롤, 비타민 B1, B2, B6 및 B12, 폴산 (folic acid), 트래닐라스트 (tranilast), 몰시도민 (molsidomine), 티폴리페놀 (tea polyphenol), 에피카테킨 (epicatechin gallate), 몰식자산 에피갈로카테킨 (epigallocatechingallate) 및 보스웰린산 (Boswellinic acid) 및 그 유도체로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 폴리페놀산화효소를 이용한 생리활성 물질의 표면 고정화 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 페놀 유도체는 티라민, 하이드록시페닐아세트산, 하이드록시프로피온산 및 이의 유도체로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상인 것을 특징으로 하는, 폴리페놀산화효소를 이용한 생리활성 물질의 표면 고정화 방법.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 카테콜 유도체는 L-디하이드록시 페닐알라닌(L-DOPA), 도파민(dopamine), 노레피네프린(norepinephrine), 에피네프린(epinephrin), 에피갈로카테킨(epigallocatechin gallate) 및 이들의 유도체로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상인 것을 특징으로 하는, 폴리페놀산화효소를 이용한 생리활성 물질의 표면 고정화 방법.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 링커는 폴리에스터, 폴리안하이드리드, 폴리오르토에스터, 폴리우레탄, 폴리아마이드, 폴리펩타이드, 다핵지방족, 다핵방향족, 알킬 사슬 및 이들의 조합물로 이루어진 군에서 선택된 친수성 고분자인 것을 특징으로 하는, 폴리페놀산화효소를 이용한 생리활성 물질의 표면 고정화 방법.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 상기 링커는 폴리에틸렌글리콜-폴리락트산[PEG-PLA], 폴리에틸렌글리콜-폴리카프로락톤[PEG-PCL], 폴리에틸렌글리콜-폴리(DL-락틱-코-글리코산)[PEG-PLGA], 폴리((프로필렌)푸마레이트), 폴리((에틸렌)푸마레이트) 및 이들의 조합물로 이루어진 군에서 선택된 친수성 고분자인 것을 특징으로 하는, 폴리페놀산화효소를 이용한 생리활성 물질의 표면 고정화 방법.

청구항 13

청구항 1에 있어서, 상기 링커는 폴리에틸렌글리콜[PEG], 폴리에틸렌옥사이드[PEO], 폴리에틸렌이민[PEI], 폴리프로필렌옥사이드[PPO], 폴리비닐알코올[PVA], 폴리(N-이소프로필아크릴아마이드)[polyNIPAM], 폴리푸마레이트, 폴리오르가노포스파젠, 폴리아크릴산[polyAAc], 폴리아크릴설포네이트, 폴리하이드록시에틸메타크릴레이트 [PolyHEMA] 및 이들의 공중합체로 이루어진 군에서 선택된 친수성 고분자인 것을 특징으로 하는, 폴리페놀산화효소를 이용한 생리활성 물질의 표면 고정화 방법.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 공중합체는 PEO-PPO-PEO (Pluronic®

시리즈), 4지(4-arm) PEO-PPO-PEO (Tetronic®

시리즈), PEG-PEI, PEG-PVA, PEG-PEI-PVA, PEI-PVA, 폴리(NIPAAM-co-AAc), 폴리(NIPAAM-co-HEMA) 및 이들의 조합물로 이루어진 군에서 선택된 친수성 고분자인 것을 특징으로 하는, 폴리페놀산화효소를 이용한 생리활성 물질의 표면 고정화 방법.

청구항 15

청구항 1에 있어서, 상기 폴리페놀산화효소는 티로시네이즈(tyrosinase) 및 카테콜옥시데이즈(catechol oxidase)로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상인 것을 특징으로 하는, 폴리페놀산화효소를 이용한 생리활성 물질의 표면 고정화 방법.

청구항 16

청구항 1에 있어서, 상기 기재는 금속 또는 고분자인 것을 특징으로 하는, 폴리페놀산화효소를 이용한 생리활성 물질의 표면 고정화 방법.

청구항 17

청구항 1에 있어서, 상기 기재 표면 처리는 생리활성 물질과 폴리페놀산화효소를 포함한 용액을 기재에 분무, 분사, 페인팅, 침지, 롤 코팅 및 플로우 코팅으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 방법으로 처리한 것을 특징으로 하는, 폴리페놀산화효소를 이용한 생리활성 물질의 표면 고정화 방법.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 용액은 생리활성 물질 0.001 내지 50 중량% 및 폴리페놀산화효소 0.001 KU/mL 내지 1 KU/mL 을 포함한 것을 특징으로 하는, 폴리페놀산화효소를 이용한 생리활성 물질의 표면 고정화 방법.

청구항 19

청구항 17에 있어서, 상기 기재 표면 처리는 5분 내지 1 시간 동안 처리한 것을 특징으로 하는, 폴리페놀산화효소를 이용한 생리활성 물질의 표면 고정화 방법.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 의료용 금속 및 고분자 소재 표면에 생리활성 물질을 간단한 방법으로 고정화할 수 있는, 폴리페놀산 화효소를 이용한 생리활성 물질의 표면 고정화 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 생체재료(biomaterials)는 사고 또는 선천적인 원인으로 인하여 손상된 인체 조직의 기능을 대체하거나 회복시키기 위하여 간헐적 또는 지속적으로 체내 삽입되어 주변 인체 조직과 접촉하며 체액에 노출되는 인공적인 물질을 의미한다.

[0003] 생체재료는 생체 내에 이식되는 재료이기 때문에 조직 형성능 등을 포함한 조직 적합성과 혈액 적합성이라고 하는 생체기능성이 요구된다. 조직 재생 기반에 사용되는 생체재료는 조직 접착성과 조직 유도성이 요구되며, 순환기 장치나 바이오센싱에 사용되는 생체재료는 혈액 적합성과 비특이적 흡착의 억제 등의 생체기능성이 요구된다.

[0004] 금속, 고분자, 또는 세라믹 생체재료의 생체 기능성 향상을 위하여 수많은 연구들이 진행되어 왔다. 고분자 생체재료의 경우, 기계적 강도는 다른 생체재료들에 비하여 상대적으로 낮지만 다양한 관능기를 통한 화학적 개질이 용이한 장점이 있다. 하지만 고분자 재료 중에도 테프론, 실리콘과 같은 비활성 고분자의 경우 재료 화학적 개질에 제한점을 가지고 있다. 또한, 금속 생체재료의 경우, 우수한 기계적 강도를 가지고 있지만, 화학적 개질이 용이하지 않은 제한점을 가지고 있다.

[0005] 이러한 제한점을 극복하기 위하여 생체재료의 표면 개질에 관하여 많은 연구들이 진행되어 왔으며 실제로 산업에 많이 응용되고 있다. 대표적인 화학적 개질 방법은 플라즈마 처리, 고분자를 이용한 표면 코팅 또는 산/염기를 이용한 표면 처리 방법 등이 흔히 사용되고 있다.

[0006] 예를 들어, 최근 들어 많이 사용되고 있는 치과용 임플란트의 경우, 임플란트 식립부 주변의 골조직 형성능을 향상하기 위하여 타이타늄 플라즈마 분산, 하이드록시아파타이트 코팅, 산/염기 부식 또는 생리활성 물질 고정화 및 코팅과 같은 다양한 임플란트 표면처리가 시행되고 있다.

[0007] 이러한 표면처리 방법은 임플란트의 표면적을 넓혀주어 골-임플란트 계면의 강화를 촉진하거나 생리활성 물질의 역할로 인하여 주변 골조직 형성에 긍정적인 영향을 줄 수 있다. 하지만 이러한 표면 처리 방법은 코팅 면의 균열, 금속 이온의 방출, 박테리아의 서식지가 될 수 있는 문제점을 가지고 있다.

[0008] 또한, 생리활성 물질의 고정화 및 코팅 기술의 경우, 기술의 복잡성과 표면에 고정화되는 생리활성 물질의 양에 한계를 가지고 있으며, 고정화를 위한 충분한 화학적 반응 시간이 필요하다는 제한점을 가지고 있다. 예를 들어, 대표적으로 컨주게이션에 많이 사용되는 1-에틸-3-[3-디메틸아미노프로필]카보다이미드 염산염(EDC)/ N-하이드록시설포-숙신이미드(NHS)의 경우, 평균적으로 결합을 위한 반응 시간이 3 내지 24 시간이 소요되며 세포 독성을 초래하는 잔존하는 EDC 유래 우레아 유도체(EDU)의 제거에 어려움이 있다. 또한, 고분자 표면 관능기, 예를 들어 카복실기 또는 아미노기 등을 도입하기 위하여 플라즈마 또는 이온빔과 같은 외부에너지 처리가 필요하게 되며, 이 경우 표면 형상의 변화를 초래할 수도 있다.

[0009] 또한, 혈액 적합성이 요구되는 스텐트 또는 인공혈관과 같은 순환기 생체재료의 경우, 생체재료 표면의 우수한 혈액 적합성(항혈전성)이 요구된다. 또한, 스텐트의 경우 항혈전성과 동시에 평활근 세포의 증식 억제가 요구되며, 인공혈관의 경우에는 항혈전성과 동시에 혈관 내피세포의 유도 및 재생의 생체 기능성이 요구된다.

[0010] 이러한 생체적합성 향상을 위하여 고분자/약물 코팅 기술 또는 생리활성 물질 고정화 연구가 많이 진행되고 있

다. 기존에 연구되고 있는 금속 또는 고분자 재료의 표면 고정화 및 코팅기술은 앞서 언급한 바와 같이 기술의 복잡성과 생리활성 물질 고정화 양의 한계, 화학적 결합, 잔존하는 부산물 제거의 어려움 또는 코팅을 위한 충분한 시간이 요구된다는 한계점을 가지고 있다.

- [0011] 최근에는 홍합유래 단백질인 3,4-디하이드록시페닐-L-알라닌(도파)을 이용한 표면 고정화 및 코팅 기술이 연구되고 있다. 도파 물질은 홍합의 족사에 존재하는 족사 단백질(foot protein)에서 유래된 아미노산으로, 친수성 표면과 매우 강한 수소 결합을 형성할 수 있으며, 금속이나 반금속 등과도 강한 배위 결합을 할 수 있는 특징을 가지고 있다. 또한, 도파 잔기는 도파-퀴논 형태로 산화되면서 단백질 분자들과 가교를 도모할 수 있다.
- [0012] 도파 유도체를 이용한 표면 고정화 기술은 현재 포항공과대학 차형준 교수 연구팀에 의하여 연구된 바 있다. 차형준 교수 연구팀은 새로운 홍합 단백질 추출 방법을 개발하였으며, 개발된 기술을 이용하여 도파를 포함하는 세포 부착성 단백질을 고분자 또는 금속 표면에 배위 결합을 통하여 고정화하여 고분자 또는 금속 생체 재료의 생체 적합성을 향상시키는 연구를 진행하고 있다.
- [0013] 또한, 한국과학기술원 이해신 교수 연구팀과 미국 노스웨스턴 대학의 Phillip B. Messersmith 교수 연구팀은 도파 유도체를 이용하여 소수성 고분자 또는 금속 표면의 친수화를 통한 단백질 흡착 억제 기술을 개발하였다.
- [0014] 도파를 이용한 표면 고정화 기술은 도파 분자와 금속 또는 고분자 표면 사이에 배위 결합을 통하여 분자 결합이 이루어지기 때문에 물리적 코팅 기술에 비하여 상대적으로 고정화 물질을 안정하게 도입할 수 있는 장점을 가지고 있다. 하지만, 도파 유도체를 이용한 표면 고정화 기술은 고정화 반응에 필요한 오랜 반응 시간이 요구된다. 일례를 들면, 도파 유도체가 결합된 폴리에틸렌 글라이콜 (polyethylene glycol, PEG)의 금속 및 고분자 표면 고정화를 위하여 12 시간 이상의 반응시간이 필요하다. 또한, 도파 유도체의 표면 고정화 기술은 합성 과정에서 도파 분자의 산화로 인한 폴리도파의 형성 문제가 있다. 이 문제점을 보완하기 위하여 반응 시, pH를 조절하여 도파의 산화 반응을 억제하는 과정이 추가로 요구된다. 또한, 아민 또는 티올과 같은 친핵성 분자가 포함되어 있는 분자 또는 고분자 주 사슬에는 응용하기 힘든 단점을 가지고 있다. 그 이유는 앞서 언급한 바와 같이 합성 과정 및 고정화 준비 과정에서 도파의 산화로 인하여 형성된 도파 퀴논 분자 형태가 아민 또는 티올과 결합 문제를 유도할 수 있기 때문이다. 따라서, 합성과정에서 pH를 조절하여 도파 분자의 산화를 억제해야 하는 과정이 필요하며 합성 후 보관에도 주의가 필요한 제한점을 가지고 있다.
- [0015] 따라서, 이러한 한계점을 극복하기 위해서 금속 또는 고분자 생체재료 표면에 생리활성 물질을 포함하는 다양한 물질을 단시간에 간단한 방법으로 안정적으로 고정화 시킬 수 있는 기술 개발의 필요성이 크게 부각되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0016] 상기 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명자는 폴리페놀산화효소(PPO)를 이용하여 페놀 또는 카테콜 분자를 포함하는 생리활성 물질을 간단한 방법으로 기재 표면에 안정적으로 고정화 하는 기술을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0017] 이에, 본 발명의 목적은 폴리페놀산화효소(PPO)를 이용하여 페놀 또는 카테콜 분자를 포함하는 생리활성 물질 예를 들어, 세포부착 펩타이드 또는 성장인자, 성장 호르몬, 단백질, 항혈전성 물질 등을 침지 또는 분무 등과 같은 간단한 방법으로 금속 또는 고분자 기재 표면에 안정적으로 고정화하는 기술을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

- [0018] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 페놀 또는 카테콜 분자를 포함하는 생리활성 물질을 준비하는 단계(제1단계); 및 생리활성 물질과 폴리페놀산화효소를 기재 표면에 처리하여 생리활성 물질을 기재 표면에 결합시키는 단계(제2단계)를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는, 폴리페놀산화효소를 이용한 생리활성 물질의 표면 고정화 방법을 제공한다.
- [0019] 상기 페놀 또는 카테콜 분자를 포함하는 생리활성 물질은 폴리페놀산화효소(PPO)의 *in situ* 산화에 의하여 페놀 또는 카테콜 분자가 표면 접착력 갖는 도파 또는 도파 퀴논 형태로 변화되며, 이러한 도파 또는 도파 퀴논을 배위 결합을 통해 금속 또는 고분자 기재 표면에 단시간 내에 간단하면서도 안정적으로 고정화 시킬 수 있다.
- [0020] 보다 상세하게는, 폴리페놀산화효소를 이용하여 생리활성 물질을 표면 고정화 하기 위하여, 기재로서 고분자 기재 또는 스테인레스 스틸과 티타늄 등과 같은 금속 기재를 사용할 수 있고, 먼저 기재에 인산완충용액을 넣고

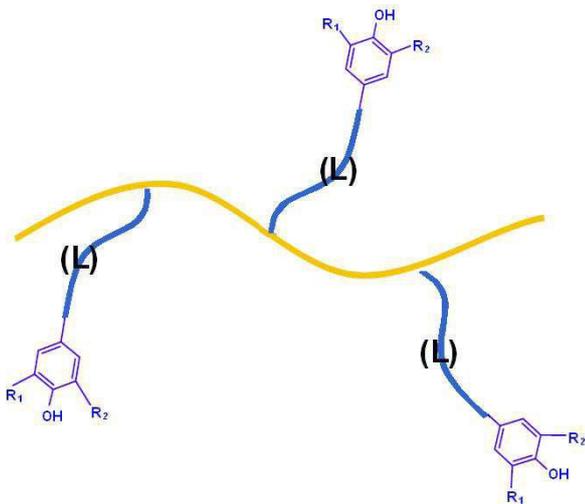
고정화를 원하는 생리활성 물질의 용액을 첨가하며, 그 후 생리활성 물질이 첨가된 용액에 폴리페놀산화효소를 첨가한다.

[0021] 이때, 반응 시간, 폴리페놀산화효소의 농도 및 생리활성 물질의 초기 농도를 조절하여 생리활성 물질의 고정화 농도를 조절할 수 있다. 반응이 끝난 기재 표면은 증류수로 3-5회 세척한 후, 건조하여 생리활성 물질이 고정화된 금속 또는 고분자 표면이 완성된다.

[0022] 상기 생리활성 물질은 티로신(Y)을 포함한 세포 부착 펩타이드일 수 있고, 상기 세포 부착 펩타이드는 바람직하게는 서열번호 1의 펩타이드(RGD-Y), 서열번호 2의 펩타이드(KQAGDV-Y), 서열번호 3의 펩타이드(YIGSR), 서열번호 4의 펩타이드(REDV-Y), 서열번호 5의 펩타이드(IKVAN-Y), 서열번호 6의 펩타이드(RNIAEIIKDI-Y), 서열번호 7의 펩타이드(KHIFSDDSSSE-Y), 서열번호 8의 펩타이드(VPGIG-Y), 서열번호 9의 펩타이드(FHRRIKA-Y), 서열번호 10의 펩타이드(KRSR-Y), 서열번호 11의 펩타이드(NSPVNSKIPKACCVPTELSAI-Y), 서열번호 12의 펩타이드(APGL-Y), 서열번호 13의 펩타이드(VRN-Y) 및 서열번호 14의 펩타이드(AAAAAAAAA-Y)로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상의 펩타이드를 포함할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 또한, 상기 생리활성 물질은 고분자 주사슬에 링커를 통하거나 통하지 않고 페놀 유도체 또는 카테콜 유도체가 결합된 화학식 1로 표기되는 고분자를 하나 또는 둘 이상 포함할 수 있다:

[0024] [화학식 1]

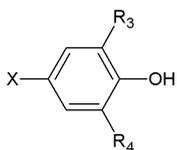


[0025]

[0026] 상기 화학식 1에서, R₁ 및 R₂는 하이드록실기 또는 수소이고, L은 링커로서 고분자일 수 있다.

[0027] 상기 생리활성 물질은 고분자 사슬을 링커로 사용하여 아미노기, 하이드록실기 또는 카르복실기를 지닌 고분자 주사슬에 화학식 2로 표기되는 페놀 유도체 또는 카테콜 유도체를 아마이드, 우레탄, 우레아 또는 에스터 결합시켜 제조될 수 있다:

[0028] [화학식 2]



[0029]

[0030] 상기 화학식 2에서, R₃ 및 R₄는 하이드록실기 또는 수소이고, X는 카르복실기 또는 아민기일 수 있다.

[0031] 예를 들어, 상기 화학식 1로 표기되는 고분자는 하기 반응식 1 내지 5와 같이 제조할 수 있다. 이때, 반응식에서 EDC는 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드, NHS는 N-하이드록시숙신산이미드, TEA는 트리에틸아민, DMAP는 디메틸암모늄피리딘, NPCF는 p-니트로페닐클로로포메이트를 의미한다.

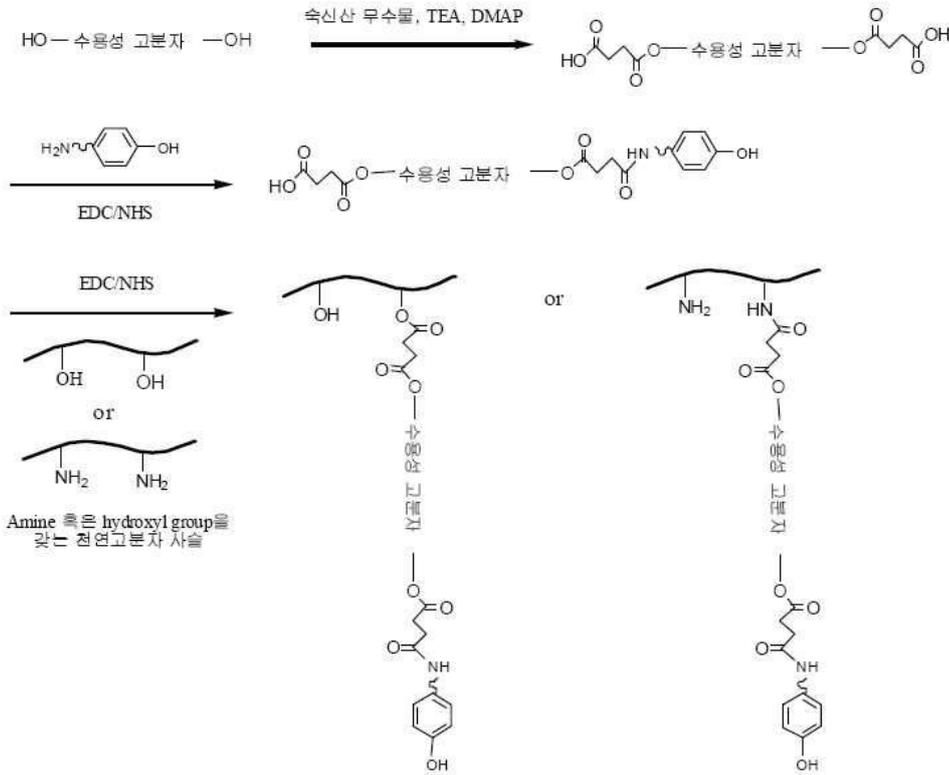
[0032] 보다 상세하게는, (i) 하이드록실기 또는 카르복실기를 지닌 수용성 고분자를 준비하는 단계; (ii) 페놀 유도체 또는 카테콜 유도체 중 어느 하나를 첨가하는 단계; 및 (iii) 아민기 또는 하이드록실기를 갖는 고분자 주사슬을 첨가하는 단계를 거쳐 화학식 1로 표시되는 고분자를 제조할 수 있다.

[0033] 상기 수용성 고분자에 숙신산 무수물 또는 NPCF 중 어느 하나의 화합물, TEA 및 DMAP를 첨가하는 단계 (i) 단계 및 (ii) 단계 사이에 더 포함할 수 있다.

[0034] 상기 페놀 유도체 또는 카테콜 유도체 첨가 시에 EDC 및 HNS를 함께 첨가하여 활성화 할 수 있다. 또, 고분자 주사슬 첨가 시에도 EDC 및 HNS를 함께 첨가하여 활성화 할 수 있다.

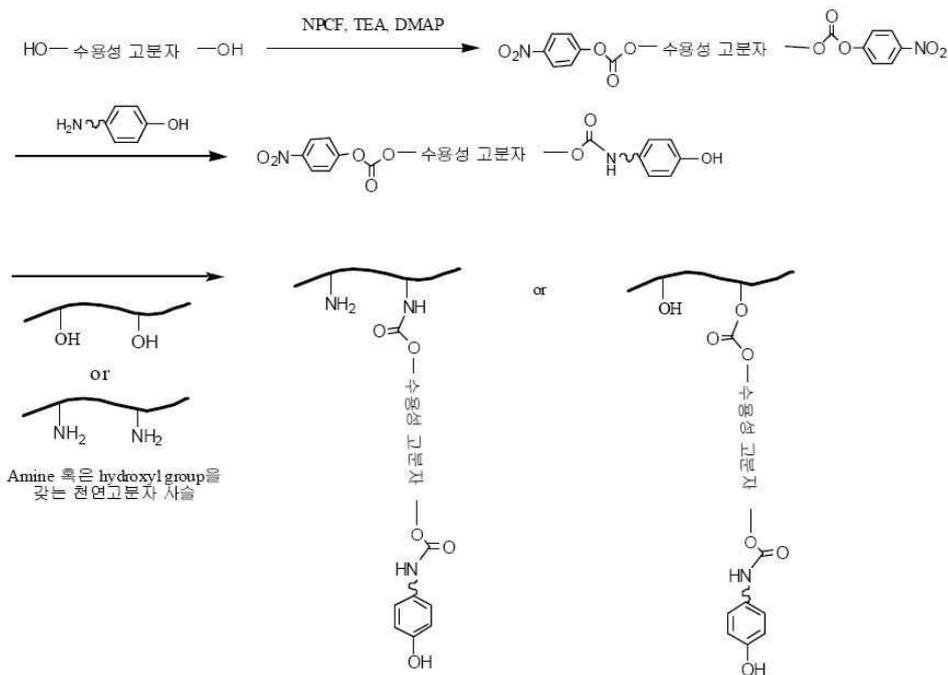
[0035] 또한, (ii) 단계 및 (iii) 단계 사이에 디아민 화합물을 첨가하는 단계를 추가할 수도 있다.

[0036] [반응식 1]



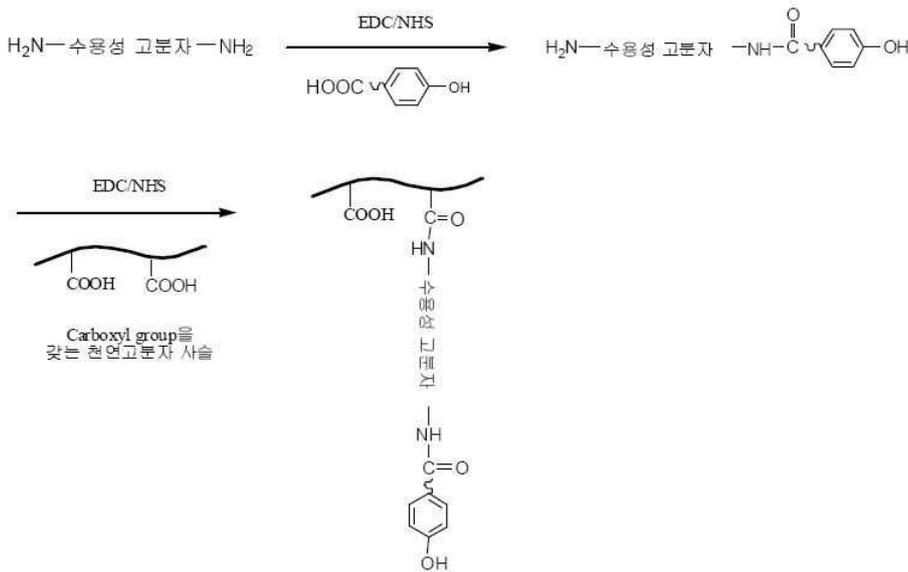
[0037]

[0038] [반응식 2]



[0039]

[0044] [반응식 5]



[0045]

[0046] 상기 고분자 주사슬은 헤파린, 하이알루론산, 콜라겐, 젤라틴, 키토산, 셀룰로스, 텍스트란, 텍스트란 설페이트, 콘드로이틴 설페이트, 케라탄 설페이트, 더마탄 설페이트, 알지네이트, 알부민, 피브로넥틴, 라미닌, 엘라스틴, 비트로넥틴 및 피브리노겐으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상일 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0047] 또한, 상기 고분자 주사슬은 단백질 의약품인 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor; FGF), 혈관내피 세포 성장인자(vascular endothelial growth factor; VEGF), 전환 성장인자(transforming growth factor; TGF), 골형성 성장인자(bone morphogenetic protein; BMP), 인간성장호르몬(hGH), 돼지성장호르몬(pGH), 백혈구성장인자(G-CSF), 적혈구성장인자(EPO), 대식세포성장인자(M-CSF), 종양 괴사 인자(TNF), 상피세포 성장인자(EGF), 혈소판유도성장인자(PDGF), 인터페론- α , β , γ , 인터루킨-2(IL-2), 칼시토닌, 신경성장인자(NGF), 성장호르몬 방출인자, 엔지오텐신, 황체형성 호르몬 방출 호르몬(LHRH), 황체 형성 호르몬 방출 호르몬 작용약(LHRH agonist), 인슐린, 갑상선 자극 호르몬 방출 호르몬(TRH), 엔지오스테틴, 엔도스테틴, 소마토스타틴, 글루카곤, 엔도르핀, 바시트라신, 머게인, 콜리스틴, 바시트라신, 단일 항체 및 백신류로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상일 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0048] 또한, 상기 고분자 주사슬은 항증식성, 항염증성 또는 항혈전성 활성제 중 어느 하나 또는 둘 이상으로서, 상기 항증식성 활성제는 상기 항증식성 활성제는 실로리무스 (sirolimus: 라파마이신(rapamycin)), 에베로리무스 (everolimus), 피메크롤리무스 (pimecrolimus), 소마토스타틴 (somatostatin), 태크로리무스 (tacrolimus), 록시스로마이신 (roxithromycin), 듀나이마이신 (dunaimycin), 아스코마이신(ascomycin), 바필로마이신 (bafilomycin), 에리스로마이신 (erythromycin), 미데카마이신 (midecamycin), 조사마이신 (josamycin), 콘카나마이신 (concanamycin), 클래리스로마이신 (clarithromycin), 트로리안도마이신(troleandomycin), 폴리마이신 (folimycin), 세리바스타틴 (cerivastatin), 심바스타틴 (simvastatin), 로바스타틴 (lovastatin), 플루바스타틴 (fluvastatin), 로수바스타틴 (rosuvastatin), 아토바스타틴(atorvastatin), 프라바스타틴 (pravastatin), 피타바스타틴 (pitavastatin), 빈블라스틴 (vinblastine), 빈크리스틴 (vincristine), 빈데신 (vindesine), 비노렐빈 (vinorelbine), 에토포사이드 (etoposide), 테니포사이드 (teniposide), 니무스틴 (nimustine), 카르무스틴 (carmustine), 로무스틴 (lomustine), 시클로포스파미드 (cyclophosphamide), 4-히드록시시클로포스파미드 (4-hydroxycyclophosphamide), 에스트라무스틴 (estramustine), 멜팔란 (melphalan), 이포스파미드 (ifosfamide), 트로포스파미드 (trofosfamide), 클로람부실 (chlorambucil), 벤다무스틴 (bendamustine), 다크르바진 (dacarbazine), 부설판 (busulfan), 프로카르바진 (procarbazine), 트레오설판 (treosulfan), 테모졸로마이드 (temozolomide), 타이오테파 (thiotepa), 도노루비신 (daunorubicin), 독소루비신 (doxorubicin), 아클라루비신 (aclerubicin), 에피루비신 (epirubicin), 미톡산트론 (mitoxantrone), 이다루비신 (idarubicin), 블레오마이신 (bleomycin), 미토마이신 (mitomycin), 닥티노마이신 (dactinomycin), 메토크레레이트 (methotrexate), 플루다라빈 (fludarabine), 플루다라빈-5'-디하이드로젠포스페이트 (fludarabine-5'-dihydrogenphosphate), 클라드리빈 (cladribine), 머캅토피린 (mercaptapurine), 티오구아닌

(thioguanine), 시타라빈 (cytarabine), 플루오로우라실 (fluorouracil), 겐시타빈 (gemcitabine), 카페시타빈 (capecitabine), 도세탁셀 (docetaxel), 카르보플라틴 (carboplatin), 시스플라틴 (cisplatin), 옥살리플라틴 (oxaliplatin), 암사크린 (amsacrine), 이리노테칸 (irinotecan), 토포테칸 (topotecan), 히드록시카바마이드 (hydroxycarbamide), 밀테포신 (miltefosine), 펜토스타틴 (pentostatin), 알데스루킨 (aldesleukin), 트레티노인 (tretinoin), 아스파라기나제 (asparaginase), 페가스파르가제 (pegaspargase), 아나스트로졸 (anastrozole), 엑스메스탄 (exemestane), 레트로졸 (letrozole), 포르메스탄 (formestane), 아미노글루테티마이드 (aminoglutethimide), 아드리아마이신 (adriamycin), 아지스로마이신 (azithromycin), 스피라마이신 (spiramycin), 세파란틴 (cepharantin), smc 증식 억제제-2w (smcproliferation inhibitor-2w), 에포틸론 A 및 B (epothilone A and B), 미톡산트론 (mitoxantrone), 아자티오프린 (azathioprine), 미코페놀아트모페틸 (mycophenolatmofetil), c-myc-안티센스 (c-myc-antisense), b-myc-안티센스 (b-myc-antisense), 베틀린산 (betulinic acid), 캄토테신 (camptothecin), PI-88 (황화 올리고당), 멜라노사이트 자극 호르몬 (melanocyte stimulating hormone: α -MSH), 활성화된 단백질 C, IL-1 β 억제제, 티모신 α -1 (thymosine α -1), 푸마린산 (fumaric acid) 및 그 에스테르, 칼시포트리올 (calcipotriol), 타칼시톨 (tacalcitol), 라파콜 (lapachol), β -라파콘 (β -lapachone), 포도필로톡신 (podophyllo toxin), 베틀린 (betulin), 포도필산 2-에틸하이드라지드 (podophyllic acid 2-ethylhydrazide), 몰그라모스팀 (molgramostim:rhuGM-CSF), 페긴터페론 α -2b (peginterferon α -2b), 레노그라스팀 (lenograstim: r-HuG-CSF), 필그라스팀 (filgrastim), 마크로골 (macrogol), 다카바진 (dacarbazine), 바실릭시맙 (basiliximab), 다클리주맙 (daclizumab), 셀렉틴 (selectin: 사이토카인 길항제 (cytokine antagonist), CETP 억제제, 카드헤라인 (cadherines), 사이토키닌 억제제 (cytokinin inhibitors), COX-2 억제제, NF κ B, 안지오펙틴 (angiopeptin), 시프로플록사신 (ciprofloxacin), 플루로블라스틴 (fluroblastin), 근육 세포 증식을 억제하는 모노클로날 항체 (monoclonal antibodies), bFGF 길항제, 프로부콜 (probuticol), 프로스타글란딘 (prostaglandin), 1,11-디메톡시칸틴-6-온 (1,11-dimethoxycanthin-6-one), 1-히드록시-11-메톡시칸틴-6-온 (1-hydroxy-11-methoxycanthin-6-one), 스코폴레틴 (scopoletin), 콜히친 (colchicine), 페타에리트리톨 테트라나이트레이트 및 신드노에이민 (syndnoeimine)과 같은 NO 공여체 (NO donor), S-니트로소 유도체 (S-nitrosoderivatives), 타목시펜 (tamoxifen), 스트라우로스포린 (staurosporine), β -에스트라디올 (β -estradiol), α -에스트라디올 (α -estradiol), 에스트리올 (estriol), 에스트론 (estrone), 에틸닐에스트라디올 (ethinylestradiol), 포스페스트롤 (fosfestrol), 메드록시프로게스테론 (medroxyprogesterone), 시피온산에스트라디올 (estradiol cypionate), 안식향산에스트라디올 (estradiol benzoate), 트레닐라스트 (tranilast), 암 치료에 적용되는 카메바카우린 (kamebakaurin) 및 기타 테르페노이드 (terpenoid), 베라파밀 (verapamil), 티로신 키나제 억제제 (tyrosine kinase inhibitors: 티포스틴 (tyrphostines)), 시클로스포린 A (cyclosporine A), 6- α -히드록시-파클리탁셀 (6- α -hydroxy-paclitaxel)과 같은 파클리탁셀 (paclitaxel) 및 그 유도체, 바카틴 (baccatin), 탁소테르 (taxotere), 천연 공급원 또는 합성하여 제조된 아산화탄소 (carbon suboxide)의 매크로시클릭 올리고머 (MCS) 및 그 유도체, 모페부타존 (mofebutazone), 아세메타신 (acetaminophen), 디클로페낙 (diclofenac), 로나졸락 (lonazolac), 덩손 (dapsone), o-카바모일페녹시아세트산 (o-carbamoylphenoxyacetic acid), 리도카인 (lidocaine), 케토프로펜 (ketoprofen), 메페남산 (mefenamic acid), 피록시캠 (piroxicam), 멜록시캠 (meloxicam), 인산클로로퀸 (chloroquine phosphate), 페니실라민 (penicillamine), 톨스타틴 (tolstatin), 아바스틴 (avastin), D-24851, SC-58125, 히드록시클로로퀸 (hydroxychloroquine), 오라노핀 (auranofin), 금치오 사과산나트륨 (sodium aurothiomalate), 옥사세프롤 (oxaceprol), 셀레콕시브 (celecoxib), β -시토스테린 (β -sitosterin), 아데메티오닌 (ademethionine), 미르테카인 (myrtecaine), 폴리도카놀 (polidocanol), 노니바미드 (nonivamide), 레보멘톨 (levomenthol), 벤조카인 (benzocaine), 에스신 (aescin), 엘립티신 (ellipticine), D-24851 (칼비오켄 (Calbiochem)), 콜세미드 (colcemid), 시토칼라신 A-E (cytochalasin A-E), 인다노신 (indanocine), 노코다졸 (nocodazole), S 100 프로틴 (S 100 protein), 바시트라신 (bacitracin), 비트로넥틴 수용체 길항제 (vitronectin receptor antagonist), 아젤라스틴 (azelastine), 구아니딜 사이클라제 자극제 (guanidyl cyclase stimulator), 금속 프로테이나아제-1 및 -2의 조직 억제제 (tissue inhibitor of metal proteinase-1 and -2), 유리 핵산, 바이러스 전달체 내로 통합된 핵산, DNA 및 RNA 단편, 플라스미노겐 활성화제 억제제-1 (plasminogen activator inhibitor-1), 플라스미노겐 활성화제 억제제-2, 안티센스 올리고뉴클레오티드 (antisense oligonucleotides), VEGF 억제제 및 IGF-1로 이루어진 군에서 선택되고; 상기 항염증성 활성화제는 세파드록실 (cefadroxil), 세파졸린 (cefazolin), 세파클러 (cefaclor), 세포탁심 (cefotaxim), 토브라마이신 (tobramycin), 겐타마이신 (gentamycin), 디클록사실린 (dicloxacillin), 옥사실린 (oxacillin), 레플루노미드 (leflunomide), 아나킨라 (anakinra), 에타너셉트 (etanercept), 설파살라진 (sulfasalazine), 에토포시드 (etoposide), 디클록사실린 (dicloxacillin), 테트라시클린 (tetracycline), 트리암시놀론 (triamcinolone),

뮤타마이신 (mutamycin), 프로케인아미드 (procainamid), D24851, SC-58125, 레티노산 (retinoic acid), 퀴니딘 (quinidine), 디소피라미드 (disopyramide), 플레카이니드 (flecainide), 프로파펜논 (propafenone), 소탈롤 (sotalol), 아미도론 (amidorone), 브리오윌린 A (bryophyllin A), 이노토디올 (inotodiol), 마퀴로시드 A (maquiroside A), 갈라키노시드 (ghalakinoside), 만소닌 (mansonine), 스트레블로시드 (strebloside), 하이드로코르티손 (hydrocortisone), 베타메타손 (betamethasone), 덱사메타손 (dexamethasone)과 같은 천연 및 합성되어 제조된 스테로이드, 페노프로펜 (fenopropfen), 이부프로펜 (ibuprofen), 인도메타신 (indomethacin), 나프록센 (naproxen), 페닐부타존 (phenylbutazone)과 같은 비-스테로이드계 물질 (non-steroidal substances: NSAIDs) 및 아시클로비르 (acyclovir), 간시클로비르 (ganciclovir) 및 지도부딘 (zidovudine), 클로트리마졸 (clotrimazole), 플루시토신 (flucytosine), 그리세오폴빈 (griseofulvin), 케토코나졸 (ketoconazole), 미코나졸 (miconazole), 니스타틴 (nystatin), 테르비나핀 (terbinafine), 클로로퀸 (chloroquine), 메플로퀸 (mefloquine), 퀴닌 (quinine)과 같은 안티프로조알 제제 (antiprozoal agent), 히포카데스쿨린 (hippocaesculin), 바링토게놀-C21-안젤레이트 (barringtogenol-C21-angelate), 14-디하이드로아그로스티스타친 (14-dehydroagrostistachin), 아그로스케린 (agroskerin), 아그로스티스타친 (agrostistachin), 17-히드록시아그로스티스타친 (17-hydroxyagrostistachin), 오바토디올리드 (ovatodiolid), 4,7-옥시시클로아니소멜산 (4,7-oxycycloanisomelic acid), 바카리노이드 B1, B2, B3 및 B7 (baccharinoids B1, B2, B3 and B7), 튜베이모시드 (tubeimoside), 브루세아놀 A, B 및 C (bruceanol A, B and C), 브루세안티노시드 C (bruceantinoside C), 야단지오시드 N 및 P (yadanziosides N and P), 이소데옥시엘레판토피 (isodeoxyelephantopin), 토멘판토피 A 및 B (tomenphantopin A and B), 코로나린 A, B, C 및 D (coronararin A, B, C and D), 우르솔산 (ursolic acid), 히타틱산 A (hyptatic acid A), 제오린 (zeorin), 이소-이리도제르마날 (iso-iridogermanal), 메이텐폴리올 (maytenfoliol), 에퓨산틴 A (effusantinin A), 엑시사닌 A 및 B (excisanin A and B), 롱가우린 B (longikaurin B), 스컬포네아틴 C (sculponeatin C), 카메바우닌 (kamebaunin), 루카메닌 A 및 B (leukamenin A and B), 13,18-디하이드로-6- α -세네시오일록시카파린 (13,18-dehydro-6- α -seneciolyloxychaparrin), 택사마린 A 및 B (taxamairin A and B), 레게닐롤 (regenilol), 트립톨리드 (triptolide), 시마린 (cymararin), 아포시마린 (apocymarin), 아리스톨로크산 (aristolochic acid), 아노프테린 (anopterin), 히드록시아노프테린 (hydroxyanopterin), 아네모닌 (anemonin), 프로토아네모닌 (protoanemonin), 베르베린 (berberine), 첼리부린 클로라이드 (cheliburin chloride), 식톡신 (cictoxin), 시노코쿨린 (sinococuline), 밤브레스틴 A 및 B (bombrestatin A and B), 큐드라이소플라본 A (cudraisoflavone A), 커큐민 (curcumin), 디 하이드로니티딘 (dihydranitidine), 니티딘 클로라이드 (nitidine chloride), 12- β -히드록시프레그나디엔-3,20-이온 (12- β -hydroxypregnadiene-3,20-dione), 빌로볼 (bilobol), 강크골 (ginkgol), 강크골산 (ginkgolic acid), 헬레날린 (helenalin), 인디신 (indicine), 인디신-N-옥사이드 (indicine-N-oxide), 라시오카르핀 (lasiocarpine), 이노토디올 (inotodiol), 글리코시드 1a (glycoside 1a), 포도필로톡신 (podophyllotoxin), 저스티시딘 A 및 B (justicidin A and B), 라레아틴 (larreatin), 말로테린 (malloterin), 말로토크로마놀 (mallotochromanol), 이소부틸말로토크로마놀 (isobutyrylmallotochromanol), 마퀴로시드 A (maquiroside A), 마찬틴 A (marchantin A), 메이탄신 (maytansine), 리코리디신 (lycoridicin), 마르게틴 (margetine), 판크라티스타틴 (pancratistatin), 리리오테닌 (liriodenine), 옥소우신수닌 (oxoushinsunine), 아리스톨락탐-AII (aristolactam-AII), 비스파르테놀리딘 (bisparthenolidine), 페리플로코시드 A (periplocoside A), 갈라키노시드 (ghalakinoside), 우르솔산 (ursolic acid), 디옥시프로소스페르민 (deoxyprosopospermin), 사이코루빈 (psychorubin), 리신 A (ricin A), 상귀나린 (sanguinarine), 만우 윗 산 (manwu wheat acid), 메틸소르비폴린 (methylsorbifolin), 스파델리아크로멘 (sphatheliachromen), 스티조필린 (stizophyllin), 스트레블로시드 (strebloside), 아카게린 (akagerine), 디하이드러스암 바렌신 (dihydrousambarensine), 히드록시우삼바린 (hydroxyusambarine), 스트리크노펜타민 (strychnopentamine), 스트리크노필린 (strychnophylline), 우삼바린 (usambarine), 우삼바렌신 (usambarensine), 다프노레틴 (daphnoretin), 라리시레시놀 (lariciresinol), 메톡시라리시레시놀 (methoxylariciresinol), 시링가레시놀 (syringaresinol), 움벨리페론 (umbelliferon), 아프로모손 (afromoson), 아세틸비스미온 B (acetylvismione B), 데스아세틸비스미온 A (desacetylvismione A), 비스미온 A 및 B (vismione A and B), 시스틴과 같은 황 포함 아미노산, 및 상기 언급한 활성제의 염 또는 그 혼합물로 이루어진 군에서 선택되고; 상기 항혈전성 활성제는 실론아미드, 메트로니다졸 (metronidazol), 아르가트로반 (argatroban), 아스피린 (aspirin), 압식시맙 (abciximab), 합성 안티트롬빈 (syntheticantithrombin), 비발리루딘 (bivalirudin), 코우마딘 (coumadin), 에녹사파린 (enoxaparin), 탈황산화된 및 N-재아세틸화된 헤파린 (desulphated and N-reacetylated heparin)과 같은 항혈전제 (antithrombotic), 조직 플라스미노겐 활성화제 (tissue plasminogen activator), GpIIb/IIIa 혈소판 막 수용체 (GpIIb/IIIa platelet membrane receptor), Xa 인자 억제제 항제, 헤파린 (heparin), 히루딘 (hirudin), r-히루딘 (r-hirudin), PPACK, 프로타

민 (protamin), 2-메틸티아졸리딘-2,4-디카르복실산의 나트륨염, 프로우로키나제 (prourokinase), 스트렙토키나제 (streptokinase), 와파린 (warfarin), 우로키나제 (urokinase), 디피라미돌 (dipyramidole), 트라피딜 (trapidil), 나이트로프루사이드 (nitroprusside), 트리아졸로피리미딘 (triazolopyrimidine) 및 세라민 (seramin)과 같은 PDGF 항체, 캡토프릴 (captopril), 실라자프릴 (cilazapril), 리시노프릴 (lisinopril), 에날라프릴 (enalapril), 로사탄 (losartan), 티오-프로테아제 (thio-protease) 억제제, 프로스타시클린 (prostacyclin), 바피프로스트 (vapiprost), α , β 및 γ 인터페론, 히스타민 길항제 (histamine antagonist), 세로토닌 차단제 (serotonin blocker), 아포토시스 (apoptosis) 억제제, p65, NF-kB 또는 Bcl-xL 안티센스 올리고뉴클레오티드, 할로퓨지논 (halofuginone), 니페디핀 (nifedipine), 토코페롤, 비타민 B1, B2, B6 및 B12, 폴산 (folic acid), 트래닐라스트 (tranilast), 몰시도민 (molsidomine), 티폴리페놀 (tea polyphenol), 에피카테킨 (epicatechin gallate), 몰식자산 에피갈로카테킨 (epigallocatechingallate) 및 보스웰린산 (Boswellinic acid) 및 그 유도체로 이루어진 군에서 선택될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0049] 상기 페놀 유도체는 티라민, 하이드록시페닐아세트산, 하이드록시프로피온산 및 이의 유도체로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상일 수 있으며, 상기 카테콜 유도체는 L-디하이드록시 페닐알라닌(L-DOPA), 도파민 (dopamine), 노레피네프린(norepinephrine), 에피네프린(epinephrin), 에피갈로카테킨(epigallocatechin gallate) 및 이들의 유도체로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상일 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0050] 상기 링커는 폴리에스터, 폴리안하이드리드, 폴리오르토에스터, 폴리우레탄, 폴리아마이드, 폴리펩타이드, 다핵 지방족, 다핵방향족, 알킬 사슬 및 이들의 조합물로 이루어진 군에서 선택된 고분자일 수 있다.

[0051] 또한, 상기 링커는 폴리에틸렌글리콜-폴리락트산[PEG-PLA], 폴리에틸렌글리콜-폴리카프로락톤[PEG-PCL], 폴리에틸렌글리콜-폴리(DL-락틱-코-글리코산)[PEG-PLGA], 폴리((프로필렌)푸마레이트), 폴리((에틸렌)푸마레이트) 및 이들의 조합물로 이루어진 군에서 선택된 친수성 고분자일 수 있다.

[0052] 또한, 상기 링커는 폴리에틸렌글리콜[PEG], 폴리에틸렌옥사이드[PEO], 폴리에틸렌이민[PEI], 폴리프로필렌옥사이드[PP0], 폴리비닐알코올[PVA], 폴리(N-이소프로필아크릴아마이드)[polyNIPAM], 폴리푸마레이트, 폴리오르가노포스파젠, 폴리아크릴산[polyAAc], 폴리아크릴설포네이트, 폴리하이드록시에틸메타크릴레이트[PolYHEMA] 및 이들의 공중합체로 이루어진 군에서 선택된 친수성 고분자일 수 있으며, 상기 공중합체는 PEO-PP0-PEO (Pluronic[®]

시리즈), 4지(4-arm) PEO-PP0-PEO (Tetronic[®]

시리즈), PEG-PEI, PEG-PVA, PEG-PEI-PVA, PEI-PVA, 폴리(NIPAAm-co-AAc), 폴리(NIPAAm-co-HEMA) 및 이들의 조합물로 이루어진 군에서 선택된 친수성 고분자일 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0053] 상기 폴리페놀산화효소는 티로시네이즈(tyrosinase) 및 카테콜옥시데이즈(catechol oxidase)로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상일 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0054] 상기 기재는 금속 또는 고분자일 수 있으며, 특히 의료용 금속 또는 고분자일 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0055] 상기 기재 표면 처리는 생리활성 물질과 폴리페놀산화효소를 포함한 용액을 기재에 분무, 분사, 페인팅, 침지, 롤 코팅 및 플로우 코팅으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 방법으로 처리할 수 있다.

[0056] 특히, 본 발명에 따르면, 상기 폴리페놀산화효소(PPO)의 농도, 반응온도, 반응시간, 펩타이드, 단백질 의약품 또는 고분자의 초기 도입량과 페놀 또는 카테콜 분자와 고분자 주사슬 사이의 고분자 분자량의 조절에 의하여 쉽게 기재 표면 고정화 양을 조절할 수 있다.

[0057] 상기 생리활성 물질과 폴리페놀산화효소를 포함한 용액은 생리활성 물질 0.001 내지 50 중량% 및 폴리페놀산화효소 0.001 내지 1 KU/ml를 포함한 것이 바람직하다. 만약, 상기 범위를 벗어나 생리활성 물질 및 폴리페놀산화효소를 포함하게 되면 효율적인 고정화 반응이 일어나지 않을 수도 있다.

[0058] 상기 기재 표면 처리는 5분 이내의 짧은 시간에도 효과적인 고정화가 가능하며 그 이상의 반응시간으로도 고정화가 가능하다.

[0059] 본 발명의 일실시예로서, 티로신(tyrosine)을 포함하는 세포 부착 단백질 (서열번호 15: GRGDGGGGY)을 티로시

네이즈(tyrosinase)를 이용하여 티로신의 페놀 그룹을 in situ로 도파/도파퀴논 형태로 변화하여 수용액 상태에서 배위 결합을 통해 간단하게 금속 또는 고분자 표면에 고정화할 수 있다.

[0060] 또한, 본 발명의 일실시예에 따르면, 고분자 주사슬로 항혈전성 물질인 헤파린과 단백질 및 효소 분해성 천연고분자인 젤라틴과 키토산 등의 천연고분자를 사용하며, 중간 링커로 PEG와 같은 수용성 고분자를 사용하여 페놀 또는 카테콜 분자를 결합시킨 헤파린-PEG-티라민(HPT), 젤라틴-PEG-티라민(GPT)과 키토산-PEG-티라민(CPT)을 합성하였으며, 상기 고분자를 티로시네이즈를 이용하여 페놀 또는 카테콜 그룹을 in situ로 도파/도파 퀴논 형태로 변화하여 수용액 상태에서 간단한 방법으로 금속 또는 고분자 표면에 고정화할 수 있으며, 이때, 티로시네이즈의 농도, 반응온도, 반응시간, 반응 용액의 용존산소량, 펩타이드, 고분자의 초기 도입량과 페놀 또는 카테콜 분자와 고분자 주사슬 사이의 수용성 고분자 분자량의 조절에 의하여 쉽게 표면 고정화량을 조절할 수 있다.

[0061] 또한, 본 발명은 양 말단에 티라민이 도입된 고분자를 준비하는 단계(제1단계); 상기 고분자와 폴리페놀산화효소를 기재 표면에 처리하여 고분자를 기재 표면에 결합시키는 단계(제2단계) 및 상기 고분자를 링커로 사용하여 고분자 표면에 생성된 도파 퀴논 분자를 이용하여 마이클 첨가 반응(michael addition reaction)과 이민 형성 반응(imine formation reaction)을 통하여 생리활성 물질, 항증식성 활성제, 항염증성 활성제 또는 항혈전성 활성제 중 어느 하나 또는 둘 이상을 기재 표면에 결합시키는 단계(제3단계)를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는, 폴리페놀산화효소를 이용한 생리활성 물질의 표면 고정화 방법을 제공한다.

[0062] 상기 폴리페놀산화효소의 종류, 상기 기재의 종류, 상기 기재 표면 처리 방법 등은 앞선 기재된 바와 동일하므로 생략한다.

[0063] 본 발명의 일실시예로서, 티로시네이즈를 이용하여 티라민-폴리(에틸렌글리콜)-티라민(PEG-TA)을 금속 또는 고분자 표면에 고정화한 후, 표면에 생성된 도파 퀴논 분자를 이용하여 마이클 첨가 반응(michael addition reaction)과 이민 형성 반응(imine formation reaction)을 통하여 생리활성 물질을 금속 또는 고분자 표면에 고정화 하며, 고정화에 따른 표면의 성장인자의 고정화 정도를 평가할 수 있다.

[0064] 본 발명에 따른 폴리페놀산화효소를 이용한 생리활성 물질의 표면 고정화 기술은 의료용 금속 및 고분자 소재 표면에 생리활성 물질 또는 골조직 형성 유도 성장인자를 간단한 방법으로 고정화할 수 있는 유용한 기술로서, 예를 들어, 정형외과 또는 치과용 임플란트 소재에 세포 부착 생리활성 물질을 쉽게 고정화하여 임플란트 후 빠른 골 조직 형성 유도에 효과적으로 이용될 수 있다. 또한, 스텐트 및 인공혈관과 같은 혈관계 의료용 소재에 항혈전성 생리활성 물질 및 혈관 내피세포 촉진 물질을 표면에 쉽게 고정화하여 혈액 적합성을 향상시키는데 효과적으로 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0065] 본 발명에 따르면, 폴리페놀산화효소 특히, 티로시네이즈를 이용한 생리활성 물질의 표면 고정화 방법은 의료용 금속 또는 고분자 소재 표면에 생리활성 물질을 간단한 방법으로 고정화할 수 있는 유용한 기술로서, 예를 들어, 정형외과 또는 치과용 임플란트 소재에 세포 부착 생리활성 물질을 쉽게 고정화하여 임플란트 후 빠른 골 조직 형성 유도에 효과적으로 사용될 수 있으며, 또한 스텐트 및 인공혈관과 같은 혈관계 의료용 소재에 항혈전성 생리활성 물질을 표면에 쉽게 고정화하여 혈액 적합성을 향상시키는 데에 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0066] 도 1은 일실시예에 따른 생리활성 물질의 기재 표면 고정화 방법을 나타내는 모식도이고,
 도 2는 헤파린-폴리(에틸렌글리콜)-티라민(HPT) 공중합체의 합성을 나타내는 모식도이고,
 도 3은 젤라틴-폴리(에틸렌글리콜)-티라민(GPT) 공중합체의 합성을 나타내는 모식도이고,
 도 4는 티라민-폴리(에틸렌글리콜)-티라민 (PEG-TA) 공중합체의 합성을 나타내는 모식도이고,
 도 5는 티로시네이즈 농도에 따른 티라민의 도파민으로의 변화 (conversion ratio) 결과를 나타낸 것이고,
 도 6은 도파민과 티로시네이즈를 이용한 티라민이 고정화된 금속 시편의 접촉각 결과를 나타낸 것이고,
 도 7은 도파민과 티로시네이즈를 이용한 티라민이 고정화된 금속 시편의 표면 아민 분포도 결과를 나타낸 것이고,
 도 8은 티로시네이즈를 이용하여 간단한 침지 방법으로 RGD, 젤라틴, 헤파린 및 성장인자를 표면에 고정화하는

모식도를 나타낸 것이고,

도 9는 티로시네이즈를 이용하여 간단한 침지 방법으로 티라민-폴리(에틸렌글리콜)-티라민 (PEG-TA)을 표면에 고정화한 후 표면에 도입된 도파 쿨논 분자를 이용한 단백질 의약품 (성장인자 포함)을 고정화하는 모식도를 나타낸 것이고,

도 10은 티로시네이즈 반응을 이용하여 금속 표면에 고정화된 성장인자 농도를 나타낸 것이고,

도 11은 티로시네이즈 반응을 이용하여 간단한 침지 방법으로 RGD와 YIGSR을 고분자 (폴리우레탄) 표면에 고정화하는 모식도를 나타낸 것이고,

도 12는 티로시네이즈를 이용한 생리활성 물질이 고정화된 금속 표면의 접촉각 측정결과를 나타낸 것이고,

도 13은 티로시네이즈, 반응 시간과 RGD 초기 도입 농도에 따른 표면에 고정화된 RGD 농도를 나타낸 것이고,

도 14는 티로시네이즈, 반응 시간과 HPT 초기 도입 농도에 따른 표면에 고정화된 헤파린의 농도를 나타낸 것이고,

도 15는 티로시네이즈, 반응 시간과 GPT 초기 도입 농도에 따른 표면에 고정화된 젤라틴의 농도를 나타낸 것이고,

도 16은 티로시네이즈를 이용하여 도입된 RGD와 YIGSR 펩타이드의 표면 농도를 나타내는 것이고,

도 17은 티로시네이즈를 이용하여 금속 표면에 고정화된 RGD, 젤라틴과 헤파린의 안정성 평가 결과를 나타내는 것이고,

도 18은 세포 부착 펩타이드인 RGD와 젤라틴이 고정화된 스테인레스 스틸과 티타늄의 세포 부착 평가 결과를 나타낸 것이고,

도 19는 세포 부착 펩타이드인 RGD가 고정화된 티타늄의 세포 형상 관찰 결과를 나타내는 것이고,

도 20은 티로시네이즈를 이용한 RGD 또는 젤라틴이 고정화된 스테인레스 스틸 표면의 세포 증식능 평가 결과를 나타낸 것이고,

도 21은 티로시네이즈를 이용하여 표면에 고정화된 헤파린의 활성 평가 결과를 나타낸 것이고,

도 22는 전기 방사법 모식도 및 전기방사법으로 제조된 폴리우레탄 인공 혈관의 전자 현미경 사진을 나타낸 것이고,

도 23은 티로시네이즈를 이용한 생리활성 물질이 고정화된 인공혈관을 이용한 동물 실험 모식도를 나타낸 것이고(a: 시술 전 토끼의 경동맥, b: 클램프로 혈액 유실을 막은 후 경동맥 절단, c: 절단 부위에 인공혈관 이식, d: 인공혈관 이식 모습),

도 24는 적출한 인공혈관의 부위별 육안 평가를 나타낸 것이고(PU: 대조군, Pep: PU-PEG-Heparin/YIGSR/RGD),

도 25는 적출한 인공혈관의 조직학적 분석 평가를 나타낸 것이다(a: PU, b: PU-PEG-Heparin/YIGSR/RGD, c: PU-PEG-Heparin).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0067] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0068] 본 발명의 일실시예로서 티로시네이즈를 이용하여 세포 부착 펩타이드(서열번호 15: GRGDGGGGY), 헤파린-폴리(에틸렌글리콜)-티라민(HPT)과 젤라틴-폴리(에틸렌글리콜)-티라민(GPT)을 간단한 침지 방법으로 금속 또는 고분자 표면에 고정화하였으며, 고정화에 따른 표면의 물리화학적 성질 변화, 세포 친화도, 고정화된 헤파린의 활성 및 혈액적합성 등을 평가하였다.

[0069] 또한, 티로시네이즈를 이용하여 티라민-폴리(에틸렌글리콜)-티라민(PEG-TA)을 금속 또는 고분자 표면에 고정화한 후, 표면에 생성된 도파 쿨논 분자를 이용하여 마이클 첨가 반응(michael addition reaction)과 이민 형성 반응(imine formation reaction)을 통하여 생리활성 물질 및 약물을 금속 또는 고분자 표면에 고정화 하였으며, 고정화에 따른 표면의 성장인자의 고정화 정도를 평가하였다.

[0070]

- [0071] 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시 예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0072] <제조예 1> 헤파린-폴리(에틸렌글리콜)-티라민(HPT)의 합성
- [0073] 도 2는 HPT의 합성 모식도를 나타낸 것이다.
- [0074] 1. 폴리(에틸렌글리콜)-(p-니트로페닐클로로포메이트)[PEG-PNC] 합성
- [0075] PEG 10 g (2.9 mmol)을 MC 100 ml에 용해시킨 후 이 용액에 4-디메틸아미노피리딘(DMAP) 0.779 g (6.38 mmol)과 트리에틸아민(TEA) 0.645 g (6.38 mmol)을 MC 10 ml에 용해시킨 용액과 PNC 1.286 g (6.38 mmol)를 MC 50 ml에 용해시킨 용액을 순차적으로 혼합하였다. 이때 PEG : DMAP : TEA : PNC의 몰비율은 1 : 2.2 : 2.2 : 2.2이며, 반응 온도는 30 ℃이며, 질소 분위기에서 24 시간 동안 반응을 진행하였다.
- [0076] 반응 종료 후 용액을 여과기를 이용하여 잔존하는 시약들을 제거한 후 회전식 증발 농축기를 이용하여 반응 용액을 농축시켰다. 농축 용액을 차가운 에테르 1600 ml에 한 방울씩 떨어뜨려 침전을 생성시키고 이 침전물을 여과기를 이용하여 여과하여 생성물을 수득하였다. 수득된 생성물은 잔여 유기 용매를 제거하기 위해 진공 오븐에 24 시간 방치한 후, 백색의 분말 형태의 생산물(PEG-PNC)을 수득하였다.
- [0077] 2. 아미네이트드 폴리(에틸렌글리콜)-티라민(PTA)의 합성
- [0078] PEG-PNC 5 g (1.25 mmol)을 메틸렌클로라이드(MC) 100 ml에 용해시킨 용액에 티라민(TA) 0.174 g (1.25 mmol)을 MC 50 ml에 용해시킨 용액을 첨가하여 반응을 진행하였다. PEG-PNC : TA의 몰비율은 1 : 1이며, 반응 온도는 30 ℃이고 질소 분위기에서 6 시간 반응을 진행하였다. 6 시간 후, 에틸렌디아민 2.254 g (37.5 mmol)을 MC 50 ml에 용해시킨 용액을 혼합하여 30 ℃ 질소 분위기에서 24 시간 반응을 진행하였다. 이때, PEG-PNC : 에틸렌디아민의 몰비율은 1 : 30이었다.
- [0079] 반응이 종료된 용액은 여과기를 이용하여 잔존하는 시약들을 제거한 후 회전식 증발 농축기를 이용하여 반응 용액을 농축시켰다. 농축 용액을 차가운 에테르 1600 ml에 한 방울씩 떨어뜨려 침전을 생성시키고 이 침전물을 여과기를 이용하여 여과하여 생성물을 수득하였다. 수득된 생성물은 잔여 유기 용매를 제거하기 위해 진공 오븐에 24 시간 방치한 후, 백색의 분말 형태의 생산물(PTA)을 수득하였다.
- [0080] 3. 헤파린-폴리(에틸렌글리콜)-티라민(HPT)의 합성
- [0081] 헤파린 1 g을 증류수 30 ml에 용해시킨 용액에 EDC 0.065 g (0.334 mmol)과 NHS 0.019 g (0.167 mmol)을 각각 15 분 간격으로 순차적으로 가하였다. 이 후 반응 플라스크에 PTA 1.420 g (0.334 mmol)을 증류수 10 ml에 용해시킨 용액을 혼합하여 30 ℃에서 24시간 반응을 진행하였다.
- [0082] 반응이 종료된 용액은 여과기를 이용하여 잔존하는 시약들을 제거한 후, 증류수에서 3~4일 동안 멤브레인 투석(6000 - 8000 Da 분자량 차단)을 시행하였다. 투석이 완료된 용액을 동결 건조하여 백색 분말 형태의 생성물(HPT)을 수득하였다.
- [0083] <제조예 2> 젤라틴-폴리(에틸렌글리콜)-티라민(GPT)의 합성
- [0084] 도 3은 GPT 공중합체의 합성 모식도를 나타낸 것이다.
- [0085] 1. PEG-PNC 합성
- [0086] PEG 10 g (2.9 mmol)을 MC 100 ml에 용해시킨 후 이 용액에 4-디메틸아미노피리딘(DMAP) 0.779 g (6.38 mmol)과 트리에틸아민(TEA) 0.645 g (6.38 mmol)을 MC 10 ml에 용해시킨 용액과 PNC 1.286 g (6.38 mmol)를 MC 50 ml에 용해시킨 용액을 순차적으로 혼합하였다. 이때 PEG : DMAP : TEA : PNC의 몰비율은 1 : 2.2 : 2.2 : 2.2이며, 반응 온도는 30 ℃이며, 질소 분위기에서 24 시간 동안 반응을 진행하였다.
- [0087] 반응 종료 후 용액을 여과기를 이용하여 잔존하는 시약들을 제거한 후 회전식 증발 농축기를 이용하여 반응 용액을 농축시켰다. 농축 용액을 차가운 에테르 1600 ml에 한 방울씩 떨어뜨려 침전을 생성시키고 이 침전물을 여과기를 이용하여 여과하여 생성물을 수득하였다. 수득된 생성물은 잔여 유기 용매를 제거하기 위해 진공 오븐에 24 시간 방치한 후, 백색의 분말 형태의 생산물(PEG-PNC)을 수득하였다.
- [0088] 2. 젤라틴-폴리(에틸렌글리콜)-티라민(GPT)의 합성
- [0089] PEG-PNC 5 g (1.471 mmol)을 DMSO 100 ml에 용해시킨 용액에 TA 0.202 g (1.471 mmol)을 디메틸설폭사이드

(DMSO) 50 ml에 용해시킨 용액을 첨가하여 반응을 진행하였다. 이때, PEG-PNC : TA의 몰비율은 1 : 1 이며 반응 온도는 30 °C이고, 질소 분위기에서 6 시간 반응을 진행하였다. 6 시간 후, 젤라틴 용액 (1 g/200 ml in DMSO)을 혼합하여 30 °C 질소 분위기에서 24 시간 반응을 진행하였다.

[0090] 반응 종료 후, 반응 용액을 물에서 멤브레인 투석 (6000 - 8000 Da 분자량 차단)하여 반응하지 않은 PEG-TA를 제거하였다. 투석이 완료된 후, 용액을 동결 건조하여 백색의 분말 생성물 (GPT)을 수득하였다. 합성된 GPT의 화학구조는 ¹H NMR을 통하여 TA 치환물의 특성 피크인 (6.91 - 7.23 ppm)을 확인함으로써 합성이 잘 수행되었음을 확인하였다.

[0091] <제조예 3> 티라민-폴리(에틸렌글리콜)-티라민(PEG-TA)의 합성

[0092] 도 4는 티라민-폴리(에틸렌글리콜)-티라민(PEG-TA) 공중합체의 합성 모식도를 나타낸 것이다.

[0093] 1. PEG-PNC 합성

[0094] PEG 10 g (2.9 mmol)을 MC 100 ml에 용해시킨 후 이 용액에 4-디메틸아미노피리딘(DMAP) 0.779 g (6.38 mmol)과 트리에틸아민(TEA) 0.645 g (6.38 mmol)을 MC 10 ml에 용해시킨 용액과 PNC 1.286 g (6.38 mmol)를 MC 50 ml에 용해시킨 용액을 순차적으로 혼합하였다. 이때 PEG : DMAP : TEA : PNC의 몰비율은 1 : 2.2 : 2.2 : 2.2 이며, 반응 온도는 30 °C이며, 질소 분위기에서 24 시간 동안 반응을 진행하였다.

[0095] 2. 티라민-폴리(에틸렌글리콜)-티라민(PEG-TA)의 합성

[0096] PEG-PNC 5 g (1.25 mmol)을 메틸렌클로라이드(MC) 100 ml에 용해시킨 용액에 티라민(TA) 0.383 g (2.75 mmol)을 MC 100 ml에 용해시킨 용액을 첨가하여 반응을 진행하였다. PEG-PNC : TA의 몰비율은 1 : 2.2이며, 반응 온도는 30 °C이고 질소 분위기에서 6 시간 반응을 진행하였다.

[0097] 반응이 종료된 용액은 여과기를 이용하여 잔존하는 시약들을 제거한 후 회전식 증발 농축기를 이용하여 반응 용액을 농축시켰다. 농축 용액을 차가운 에테르 1600 ml에 한 방울씩 떨어뜨려 침전을 생성시키고 이 침전물을 여과기를 이용하여 여과하여 생성물을 수득하였다. 수득된 생성물은 잔여 유기 용매를 제거하기 위해 진공 오븐에 24 시간 방치한 후, 백색의 분말 형태의 생산물(PEG-TA)을 수득하였다.

[0098] <실시예 1> 티로시네이즈를 이용한 티라민의 도파민으로의 변화

[0099] 도 5는 티로시네이즈 농도에 따른 티라민의 도파민으로의 변화 (conversion ratio)를 나타낸다.

[0100] 실험을 위하여 10 mg/ml의 티라민을 1 ml 석영 큐브에 넣은 후, 티로시네이즈를 농도별 (0.2와 0.4 KU/mL)로 처리 후 1분에서 30분 동안 UV/VIS spectrometer (JASCO, V-750 UV/VIS/NIR, Japan)를 이용하여 모니터링 하였다 (파장 270 nm).

[0101] 그 결과, 티로시네이즈의 농도에 따라서 티라민의 도파민으로의 변화 속도를 조절할 수 있음을 확인하였으며, 티로시네이즈 0.4 KU/mL의 경우 5분 이내에 약 70%의 전환율을 나타내었다.

[0102] 이러한 실험결과는 통하여, 티로시네이즈를 이용하여 티라민 분자를 도파민/도파퀸 분자로 효과적으로 변환할 수 있음을 확인하였으며, 이렇게 변화된 도파민/도파퀸 분자는 수소 결합 혹은 배위 결합을 통하여 고분자 혹은 금속 표면에 고정화 될 수 있음을 확인하였다.

[0103] <실시예 2> 기존 사용되는 도파 고정화 기술과 티로시네이즈를 이용한 고정화 기술의 비교

[0104] 도 6은 도파민과 티로시네이즈를 이용한 티라민이 고정화된 금속 시편의 접촉각을 나타낸 것이고, 도 7은 도파민과 티로시네이즈를 이용한 티라민이 고정화된 금속 시편의 아민 분포도를 나타낸다.

[0105] 실시예 1에서 티로시네이즈를 이용하여 티라민 분자를 도파/도파퀸 분자로 효과적으로 변환할 수 있는 것을 확인하였으며, 기존에 사용되고 있는 도파를 이용한 표면 고정화 기술과 본 연구에서 설명하는 티로시네이즈를 이용한 고정화 기술을 비교 평가 하였다.

[0106] 실험을 위하여, 도파민과 티라민/티로시네이즈를 이용하여 금속 표면에 고정화 하는 비교 실험을 진행하였다. 구체적으로는 먼저 스테인레스 스틸 또는 티타늄 금속에 450 μL의 인산 완충용액을 넣고 각각 40 μL의 도파민과 티라민을 100 μg/mL의 농도로 첨가한 후, 티라민이 첨가된 용액에는 10 μL의 티로시네이즈를 0.4 KU/mL의 농도로 첨가하여 반응을 진행하였다. 효과적인 비교를 위하여 반응시간을 30 분으로 하였다. 고정화 실험 후, 시편은 증류수를 이용하여 3-5회 세척하였으며, 접촉각과 표면의 아민 분포도를 이용하여 결과를 분석하였다.

접촉각은 GBX Inc., France를 이용하여 측정하였으며, 1 μ L의 물방울을 시편 표면에 떨어뜨린 후 표면의 접촉각을 소프트웨어를 통하여 측정하였다.

[0107] 그 결과, 티로시네이즈를 이용한 티라민의 고정화 경우, 약 30° 정도로 도파를 이용한 경우 약 45° 에 비하여 보다 효과적인 고정화로 인하여 금속 표면의 친수화가 향상되는 것을 확인할 수 있었다.

[0108] 또한, 고정화로 인한 표면의 아민 분포도를 확인하기 위하여 FITC를 표면의 아민과 반응하여 형광 현미경을 통하여 관찰하였다. 현미경 관찰을 위하여, 도파민 또는 티라민이 고정화된 금속 표면을 1 ml의 FITC 용액 (100 μ g/mL in 에탄올)을 이용하여 1시간 반응을 진행하여 표면에 아민과 FITC의 결합을 유도하였으며, 반응 후 잔여 FITC 분자를 제거하기 위하여 증류수와 에탄올을 이용하여 3-5회 세척한 후 형광 현미경을 통하여 관찰하였다.

[0109] 그 결과, 접촉각 결과에서와 유사하게 티로시네이즈를 이용한 시편의 경우 55 RUF로 상대적으로 높은 형광 세기가 측정되었으며 초록 형광이 고르게 분포되어 있음을 확인하였다.

[0110] 본 실험을 통하여, 티로시네이즈를 이용한 고정화 실험이 기존 도파 실험에 비하여 보다 효과적이라는 사실을 증명하였다.

[0111] <실시예 3> 티로시네이즈를 이용한 RGD-Y, GPT와 HPT의 금속 표면 고정화

[0112] 도 8은 티로시네이즈를 이용하여 간단한 침지 방법으로 RGD, 젤라틴 및 헤파린을 금속 표면에 고정화하는 모식도를 나타낸 것이다.

[0113] 티로시네이즈를 이용하여 생리활성 물질을 금속 표면에 고정화 하기 위하여, 스테인레스 스틸 또는 티타늄을 이용하여 실험을 진행하였다. 먼저, 전처리 과정으로 프로판올, 에탄올 및 아세톤을 이용하여 순차적으로 세척하였다. 스테인레스 스틸 혹은 티타늄 시편에 450 μ L의 인산완충용액을 넣고 고정화를 원하는 생리활성 물질의 용액을 40 μ L에 용해시켜 첨가하였다. 이때 사용된 생리활성 물질의 농도는 다음과 같다. 1) RGD-Y: 50-400 μ g/mL, 2) HPT: 100-600 μ g/mL, 3) GPT: 100-600 μ g/mL이다. 이후, 생리활성 물질이 첨가된 용액에 10 μ L의 티로시네이즈를 첨가하여 고정화 반응을 진행하였다. 이때 사용된 티로시네이즈의 농도는 0.1 내지 1 KU/mL이며 반응시간은 5분 내지 3시간 동안 37°C, 100 rpm에서 진행하였다. 총 반응 용액은 500 μ L로 한다.

[0114] 반응 시간, 티로시네이즈의 농도 및 생리활성 물질의 초기 농도 조절하여 생리활성 물질의 고정화 농도를 조절할 수 있었다. 반응이 끝난 표면은 증류수로 3-5회 세척한 후, 진공 오븐에 건조하였다. 건조가 끝나면, 표면에 생리활성 물질이 고정화된 금속 표면이 완성 되었다.

[0115] <실시예 4> 티로시네이즈를 이용한 성장인자의 금속 표면 고정화

[0116] 도 9는 티로시네이즈를 이용하여 간단한 침지 방법으로 티라민-폴리(에틸렌글리콜)-티라민 (PEG-TA)을 표면에 고정화한 후 표면에 도입된 도파퀸 분자를 이용한 단백질 의약품(성장인자 포함)을 금속 표면에 고정화하는 모식도를 나타낸 것이다.

[0117] 티로시네이즈를 이용하여 표면에 성장인자를 고정화하기 위하여, 티라민-폴리(에틸렌글리콜)-티라민 (PEG-TA)을 고정하고 이로 인해 생성된 표면의 도파 퀸 분자를 이용하여 성장인자를 고정화하는 실험을 진행하였다.

[0118] 먼저, 제조예 3에 의하여 분자량 4,000 Da PEG를 이용하여 PEG-TA를 합성하였다. 고정화 실험을 위하여 스테인레스 스틸 또는 티타늄 시편을 490 μ L의 PEG-TA 용액에 넣고 10 μ L의 티로시네이즈를 0.4 KU/ml 농도로 첨가하고 30분 동안 고정화 실험을 진행하였다. PEG-TA가 고정화된 시편을 증류수로 3-5회 세척 후, 500 μ L의 성장인자 또는 단백질 의약품을 1 내지 50 μ g/mL의 농도로 첨가하여 PEG 말단에 생성된 도파 퀸 분자와 성장인자의 아민 또는 티올 분자 간의 결합을 유도하여 고정화 실험을 진행하였다. 이때 첨가되는 PEG-TA의 양은 10 내지 100 μ g/mL이다.

[0119] 그 결과, 도 10에 도시된 바와 같이 티로시네이즈 반응을 이용하여 금속 표면에 성장인자가 효과적으로 도입되었음을 확인하였으며, 성장인자의 고정화 농도는 도입된 PET-TA의 농도, 티로시네이즈의 농도 및 초기 도입된 성장인자의 농도에 의하여 조절 가능함을 확인하였다.

[0120] <실시예 5> 티로시네이즈를 이용한 RGD-Y 및 YIGSR의 고분자 표면 고정화

[0121] 도 11은 티로시네이즈를 이용한 간단한 침지 방법으로 RGD와 YIGSR 펩타이드를 고분자 (폴리우레탄) 표면에 고정화하는 모식도를 나타낸 것이다.

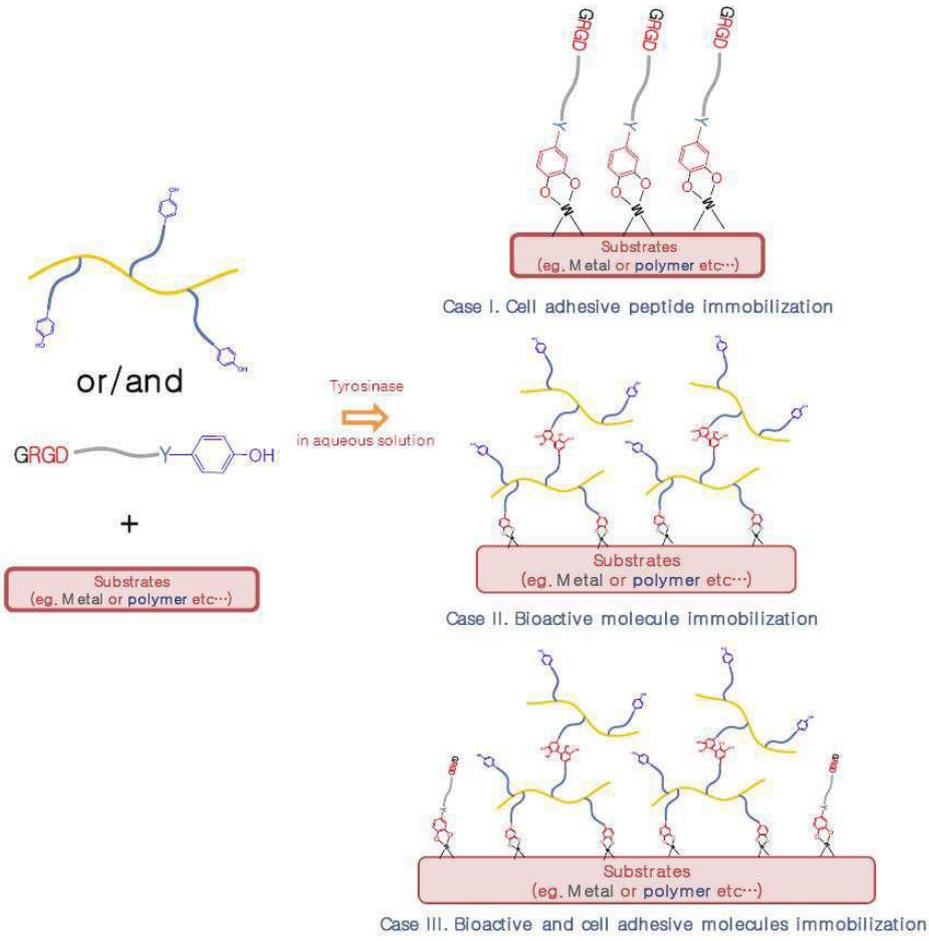
- [0122] 티로시네이즈를 이용하여 혈관 내피세포화를 촉진시킬 수 있는 RGD와 YIGSR 펩타이드를 고정화하기 위하여, 고분자 매쉬 (폴리우레탄)을 이용하여 고정화 실험을 진행하였다. 고분자 매쉬를 직경 1cm 로 편칭한 후, 450 μ L의 인산완충용액을 넣고 RGD 혹은 YIGSR 용액을 40 μ L에 용해시켜 첨가하였다. 이때 사용된 펩타이드의 농도는 50-400 μ g이다. 이후, 펩타이드가 첨가된 용액에 10 μ L의 티로시네이즈를 첨가하여 고정화 반응을 진행하였다. 이때 사용된 티로시네이즈의 농도는 0.4 KU/mL이며 반응시간은 5분 내지 3 시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 100 rpm에서 진행하였다. 총 반응 용액은 500 μ L로 하였으며, 반응이 끝나면 표면에 펩타이드가 고정화된 폴리우레탄 표면이 완성되었다.
- [0123] <실시예 6> 생리활성 물질이 고정화된 기재 표면의 접촉각 측정
- [0124] 생리활성 물질이 고정화된 표면의 친수화도 변화를 확인하기 위하여 접촉각을 측정하였다. 접촉각은 GBX Inc.(France)를 이용하여 측정하였으며, 1 μ L의 물방울을 시편 표면에 떨어뜨린 후 표면의 접촉각을 소프트웨어를 통하여 측정하였다.
- [0125] 그 결과, 도 12에 도시된 바와 같이, 생리활성 물질이 고정화되지 않은 시편에서는 약 62 $^{\circ}$ 의 접촉각을 보였으나, 생리활성 물질이 고정화된 시편에서는 약 49~51 $^{\circ}$ 정도의 접촉각을 나타내었다. 이 결과는 상대적으로 친수성이 높은 RGD나 헤파린 분자가 표면에 잘 고정화 되어 있음을 간접적으로 보여주는 결과이다.
- [0126] <실시예 7> 생리활성 물질이 고정화된 기재 표면에 고정화된 생리활성 물질의 정량
- [0127] 티로시네이즈, RGD 초기 도입량 및 반응시간에 따른 RGD 고정화 효과를 확인하기 위하여, 각 조건에 따라 RGD 표면 고정화 실험을 진행한 후, 플루오레스카민 분석(fluorescamine assay)을 통하여 표면의 RGD를 정량하였다. 실험을 위하여, RGD가 고정화된 피면을 375 μ L의 인산완충용액에 넣고 125 μ L의 플루오레스카민 용액 (100 μ g/mL in 아세톤) 첨가한 후, 1분 동안 상온에서 반응을 진행하였다. 반응 후, 반응 용액을 96 well-plate에 옮기고 형광 세기를 측정하였다. 이때 조건은 excitation 390 nm와 emission 475 nm이다.
- [0128] 그 결과, 도 13과 같이 티로시네이즈, RGD 초기 도입량 및 반응 시간이 증가할수록 표면 고정화 량이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, RGD 농도는 약 0.08-0.58 μ g/cm²로 조절이 가능하였으며, 실질적으로 0.17 μ g/cm²의 RGD 고정화 농도 이상에서 세포 부착 향상에 효과가 있는 것으로 세포 실험을 통하여 확인되었다.
- [0129] 또한, 티로시네이즈, HPT 초기 도입량 및 반응시간에 따른 헤파린 고정화 효과를 확인하기 위하여, 각 조건에 따라 HPT 표면 고정화 실험을 진행한 후, 톨루이딘 블루 분석(toluidine blue assay)을 통하여 표면의 헤파린을 정량하였다. 실험을 위하여, 헤파린이 고정화된 시편에 500 μ L의 톨루이딘 블루 분석 시약 (0.005%용액)을 첨가한 후 30분동안 상온에서 반응을 진행하여, 이때 교반을 통하여 헤파린과 톨루이딘 블루 복합체를 형성하게 하였다. 이렇게 형성된 복합체에 3 mL의 핵산을 첨가하여 녹여내며, 이후 수용층의 잔류 톨루이딘 블루를 630 nm의 파장에서 UV분석을 진행하였다. 검정곡선은 헤파린을 이용하였으며, 그 농도는 0.1 내지 8 μ g/mL이다.
- [0130] 그 결과, 도 14와 같이 티로시네이즈, HPT 초기 도입량 및 반응 시간이 증가할수록 헤파린의 표면 고정화 량이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 표면에 고정화되는 헤파린의 농도는 약 0.35~3.21 μ g/cm²로 조절이 가능하였다.
- [0131] 또한, 티로시네이즈, GPT 초기 도입량 및 반응시간에 따른 젤라틴 고정화 효과를 확인하기 위하여, 각 조건에 따라 GPT 표면 고정화 실험을 진행한 후, BCA kit을 이용하여 표면의 젤라틴을 정량하였다. 실험을 위하여, 젤라틴이 고정화된 시편에 500 μ L의 BCA 용액을 넣고 4시간 상온에서 반응을 진행하였다. 반응 후, 반응용액을 96 well-plate에 옮겨 형광 세기를 측정하였다.
- [0132] 그 결과, 도 15와 같이 티로시네이즈, GPT 초기 도입량 및 반응 시간이 증가할수록 젤라틴의 표면 고정화 량이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 표면에 고정화되는 젤라틴의 농도는 약 0.45~3.81 μ g/cm²로 조절이 가능하였다.
- [0133] 또한, 티로시네이즈를 이용한 RGD와 YIGSR 펩타이드의 고정화 효과를 확인하기 위하여, 폴리우레탄 매쉬에 상기 펩타이드 고정화 실험을 진행한 후, 플루오레스카민 분석(fluorescamine assay)을 통하여 표면의 RGD를 정량하였다. 실험을 위하여, RGD가 고정화된 피면을 375 μ L의 인산완충용액에 넣고 125 μ L의 플루오레스카민 용액 (100 μ g/mL in 아세톤) 첨가한 후, 1분 동안 상온에서 반응을 진행하였다. 반응 후, 반응 용액을 96 well-plate에 옮기고 형광 세기를 측정하였다. 이때 조건은 excitation 390 nm와 emission 475 nm이다.

- [0134] 그 결과, 도 16과 같이 폴리우레탄 매쉬에 RGD와 YIGSR 펩타이드가 0.2 nmol/cm² 이상 고정화된 것을 확인하였다.
- [0135] <실시에 8> 고정화된 생리활성 물질의 표면 안정성 평가
- [0136] 실시예 3에 따른 생리활성 물질이 고정화된 스테인레스 표면을 0.01 M 인산완충용액에 침지하여 37 °C 인큐베이터에서 체외 안정성을 평가하였다. 안정성 측정은 0 내지 30일까지 표면에 잔존하는 RGD, 젤라틴과 헤파린 양을 각각 플루오레스카민 분석(fluorescamine assay), BCA kit, 톨루이딘 블루 분석(toluidine blue assay)을 이용하여 정량을 실시하였다.
- [0137] 그 결과, 도 17과 같이 한달 후에도 RGD, 젤라틴과 헤파린이 70~80% 안정성을 유지하는 것을 확인하였다.
- [0138] <실시에 9> 고정화된 생리활성 물질의 In vitro 세포 부착 및 증식 평가
- [0139] 세포 부착성 평가를 위하여, 표면에 RGD 또는 젤라틴이 고정화된 스테인레스 스틸, 티타늄 혹은 폴리우레탄 표면에 골아세포(Osteoblast, MC3T3-E1)를 배양하였다. 실험에 사용된 세포의 농도는 2X10⁴ cell/cm²이었으며, 2 시간 혹은 1일 배양 후, MTT 분석을 통하여 평가하였다. MTT 분석은 살아있는 세포의 활성을 광학밀도로 나타내어 상대적인 값을 비교하여 세포의 부착 또는 증식을 확인하는 평가 방법이다. 또한, 배양된 세포의 형태를 확인하기 위하여 F-actin assay를 진행하였다. 실험을 위하여, 표면에 배양된 세포는 1 ml의 과라포름알데히드(4%)를 이용하여 고정화 하였으며, 고정화된 세포는 로드아민과 다피를 이용하여 각각 세포질과 핵을 염색하였다. 염색된 세포의 형상은 형광 현미경을 이용하여 관찰하였다.
- [0140] 그 결과, 도 18과 같이 RGD 또는 젤라틴이 고정화된 스테인레스 스틸, 티타늄 혹은 폴리우레탄 표면에서 세포부착능이 향상되는 것을 확인하였다. 세포 부착 펩타이드 또는 단백질이 부착되지 않은 금속 표면에서는 약 50~60%의 세포 부착률을 보였으나, RGD 또는 젤라틴이 고정화된 금속 표면에서는 80~90% 이상의 우수한 골아세포 부착능을 확인하였다. 도 19는 금속 표면에서 배양된 세포의 형상을 나타낸다. 그 결과, 티로시네이즈를 이용한 생리활성 물질이 고정화된 표면에서 세포질의 길이 혹은 면적이 보다 넓은 것을 확인하였다.
- [0141] 이는 티로시네이즈를 이용해 안정적으로 금속 표면에 도입된 RGD 또는 젤라틴이 골아세포의 부착능을 향상시킨 것으로 판단된다. 따라서, 티로시네이즈를 이용하여 안정적으로 금속 표면에 생리활성 물질을 고정화 할 수 있는 것을 확인하였으며, 고정화된 생리활성 물질이 활성을 유지하고 세포의 부착능을 향상시키는 것을 확인하였다.
- [0142] 또한, 세포 증식능 평가를 위하여, 표면에 RGD 또는 젤라틴이 고정화된 스테인레스 스틸, 티타늄 또는 폴리우레탄 표면에 골아세포(Osteoblast, MC3T3-E1)를 배양하였다. 실험에 사용된 세포의 농도는 1X10⁴ cell/cm²이었으며, 7일 동안 배양 후, MTT 분석을 통하여 평가하였다. ST-RGD 0.17의 형식으로 도식을 표기하였으며, 숫자가 의미하는 것은 표면에 고정화된 생리활성 물질의 농도($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)이다.
- [0143] 그 결과, 도 20과 같이 표면에 RGD 또는 젤라틴이 고정화된 스테인레스 스틸 표면에서 골아세포(Osteoblast, MC3T3-E1)의 증식능이 향상되는 것을 확인하였다. 티로시네이즈를 이용하여 고정화된 RGD 또는 젤라틴의 초기 세포 부착능 향상으로 인하여 세포 증식도 역시 생리활성 물질이 고정화 되지 않는 표면에 비하여 우수한 것을 확인하였다.
- [0144] 따라서, 티로시네이즈를 이용한 간단한 세포 부착 펩타이드 또는 단백질을 고정화하는 기술이 생체 재료 표면의 세포 활성도를 증가시키는데 유용하게 활용될 수 있음을 확인하였다.
- [0145] <실시에 10> 고정화된 헤파린의 활성 평가
- [0146] 티로시네이즈를 이용하여 표면에 고정화된 헤파린의 활성도를 확인하기 위하여, Factor Xa 분석을 이용하여 4주 동안 헤파린의 활성 유지 정도를 평가하였다. 헤파린이 고정화된 금속 표면을 0.01 M 인산완충용액에 침지하여 37 °C 인큐베이터에서 평가를 진행하였다. 헤파린의 활성 평가는 4주까지 표면의 잔존 헤파린의 활성을 대조군으로 유리 헤파린을 이용하여 Factor Xa 분석을 통하여 측정하였다.
- [0147] 그 결과, 도 21과 같이 4주 후에도 고정화된 헤파린의 활성이 80~85% 정도 유지하는 것을 확인하였다. 따라서, 티로시네이즈를 이용하여 간단한 방법으로 표면에 헤파린과 같은 생리활성 물질을 고정화하는 기술이 혈관계를 포함하는 의료장치 코팅에 유용한 기술이 될 것으로 판단된다.

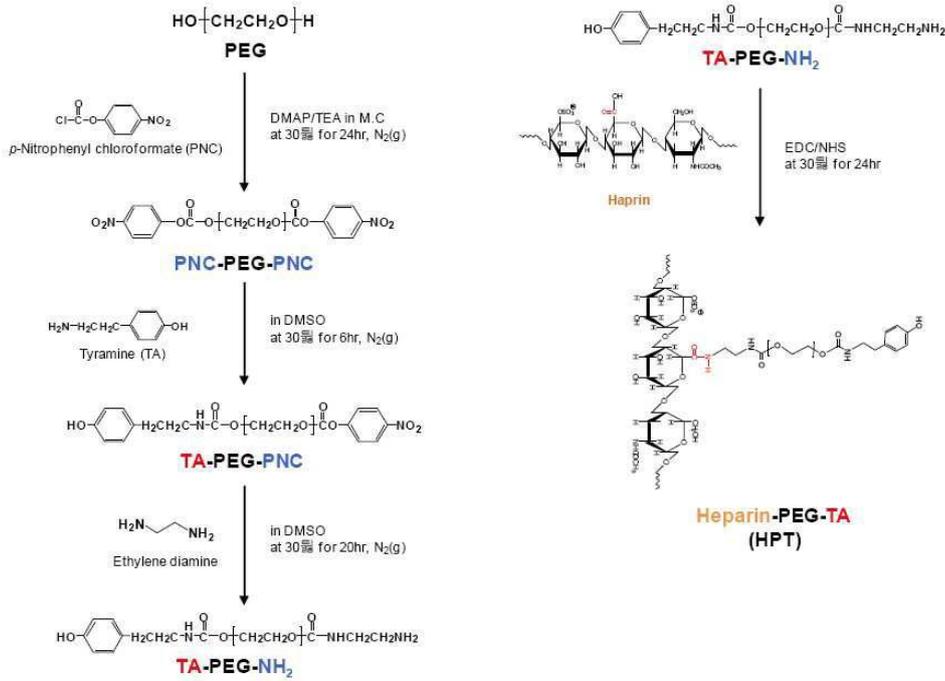
- [0148] <실시예 11> 티로시네이즈를 이용한 헤파린, RGD 또는 YISGR이 고정화된 폴리우레탄 인공혈관을 이용한 *in vivo* 동물 실험 평가
- [0149] 도 22는 전기방사법을 이용한 폴리우레탄 인공혈관 제조 모식도 및 제조된 인공혈관의 전자현미경 이미지를 나타낸 것이다.
- [0150] 도 23은 생리활성물질 (헤파린, RGD 혹은 YIGSR)이 고정화된 폴리우레탄 인공혈관을 이용한 동물실험 모식도를 나타낸 것이다.
- [0151] 실험을 위하여 폴리우레탄 인공혈관은 전기방사법을 이용하여 제조되었다. 전기 방사 조건은 고분자 농도 20%, 방사속도 10 μ L, 방사시간 3 시간, 전압 10 kV, 콜렉터 속도 400 rpm 및 콜렉터와 팁 사이의 거리는 25 cm이다.
- [0152] 동물 실험은 토끼 모델을 사용하였으며, 토끼를 전신마취 및 기관 삽입 후에 호흡기에 연결하여 기계호흡을 시킨 후, 수술부위인 복부의 전면을 면도하고 베타딘으로 2차례에 걸쳐 깨끗하게 소독하였다. 복부의 정중앙을 종으로 열어서 먼저 경동맥을 노출시키고 헤파린을 1~3mg 정맥 주사한 후에 복부 경동맥의 근위부 및 원위부를 혈관 겹자로 차단한 후, 복부 경동맥을 2 cm 가량 잘라내고 난 후에 생리활성물질 및 세포부착 펩타이드가 고정화된 폴리우레탄 인공혈관을 Prolene 6-0 실을 이용하여 연속적인 방법으로 근위부부터 단단문합(end-to-end anastomosis)한 후, 원위부도 같은 방법으로 문합 후 공기를 제거하고 혈관 겹자를 하나씩 제거하였다. 양측 혈관의 문합 부위에 더 이상 출혈이 되지 않는 것을 확인한 후에 상처 봉합하고, 토끼의 자발 호흡이 돌아오는 것을 확인한 후에 기관 삽입을 제거하고 우리로 이송하여 사육하였다. 토끼는 수술 시작 직전 및 수술 후에, 그리고 하루에 2 차례씩 항생제 및 진통제를 투여하였다.
- [0153] 적출 평가를 위하여, 혈관이식 후에 1주일에 1차례씩 doppler를 시행하여 혈관의 개통여부 확인하였으며, 수술 후 일정기간 동안 각각 혈관 촬영을 시행하여 혈관의 개통상태 및 이식된 혈관형태 관찰하였다. 관찰도중 인공혈관의 폐쇄 및 하반신마비가 확인이 되면 토끼를 안락사 시키고, 4개월까지 혈관의 개통성이 유지된 토끼는 수술 후 4개월에 모두 안락사 시켜서 이식된 인공혈관을 적출하였다. 적출된 혈관은 H&E 염색, vWF 염색, SMA 염색, CD68 염색, CD31 염색을 통하여 조직학적인 특성 관찰하였으며, 적출된 혈관의 일부분을 잘라서 혈관 내피세포를 보기 위한 CD31, vWF 등의 면역 염색을 시행하고 평활근을 관찰하기 위하여 평활근세포의 α -chain과 myosin heavy chain에 대한 면역염색(SMA stain) 및 대식세포에 대한 면역염색(CD68 stain)을 시행하여 관찰하였다. 적출혈관을 이용하여 혈관내피세포 및 평활근세포를 전자 현미경으로 관찰하였으며, image analyser로 부위별 개통성 관찰하였다.
- [0154] 그 결과, 도 24에 나타난 바와 같이, 의미 있는 정도의 협착을 유발하지 않았으며, 도 25에 나타난 바와 같이, 도관 내부의 협착을 일으킨 부분을 혈관내피세포(endothelial cell; Factor 8, CD31), 평활근세포(smooth muscle α -actin), 대식세포(macrophage: CD68)에 대한 면역염색 후 관찰한 결과, 미처리된 PU 도관에 비해 펩타이드 또는 CD34 항체와 헤파린 처리 도관에서 내피세포막이 관찰되었다.

도면

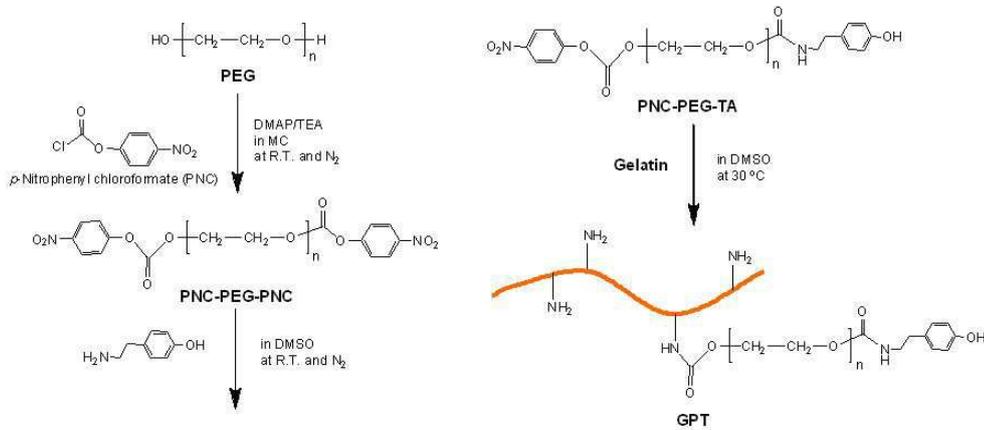
도면1



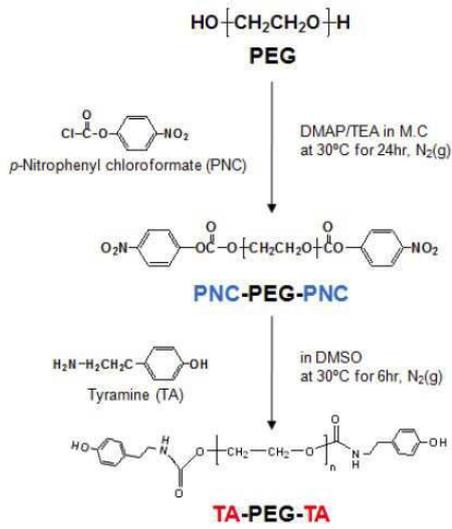
도면2



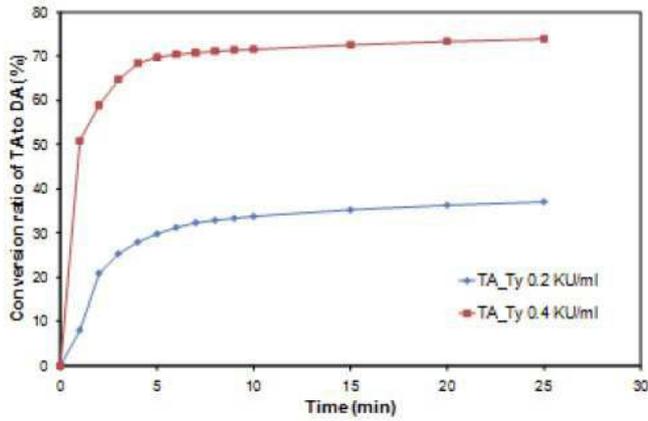
도면3



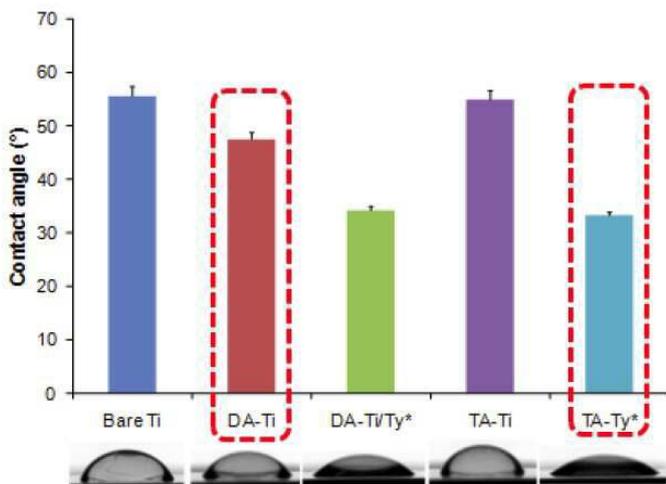
도면4



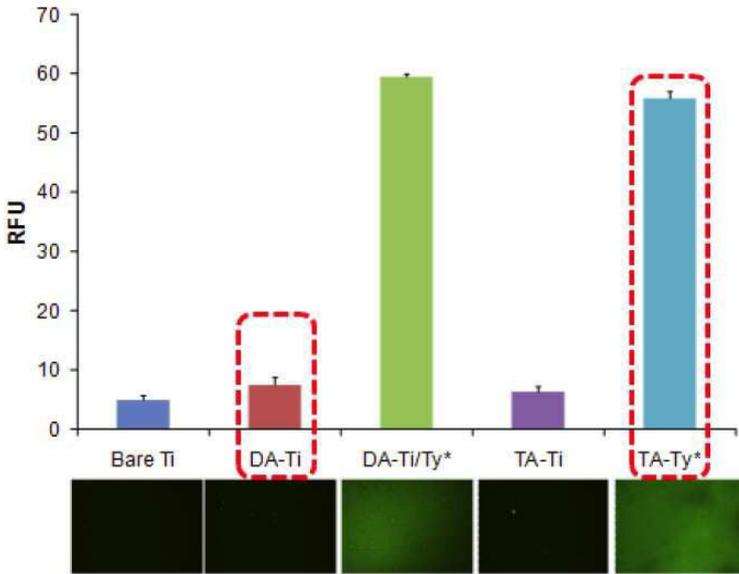
도면5



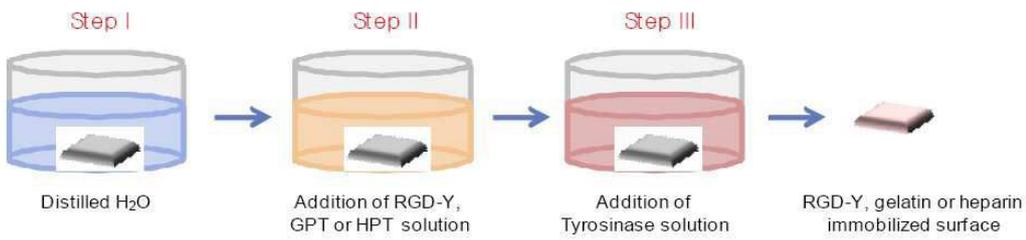
도면6



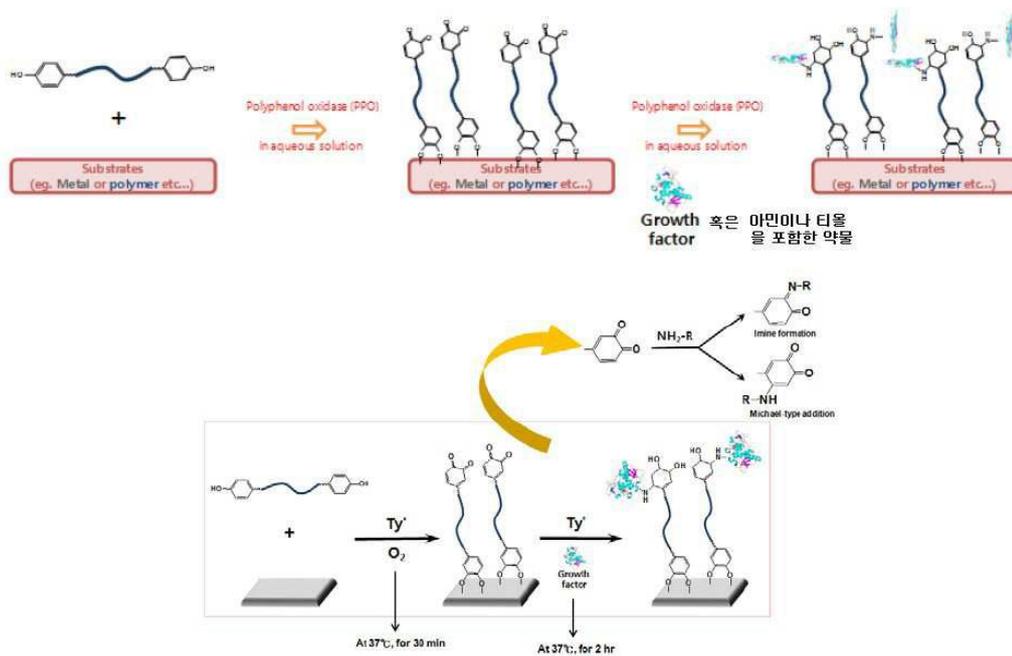
도면7



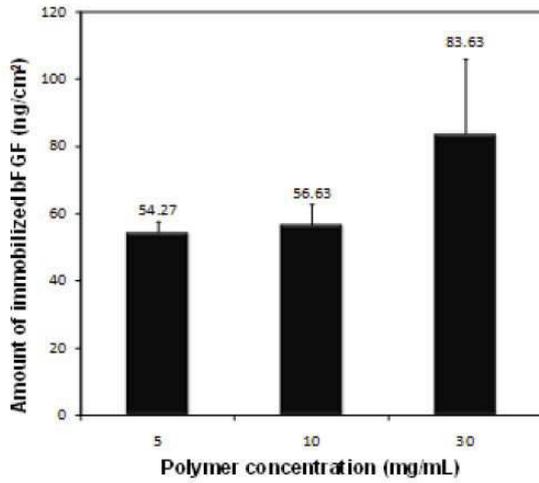
도면8



도면9

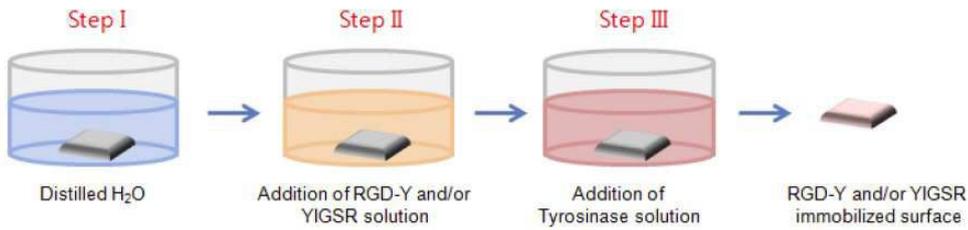


도면10

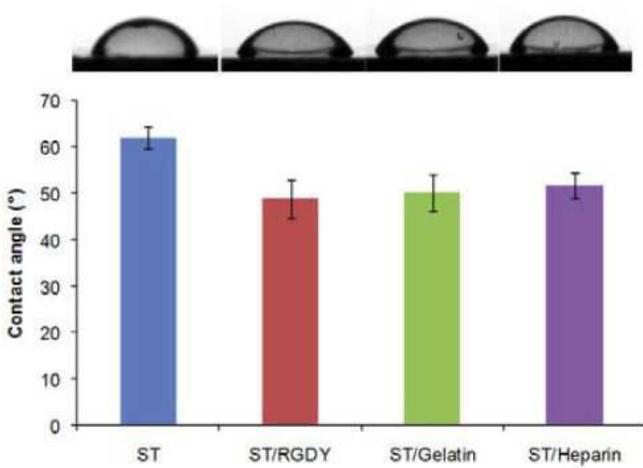


PEGTA conc. (mg/m)	bFGF amounts (ng)
5	54.27 ± 3.27
10	56.63 ± 6.08
30	83.63 ± 22.26

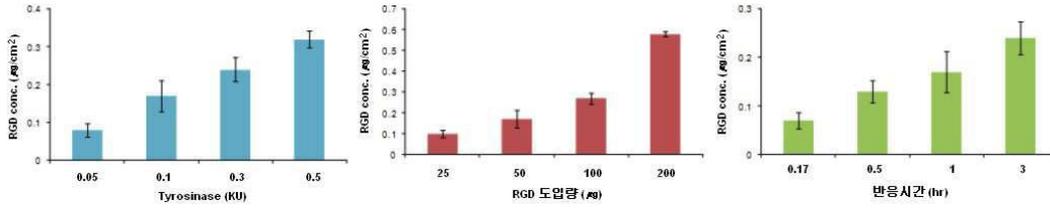
도면11



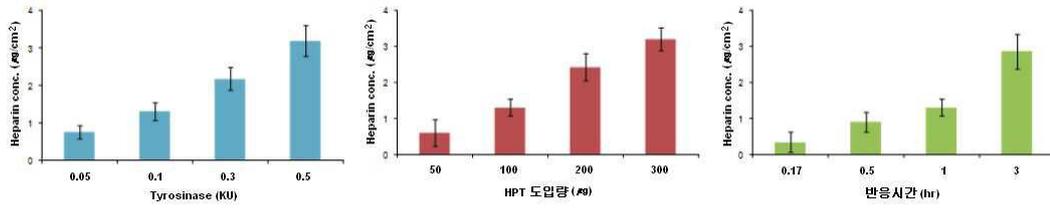
도면12



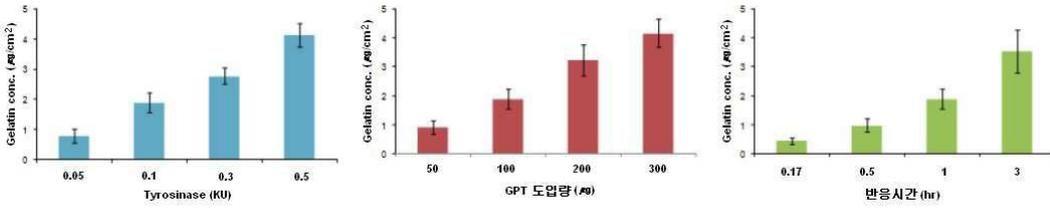
도면13



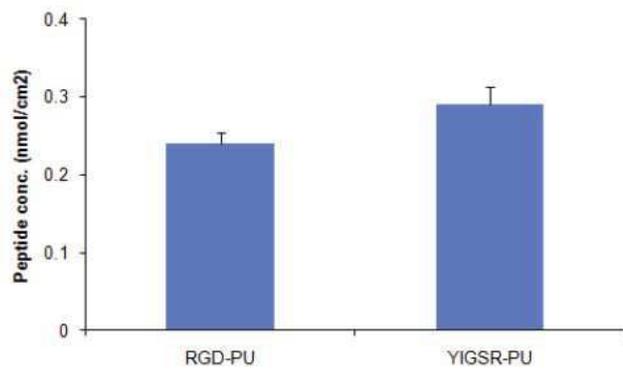
도면14



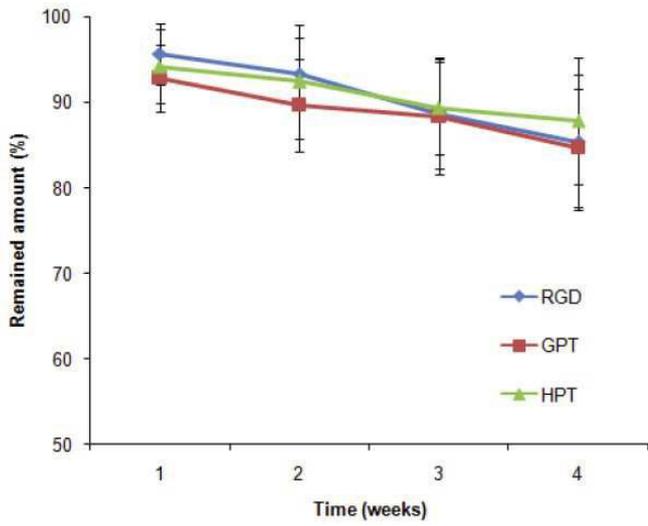
도면15



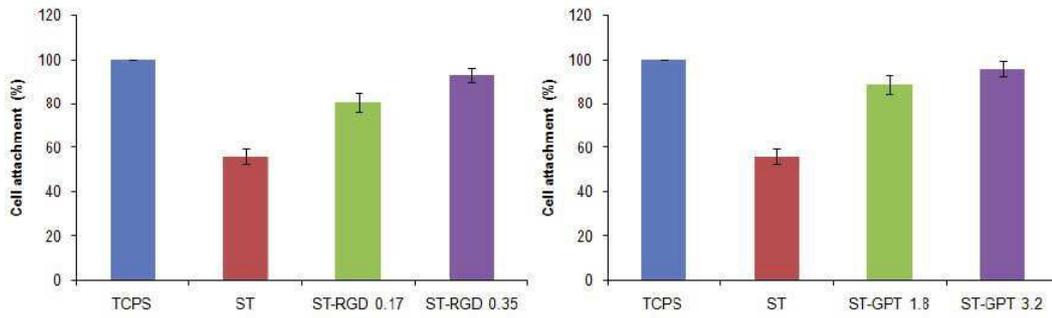
도면16



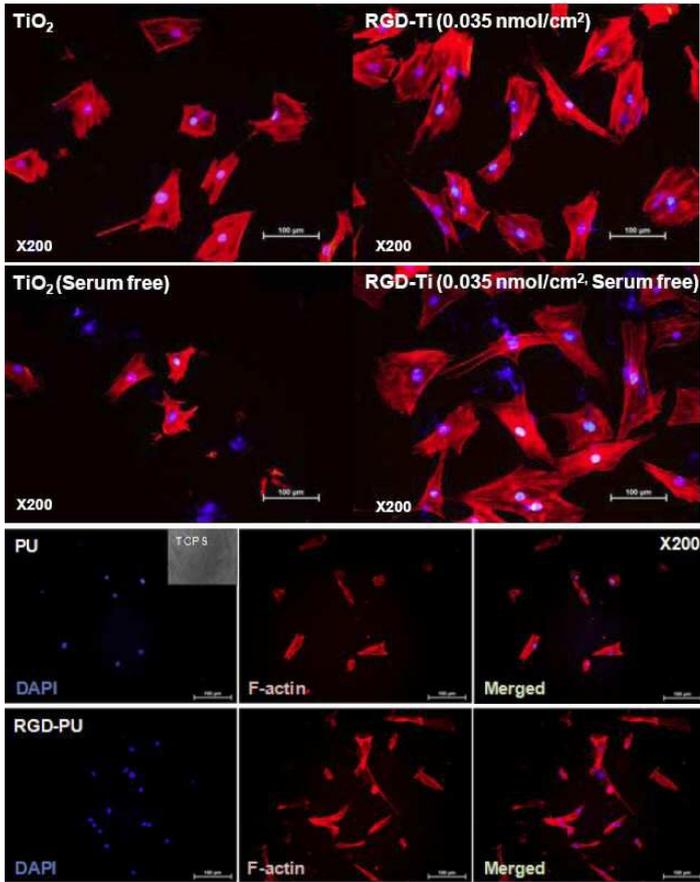
도면17



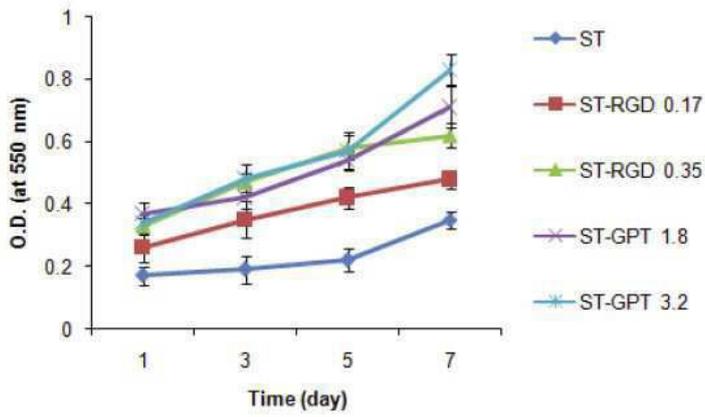
도면18



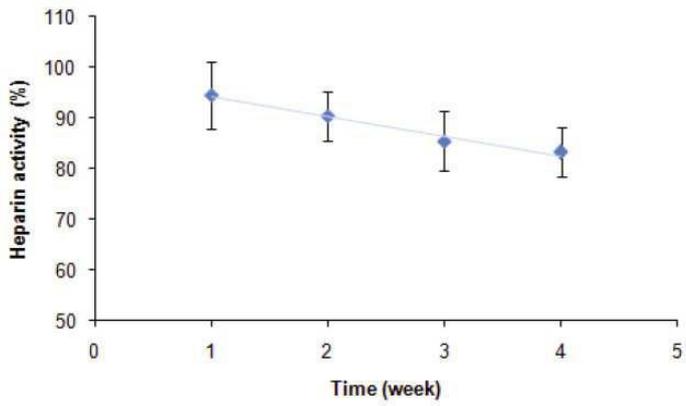
도면19



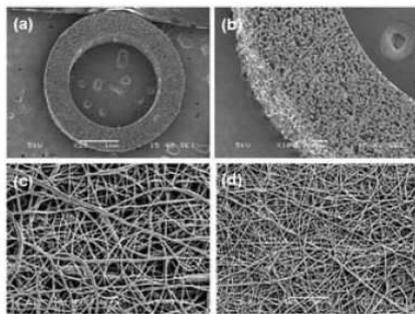
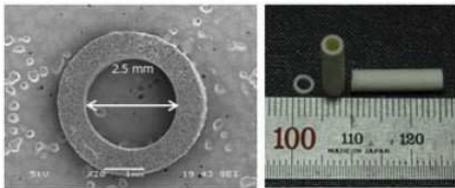
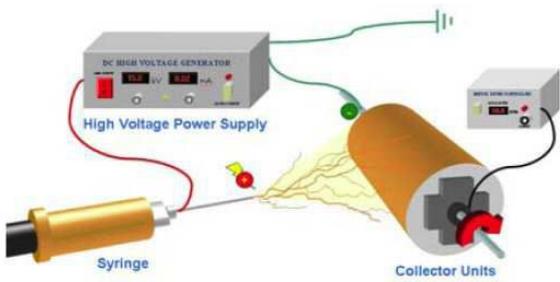
도면20



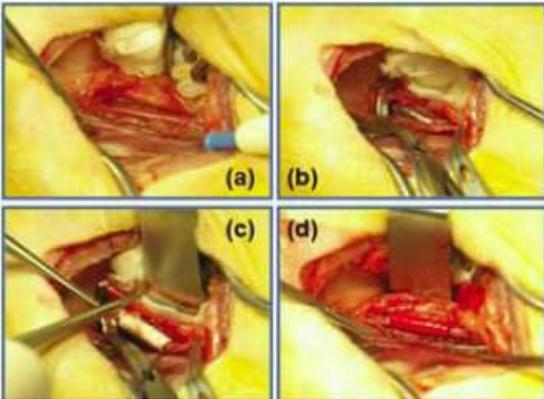
도면21



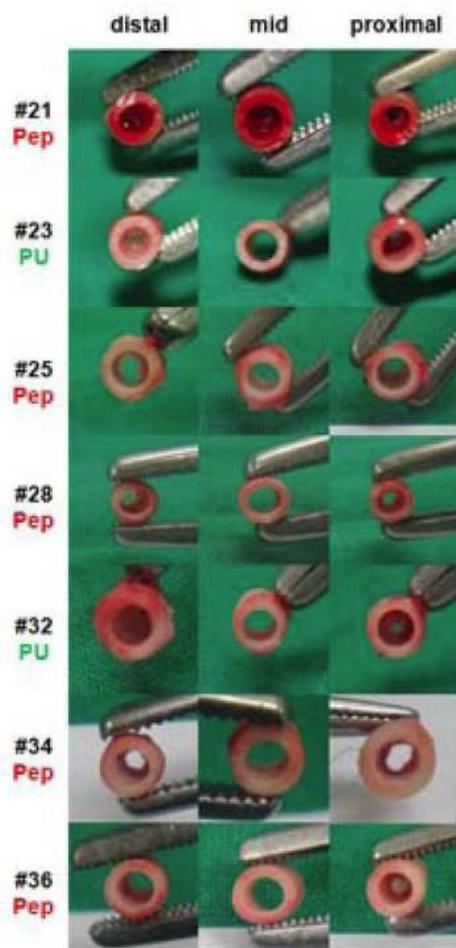
도면22



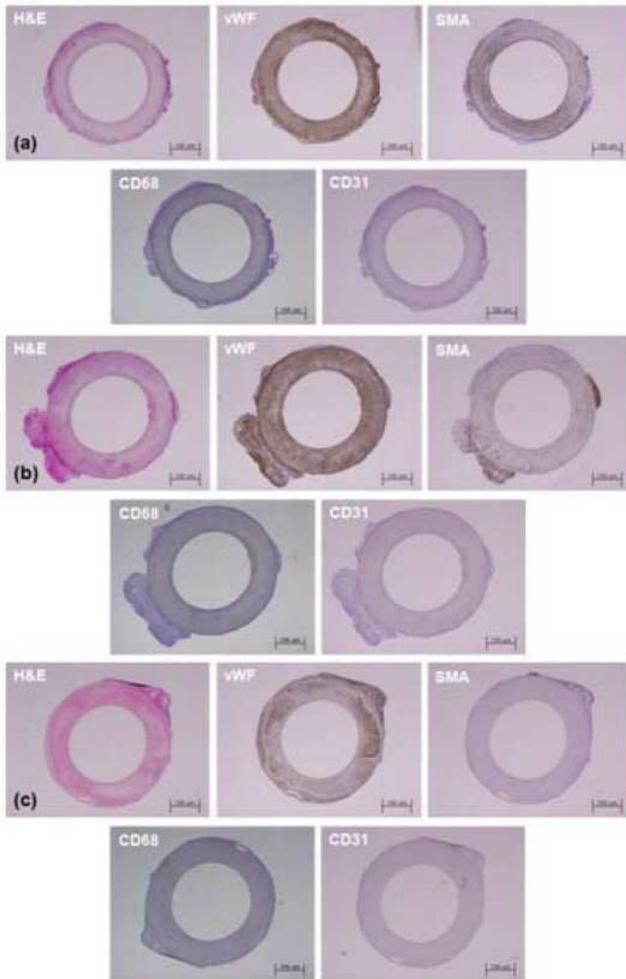
도면23



도면24



도면25



서열목록

<110> AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION

<120> Immobilization method of bioactive molecules using
polyphenoloxidase

<130> DP-2010-0360

<160> 15

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell adhesion molecule

<400> 1

Arg Gly Asp Tyr

1

<210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cell adhesion molecule
 <400> 2
 Lys Gln Ala Gly Asp Val Tyr

1 5
 <210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cell adhesion molecule
 <400> 3
 Tyr Ile Gly Ser Arg

1 5
 <210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cell adhesion molecule
 <400> 4
 Arg Glu Asp Val Tyr

1 5
 <210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cell adhesion molecule
 <400> 5
 Ile Lys Val Ala Asn Tyr

1 5
 <210> 6

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cell adhesion molecule
 <400> 6
 Arg Asn Ile Ala Glu Ile Ile Lys Asp Ile Tyr
 1 5 10

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell adhesion molecule

<400> 7

Lys His Ile Phe Ser Asp Asp Ser Ser Glu Tyr
 1 5 10

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell adhesion molecule

<400> 8

Val Pro Gly Ile Gly Tyr

1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell adhesion molecule

<400> 9

Phe His Arg Arg Ile Lys Ala Tyr

1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell adhesion molecule

<400> 10

Lys Arg Ser Arg Tyr

1 5

<210> 11

<211> 22

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> cell adhesion molecule

<400> 11

Asn Ser Pro Val Asn Ser Lys Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr

1 5 10 15

Glu Leu Ser Ala Ile Tyr

20

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell adhesion molecule

<400> 12

Ala Pro Gly Leu Tyr

1 5

<210> 13

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

cell adhesion molecule

<400> 13

Val Arg Asn Tyr

1

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell adhesion molecule

<400> 14

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Tyr

1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell adhesion molecule

<400> 15

Gly Arg Gly Asp Gly Gly Gly Gly Tyr

1 5 10