

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0137842
(43) 공개일자 2023년10월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C08B 37/08 (2006.01) A61K 8/73 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)
C08J 3/075 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C08B 37/0072 (2013.01)
A61K 8/735 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0035844

(22) 출원일자 2023년03월20일

심사청구일자 2023년03월20일

(30) 우선권주장

1020220035285 2022년03월22일 대한민국(KR)

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

주식회사 세라트젠

서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 공학원 332에이비씨호(신촌동)

(72) 발명자

조승우

서울특별시 서대문구 연세로 50, 공학원 347호(신촌동)

안수환

서울특별시 서대문구 연세로 50, 제2공학관 525호(신촌동)

전은제

서울특별시 서대문구 연세로 50, 공학원 332ABC호(신촌동)

(74) 대리인

특허법인엠에이피에스

전체 청구항 수 : 총 13 항

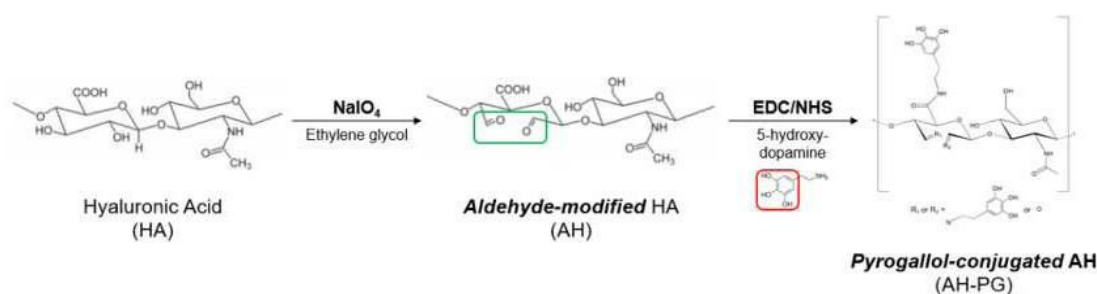
(54) 발명의 명칭 갈لول기로 수식된 알데히드 치환 히알루론산 유도체 및 그 용도

(57) 요약

본원은, 갈لول기로 수식된 알데히드 치환 히알루론산 유도체 및 그 용도에 관한 것이다.

본원의 일 구현예에 따른 갈لول기로 수식된 알데히드 치환 히알루론산 유도체는, 기존의 갈لول기 수식 히알루론산 기반 하이드로젤 대비 주사 시 요구되는 압출력 (extrusion force)을 크게 감소하였기 때문에 근육 주사 시 근막 내의 내압 변화가 작아 근육 주사로 인한 통증을 최소화할 수 있으므로 고령 환자들의 약물 반복투여로 인한 고통과 스트레스를 최소화하고 삶의 질을 향상시킬 수 있으며, 다양한 조직 유래의 세포외기질 전달이 가능한 바, 약물 전달, 조직 봉합 및 치료제 등에 응용될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 9/0024 (2013.01)

A61P 21/00 (2018.01)

C08J 3/075 (2013.01)

C08J 2305/08 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711191960
과제번호	2021R1A2C3004262
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	오가노이드 모듈 합체 · 정렬 기술을 통한 바이오 인공 장기 생산 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415180884
과제번호	20012378
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	산업기술평가관리원
연구사업명	산업기술알키미스트프로젝트사업
연구과제명	메타 소프트오간모듈 제작 기술 및 모듈 어셈블리 로봇 시스템 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

알데히드 그룹 치환 히알루론산에 파이로갈롤 그룹을 수식한 유도체(AH-PG).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 알데히드 그룹 치환 히알루론산에 파이로갈롤 그룹을 수식한 유도체(AH-PG)는 점성 수준이 낮은 것인,

알데히드 그룹 치환 히알루론산에 파이로갈롤 그룹을 수식한 유도체(AH-PG).

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 알데히드 그룹 치환 히알루론산에 파이로갈롤 그룹을 수식한 유도체(AH-PG)는 주사 주입력이 개선된 것인,

알데히드 그룹 치환 히알루론산에 파이로갈롤 그룹을 수식한 유도체(AH-PG).

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 알데히드 그룹 치환 히알루론산에 파이로갈롤 그룹을 수식한 유도체(AH-PG)는 근섬유 또는 근섬유다발 사이 공간으로 침투가 가능한 것인,

알데히드 그룹 치환 히알루론산에 파이로갈롤 그룹을 수식한 유도체(AH-PG).

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 알데히드 그룹 치환 히알루론산에 파이로갈롤 그룹을 수식한 유도체(AH-PG)는 자발적 가교를 유도할 수 있는 것인,

알데히드 그룹 치환 히알루론산에 파이로갈롤 그룹을 수식한 유도체(AH-PG).

청구항 6

제1항 내지 제5항의 AH-PG를 포함하는 것인,

AH-PG 기반 하이드로젤.

청구항 7

제6항의 AH-PG 기반 하이드로젤에 근육조직 유래 세포외기질(MEM)을 탑재한 것인,

AH-PG/MEM 하이드로젤.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 AH-PG/MEM 하이드로젤은 근육량 증진 또는 개선 효과가 있는 것인,

AH-PG/MEM 하이드로젤.

청구항 9

제7항의 AH-PG/MEM 하이드로젤을 포함하는 것인,

근육질환 예방 또는 치료용 약학 조성물

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 근육질환은 근위축증, 노화성 근감소증, 외상성 근육손상, 근이영양증, 근무력증, 염증성 근육병증, 다발성 근염 및 근긴장증으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인,

근육질환 예방 또는 치료용 약학 조성물

청구항 11

알데히드 그룹 치환 파이로갈롤 수식 히알루론산 유도체(AH-PG) 제조방법에 있어서,

(a) 히알루론산(HA) 및 과아이오딘산나트륨(NaIO_4)을 반응하는 단계;

(b) 에틸렌 글리콜(ethylene glycol)을 처리하고 투석후 동결건조하는 단계; 및

(c) 상기 (a) 및 (b) 단계를 거쳐 생성된 알데히드 그룹 치환 히알루론산(AH), EDC, NHS 및 5-수산화도파민(5-hydroxydopamine)을 EDC/NHS 반응을 거치는 단계를 포함하는,

알데히드 그룹 치환 파이로갈롤 수식 히알루론산 유도체(AH-PG) 제조방법.

청구항 12

알데히드 그룹 치환 히알루론산(AH) 제조방법에 있어서,

(a) 히알루론산(HA)과 과아이오딘산나트륨(NaIO_4)을 반응하는 단계; 및

(b) 에틸렌 글리콜(ethylene glycol)을 처리하고 투석후 동결건조하는 단계; 를 포함하는 것인,

알데히드 그룹 치환 히알루론산(AH) 제조방법.

청구항 13

제12항의 제조방법에 의해 제조되는 것인,

알데히드 그룹 치환 히알루론산(AH).

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은, 갈릴기로 수식된 알데히드 치환 히알루론산 유도체 및 그 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 전 세계 첨단 약물전달 시스템 시장 규모는 연평균 6.1% 이상의 성장률로 확대되어 2020년 2310억 달러에서 2025년에는 3100억 달러로 그 규모가 크게 확대될 전망이다. 지역별로는 북미 지역이 5.8% 연평균 성장률을 보일 것으로 예상되며 아시아-태평양 지역은 연평균 6.7%의 성장률을 보일 것으로 예상된다 (BBC Research, 2020. 12.).

[0003] 이와 관련하여, 생체 내로 국소적이고 장기적인 방식의 효율적인 약물 및 생체분자의 전달을 위해서 다양한 전달 시스템이 개발되고 있다. 그 중에서도 절개, 삽입 및 봉합의 수술적 처치가 필요한 삽입형의 전달 시스템과 달리, 주사형의 하이드로젤은 주사를 통한 비교적 간단한 주입 과정 이후 주사 부위에서 탑재한 물질의 서방출을 유도할 수 있다는 점에서 각광받고 있다. 그러나 기존에 많이 사용되고 있는 주사형 하이드로젤은 이미 젤 상태인 하이드로젤에 힘을 가해 전단유동화 (shear-thinning)를 유발한 후에 자가 회복 (self-healing) 시키는 방식을 통해 주사하기 때문에 주사를 위해 많은 힘을 들여야 하므로, 사용자 편의성이 떨어지거나 정교한 주사량 조절이 어려운 등 여러가지 문제점이 있다. 또한, 위의 방식 외의 주사형 하이드로젤은 주사 시 가교 촉진제 등을 함께 혼합하여 주사해야 하므로, 사용자 편의성이 떨어지거나 잠재적인 독성 유발 가능성에 따른 부작용이 우려된다.

[0004] 이를 해결하기 위해 액상으로 주사한 이후에 별도의 가교 첨가제 없이도 그 상태에서 (in situ) 젤이 자발적으로 형성되는 (self-crosslinkable) 하이드로젤이 최근 개발되고 있다. 예시로 멧게와 같은 해양생물의 빠른 자가 회복 및 수중 접착에 관여하는 것으로 알려진 파이로갈롤 (pyrogallol)기를 생체 고분자에 수식하여 작용기의 높은 자연 산화 능력을 이용하여 자가 가교를 유도하는 방식의 하이드로젤이 최근에 보고되었다. 그러나 이 경우에도 파이로갈롤기 자체의 상호작용과 더불어 고분자 간의 무수히 많은 수소 결합 등으로 인해 높은 점성을 가지게 되므로 기존의 전단유동화 후 자가 회복 방식보다는 덜하지만 주사 시 여전히 비교적 높은 힘이 필요한 문제점이 있다. 따라서 높은 점성으로 인해 주사된 하이드로젤이 조직 내로 고르게 퍼져 전달되기 어려운 한계와 주사 시 통증을 유발할 수 있다는 문제점도 있어, 임상적 효용성을 떨어뜨리는 요인으로 작용할 수 있다.

[0005] 또한, 기존 대부분의 주사형 하이드로젤은 그 자체로는 별도의 직접적인 기능성이 없어 단순 전달체로서의 역할만을 수행하는 한계점이 있으며, 이런 점을 해결하기 위해 최근 조직 특이적 미세환경을 구현하여 조직 재생을 촉진하는 역할을 하는 탈세포 조직 유래 매트릭스 (decellularized tissue-derived matrix)를 적용하는 기술이 개발되었으나, 탈세포 매트릭스 기반 하이드로젤의 낮은 물성으로 인해 주입된 부위에서 안착하지 못하고 손실되거나 단기간만에 체내에서 분해되어 기대하는 치료 효과를 충분히 유도하지 못하는 문제점이 있었다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 뛰어난 생체적합성을 가지며 의료적 용도로 널리 사용되고 있는 천연고분자인 히알루론산에 알데히드기를 치환해주는 과정을 통해 고분자 간 상호작용을 줄이고 점성을 낮춘 알데히드기 치환 히알루론산에 파이로갈롤기를 포함하고 있는 생체 분자인 5-수산화도파민(hydroxydopamine)을 수식한 신규한 히알루론산 유도체를 개발하여, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허공보 10-0507545호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본원은, 갈릴기로 수식된 알데히드 치환 히알루론산 유도체 및 그 용도에 관한 것이다.

[0009] 그러나, 본원이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본원의 제1측면은, 갈륨기로 수식된 알데히드 치환 히알루론산 유도체(AH-PG)를 제공한다.

[0011] 본원의 제2측면은, AH-PG 기반 하이드로젤을 제공한다.

[0012] 본원의 제3측면은, AH-PG 기반 하이드로젤에 근육조직 유래 세포외기질(MEM)을 탑재한 AH-PG/MEM 하이드로젤을 제공한다.

[0013] 본원의 제4측면은, AH-PG/MEM 하이드로젤을 유효성분으로 포함하는, 근육질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0014] 본원의 제5측면은, 갈륨기로 수식된 알데히드 치환 히알루론산 유도체(AH-PG) 제조방법을 제공한다.

[0015] 본원의 제6측면은, 알데히드 치환 히알루론산(AH) 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본원의 갈륨기로 수식된 알데히드 치환 히알루론산 유도체는 기존의 갈륨기 수식 히알루론산 기반 하이드로젤 대비 주사 시 요구되는 압출력 (extrusion force)을 크게 감소하였기 때문에 근육 주사 시 근육 내의 내압 변화가 작아 근육 주사로 인한 통증을 최소화할 수 있으므로 고령 환자들의 약물 반복투여로 인한 고통과 스트레스를 최소화하고 삶의 질을 향상시킬 수 있으며, 다양한 조직 유래의 세포외기질 전달이 가능한 바, 약물 전달, 조직 봉합 및 치료제 등에 응용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1a는, 알데히드 그룹 치환 히알루론산에 파이로갈롤 그룹을 수식한 유도체(AH-PG)를 제작하는 과정을 나타낸 도면이다.

도 1b는, 합성이 완료된 고분자 유도체에 대한 $^1\text{H-NMR}$ 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 1c는, 합성이 완료된 고분자 유도체에 대한 UV-vis 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 2a는, 파이로갈롤기의 산화적 가교를 유도하기 위해 화학적 산화제 (NaIO_4 그룹: 2% AH-PG + 1.125 mg/ml NaIO_4)를 첨가하거나 또는 알칼리 성 pH 조건 (NaOH 그룹: 2% AH-PG + 0.020 M NaOH)에 맞춰 주었을 때, AH-PG 용액이 가교를 통해 젤화되는 것을 나타낸 도면이다.

도 2b는, 두 가지 조건(최종 농도 기준, NaIO_4 그룹: 2% AH-PG + 1.125 mg/ml NaIO_4 , NaOH 그룹: 2% AH-PG + 0.020 M NaOH)으로 형성된 하이드로젤의 탄성계수를 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 2c는, 두 가지 조건(최종 농도 기준, NaIO_4 그룹: 2% AH-PG + 1.125 mg/ml NaIO_4 , NaOH 그룹: 2% AH-PG + 0.020 M NaOH)으로 형성된 하이드로젤의 loss factor($\tan \delta$, G'/G'')를 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 3은, 세가지 조건에서 AH-PG 그룹 내 파이로갈롤기의 자연 산화에 따른 자가 가교 능력을 확인한 도면이다.

도 4는, 자연 산화 그룹 (0.2% AH-PG solution without HRP)과 체내 산화 환경 모사 그룹 (0.2% AH-PG solution with 0.6 U/ml of HRP)에 대한 UV-vis spectroscopy 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 5a는, 자연 산화 조건 (0 U/ml HRP)과 여러 농도의 HRP 첨가를 통한 체내 모사 산화 조건 (최종 농도 기준 0.06, 0.6, 6, 60 U/ml)에서 형성된 하이드로젤의 탄성계수 (elastic modulus)를 비교한 도면이다.

도 5b는, 자연 산화 조건 (0 U/ml HRP)과 여러 농도의 HRP 첨가를 통한 체내 모사 산화 조건 (최종 농도 기준 0.06, 0.6, 6, 60 U/ml)에서 형성된 하이드로젤의 loss factor ($\tan \delta$, G'/G'')를 비교한 도면이다.

도 6a는, AH-PG 하이드로젤의 세포 독성을 평가하기 위해 세포를 AH-PG 하이드로젤 내에서 배양하며 배양 기간 동안 생존율을 Live/Dead 염색법을 통해 분석한 도면이다.

도 6b는, AH-PG 하이드로젤의 세포 독성을 평가하기 위해 세포를 AH-PG 하이드로젤 내에서 배양하며 배양 기간

동안 생존율을 나타낸 도면이다.

도 7a는, 2% 농도의 각 유도체 (AH-PG와 HA-PG) 용액의 PBS 대비 점성 (Viscosity)을 레오미터(rheometer)를 통해 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 7b는, 2% 농도의 각 유도체 (AH-PG와 HA-PG) 용액 및 PBS의 주사 바늘 별(27G, 29G) 압출력(extrusion force)을 UTM(universal testing machine)를 통해 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 7c는, 2% 농도의 각 유도체 (AH-PG와 HA-PG) 용액 및 PBS의 주사 바늘 별(27G, 29G) DGF(dynamic glide force, 주사기의 내용물을 배출하기 위해 플런저의 움직임을 유지하는 데 필요한 힘)를 UTM(universal testing machine)를 통해 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 8a는, 탈세포 공정 전 근육조직 (Before)과 탈세포 공정 후 근육조직 (After)의 조직학적 형태를 나타낸 도면이다.

도 8b는, 탈세포 공정 전 근육조직 (Before)과 탈세포 공정 후 근육조직 (After)의 DNA 잔존량을 정량 비교한 결과를 나타낸 도면이다.

도 8c는, 탈세포 공정 전 근육조직 (Before)과 탈세포 공정 후 근육조직 (After)의 GAG(glycosaminoglycan) 잔존량을 정량 비교한 결과를 나타낸 도면이다.

도 8d는, 질량분석 (mass spectrometry) 기반 단백질체 (proteomics) 분석을 통해 MEM에 존재하는 다양한 종류의 근육조직 특이적 단백질을 확인한 결과를 나타낸 도면이다. 총 219개의 단백질로 구성되어 있음을 확인하였으며, 이 중 196개의 단백질이 skeletal muscle expressed protein에 해당되며, 그 중 54개가 skeletal muscle elevated protein으로 구성되어 있음을 확인하였다.

도 8e는, 질량분석 (mass spectrometry) 기반 단백질체 (proteomics) 분석을 통해 MEM에 존재하는 다양한 종류의 근육조직 특이적 단백질을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 9a는, 세가지 조건(PBS, 2% AH-PG+5 mg/ml MEM, 2% HA-PG+5 mg/ml MEM 용액)에서 압출력(extrusion force)을 universal testing machine (UTM)을 통해 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 9b는, 세가지 조건(PBS, 2% AH-PG+5 mg/ml MEM, 2% HA-PG+5 mg/ml MEM 용액)에서 DGF(dynamic glide force, 주사기의 내용물을 배출하기 위해 플런저의 움직임을 유지하는 데 필요한 힘)를 universal testing machine (UTM)을 통해 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 10a는, AH-PG 하이드로젤 (2% AH-PG+5 mg/ml MEM 이용, 50 μ l 주사), MEM (5 mg/ml MEM 용액 이용, 50 μ l 주사) 및 HA-PG 하이드로젤 (2% HA-PG+5 mg/ml MEM 이용, 50 μ l 주사)을 적용하여 제형에 따른 MEM 체내 분포 및 안정성 차이를 분석한 결과를 나타낸 도면이다.

도 10b는, AH-PG/MEM 하이드로젤을 이용한 근조직 재생의 기전을 나타낸 도면이다.

도 11a는, 다양한 제형의 하이드로젤들을 불용성 골격근 위축 소동물모델 (mouse model of disuse muscle atrophy)의 TA muscle에 적용 후 적출한 것을 나타낸 도면이다.

도 11b는, 각 조건[HA-PG (2% HA-PG), AH-PG (2% AH-PG), HA-PG/MEM (2% HA-PG+5 mg/ml MEM), AH-PG/MEM (2% AH-PG+5 mg/ml MEM)]에서 근육량 증진 효과를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 11c는, 각 하이드로젤 주사 후 수거한 TA muscle 샘플에 대한 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 실시하여 주입한 하이드로젤 (검정색 화살표)이 주변 근육 조직과 얼마나 잘 융합되어 있는지 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 11d는, 각 하이드로젤 주사 후 수거한 TA muscle 샘플에 대해 근육줄기세포에서 발현되는 마커인 Pax7과 활성화된 근육줄기세포에서 발현되는 마커인 MyoD에 대한 염색을 실시하여 근육줄기세포의 활성화 및 증식 정도를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 11e는, 각 하이드로젤 주사 후 수거한 TA muscle 샘플에 대해 근육줄기세포에서 발현되는 마커인 Pax7과 활성화된 근육줄기세포에서 발현되는 마커인 MyoD에 대한 염색을 실시한 조직학 이미지에 대하여 각 마커의 발현 정도를 정량적으로 비교한 결과를 나타낸 도면이다.

도 12a는, 노화성 근육감소증(sarcopenia) 모델에 MEM을 탑재한 AH-PG 하이드로젤 (AH-PG/MEM 그룹)을 주사하

여 근육 증진 효과를 확인한 것으로서, 각 조건 [MEM (5 mg/ml MEM), AH-PG/MEM (2% AH-PG+5 mg/ml MEM)] 별로 하이드로젤들을 노화 마우스의 TA muscle에 적용 후 적절한 근육 조직을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 12b는, 노화성 근육감소증(sarcopenia) 모델에 MEM을 탑재한 AH-PG 하이드로젤 (AH-PG/MEM 그룹)을 주사하여 근육 증진 효과를 확인한 것으로서, 각 조건 [MEM (5 mg/ml MEM), AH-PG/MEM (2% AH-PG+5 mg/ml MEM)] 별로 H&E 염색한 결과를 나타낸 도면이다.

도 12c는, 노화성 근육감소증(sarcopenia) 모델에 MEM을 탑재한 AH-PG 하이드로젤 (AH-PG/MEM 그룹)을 주사하여 근육 증진 효과를 확인한 것으로서, 각 조건 [MEM (5 mg/ml MEM), AH-PG/MEM (2% AH-PG+5 mg/ml MEM)] 별로 Masson's trichrome (MT) 염색한 결과를 나타낸 도면이다.

도 12d는, 노화성 근육감소증(sarcopenia) 모델에 MEM을 탑재한 AH-PG 하이드로젤 (AH-PG/MEM 그룹)을 주사하여 근육 증진 효과를 확인한 것으로서, 각 조건 [MEM (5 mg/ml MEM), AH-PG/MEM (2% AH-PG+5 mg/ml MEM)] 별로 근육 특이적 마커인 myosin heavy chain 1E (MYH1E)와 laminin을 면역염색한 결과를 나타낸 도면이다.

도 12e는, 노화성 근육감소증(sarcopenia) 모델에 MEM을 탑재한 AH-PG 하이드로젤 (AH-PG/MEM 그룹)을 주사하여 근육 증진 효과를 확인한 것으로서, 각 조건 [MEM (5 mg/ml MEM), AH-PG/MEM (2% AH-PG+5 mg/ml MEM)] 별로 혈관화 관련 마커인 α -smooth muscle actin (α -SMA)를 염색한 결과를 나타내는 도면이다.

도 12f는, 노화성 근육감소증(sarcopenia) 모델에 MEM을 탑재한 AH-PG 하이드로젤 (AH-PG/MEM 그룹)을 주사하여 근육 증진 효과를 확인한 것으로서, 각 조건 [MEM (5 mg/ml MEM), AH-PG/MEM (2% AH-PG+5 mg/ml MEM)] 별로 모세혈관 마커인 von Willebrand factor (vWF)를 염색한 결과를 나타내는 도면이다.

도 12g는, 재건된 근육 조직에 존재하는 신경의 분포와 그 기능성을 확인하기 위해 신경 마커인 nestin, acetylcholine receptor (AChR)와 기능성 AChR에 결합한다고 알려진 alpha-bungarotoxin (BTX)에 대해 면역염색한 결과를 나타내는 도면이다.

도 13a는, 노화성 근육감소증(sarcopenia) 모델에서 각 하이드로젤을 주사한 다리의 조직과 아무 처치도 하지 않은 반대편 다리의 조직의 무게 비교 결과(무게 차이 비교)를 나타낸 도면이다.

도 13b는, 노화성 근육감소증(sarcopenia) 모델에서 각 하이드로젤을 주사한 후 조직학 분석을 기반으로 근육 다발 내에 존재하는 핵의 수를 정량 분석하여 근육조직의 재생 양상을 나타낸 도면이다.

도 13c는, 노화성 근육감소증(sarcopenia) 모델에서 각 하이드로젤 주사에 따른 myofiber diameter 증진 효과를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 13d는, 노화성 근육감소증(sarcopenia) 모델에서 각 하이드로젤을 주사한 후 조직학 분석을 기반으로 근육 특이적 마커인 MYH1E 양성 근육다발의 myofiber diameter 분포를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 13e는, 노화성 근육감소증(sarcopenia) 모델에서 각 하이드로젤을 주사한 후 조직학 분석을 기반으로 근육 특이적 마커인 MYH1E 양성 근육다발의 cross-sectional area (CSA) 분포를 분석한 결과를 나타낸 도면이다.

도 13f는, 노화성 근육감소증(sarcopenia) 모델에서 각 하이드로젤을 주사한 후 조직학 분석을 기반으로 혈관 특이적 마커인 α -SMA 양성 소동맥의 단면적 정량 분석을 진행한 결과를 나타낸 도면이다.

도 13g는, 노화성 근육감소증(sarcopenia) 모델에서 각 하이드로젤을 주사한 후 조직학 분석을 기반으로 혈관 특이적 마커인 α -SMA 양성 소동맥의 수를 정량 분석한 결과를 나타낸 도면이다.

도 13h는, 노화성 근육감소증(sarcopenia) 모델에 MEM을 탑재한 AH-PG 하이드로젤 (AH-PG/MEM 그룹)을 주사하여 근육 증진 효과를 확인한 것으로서, 각 조건 [MEM (5 mg/ml MEM), AH-PG/MEM (2% AH-PG+5 mg/ml MEM)] 별로 모세혈관 마커인 von Willebrand factor (vWF)를 염색하여 이를 정량적으로 평가한 결과를 나타낸 도면이다.

도 13i는, 재건된 근육 조직에 존재하는 신경의 분포와 그 기능성을 확인하기 위해 신경 마커인 nestin, acetylcholine receptor (AChR)와 기능성 AChR에 결합한다고 알려진 alpha-bungarotoxin (BTX)에 대해 면역염색하여 이를 정량적으로 평가한 결과를 나타내는 도면이다.

도 14a는, AH-PG 및 AH-PG+MEM 그룹의 하이드로젤 내부에서 예상되는 화학 구조의 양상과 생체 조직 표면에 대한 접착 기전을 보여주는 도면이다.

도 14b는, MEM, HA-PG, AH-PG 및 AH-PG+MEM 그룹에서 프로브 (Probe)가 이동함에 따라 조직에 부착시킨 하이드

로젤이 떨어지면서 측정된 접착력을 비교한 결과를 나타낸 도면이다.

도 14c는, MEM, HA-PG, AH-PG 및 AH-PG+MEM 그룹에서 측정된 최대 힘(Maximum force)을 정량적으로 비교한 결과를 나타낸 도면이다.

도 14d는, MEM, HA-PG, AH-PG 및 AH-PG+MEM 그룹이 접착에 기여한 일의 양을 정량적으로 비교한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 아래에서는 첨부한 도면을 참조하여 본원이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본원은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본원을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [0019] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부재가 다른 부재 “상에” 위치하고 있다고 할 때, 이는 어떤 부재가 다른 부재에 접해 있는 경우뿐 아니라 두 부재 사이에 또 다른 부재가 존재하는 경우도 포함한다.
- [0020] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 “약”, “실질적으로” 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본원의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 “~(하는) 단계” 또는 “~의 단계”는 “~를 위한 단계”를 의미하지 않는다.
- [0021] 본원 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 “이들의 조합(들)”의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.
- [0022] 본원 명세서 전체에서, “A 및/또는 B”의 기재는 “A 또는 B, 또는 A 및 B”를 의미한다.
- [0023] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본원의 구현예 및 실시예를 상세히 설명한다. 그러나, 본원이 이러한 구현예 및 실시예와 도면에 제한되지 않을 수 있다.
- [0024] 본원의 제 1 측면은, 갈물기로 수식된 알데히드 치환 히알루론산 유도체(AH-PG)를 제공한다.
- [0025] 본원의 일 구현예에 있어서, 본원의 갈물기는 파이로갈물기일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 본원의 일 구현예에 있어서, 본원의 AH-PG 유도체는 자발적 가교를 유도할 수 있다.
- [0027] 일반적으로 다당류 사슬을 구성하고 있는 당 분자가 가지고 있는 수산기(hydroxyl group)에 의해서 생기는 수소 결합 등에 의해서 사슬 간의 상호작용이 생겨 점성이 높아지게 되는데, 본원의 AH-PG는 이를 제작하는 과정에서 HA 내의 당의 디올(diol) 부분을 링-오픈(ring-open) 해주는 반응을 통해서 수산기(hydroxyl group)을 알데히드 기(aldehyde group)로 치환하여, 당 사슬 내에 수산기(hydroxyl group) 간의 상호작용을 감소시켜 점성이 낮아지게 되고, 이로 인해서 주입력이 현격히 개선되는 효과를 나타낸다.
- [0028] 본원의 일 구현예에 있어서, 본원의 AH-PG유도체는 낮은 수준의 점성(Viscosity)을 보이는 것을 확인할 수 있다. 체내 주사에 있어, 점성이 높으면 큰 구경의 주사 바늘을 써야하며 주사 바늘의 구경이 커질수록 통증이 증가한다. 본원의 AH-PG 하이드로젤은 종래 기술에 비해 점성이 낮아 종래에 비해 작은 구경의 주사 바늘을 사용해도 되므로 통증이 감소된다는 이점을 가진다.
- [0029] 따라서, 본원 AH-PG 유도체는 종래 기술과 구조적 차이(HA 내의 당의 디올 부분 링-오픈) 및 이로 인한 효과적 차이(점성이 낮아지고, 주입력이 현저히 개선됨)가 있음을 알 수 있다.
- [0030] 본원의 제2측면은, AH-PG 기반 하이드로젤을 제공한다. 제1측면과 중복되는 내용은 제2측면의 하이드로젤에도 공히 적용된다.
- [0031] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 하이드로젤은 조직 수복, 약물 전달, 조직 봉합, 세포 이식, 창상 치료, 조직 재생, 지혈제 및 충전제 등에 사용될 수 있다.

- [0032] 본원의 제3측면은, AH-PG 기반 하이드로젤에 근육조직 유래 세포외기질(MEM)을 탑재한 AH-PG/MEM 하이드로젤을 제공한다. 제1측면 및 제2측면과 중복되는 내용은 제3측면의 AH-PG/MEM 하이드로젤에도 공히 적용된다.
- [0033] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "MEM"은 근육조직 유래 세포외기질 (muscle extracellular matrix: MEM)을 말한다.
- [0034] 본원의 제4측면은, AH-PG/MEM 하이드로젤을 유효성분으로 포함하는, 근육질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 제1측면 내지 제3측면과 중복되는 내용은 제4측면의 약학 조성물에도 공히 적용된다.
- [0035] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 근육질환은 근위축증, 노화성 근감소증, 외상성 근육손상, 근이영양증, 근무력증, 염증성 근육병증, 다발성 근염 및 근긴장증으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 것이나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 본원의 일 구현예에 있어서, 본원의 근육질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은 AH-PG/MEM 하이드로젤 외에 다른 약학 조성물을 포함할 수 있다.
- [0037] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제제화하여 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0038] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 약학 조성물을 제제화할 경우, 일반적으로 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 또는 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0039] 본원의 일 구현예에 있어서, 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 또는 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 군주의 사균체에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 예를 들어, 단순한 부형제 이외에도 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0040] 본원의 일 구현예에 있어서, 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0041] 본원의 일 구현예에 있어서, 비경구 투여를 위한 제제로는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 비수성용제 또는 현탁제로는, 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 좌제로는, 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0042] 본원의 일 구현예에 따른 약학 조성물은 의약품 조성물 또는 의약외품 조성물일 수 있다.
- [0043] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "의약외품"은 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 개선, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 물품들 중 의약품보다 작용이 경미한 물품들을 의미하는 것으로, 예를 들어 약사법에 따르면 의약외품이란 의약품의 용도로 사용되는 물품을 제외한 것으로, 사람·동물의 질병 치료나 예방에 쓰이는 제품, 인체에 대한 작용이 경미하거나 직접 작용하지 않는 제품 등이 포함된다.
- [0044] 본원의 상기 의약외품 조성물은 바디 클렌저, 소독 청결제, 세정제, 주방용 세정제, 청소용 세정제, 치약, 가글제, 물티슈, 세제, 비누, 핸드 위시, 헤어세정제, 헤어 유연제, 가습기 충전제, 마스크, 연고제 및 필터 충전제로 이루어진 군에서 선택되는 제형으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있는데, 본원의 용어 "약제학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료 또는 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율 치료기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본원의 약학 조성물은 단독으로 투여하거나 공지된 장 질환에 대한 치료 효과를 나타

내는 것으로 알려진 성분과 병용하여 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.

[0046] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 약학 조성물의 투여량은 사용목적, 질환의 중독도, 환자의 연령, 체중, 성별, 기왕력, 또는 유효성분으로서 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물은 성인 1인당 약 0.1 ng 내지 약 1,000 mg/kg, 바람직하게는 1 ng 내지 약 100 mg/kg로 투여할 수 있고, 본원의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다. 상기 투여량 또는 투여횟수는 어떠한 면으로든 본원의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0047] 본원의 약학 조성물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경피패치투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 등의 경로를 통해 투여될 수 있다. 다만, 경구 투여 시에는 제형화되지 않은 형태로도 투여할 수 있고, 위산에 의하여 상기 락토바실러스 파라카제이 LM1014 균주가 변성 또는 분해될 수 있기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화된 형태 또는 경구용 패치형태로 구강내에 투여할 수도 있다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0048] 본원의 제5측면은, 갈롤기로 수식된 알데히드 치환 히알루론산 유도체(AH-PG) 제조방법을 제공한다. 제1측면 내지 제4측면과 중복되는 내용은 제5측면의 제조방법에도 공히 적용된다.

[0049] 본원의 일 구현예에 있어서, 본원은 (a) 히알루론산(HA) 및 과아이오딘산나트륨(NaIO_4)을 반응하는 단계; (b) 에틸렌 글리콜(ethylene glycol)을 처리하고 투석후 동결건조하는 단계; 및 (c) 상기 (a) 및 (b) 단계를 거쳐 생성된 알데히드 그룹 치환 히알루론산(AH), EDC, NHS 및 5-수산화도파민(5-hydroxydopamine)을 EDC/NHS 반응을 거치는 단계를 포함하는 알데히드 그룹 치환 파이로갈롤 수식 히알루론산 유도체(AH-PG) 제조방법을 제공한다.

[0050] 본원의 제6측면은, 알데히드 치환 히알루론산(AH) 제조방법을 제공한다. 제1측면 내지 제5측면과 중복되는 내용은 제6측면의 제조방법에도 공히 적용된다.

[0051] 본원의 일 구현예에 있어서, 본원은 (a) 히알루론산(HA)과 과아이오딘산나트륨(NaIO_4)을 반응하는 단계; 및 (b) 에틸렌 글리콜(ethylene glycol)을 처리하고 투석후 동결건조하는 단계; 를 포함하는 알데히드 그룹 치환 히알루론산(AH) 제조방법을 제공한다.

[0052] 이하, 본원의 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 하나, 하기의 실시예는 본원의 이해를 돕기 위하여 예시하는 것 일뿐, 본원의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

실시예 1. AH-PG 제작

[0055] 히알루론산 고분자의 일부 디올(diol)을 알데히드 그룹으로 치환해주기 위하여 NaIO_4 를 처리해주고 (molar ratio of HA: NaIO_4 = 1 : 1) 잔여 NaIO_4 를 제거해주기 위하여 에틸렌 글리콜(ethylene glycol) 처리와 투석 과정을 거친 뒤 동결건조 했다(도 1a 참조). 염화수소산염(hydroxylamine hydrochloride)와 지시약을 이용한 적정(titration) 방식을 통해 정량적으로 확인한 결과, 약 45%의 디올기가 알데히드로 치환된 것을 확인하였다(도 1a 참조).

[0056] 이후 동결건조가 완료된 알데히드 그룹 치환 히알루론산 (AH)에 파이로갈롤 (Pyrogallol) 그룹을 수식해 주기 위해 EDC/NHS 화학반응 (molar ratio of AH: EDC: NHS: 5-hydroxydopamine = 1 : 1.5 : 2 : 1)을 이용하여 AH에 5-수산화도파민(5-hydroxyDopamine)을 화학적으로 도입했다(도 1a 참조).

[0057] 합성이 완료된 고분자 유도체에 대한 $^1\text{H-NMR}$ 분석을 통해 HA에 알데히드 그룹이 치환됨과 동시에 파이로갈롤기가 수식된 것을 확인하였다(도 1b 및 1c 참조).

[0058] 이후 UV-vis 분석(UV-vis spectroscopy)을 통해 히알루론산에 파이로갈롤기가 수식된 것을 재차 확인하였으며, 히알루론산에 대한 파이로갈롤 그룹의 수식 비율 (Degree of Substitution; DS)은 약 10% 임을 확인하였다(도 1b 및 1c 참조).

- [0059] 이하에서는 파이로갈롤기로 수식된 알데히드 치환 히알루론산 유도체를 'AH-PG 유도체'로 기재한다.
- [0060] **실시예 2. AH-PG 유도체 내 파이로갈롤 그룹 수식의 정성적 확인**
- [0061] AH-PG 유도체 내에 파이로갈롤기의 수식을 추가적으로 확인하기 위해, 종래 보고된 파이로갈롤기 수식-히알루론산 유도체 기반 하이드로젤의 가교 방식과 동일한 방식으로 작동하는지를 확인하였다.
- [0062] 종래의 파이로갈롤기 수식 하이드로젤에서처럼, 파이로갈롤기의 산화적 가교를 유도하기 위해 화학적 산화제(NaIO_4)를 첨가하거나 또는 알칼리성 pH 조건(NaOH 이용)에 맞춰 주었을 때, AH-PG 용액이 가교를 통해 젤화되는 것을 확인하였다(도 2a 참조). 두 가지 가교 방식의 양상이 다른 것도 파이로갈롤기 수식 하이드로젤의 특징인데, 이를 통해 파이로갈롤기가 AH에 성공적으로 수식된 것을 재차 확인하였다 (최종 농도 기준, NaIO_4 그룹: 2% AH-PG + 1.125 mg/ml NaIO_4 , NaOH 그룹: 2% AH-PG + 0.020 M NaOH)
- [0063] 위의 두 가지 조건(NaIO_4 그룹, NaOH 그룹)으로 형성된 하이드로젤의 탄성계수 (elastic modulus)와 연성과 관련이 있는 loss factor ($\tan \delta$, G' / G'') 값 역시 종래 보고된 파이로갈롤기 수식 하이드로젤과 경향이 유사함을 확인하였다. 또한, 탄성계수 측정을 위해 rheometer를 이용하여 frequency sweep mode (0.1 ~ 10 Hz 구간)로 측정하였고, 1 Hz일 때의 저장 탄성률 (storage modulus) 값과 손실 탄성률 (loss modulus)을 이용하여 탄성계수 및 loss factor를 계산하였다(도 2b 및 2c 참조).
- [0064] **실시예 3. AH-PG 유도체 기반 하이드로젤의 자가 가교 (self-crosslinking) 능력 확인**
- [0065] AH-PG 유도체 내 파이로갈롤기의 자연 산화에 따른 자가 가교 능력을 확인하였다. 2% AH-PG 용액 (in PBS)은 별도의 첨가제 없이도 시간이 지남에 따라 고분자간 가교가 진행되어 젤화가 유도될 수 있으며 [(1) spontaneous oxidation (in vitro) 그룹, 도 3 참조], 체내 (마우스의 피하 조직)에 주사한 이후에 마우스로부터 주사한 부위의 조직을 수거하여 확인하였을 때 체내에서 안정적으로 젤이 형성되어 있음을 확인하였다 [(3) in situ self-crosslinking (in vivo) 그룹, 도 3 참조]. 이 경우에는 체외에서 자연 산화된 경우와는 다른 색깔과 물성의 젤이 형성되는데, 이를 바탕으로 AH-PG 유도체의 체내 자가 가교 반응에서는 체외 자연 산화 반응에 더해 추가적인 화학적 가교가 유도되는 것으로 예측하였다. 이를 체외에서 모방하기 위해 체내 산화 환경에서 주요한 역할을 수행할 것으로 생각되는 페록시다아제(oxidase, 여기서는 horseradish peroxidase; HRP 이용)를 AH-PG 용액에 첨가하여 젤화를 유도하면 체내 가교의 결과물과 유사한 색깔과 물성의 젤이 형성되는 것을 확인하였다 [(2) oxidation using peroxidase (in vitro) 그룹, 도 3 참조]. 이 때의 가교 조건은 최종 농도 2% AH-PG + 6 U/ml HRP를 적용하였다.
- [0066] **실시예 4. AH-PG 유도체 기반 하이드로젤의 가교 기전 확인**
- [0067] AH-PG 유도체의 가교 반응 확인을 위해, 자연 산화 그룹 (0.2% AH-PG solution without HRP)과 체내 산화 환경 모사 그룹 (0.2% AH-PG solution with 0.6 U/ml of HRP)에 대한 UV-vis spectroscopy 분석을 진행하였다.
- [0068] 두 그룹 모두 280-300 nm 대에서 흡광도 증가가 관찰되는데, 이는 파이로갈롤기의 다양한 산화 산물을 의미한다. 또한, 두 그룹 모두에서 파이로갈롤 간의 결합에 의해 형성된 푸르푸로갈린(purpurogallin)에 해당하는 peak (330 nm, 420-440 nm)의 흡광도 증가가 관찰된 것으로 보아, 주로 biphenol 형태의 가교보다는 푸르푸로갈린(purpurogallin) 형태로 가교가 이뤄지는 것을 알 수 있었다. 다만 두 그룹의 흡광도 증가 속도나 정도를 보면, 페록시다아제(oxidase)가 존재하는 경우에 상당히 증진되는데 따라서 체내의 페록시다아제가 존재하는 산화 조건 하에서도 이러한 증가된 가교 속도 및 물성을 보일 것으로 예측할 수 있다. 특히 500-570 nm 대 peak의 증가가 페록시다아제가 추가된 그룹에서 두드러지게 관찰되는데, 이는 페록시다아제에 의해서 강화된 산화 조건 하에서 다량으로 생성된 oxidized pyrogallol이 페록시다아제 단백질에 존재하는 amine group같은 작용기와 결합한 산물에 의해 나타난 peak로 사료된다(도 4 참조).
- [0069] 이를 통해 AH-PG 유도체는 생체내 주입 후 체내 산화 환경에 노출되었을 때 다양한 산화 반응과 체내 단백질 등의 생체물질과의 상호작용을 통해 주입된 부위에서 효과적으로 가교되어 젤화 될 수 있을 것으로 예측된다.
- [0070] **실시예 5. 산화 조건에 따른 AH-PG 하이드로젤 물성 비교**
- [0071] 자연 산화 및 체내 모사 산화 조건에서 형성된 AH-PG 하이드로젤의 물리적 성질을 확인하기 위해 레오미터(rheometer)를 이용하여 frequency sweep mode (0.1 ~ 10 Hz 구간)로 측정하였고, 1 Hz일 때의 저장 탄성률(storage modulus) 값과 손실 탄성률(loss modulus)을 이용하여 탄성계수 및 loss factor를 계산하였다.

- [0072] 자연 산화 조건 (0 U/ml HRP)과 여러 농도의 HRP 첨가를 통한 체내 모사 산화 조건 (최종 농도 기준 0.06, 0.6, 6, 60 U/ml)에서 형성된 하이드로젤의 탄성계수 (elastic modulus)를 비교해 보았을 때, HRP 첨가로 인해 강화된 산화 조건에서 더 높은 탄성 계수를 보이는 하이드로젤이 형성됨을 확인하였다(도 5 참조).
- [0073] 또한 loss factor ($\tan \delta$, G''/G') 값을 비교해 보면, 단순히 자연 산화를 시킨 조건과 HRP가 첨가된 체내 모사 환경에서 형성된 하이드로젤들이 상이한 물리적 성질을 보임을 확인하였다. 이는 AH-PG 유도체가 체내 산화 조건에서는 자연 산화로 인한 반응 외에 추가적인 가교 촉진 반응을 통해 자연 산화된 하이드로젤과는 구별되는 물성을 가지는 하이드로젤을 형성할 수 있음을 의미한다. AH-PG 유도체의 농도는 최종 2% 조건에서 분석하였다(도 5 참조).
- [0074] **실시예 6. AH-PG 하이드로젤의 세포 독성 평가**
- [0075] AH-PG 하이드로젤의 세포 독성을 평가하기 위해 세포를 하이드로젤 내에서 3차원 배양하며 배양 기간 동안 생존율을 분석하였다.
- [0076] AH-PG 용액 (최종 AH-PG 농도 2%)에 두 가지 농도 (0.6 U/ml & 6 U/ml)로 HRP를 첨가한 체내 산화 환경 모사 조건에서 가교를 유도한 AH-PG 하이드로젤 내에, 마우스 유래 근원세포주인 C2C12 cell을 1.0×10^6 cells per 100 μ l 하이드로젤(hydrogel) 농도로 봉입하고 삼차원 배양을 진행하였다.
- [0077] 배양을 시작한 후 1, 4, 7, 14일에서 세포의 생존율을 Live/Dead 염색법을 통해 분석하였을 때, 모든 분석 시점에서 90% 이상의 세포 생존율을 보이는 것을 확인하였고, 이를 통해 AH-PG 하이드로젤의 세포 독성이 거의 없음을 검증하였다(도 6 참조).
- [0078] **실시예 7. AH-PG 하이드로젤의 점성 및 주입력 평가**
- [0079] 본원 발명인 AH-PG 하이드로젤과 종래 기술 (HA-PG 하이드로젤)의 점성과 주입력을 측정하여 비교하였다.
- [0080] 2% 농도의 각 유도체 (AH-PG와 HA-PG) 용액의 PBS 대비 점성 (Viscosity)을 레오미터(rheometer)를 통해 측정하였다. 측정 시 변형률(strain rate)은 1 s^{-1} 로 고정하여 반복 측정한 값에 대한 평균으로 점도를 계산하였다. 종래 보고된 HA-PG 유도체 용액과 비교하여, 본원 발명인 AH-PG 유도체 용액은 굉장히 낮은 수준의 점도를 보였으며 거의 PBS와 비슷한 수준의 점성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이는 주사 시 주입력에도 영향을 줄 뿐만 아니라, 체내 주사 이후에 원하는 조직 부위 내로 용이하게 용액이 스며들 수 있다는 점에서 큰 장점으로 작용할 수 있다(도 7a 참조).
- [0081] 또한, PBS, 2% AH-PG, 2% HA-PG 용액을 1 ml 주사기(syringe)에 탑재하고 각기 다른 크기의 주사 바늘 (27 G와 29 G 이용)을 장착하여 주사 시 필요한 힘을 universal testing machine (UTM)을 통해 측정하였다. 점성 분석에서의 경향성과 마찬가지로 본원 발명인 AH-PG 유도체 용액이 훨씬 더 낮은 주입력을 필요로 함을 확인할 수 있었다. 더욱 적은 힘으로 정교한 양을 주사할 수 있다는 점에서 AH-PG 하이드로젤을 적용함으로써 경제성과 임상적 효용성을 제고할 수 있을 것으로 사료된다(도 7b 및 7c 참조).
- [0082] **실시예 8. 근육조직 유래 세포외기질 (MEM) 제조 및 분석**
- [0083] 돼지 다리 근육을 1% SDS (sodium dodecyl sulfate)로 2일 동안 처리한 후 1% Triton X-100 + 0.1% NH_4OH (ammonium hydroxide) 용액으로 2시간 처리하는 탈세포 공정을 통해 근육조직 유래 세포외기질 (muscle extracellular matrix: MEM)을 수득하였다.
- [0084] 탈세포 전 근육조직 (Before)과 탈세포 후 근육조직 (After)의 조직학적 형태(도 8a 참조)와 DNA(도 8b 참조), GAG (glycosaminoglycan) 잔존량(도 8c 참조)을 정량 비교하였다. 탈세포 공정을 통해 95.6%의 유전물질(DNA)을 제거하여 생체 적용 시 발생할 수 있는 면역반응을 최소화한 반면, 대표적인 유효 세포외기질 성분인 GAG는 원래 조직 수준으로 유지하여 근육조직의 탈세포 공정 프로토콜을 성공적으로 구축했음을 확인하였다.
- [0085] 질량분석 (mass spectrometry) 기반 단백질체 (proteomics) 분석을 통해 MEM에 존재하는 다양한 종류의 근육조직 특이적 단백질을 확인하였다. MEM은 collagen, glycoprotein, proteoglycan, ECM regulators, ECM-affiliated proteins 등으로 이루어져 있으며, 총 219개의 단백질로 구성되어 있음을 확인하였으며, 이 중 196개의 단백질이 skeletal muscle expressed protein(Skeletal muscle elevated protein: 인간 조직의 단백질 발현 양상을 분석한 “<https://www.proteinatlas.org/>”에서 제공하는 정보로서, 다른 조직과 비교하여 근육 조직에서 평균적으로 4배 이상의 발현량을 보이는 단백질을 의미)에 해당되며, 그 중 54개가 skeletal muscle elevated

protein으로 구성되어 있음을 확인하였다(도 8d 및 8e 참조).

[0086] 일련의 분석을 통해 실제 근육에 존재하는 다양한 조직 특이적 단백질이 MEM에 존재함을 확인하였다.

[0087] **실시예 9. AH-PG/MEM 하이드로젤의 주입력 평가**

[0088] AH-PG/MEM 하이드로젤과 종래 기술 (HA-PG 하이드로젤)의 주입력을 측정하여 비교하였다.

[0089] PBS, 2% AH-PG+5 mg/ml MEM, 2% HA-PG+5 mg/ml MEM 용액을 31G 바늘이 장착된 insulin syringe에 탑재하고, 주사를 위해 필요한 힘을 universal testing machine (UTM)을 통해 측정하였다. 앞서 측정한 AH-PG, HA-PG 유도체 용액에서의 점성 및 주입력 측정 결과의 경향과 마찬가지로, AH-PG/MEM 유도체 용액이 임상적으로 많이 사용되고 있는 insulin syringe를 이용하여 적용되는 경우에도 훨씬 더 낮은 주입력으로도 주사가 가능함을 확인하였다(도 9a 및 9b 참조).

[0090] 따라서 더욱 적은 힘으로도 정교한 양을 주사할 수 있으므로 경제성과 임상적 효용성을 제고할 수 있을 뿐만 아니라, 고령 인구에 대한 personalized medicine으로 적용될 때 이러한 특징은 종래 기술에 비해 큰 장점으로 작용될 수 있을 것으로 사료된다.

[0091] **실시예 10. AH-PG/MEM 하이드로젤의 체내 분포 및 안정성 평가**

[0092] MEM을 탑재한 AH-PG 하이드로젤 (2% AH-PG+5 mg/ml MEM 이용, AH-PG/MEM 그룹)을 마우스 tibialis anterior (TA) muscle에 근육 주사하여 체내 안정성을 평가하였다.

[0093] MEM만 주입(MEM 그룹), 기존 HA-PG를 이용한 MEM 주입(HA-PG/MEM 그룹) 및 AH-PG를 이용한 MEM 주입(AH-PG/MEM 그룹) 후, 1, 14, 28일에 조직을 수거하여 조직학 분석을 통해 체내 안정성을 확인하였다(도 10a 참조). 이때 주입된 MEM 성분의 체내 잔존량을 확인하기 위해 tetramethylrhodamine (TAMRA)를 MEM에 수식하여 추적할 수 있도록 하였으며, AH-PG 하이드로젤 (2% AH-PG+5 mg/ml MEM 이용, 50 μ l 주사)의 대조군으로 MEM (5 mg/ml MEM 용액 이용, 50 μ l 주사)과 HA-PG 하이드로젤 (2% HA-PG+5 mg/ml MEM 이용, 50 μ l 주사)을 함께 적용하여 제형에 따른 MEM 체내 분포 및 안정성 차이를 분석하였다.

[0094] 그 결과, 하이드로젤 주입 후 하루 뒤에는 모든 그룹에서 MEM이 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 주입 14일 뒤부터 MEM 그룹에서는 MEM이 거의 관찰되지 않았다. 반면 HA-PG/MEM 그룹 및 AH-PG/MEM 그룹은 28일 뒤까지 MEM이 안정적으로 남아있는 것을 확인하여 HA 하이드로젤에 의해 MEM이 체내에 안정적으로 유지될 수 있음을 확인하였다.

[0095] 또한, 상대적으로 점성이 낮은 MEM 그룹과 AH-PG/MEM 그룹의 경우 근육주사에 적합해 근섬유 사이 사이로 고르게 MEM 성분이 침투되어 분포하고 있는 양상을 보였지만, HA-PG/MEM 그룹의 경우 MEM 성분이 조직 내부로 완전히 침투하지 못하고 HA-PG 용액의 높은 점성과 형성된 HA-PG 하이드로젤의 상대적으로 단단한 물성으로 인해 근섬유 사이에 과도하게 채워지거나 주사 후 근막 (도 10a의 흰색 점선 참조) 밖으로 빠져나와 버리는 양상을 확인하였다.

[0096] 따라서 AH-PG 하이드로젤이 근육 내로 전달하고자 하는 유효 성분인 MEM을 근육 내부 곳곳에 장기간 안정적으로 전달할 수 있으면서 동시에 근육주사 제형으로서 적합한 재료임을 알 수 있었다.

[0097] 하기 도 10b는 AH-PG/MEM 하이드로젤을 이용한 근조직 재생의 기전을 나타낸 것이다. AH-PG의 우수한 주입성으로 인해, MEM을 탑재한 AH-PG pre-gel solution은 주사 시에 미세한 근섬유 사이로 스며들 수 있게 되고, 그 이후 자연 산화로 인한 자가 가교가 일어나 안정적인 하이드로젤의 형태로 전환되며, 그로 인해 근육 재생을 위한 유효 성분인 MEM이 장기간 유지되면서 지속적으로 근섬유 사이에 존재하는 근육줄기세포를 활성화시켜 효과적인 근육 재생을 유도할 수 있다.

[0098] **실시예 11. 불용성 근위축 동물모델에서 AH-PG/MEM 하이드로젤의 근육량 증진 효과 검증**

[0099] MEM을 탑재한 AH-PG 하이드로젤 (AH-PG/MEM 그룹)을 불용성 골격근 위축 소동물모델 (mouse model of disuse muscle atrophy)에 적용하여 근육량 증진 효과를 평가하였다. 신규 AH-PG 하이드로젤의 대조군으로 기존 HA-PG 하이드로젤을 함께 사용하여 하이드로젤 종류에 따른 차이를 비교하였다.

[0100] Surgical staple로 2주간 마우스의 다리를 사용하지 못하게 고정하여 TA muscle 무게를 약 20% 감소시키는 불용성 골격근 위축 유발 후 다양한 제형의 하이드로젤들을 TA muscle에 근육주사한 뒤, 2주차에 TA muscle을 적출하여 정상 조직 (같은 개체에서 손상을 유발하지 않은 반대쪽 다리 사용)과 무게를 비교하였다(도 11a 및 11b

참조). HA-PG (2% HA-PG), AH-PG (2% AH-PG), HA-PG/MEM (2% HA-PG+5 mg/ml MEM), AH-PG/MEM (2% AH-PG+5 mg/ml MEM)을 주사한 그룹에서 정상 조직 수준의 근육량 증진 효과가 관찰되었고, 이 중 AH-PG/MEM을 주사한 그룹만 유일하게 PBS를 근육주사한 대조군 그룹 (PBS)과 비교하여 통계적으로 유의미한 무게 증진 효과가 있었음을 확인하였으며(도 11b 참조), 이러한 특징은 육안으로도 확인할 수 있었다 (도 11a 참조). 모든 그룹에서 하이드로젤은 50 μ l씩 주사하였다.

[0101] 각 하이드로젤 주사 후, 2주차에 수거한 TA muscle 샘플에 대한 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 실시하여 주입한 하이드로젤 (검정색 화살표)이 주변 근육 조직과 얼마나 잘 융합되어 있는지 확인하였다. 높은 점성과 상대적으로 단단한 물성을 가지고 있는 HA-PG 하이드로젤을 주사한 그룹 (HA-PG, HA-PG/MEM)들에서는 주입한 하이드로젤 내에 세포가 별로 관찰되지 않은 반면, MEM만 주사한 그룹과 AH-PG를 주사한 모든 그룹 (AH-PG, AH-PG/MEM)들에서는 주입된 하이드로젤 내에 많은 세포가 자라 들어와 분포하는 것을 확인함으로써 주변 근육 조직과의 상호작용이 활발하게 일어나고 있음을 확인하였다(도 11c 참조).

[0102] 뿐만 아니라, HA-PG 하이드로젤을 투여한 그룹 (HA-PG, HA-PG/MEM 그룹) 대비 AH-PG 하이드로젤을 투여한 그룹 (AH-PG, AH-PG/MEM 그룹)에서 근육 fiber 다발 사이사이로 주입된 하이드로젤이 고르게 분포하고 있는 것을 확인하여 근육재건을 위한 주사용 제제로서 AH-PG 하이드로젤의 효율적인 기능성을 다시 한번 확인할 수 있었다.

[0103] 마찬가지로 2주차에 수거한 TA 근육 샘플에 대하여 근육줄기세포에서 발현되는 마커인 Pax7과 활성화된 근육줄기세포에서 발현되는 마커인 MyoD에 대한 면역염색을 실시하였다. MEM을 주사한 그룹에서 Pax7+ 근육줄기세포의 수가 많아진 것을 확인하였고, 근섬유 사이로 잘 스며들어 적절한 자극을 제공한 AH-PG 그룹도 근육줄기세포의 수가 증가한 것을 확인하였다. 그 중에서도 특히 MEM을 탑재한 AH-PG 하이드로젤을 주사한 경우 (AH-PG/MEM 그룹)에 근육줄기세포의 증식과 활성이 가장 많이 향상된 것을 확인할 수 있었다(도 11d 및 11e 참조).

[0104] 이러한 결과들을 통해 AH-PG의 우수한 주입성과 유효 성분인 MEM을 지속적으로 제공할 수 있는 장점으로 인해 AH-PG/MEM 하이드로젤이 뛰어난 근조직 재생 효과를 유도할 수 있음을 알 수 있었다.

[0105] 실시예 12. 노화성 근육감소증 모델에서 AH-PG/MEM 하이드로젤의 근육량 개선 효과 확인

[0106] 노화성 근육감소증(sarcopenia) 모델에 MEM을 탑재한 AH-PG 하이드로젤 (AH-PG/MEM 그룹)을 주사하여 근육 증진 효과를 확인하였다.

[0107] 마우스의 경우 생후 15개월부터 근육량 감소가 시작된다고 알려져 있다. 따라서 노화성 근육감소증이 있을 것으로 예상되는 18개월령 노화 마우스 TA muscle에 그룹별로 다양한 조건의 하이드로젤 (MEM: 5 mg/ml MEM 용액 /AH-PG/MEM: 2% AH-PG + 5 mg/ml MEM, 50 μ l씩 주사)을 주사한 뒤, 8주차에 조직을 수거하여 아무 처치도 하지 않은 반대편 다리와 무게를 비교하였다.

[0108] 분석 결과 AH-PG/MEM을 주사한 그룹만이 PBS 근육 주사한 그룹 (PBS)과 유의한 무게 차이가 났으며, 이러한 특징은 육안으로도 확인할 수 있었다(도 12a 및 도 13a 참조).

[0109] 하이드로젤 주사 후 8주에 수거한 TA muscle 샘플을 조직학 분석을 진행하여 근육량 개선이 얼마나 이루어졌는지 확인하고(도 12b 내지 도 12e 참조), 조직학 분석을 기반으로 각 지표에 대해서 정량 분석을 진행하였다(도 13b 내지 도 13g 참조).

[0110] H&E(도 12b 참조) 및 Masson's trichrome (MT)(도 12c 참조) 염색을 통해 MEM을 주입한 그룹에서 유의한 myofiber diameter 증진 효과를 관찰하였다(도 13c 참조). 또한, 하이드로젤을 주사하고 8주가 지난 시점에도 AH-PG/MEM 그룹은 47.3%의 myofiber에서 핵이 내부에 존재하는 것을 보아 재생 과정 동안 관찰되는 myofiber의 proliferation이 지속되고 있음을 알 수 있었다(도 13b 참조).

[0111] 근육 특이적 마커인 myosin heavy chain 1E (MYH1E)와 laminin을 면역염색한 결과, MEM을 주입한 모든 그룹 (MEM, AH-PG/MEM)에서 MYH1E+ myofiber의 수가 증가하였고 correct laminin deposition이 관찰되었다(도 12d 참조). 또한, AH-PG/MEM 그룹에서 MYH1E+ myofiber의 최소 Feret diameter(도 13d 참조)와 cross-sectional area (CSA)(도 13e 참조)를 분석하였을 때 가장 myofiber 크기가 증가된 것을 확인하여 근육량 증진이 가장 성공적으로 유도된 것을 확인하였다.

[0112] 한편, 근육량 개선은 조직에 함께 존재하는 혈관을 통해 원활한 산소 및 영양분 공급이 이루어져야 극대화될 수 있다. 혈관화 관련 마커인 α -smooth muscle actin (α -SMA)를 염색한 결과(도 12e 참조), α -SMA+ 소동맥의 수와 크기가 PBS 그룹에 비해 AH-PG/MEM 그룹에서 유의하게 증가하는 것을 확인하였다(도 13f 및 13g 참조). 또한, 모세혈관 마커인 von Willebrand factor (vWF)의 발현 및 vWF+ 모세혈관의 개수가 AH-PG/MEM 그룹에서

유의하게 증가하는 것을 확인하였다(도 12f 및 13h참조).

[0113] 재건된 근육 조직에 존재하는 신경의 분포와 그 기능성을 확인하기 위해 신경 마커인 nestin, acetylcholine receptor (AChR)와 기능성 AChR에 결합한다고 알려진 alpha-bungarotoxin (BTX)에 대한 면역염색 분석을 진행하였다. MEM, AH-PG/MEM 그룹에서 nestin과 AChR 마커 발현이 같은 위치에서 검출된 것을 확인함으로써 neuromuscular junction이 잘 형성된 것을 알 수 있었으며, 특히 AH-PG/MEM 그룹의 neuromuscular junction 위치에서 BTX가 가장 많이 염색된 것으로 보아 기능성 신경 재생이 가장 효과적으로 유도되었음을 알 수 있었다(도 12g 참조). 또한, 그룹별 근육 조직 내 AChR 마커 발현 수준을 정량 분석하였을 때, PBS 그룹 대비 AH-PG/MEM 그룹에서 2배 가까이 향상된 것을 확인할 수 있었다(도 13i 참조).

[0114] 이를 통해 AH-PG/MEM 하이드로젤은 근육뿐만 아니라 혈관과 신경과 같은 주변 조직의 재생을 함께 유도하여 기능성 근육조직 재건을 유도할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0115] 이를 통해 AH-PG/MEM 하이드로젤은 근육뿐만 아니라 혈관 및 신경과 같은 주변 조직의 재생을 함께 유도하여 향상된 조직 재생 효과를 유도할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0116] 실시예 13. AH-PG 및 AH-PG/MEM 하이드로젤의 조직 접착성 평가

[0117] AH-PG 하이드로젤 (2% AH-PG, AH-PG 그룹)과 MEM을 탑재한 AH-PG 하이드로젤 (2% AH-PG+5 mg/ml MEM 이용, AH-PG+MEM 그룹)의 조직 접착성을 평가하였다. 비교군으로는 종래 기술인 HA-PG 하이드로젤 (2% HA-PG, HA-PG 그룹)과 MEM 하이드로젤 (5 mg/ml)을 대조군으로 비교하였다. AH-PG 하이드로젤과 HA-PG 하이드로젤은 체내 산화 환경을 모사하기 위해 HRP (horseradish peroxidase, 최종 HRP 농도: 6 U/ml)를 혼합하여 하이드로젤 형성을 유도하였다.

[0118] AH-PG가 포함된 하이드로젤들의 경우 접착성 작용기인 갈롤기 (PG)와 더불어 AH 유도체에 존재하는 알데히드기 (aldehyde)가 조직 표면에 존재하는 아민기 (amine)와 Schiff base를 형성할 수 있으므로 기존 HA-PG 하이드로젤과 비교하여 보다 향상된 접착력을 보여줄 수 있을 것으로 예측하였다 (도 14a 참조).

[0119] 조직 접착력 측정을 위해 rheometer의 plate와 probe에 돼지 근육 조직을 부착한 뒤에, 각 재료를 그 사이에 도포한 상태에서 하이드로젤 형성을 유도하여 조직과 접착시킨 후 probe를 잡아당기면서 조직으로부터 탈착되는 힘을 측정하였다(도 14b 참조). AH-PG 하이드로젤이 MEM 및 종래 접착성 하이드로젤인 HA-PG에 비해 상당히 증진된 접착력을 보이는 것을 확인하였다 (도 14b 및 14c 참조). AH-PG+MEM 그룹도 MEM 및 HA-PG 그룹에 비해 우수한 접착력을 보이는 것을 확인하였다. 이때 AH-PG+MEM 그룹이 AH-PG 그룹에 비해 약간 감소된 접착력을 보였는데, 이는 AH 내에 존재하는 알데히드기가 MEM에 존재하는 아민기와 결합하기 때문에 조직 표면에 있는 아민기에 대한 반응성이 일부 감소했기 때문으로 추측되지만, 또 한편으로는 AH-PG가 근육 재생 치료를 위한 유효 성분인 MEM을 효과적으로 담지 할 수 있음을 간접적으로 보여주는 결과라고도 할 수 있다.

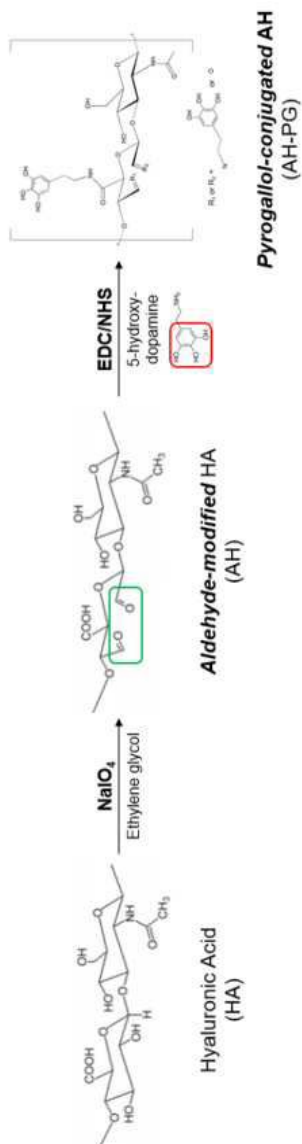
[0120] 접착에 기여한 전체 일의 양을 비교해 보았을 때, AH-PG 및 AH-PG+MEM 그룹 모두 MEM 및 HA-PG 보다 높으면서도, 두 그룹은 유사한 수준을 보여주는 것을 확인하였다 (도 14d 참조). 이는 AH-PG가 MEM과 혼합되면서 내부적으로 추가적인 고분자 간 네트워크를 형성하며 energy dissipation에 기여할 수 있으므로 AH-PG+MEM이 AH-PG 대비 peak force는 다소 감소했지만 접착에 기여하는 성능 자체는 거의 유사한 수준임을 의미하는 것이다.

[0121] 전술한 본원의 설명은 예시를 위한 것이며, 본원이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본원의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

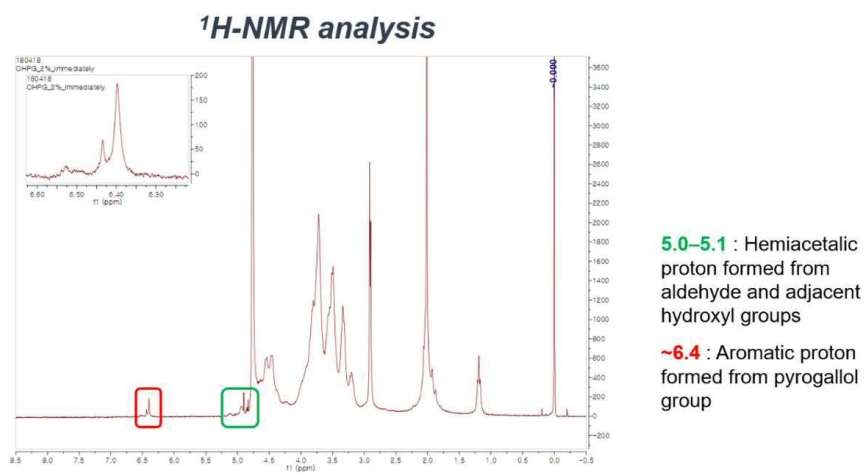
[0122] 본원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1a

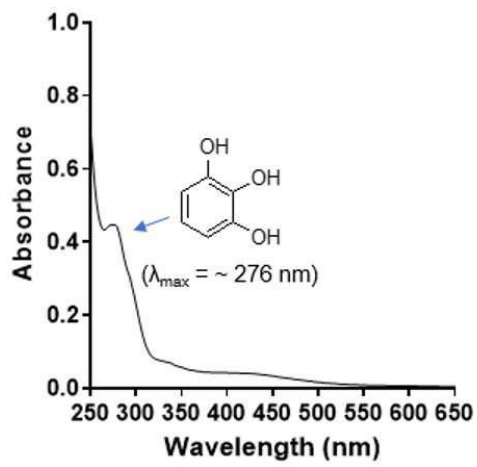


도면1b

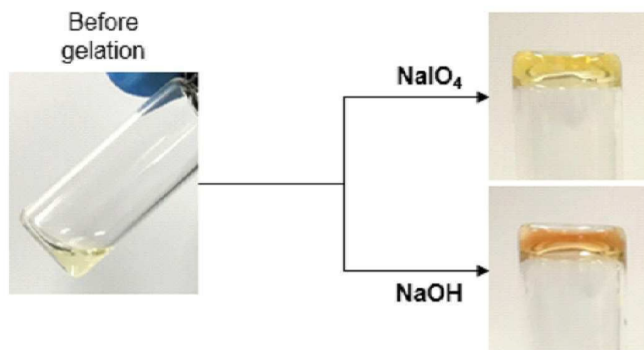


도면1c

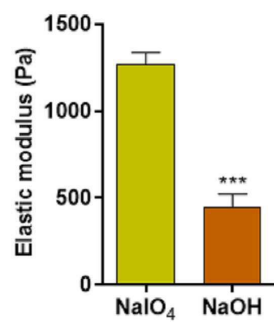
UV-vis spectroscopy



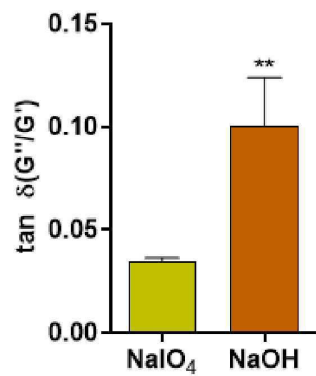
도면2a



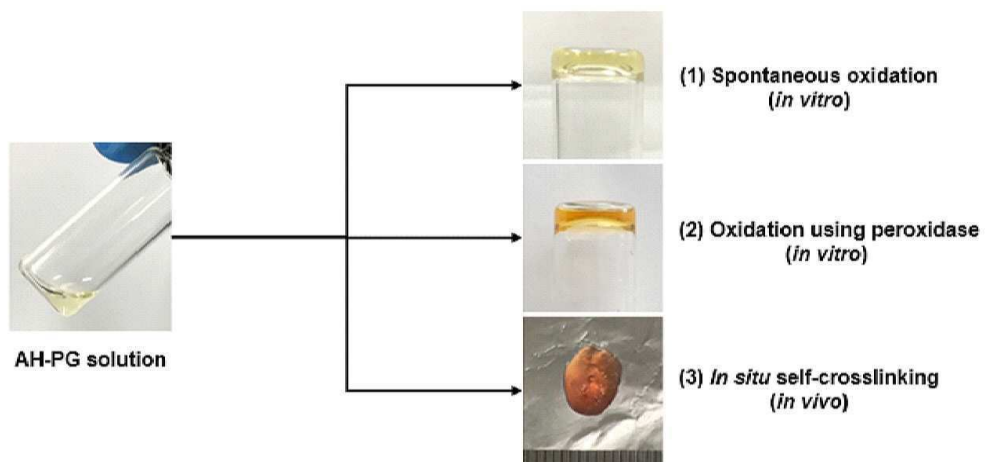
도면2b



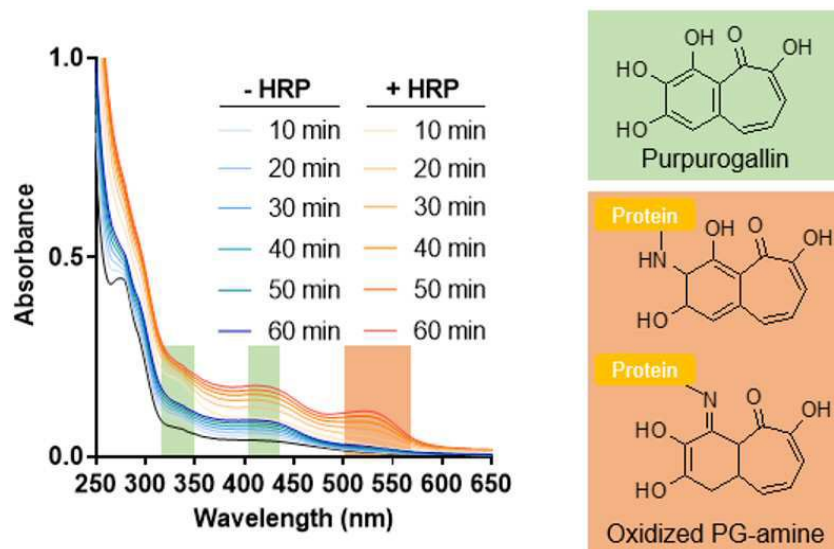
도면2c



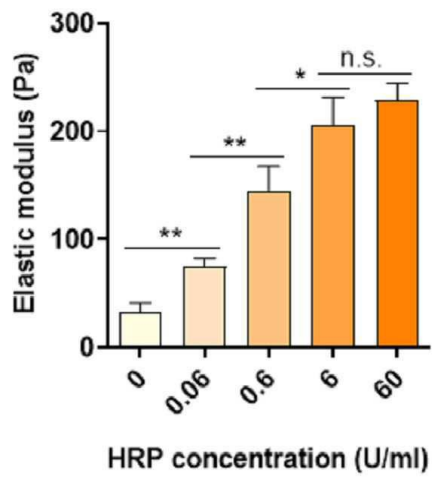
도면3



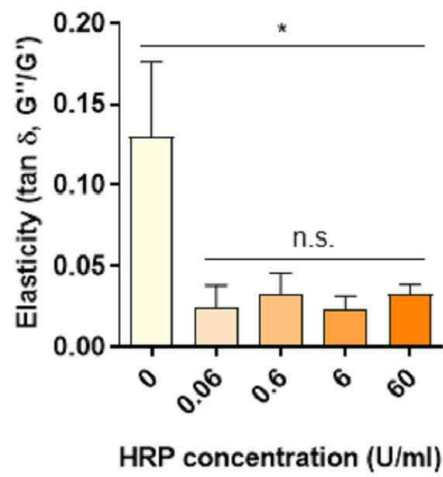
도면4



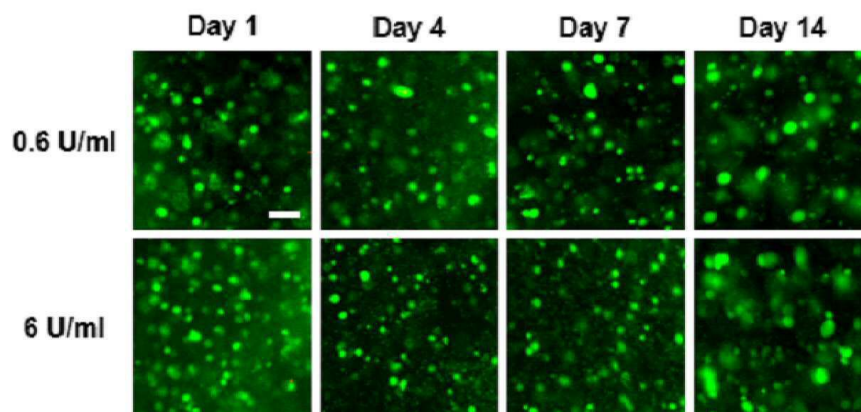
도면5a



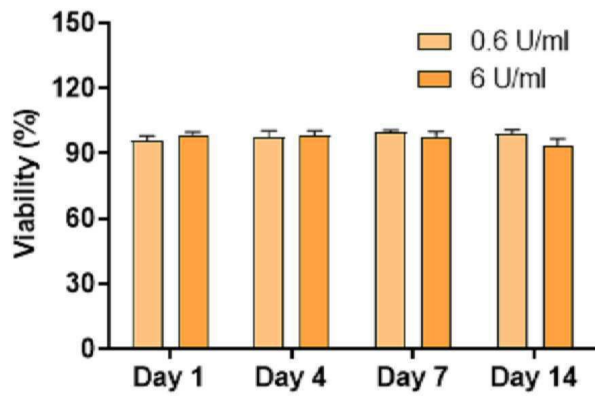
도면5b



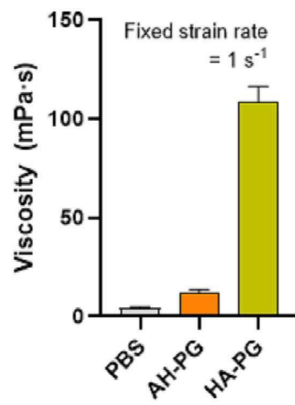
도면6a



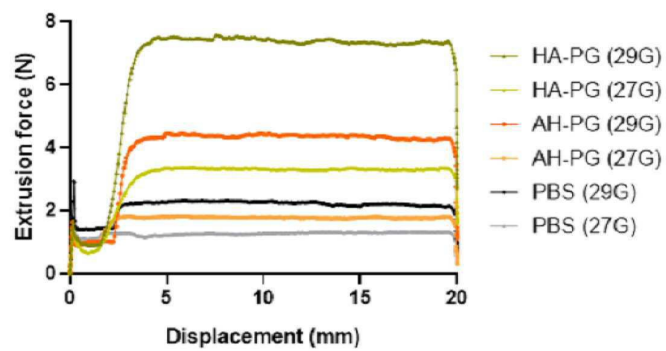
도면6b



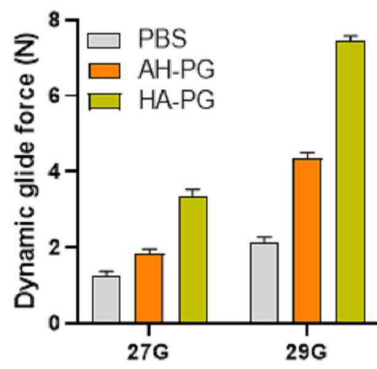
도면7a



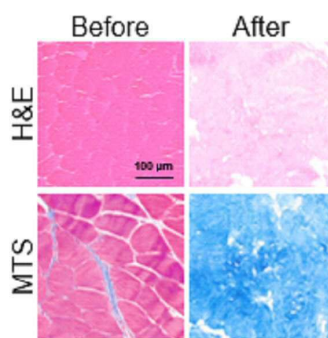
도면7b



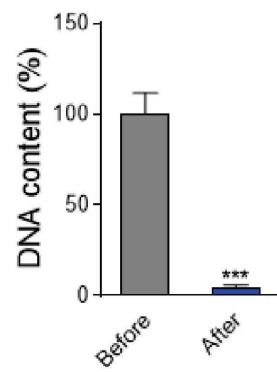
도면7c



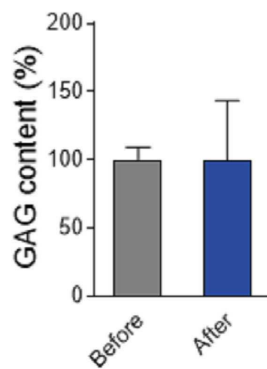
도면8a



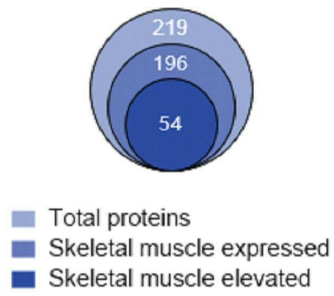
도면8b



도면8c



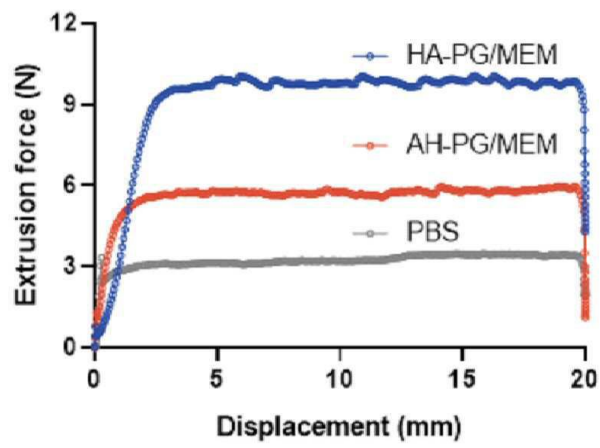
도면8d



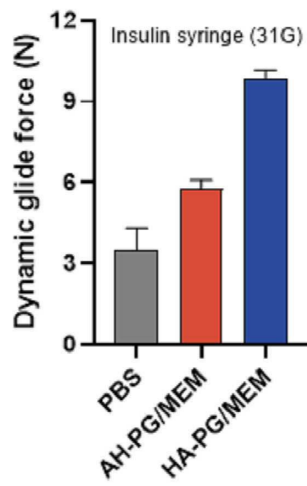
도면8e



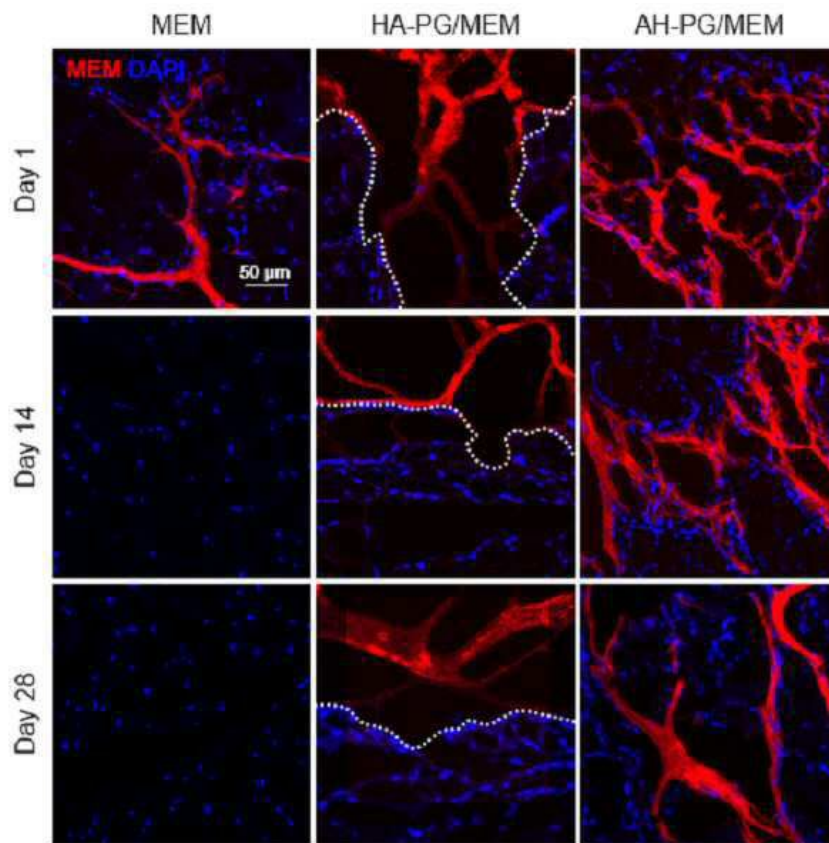
도면9a



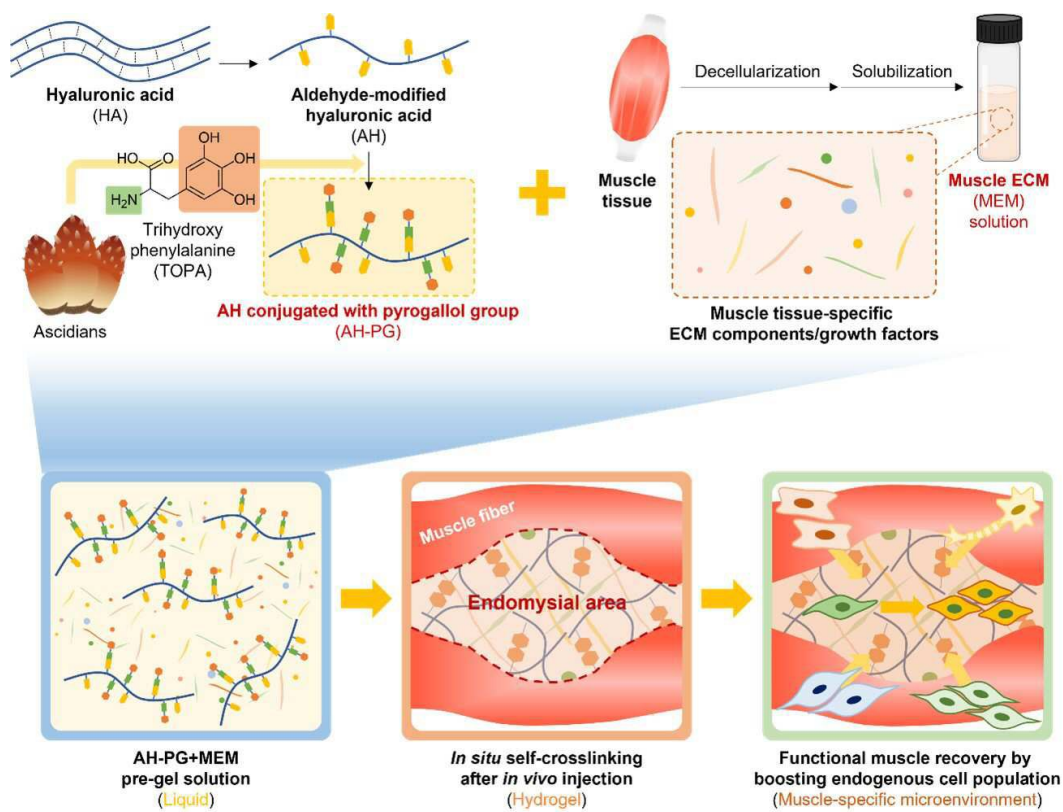
도면9b



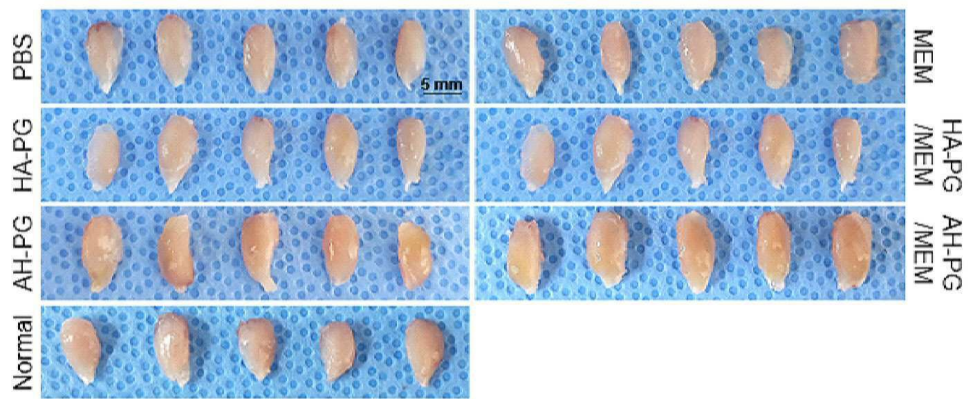
도면10a



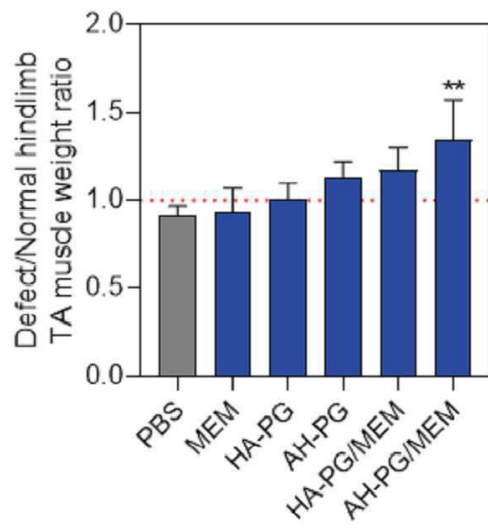
도면10b



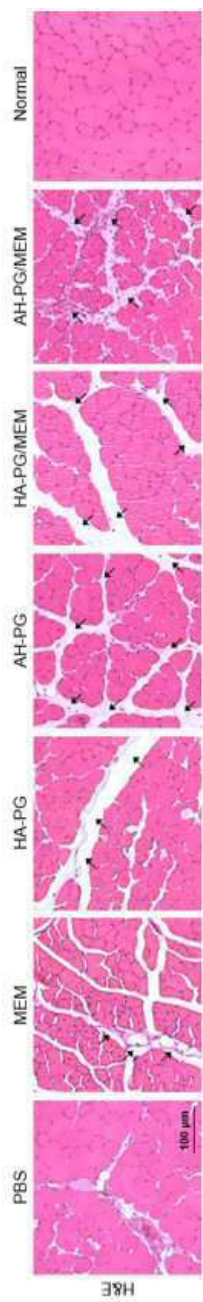
도면11a



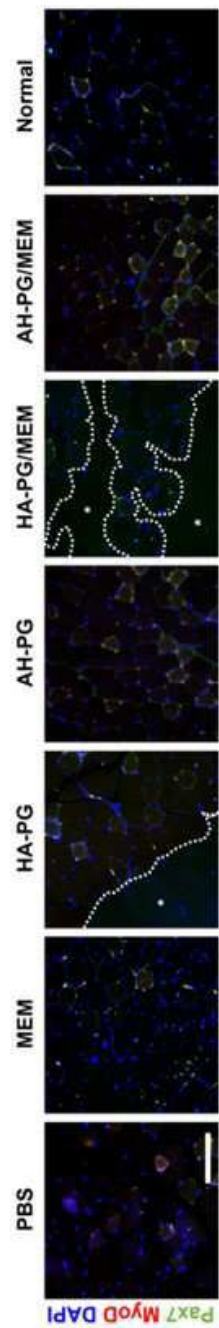
도면11b



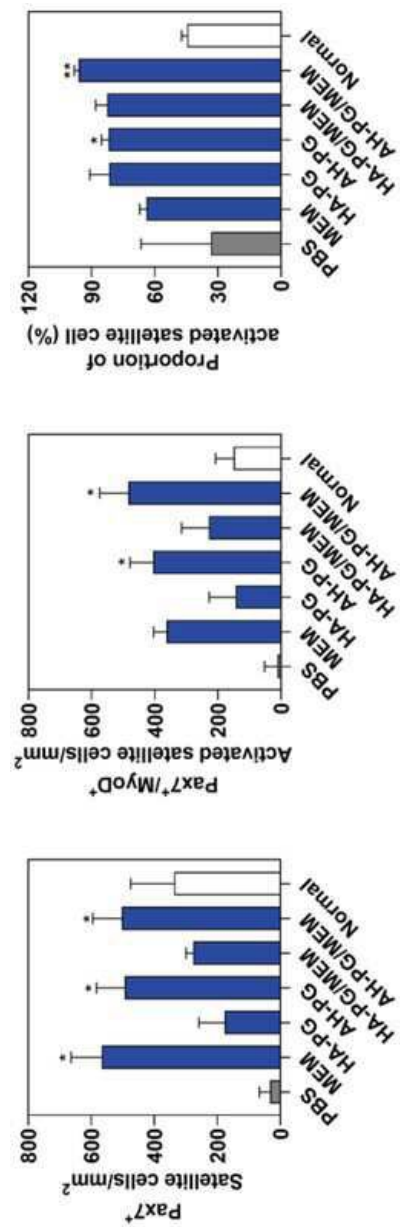
도면11c



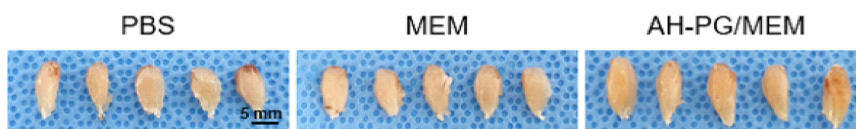
도면11d



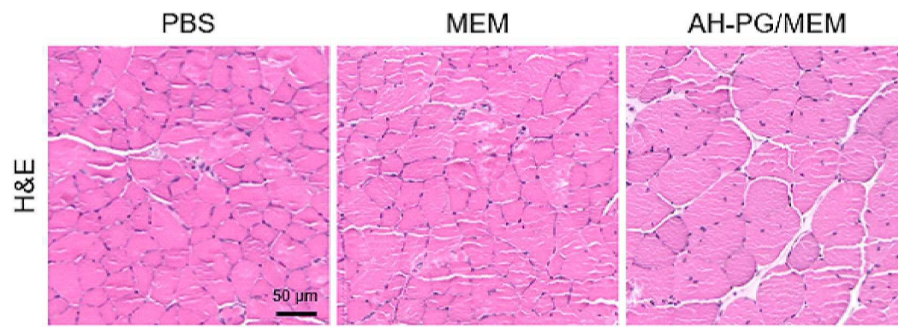
도면11e



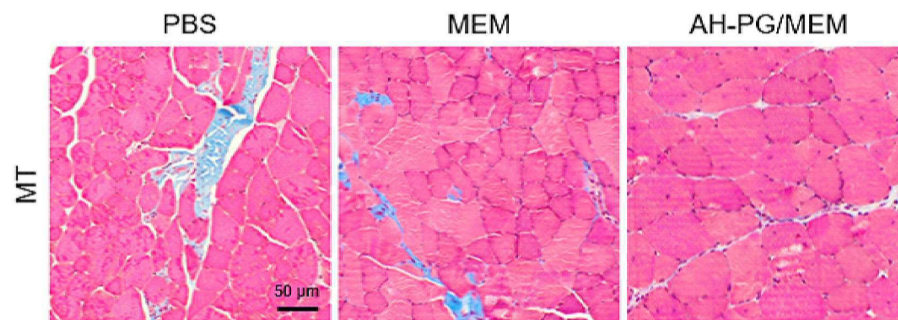
도면12a



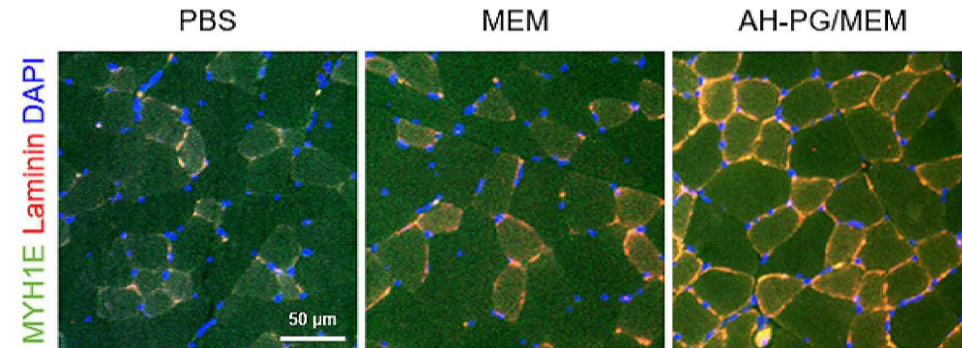
도면12b



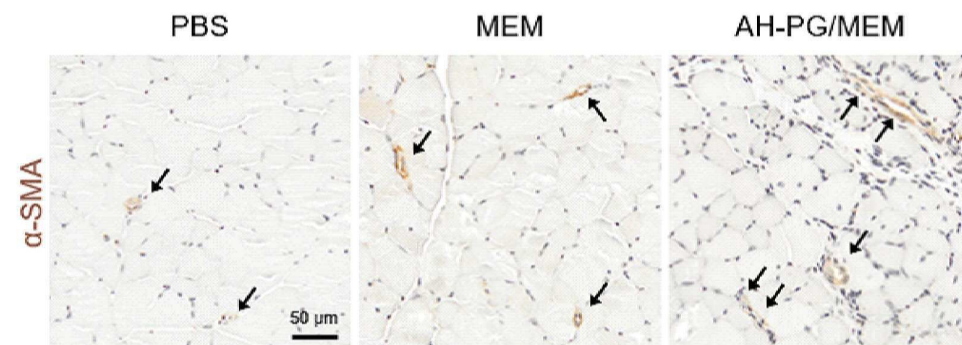
도면12c



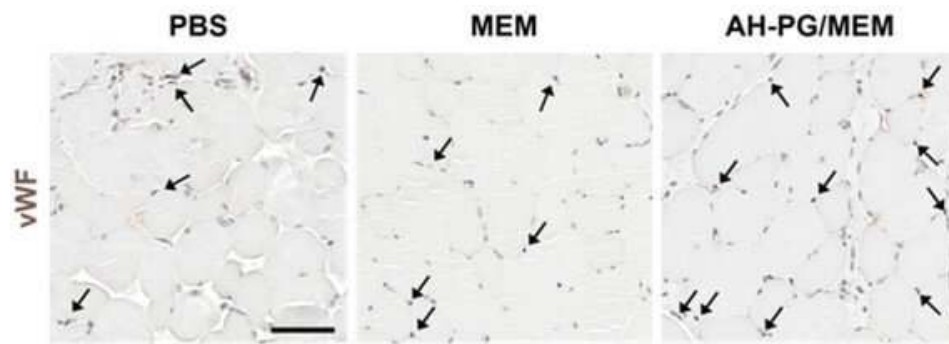
도면12d



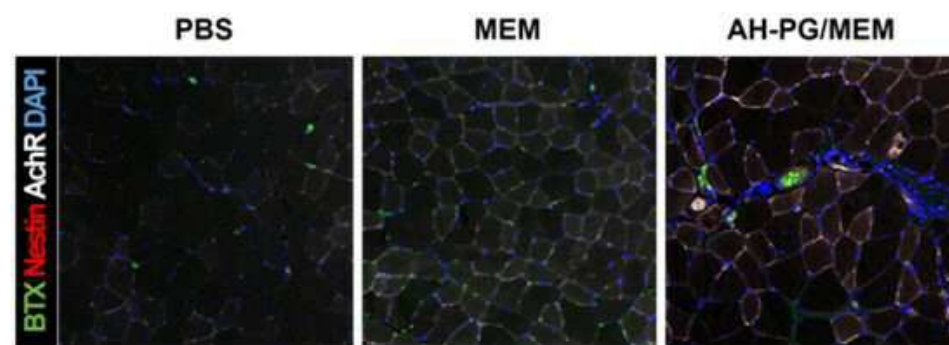
도면12e



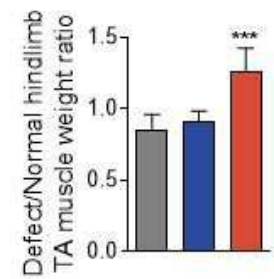
도면12f



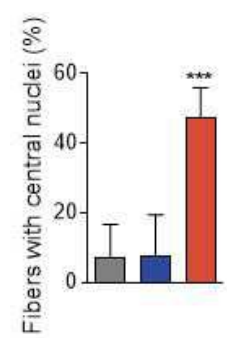
도면12g



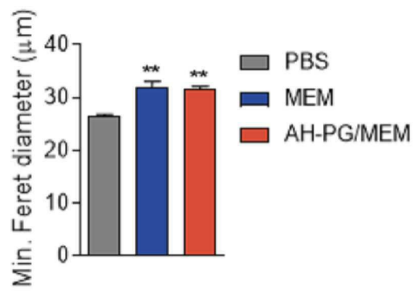
도면13a



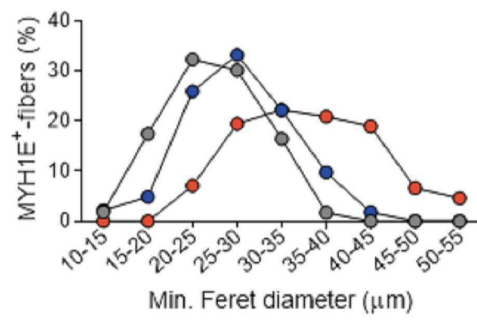
도면13b



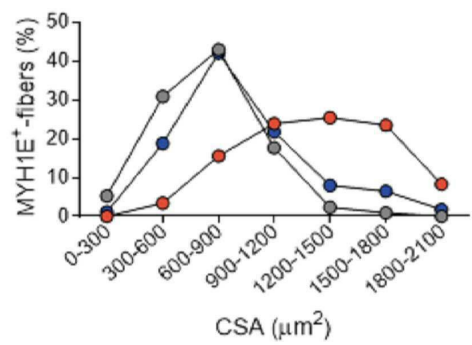
도면13c



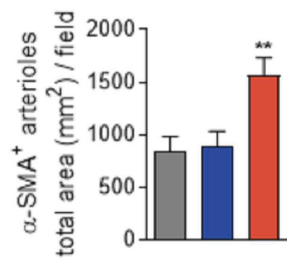
도면13d



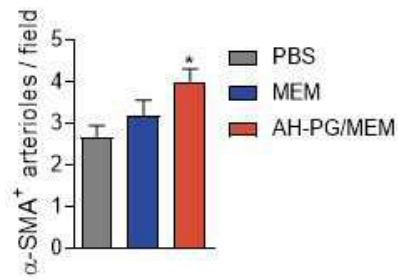
도면13e



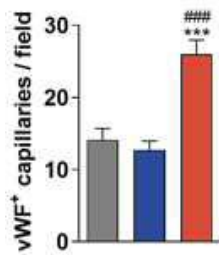
도면13f



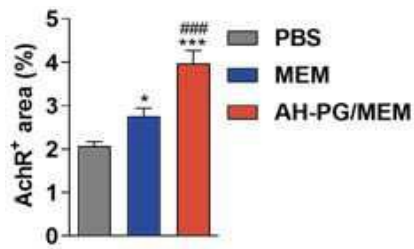
도면13g





도면13h

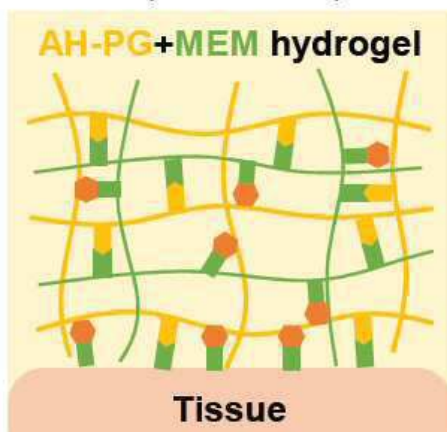


도면13i

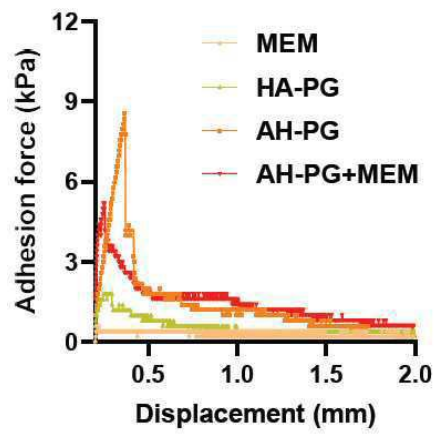


도면14a

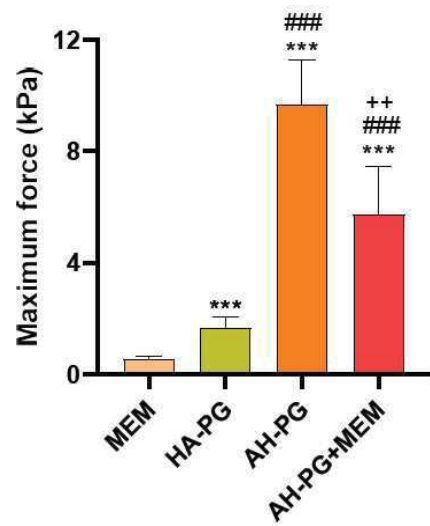
 : Oxidized PG-amine
 : Aldehyde-amine
 (Schiff base)



도면14b



도면14c



도면14d

