



(24) 등록일자 2020년 11월 03일

- (73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자
함승주
서울특별시 서대문구 연세로 50, 제1공학관
에스501호 (신촌동, 연세대학교)
- 이형근
서울특별시 강남구 도곡로78길 22, 109동 230호
(대치동, 대치삼성아파트)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인다나

심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 **염증성 질환 진단용 조성물 및 이를 포함하는 안내레즈형 센서**

본 발명은 염증성 질환 진단용 조성물 및 이를 포함하는 염증성 질환 관련 바이오 마커 검출용 안내 렌즈형 센서에 관한 것이다. 본 발명의 안내 렌즈형 센서는 안구의 방수 내 질병 특이적 바이오 마커를 검출함으로써, 특정 질환의 진단이 가능하다. 특히, 생체 적합한 고분자로 구성된 하이드로젤 및 펩타이드 프로브를 사용함으로써 안구 내 환경에서 안정하고 안정적으로 바이오 마커를 검출 진단할 수 있다.

The diagram illustrates the synthesis of a PEGDAAm-co-allyl-peptide probe hydrogel. The process begins with the UV polymerization of PEGDAAm and allylamine to form a hydrogel network. This network is then reacted with a peptide probe (EDC/au10-NHS) to create a PEGDAAm-co-allyl-peptide probe hydrogel. The final structure shows the peptide probe (a blue chain with a red circle) covalently attached to the hydrogel network, which is depicted as a yellow cylindrical block.

(52) CPC특허분류
G01N 2800/16 (2013.01)

(72) 발명자
신무광
서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 공학
원 367A (신촌동)

지용우
서울특별시 서초구 신반포로 267, 340동 601호 (잠
원동, 신반포21차아파트)

이효
서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 공학
원 367A (신촌동)

진우석
서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 공학
원 367A (신촌동)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020160028592 A*

KR1020180093097 A*

WO2016029139 A1*

Arantxa Acera et al., 'Tear MMP-9 Levels as a
Marker of Ocular Surface Inflammation in
Conjunctivochalasis', Invest Ophthalmol Vis
Sci., 2013, Vol. 54, pp 8285-8291. 1부.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI18C1159

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발사업

연구과제명 [withKHIDI] (3세부)눈물 시료에서의 알츠하이머 고위험 바이오마커의 저비용·고감

도 검출 플랫폼 개발 (1/3)

기 여 율 1/2

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2018.04.30 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2019019674

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 방수(aqueous humor) 액체생검을 이용한 뇌질환 바이오마커 탐색과 생체감응형 패턴

화 하이드로젤 모듈 개발을 통한 마커 센싱 시스템 구축

기 여 율 1/2

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2019.02.01 ~ 2019.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

폴리에틸렌 글리콜계 화합물 및 아민기를 포함하는 모노머의 공중합체로 이루어진 하이드로젤; 및
상기 하이드로젤에 결합되고 염증성 마커를 검출하는 펩타이드 프로브를 포함하고,
상기 펩타이드 프로브는 펩타이드의 N-말단 및 C-말단은 소광체 및 형광체가 각각 결합된 것인 안내 렌즈에 사용하기 위한 염증성 질환 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 공중합체는 폴리에틸렌 글리콜계 화합물 및 아민기를 포함하는 모노머가 반복하여 중합된 것인, 안내 렌즈에 사용하기 위한 염증성 질환 진단용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 펩타이드 프로브는 상기 모노머의 아민기에 펩타이드 결합되는 것인, 안내 렌즈에 사용하기 위한 염증성 질환 진단용 조성물

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 펩타이드 프로브가 검출하는 염증성 마커는 MMP(matrix metalloproteinase)인 것인, 안내 렌즈에 사용하기 위한 염증성 질환 진단용 조성물

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 폴리에틸렌 글리콜계 화합물은 폴리에틸렌글리콜 디아크릴아마이드이고, 상기 아민기를 포함하는 모노머는 알릴 아민인 것인, 안내 렌즈에 사용하기 위한 염증성 질환 진단용 조성물

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물로 이루어진 센싱부를 포함하는, 염증성 질환 진단용 안내 렌즈형 센서.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 조성물은 센싱부에 광중합을 통해 결합하는 것인 염증성 질환 진단용 안내 렌즈형 센서.

청구항 8

폴리에틸렌 글리콜계 화합물 및 이민기를 포함하는 모노머를 반복적으로 중합하여 하이드로젤을 제조하는 단계; 및
상기 하이드로젤의 아민기에 펩타이드 프로브를 펩타이드 결합시키는 단계를 포함하고,
상기 펩타이드 프로브는 펩타이드의 N-말단 및 C-말단은 소광체 및 형광체가 각각 결합된 것인, 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 하이드로젤 및 펩타이드 프로브간의 펩타이드 결합은 EDC/NHS 화학반응에 의해 형성되는 것인, 제조방법.

청구항 10

제 8항에 있어서, 상기 폴리에틸렌 글리콜계 화합물은 폴리에틸렌글리콜 디아크릴아마이드이고, 상기 아민기를

포함하는 모노머는 알릴 아민인 것인, 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 염증성 질환 진단용 하이드로젤 조성물 및 이를 포함하는 방수 내 염증성 질환 마커 검출을 위한 안 내 렌즈 센서에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 안구 질환은 시력 저하, 통증 또는 실명까지 이르게 하는 질병으로, 고령화 사회에 접어들며 발병 빈도는 더욱 증가하고 있다. 안구 내 체액인 방수(aqueous humor)와 유리체(vitreous humor)는 이러한 중증 안질환 조직으로부터 분비되는 바이오마커를 포함하고 있어, 이러한 바이오마커 분석은 안질환의 조기 진단 및 예후 관찰에 도움이 될 수 있다.

[0003] 또한, 중추 신경계의 연장선상으로써 시신경이 분포되어있는 안내 환경은, 알츠하이머 병 등의 신경 퇴행성 질환과 병리학적으로 연관되어 있다는 연구결과가 보고되고 있어, 안구 체액 분석을 통해 안구를 포함하는 뇌질환의 진단도 가능할 것으로 예상되어 관심이 높아지고 있다. 하지만 안내 액의 체외 진단을 위한 체액 수집은 침습적인 방법으로 현재 수행되고 있어, 검체 수집에 어려움이 있다.

[0004] 한편, 시력 교정 또는 노령 인구에 대한 백내장 수술용으로 안내 렌즈 삽입술의 빈도가 증가하는 추세인데, 최근 안구에 적용하는 렌즈를 이용하여 안내 체액의 혈당을 측정하는 기술 등이 공개되고 있다. 현재, 최근 주목 받고 있는 '스마트 콘택트렌즈' 기술에는, 대부분 potentiometry 또는 amperometry 기술이 적용되고 있어, 이러한 '스마트'한 기능을 안내렌즈 내부에 구현하기 위한 각종 컨트롤 회로, 통신 회로, 안테나 등이 극 소형화되어야 하는바, 상용화를 위해서는 이와 관련된 추가적인 기술의 개발이 요구되고 있다. 또한, 혈당(글루코스)과 같은 단순한 구조의 생체 마커를 검출 진단하는 기술에 머물고 있어 복잡한 구조의 다양한 바이오 마커를 검출하기 위한 플랫폼의 구축이 필요한 실정이다.

[0005] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 염증성 질환 진단 및 예방의 일환으로서, 안구 내 삽입되어 방수 내 다양한 바이오 마커를 검출하는데 적합한 센싱용 조성물 및 이를 적용한 안내 렌즈 센서를 개발하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Diabetes Technology & Therapeutics, Vol. 2, No. 1 |July 5, 2004

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은, 염증성 질환 바이오 마커의 검출을 위한, 폴리에틸렌 글리콜계 화합물(poly(ethyleneglycol)-based compound) 및 아민기를 포함하는 모노머의 공중합체로 이루어진 하이드로젤 및 이에 결합된 바이오 마커 검출용 펩타이드 프로브를 포함하는, 염증성 질환 진단용 조성물을 제공하는데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은, 안구의 방수 내 염증성 질환 바이오 마커의 검출을 위한, 상기 조성물을 포함하는, 염증성 질환 진단용 안내 렌즈형 센서를 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 제조하는 방법을 제공하는데 있다.

[0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해, 본 발명자들은, 안구 내 환경에 적합한 센싱 조성물로, 폴리에틸렌 글리콜계 화합물 및 아민기를 포함하는 모노머의 공중합체로 이루어진 하이드로젤 및 이에 결합된 바이오마커 검출용 펩타이드 프로브를 이용함으로써, 펩타이드 프로브의 발색 반응을 통해 특정 질환 관련 바이오마커를 더욱 손쉽게 검출할 수 있었으며, 이러한 결과에 기반하여, 상기 조성물을 포함하는, 본 발명의 안내 렌즈형 센서로 방수 내 환경과 동일한 조건에서 염증성 질환 바이오마커를 검출 측정한 결과, 생체에 안전하게 바이오마커의 검출이 가능함을 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하게 되었다. 또한 토끼 안구를 이용한 본 발명의 안내 렌즈형 센서 전임상시험 결과, 안구 내에서 염증반응 없이 안정하게 삽입되어 있는 것을 확인하였다.
- [0012] 이에 따라, 본 발명은 폴리에틸렌 글리콜계 화합물 및 아민기를 포함하는 모노머의 공중합체로 이루어진 하이드로젤; 및 상기 하이드로젤에 결합되고 염증성 마커를 검출하는 펩타이드 프로브를 포함하는 염증성 질환 진단용 조성물을 제공한다.
- [0013] 상기 조성물은 본 명세서에서 하이드로젤 센싱 모듈과 교환적으로 사용될 수 있다.
- [0014] 상기 염증성 질환은 구체적으로는 염증성 안 질환일 수 있으며, 보다 구체적으로는 포도막염, 노인성 황반변성, 당뇨병성 망막증 및 망막 정맥 폐쇄증 등 일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 공중합체는 폴리에틸렌 글리콜계 화합물 및 아민기를 포함하는 모노머가 반복적으로 중합되어 형성된 하이드로젤일 수 있고, 상기 폴리에틸렌 글리콜계 화합물은 폴리에틸렌 글리콜 디아크릴아마이드(polyethylene glycol diacrylamide; PEGDAAm) 및 폴리에틸렌 글리콜 디아크릴레이트(polyethylene glycol diacrylate; PEGDA)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 하이드로젤의 형성이 가능한 공지의 고분자도 이용될 수 있으며, 이에 한정되지 않는다. 상기 폴리에틸렌 글리콜은 2-, 3-, 4-, 6-, 8-arm 등의 multi-arm 형태일 수 있고, 상기 아민기를 포함하는 모노머는 바람직하게는 알릴 아민(allylamine)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0016] 본 발명에서 상기 하이드로젤에 결합되는 펩타이드 프로브는, 안구의 방수 내 염증성 질환과 관련된 바이오마커를 인식할 수 있는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 구조의 물질로서, 검출하고자 하는 염증 질환 관련 단백질과의 특이적 반응으로 펩타이드가 절단되면서 형광 또는 발색 반응을 유도하는 역할을 한다. 따라서 특정 염증성 질환 마커와 반응하여 절단된 펩타이드 서열로부터 발생하는 형광 또는 발색을 측정함으로써 상기 염증성 질환 마커를 검출 정량함으로써 염증성 질환을 진단할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일 구체예에서, 염증성 질환 관련 바이오마커로 MMP(matrix metalloproteinase), 구체적으로 MMP-9에 특이적으로 반응하는 펩타이드 프로브를 제조하였다 MMP에 특이적인 펩타이드 프로브는 서열번호 1 내지 5 중 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어질 수 있고, 구체적으로 MMP-9에 특이적으로 반응하는 펩타이드 프로브는 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다. 이와 같이, 검출하고자 하는 다양한 바이오마커에 대하여 이에 특이적으로 반응하는 펩타이드 프로브를 제작하여 상기 하이드로젤에 적용할 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명의 하이드로젤은 특성상 농도(가교도)에 따라 메쉬(mesh) 크기의 조절이 가능하므로, 하이드로젤의 농도를 조절함으로써 원하는 바이오마커의 선택적인 투과를 유도하여 불필요한 비특이적 반응을 줄이고 상기 펩타이드 프로브와의 특이적 반응성을 극대화시킬 수 있다(도 8).
- [0019] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 펩타이드 프로브는 상기 하이드로젤에 펩타이드 결합을 통해 결합되며, 구체적으로 하이드로젤을 구성하는 모노머의 아민기와 펩타이드 프로브의 카복실기간의 펩타이드 결합이 형성되어 결합될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 다른 양태로서, 상기 조성물을 포함하는, 염증성 질환 진단용 안내 렌즈형 센서를 제공한다.
- [0021] 안구 질환, 특히 염증성 질환과 관련된 바이오마커를 검출 진단하기 위한 기존의 방법은 환자에게 스트레스와 고통을 유발할 뿐만 아니라, 혈액을 통한 외부 감염 가능성과 같은 단점이 존재하였다. 이에, 본 발명은 안구의 방수가 체액으로써 다양한 바이오마커를 포함하고 있는 사실에 기반을 두어 이로부터 질환 관련 바이오마커를 검출할 수 있는, 즉, 안구 내 환경에 적합한 검출용 조성물을 도입한 안내 렌즈형 센서를 제조하였다.
- [0022] 본 발명에 따른 안내 렌즈형 센서는 안내 렌즈 본체 (기재); 및 상기 안내 렌즈 본체상의 특정 위치(센싱부)에 염증성 질환 바이오마커 검출용 조성물(센싱 모듈)이 결합되도록 마련될 수 있다.

- [0023] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 센싱부는 환자의 시야 및 시력에 방해가 되지 않는 안내 렌즈 본체상에 위치할 수 있다. 구체적으로, 안내 렌즈 본체는 안구상에 접하는 옵틱(optic) 부위 및 렌즈를 안구에 고정시키는 역할을 하는 헵틱(heptic) 부위로 구분되는데, 상기 센싱부는 상기 부위 각각에 또는 모두에 단일 또는 복수 채널을 포함할 수 있으며, 복수 채널을 포함하는 경우에는 각각의 채널에 결합되는 펩타이드 프로브를 달리하여 복수의 바이오 마커를 검출하도록 제작될 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명의 다른 실시예에서는 상기 염증성 질환 진단용 조성물을 기반으로 하여, 안구 내 방수로부터 염증성 질환 관련 바이오 마커를 검출할 수 있는 안내렌즈형 센서를 제조하였고 상기와 마찬가지로, 특정 바이오 마커 및 이에 특이적인 펩타이드 프로브간의 반응으로부터 발생하는 형광을 측정하여 정성적 및 정량적으로 염증성 질환 관련 바이오 마커를 측정할 수 있었으며, 안구 내 환경과 유사한 환경에서 시험한 결과, 물리적 성질, 보관 안정성, 및 세포 독성여부 등 역시 우수함을 확인할 수 있었고, 대상체, 구체적으로는 토끼의 안구 내에 안정하게 삽입될 수 있음을 확인할 수 있었다.
- [0025] 이에, 본 발명은 상기와 같이 제조된 안내 렌즈를 대상체에 삽입하는 단계를 포함하는 염증성 질환 관련 바이오 마커 검출 방법 또는 염증성 질환 진단방법을 제공한다.
- [0026] 본 발명에서, 상기의 처리에 의한 안내 렌즈형 센서를 대상으로 색상 또는 형광 강도 분석을 실시하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 염증성 질환 진단용 조성물 및 이를 포함하는 안내렌즈형 센서의 발색 반응과 특정 바이오 마커의 농도는 선형비례 관계에 있음을 확인할 수 있었다. 따라서, 상기 단계에서는 이들간 관계식에 기초하여, 안구 내 특정 염증성 질환 관련 바이오 마커 농도를 구체적으로 정량할 수 있다.
- [0027] 본 발명에서, "대상체"는 염증성 질환의 진단 및 모니터링을 위하여 염증성 질환과 관련된 바이오 마커의 검출을 필요로 하는 대상을 의미하며, 보다 구체적으로 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 토끼, 개, 고양이, 말, 돼지 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 양태로서,
- [0029] (1) 폴리에틸렌 글리콜계 화합물 및 이민기를 포함하는 모노머를 반복적으로 중합하여 하이드로젤을 제조하는 단계; 및
- [0030] (2) 상기 제조된 하이드로젤의 아민기에 펩타이드 프로브를 펩타이드 결합시키는 단계를 포함하는, 염증성 질환 진단용 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0031] 상기 하이드로젤의 아민기 및 펩타이드 프로브의 카복실기의 펩타이드 결합은 EDC/NHS 화학반응에 의해 형성될 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 펩타이드 결합을 형성시킬 수 있는 공지된 방법이 이용될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 구체예에서 상기 폴리에틸렌 글리콜계 화합물은 폴리에틸렌글리콜 디아크릴아마이드이고, 상기 아민기를 포함하는 모노머는 알릴 아민일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 제조방법의 단계 (1) 및 (2)는 순차적으로 수행되는 것이 바람직하다.

발명의 효과

- [0034] 본 발명에 따른 염증성 질환 진단용 조성물을 포함하는 안내 렌즈형 센서를 이용하면, 질병 특이적 바이오 마커를 검출함으로써, 특정 질환의 진단이 가능하다. 특히, 생체 적합한 고분자로 구성된 하이드로젤 및 펩타이드 프로브를 사용함으로써 안구 내 환경에서 안전하고 안정적으로 바이오 마커를 검출 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1은, 본 발명의 구체적인 구현예로서, 폴리에틸렌 글리콜 디아크릴아마이드 및 알릴아민의 공중합체로 이루어진 하이드로젤 및 이에 결합된 펩타이드 프로브로 구성된 본 발명의 조성물을 제조하는 공정을 개략적으로 나타낸 도이다.
- 도 2는, 본 발명의 다른 구체적인 구현예로서, 폴리에틸렌 글리콜 디아크릴아마이드 및 알릴아민의 공중합체로 이루어진 하이드로젤 및 이에 결합된 펩타이드 프로브로 구성된 본 발명의 조성물을 제조하는 공정을 개략적으로 나타낸 도이다.
- 도 3은, 상기 도 1 및 도 2에 개시된 방법으로 제조된 조성물의 활성을 비교한 것이다.

도 4는, MMP-9에 특이적인 펩타이드 프로브의 스크리닝 결과를 나타낸 것이다. 스크리닝에 사용된 후보 펩타이드 프로브는 다음과 같다: (a) GPLPLRSWGLK, (b) PLGLAR, (c) GGPLGLAGGK, (d) WYPAGLRMVK, (e) GPQGIAGQLK 및 (f) MMPs와 GPQGIAGQLK의 장기간 반응성.

도 5는, 본 발명에 따라 제조된 하이드로젤의 안정성을 측정한 그래프로, 폴리아크릴레이트 계열의 하이드로젤과 다양한 조건((a) 염기성, (b) 산성, (c) 안구 내와 유사 환경)에서의 안정성을 비교하였다.

도 6은, 본 발명에 따라 제조된 하이드로젤 모노머의 안구상피세포에 대한 농도별 세포독성을 측정한 것이다.

도 7은, 본 발명에 따라 제조된 하이드로젤 중합체의 생체 내 안정성을 측정한 것이다.

도 8은, 본 발명에 따른 제조된 하이드로젤의 농도에 따른 특정 바이오 마커 분자의 투과도 및 효소 반응성을 측정한 것이다.

도 9는, 본 발명에 따른 제조된 하이드로젤의 농도에 따른 특정 바이오 마커 분자의 투과도 및 효소 반응성을 측정한 것이다.

도 10은, 본 발명에 따른 제조된 하이드로젤의 농도에 따른 MMP-9에 대한 효소 반응성을 측정한 것이다.

도 11은, 본 발명에 따른 제조된 하이드로젤의 농도에 따른 MMP-9에 대한 특이적 효소 반응성을 측정한 것이다.

도 12는, 본 발명에 따라 제조된 안내 렌즈 센서의 모식도이다.

도 13은, 복수의 센싱부(모듈)를 장착한 안내 렌즈 센서의 모식도이다.

도 14는, 본 발명에 따라 제조된 안내 렌즈 센서의 MMP-9 농도에 따른 형광 신호를 측정한 결과이다.

도 15는, 본 발명에 따라 제조된 안내 렌즈 센서의 MMP-9에 대한 시간에 따른 형광 신호를 측정한 결과이다.

도 16은, 본 발명에 따라 제조된 안내 렌즈 센서를 대상체인 토끼 안구 내에 삽입 후 세극등 현미경을 이용하여 촬영한 형광 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0038] 제조예 1. 폴리에틸렌글리콜 디아크릴아마이드(PEGDAAm)기반 하이드로젤 센싱 모듈의 제조(도 1)

[0039] [1-1] 폴리에틸렌글리콜 디아크릴아마이드 및 이의 하이드로젤의 합성

[0040] PEGDAAm 는 Elbert et al. *Biomacromolecules* **2**, 430-441 (2001) 및 Cosgriff-Hernandez et al.. *J Biomed Mater Res A* **102**, 4244-4251 (2014)에 기술된 방법에 따라 제조하였다.

[0041] 하이드로젤 센싱 모듈 제작을 위한 PEGDAAm, PEGDA 하이드로젤은 광개시제를 이용한 광중합법을 통해 제조하였다. PEGDAAm과 PEGDA 고분자 모노머는 0.1~100wt% 사이일 수 있으며, 용이하게는 0~30wt%, 구체적으로는 2.5~20wt%의 질량비로 제조하였다. 광개시제로는 0.5% (w/v)의 2-히드록시-2-메틸프로피오페논 (2-Hydroxy-2-methylpropiophenone: HMPP)을 이용하였다. 광원으로는 UV lamp(LF-104.L, UVITEC, France)를 이용하였다. PEGDAAm 또는 PEGDA 고분자 모노머와 광개시제를 포함한 전구체 용액을 초음파분쇄기(sonicator) 및 볼텍서(vortexer)를 이용하여 교반한 뒤, 8W UV lamp를 365 nm에서 600초간 조사하여 광중합 과정을 거쳐 하이드로젤을 제조하였다.

[0043] [1-2] 폴리에틸렌글리콜 디아크릴아마이드 및 알릴아민의 공중합체로 이루어진 하이드로젤의 제조(도 1)

[0044] 아민기가 도입된 하이드로젤의 합성은, 하이드로젤 합성 전구체 용액에 아민기를 갖는 모노머, 구체적으로는 알릴아민을 첨가하여 제조하였다. 자세하게는, 폴리에틸렌글리콜 디아크릴아마이드 및 알릴아민이 포함된 하이드로젤 전구체 용액을 제조하였고, 구체적으로 본 실시예에서는 4~9.5wt% 폴리에틸렌글리콜 디아크릴아마이드 및 0.5~1wt%의 알릴아민을 사용하여 제조하였으나, 상기 농도비는 아민기의 개질 비율 조절을 위해 제시된 범위에 국한되지 않고 조절이 가능하다. 광개시제로는 0.5% (w/v)의 2-히드록시-2-메틸프로피오페논 (2-Hydroxy-2-methylpropiophenone: HMPP)을 이용하였으며, 광원으로는 UV lamp를 이용다. 폴리에틸렌글리콜 디아크릴아마이드, 알릴아민 및 광개시제를 포함한 용액을 초음파분쇄기(sonicator) 및 볼텍서(vortexer)를 이용하여 교반한 뒤, 8W UV lamp를 365 nm로 600초간 조사하여 광중합 과정을 거쳐 하이드로젤을 제조하였다.

[0046] [1-3] MMP-9 특이적 펩타이드 프로브의 스크리닝(도 4)

[0047] MMP-9 특이적 펩타이드 프로브는, MMP-9와 특이적으로 반응하여 단백분해를 일으키는 펩타이드 서열 양 말단에, 구체적으로는 N-말단에 소광체를, C-말단의 라이신(lysine) 아미노산의 아민 작용기에 형광체를 결합하여 FRET 현상을 유도할 수 있게 제작하였다. 이때, 형광체와 소광체로 각각 5-FAM과 Dabcyl을 이용하였으나 이에 국한되지 않으며, C-말단, N-말단의 위치 선정 또한 국한되지 않는다. MMP-9에 특이적이고 최적으로 단백분해를 일으키는 펩타이드 서열은 기존에 보고된 서열 5종 (Ohkubo, S. et al., *Biochem Bioph Res Co* 266, 308-313 (1999); Jiang, T. et al., *P Natl Acad Sci USA* 101, 17867-17872 (2004); Myochin, T. et al., *J Am Chem Soc* 134, 13730-13737 (2012); Kukreja, M. et al., *Chem Biol* 22, 1122-1133 (2015); Woessner, J.F., *Faseb J* 5, 2145-2154 (1991))을 선정하여 스크리닝하였다 (표 1). 후보 펩타이드 프로브는 각각 MMP-3, MMP-7, MMP-9, 그리고 MMP-14와 반응하였고, 형광 신호의 증감 양상을 통해 가장 MMP-9과 특이적이고 최적으로 반응하는 서열을 선정하였다. 선정된 펩타이드 프로브는 본 연구의 하나의 실시예로써 타겟 바이오마커 및 효소의 종류에 따라 용이하게 변경이 가능하다. MMP 효소와 펩타이드 프로브의 반응은 제품에 제시된 반응 용액 및 반응 조건을 따라 진행하였다. 구체적으로는 반응 용액 (50 mM Tris, 150mM NaCl, 5 mM CaCl₂ and 0.025% Brij35; pH 7.4)에 1mM 펩타이드 프로브를 분산한 용액 1과, 반응 용액에 MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-14를 각각 분산한 용액 2를 37℃에서 1시간 활성화시킨 뒤, 용액 1에 용액 2를 첨가하여 시간 진행에 따른 형광 변화를 형광 리더기를 이용하여 확인하였다.

표 1

서열번호	Peptide sequences
1	GPLP↓↓LRSWGLK
2	PLG↓↓LAR
3	GGPLG↓↓LAGGK
4	WYPAG↓↓LRMVK
5	GPQG↓↓IAGQLK

[0050]

[0052] 그 결과, 펩타이드 서열 GPQGIAGQLK(서열번호 5)을 보유한 펩타이드 프로브의 형광 신호가 MMP-9에 대하여 가장 특이적으로 증가하여, 선도 펩타이드 프로브로 선정하였고, 이를 이용하여 MMP-9 센싱용 형광 하이드로젤을 제조하였다.

[0054] [1-4] 펩타이드 프로브와 결합된 폴리에틸렌글리콜 디아크릴아마이드 및 알릴아민의 공중합체로 이루어진 하이드로젤 센싱 모듈의 제조(도 1)

[0055] 폴리에틸렌글리콜 디아크릴아마이드 및 폴리알릴아민의 공중합체로 이루어진 하이드로젤 내부 아민기에 선정된 펩타이드 프로브를 결합하여 하이드로젤 센싱 모듈의 제조를 진행하였다. 이때, 펩타이드 프로브의 카복실기와 하이드로젤 내부 아민기 사이의 펩타이드 결합 반응을 통해 하이드로젤 센싱 모듈을 제조하였고, 본 실시예에서는 EDC/NHS 반응을 이용하였으나 이에 국한되지 않고, 도입 방법은 통상적으로 알려진 다양한 결합법이 이용될 수 있다. 구체적으로, 8 μmol 펩타이드 프로브의 카복실기는 2.4mg의 EDC가 첨가된 DMSO 용액에 분산한 뒤, 5분간 교반하였고, 이어서 1.6mg의 sulfo-NHS가 첨가된 DMSO 용액을 첨가하여 5분간 교반하여 활성화하였다. 활성화된 카복실기를 보유한 펩타이드 프로브는 폴리에틸렌글리콜 디아크릴아마이드 및 폴리알릴아민의 공중합체로 이루어진 하이드로젤에 분산되어, 펩타이드 결합을 형성하였다. 3~24시간 반응 뒤 에탄올, PBS 또는 반응 용액을 이용하여 정제하였다.

[0057] 비교예 1. 도 2의 공정에 따른 하이드로젤 센싱 모듈의 제조

[0058] 제조예 1과 공정 과정은 다르지만 최종 결과물인 하이드로젤 센싱 모듈의 조성은 같은 제조 비교예를 제시하였다. 펩타이드 프로브를 알릴아민의 아민기와 EDC/NHS 반응을 통해 펩타이드 프로브-알릴아민 복합체를 합성하였다. 구체적으로, 8 μmol 의 펩타이드 프로브의 카복실기는 2.4mg의 EDC가 첨가된 DMSO 용액에 분산한 뒤, 5분간 교반하였고, 이어서 1.6mg의 sulfo-NHS가 첨가된 DMSO 용액을 첨가하여 5분간 교반하여 활성화하였다. 활성화된 카복실기를 보유한 펩타이드 프로브는 16 μmol 의 알릴아민과 3~24시간 반응하여 펩타이드 결합을 형성하였다. 반응물은 3500 분자량의 기공 크기를 갖는 (3500 MWC0) 멤브레인을 이용하여 분리정제하였고, 동결건조를 통해 펩타이드 프로브-알릴아민 복합체를 제조하였다. 복합체의 알릴기는 폴리에틸렌글리콜 디아크릴아마이드 고분자 모노머와 혼합한 뒤, 제조예 1에서 제시된 방법으로 광중합하여, 펩타이드 프로브가 도입된 형광 하이드로젤 센싱 모듈을 제조하였다.

[0060] **제조예 2. 제조예 1에 따라 제조된 하이드로젤 센싱 모듈이 포함된 안내 렌즈 제조(도 12 및 13)**

[0061] 하이드로젤 센싱 모듈이 포함된 안내 렌즈 제조를 위해, 도 2의 과정을 통해 홈이 형성된 안내 렌즈를 제작하였다. 구체적으로, 홈이 파인 안내 렌즈 형상을 갖는 양각 몰드를 3D 프린터를 이용하여 제작하였다. 이어서, PDMS를 양각 몰드 위에 중합하여 유연한 음각 안내 렌즈 PDMS 몰드를 제조하였다. 그 후, 80~100wt%의 PHEMA 또는 PEG 하이드로젤 전구체 용액 (0.1~5 wt% HMPP 첨가)을 음각 안내 렌즈 몰드 홈에 분산한 뒤, UV 광원을 통한 광중합을 통해 경화하였다. 이때, 안내 렌즈로 사용되는 물질은 통상적으로 제작되는 안내 렌즈의 물질들이 이용될 수 있다. 경화된 안내 렌즈는 PDMS 몰드에서 분리한 뒤, 물에 분산되어 팽창되었고, 최종 제작된 안내 렌즈 크기는 약 12.00 x 7.50 x 1.00 mm (가로 x 너비 x 높이) 였으나, 크기는 통상적으로 사용되는 안내 렌즈의 크기와 유사하다. 제조된 안내 렌즈의 홈에 하이드로젤 센싱 모듈을 제조예 1, 2와 같은 방법을 통해 장착하였고, 최종적으로 하이드로젤 센싱 모듈이 포함된 안내 렌즈를 제조하였다.

[0063] **[실시예]**

[0064] **실시예 1. 다양한 버퍼에서의 PEGDAAm 하이드로젤의 안정성 비교(도 5)**

[0065] 통상적으로 사용되는 PEG 하이드로젤의 전구체로 사용되는 폴리에틸렌글리콜 디아크릴레이트와 대비하여, 하이드로젤 센싱 모듈은 폴리에틸렌글리콜 디아크릴아마이드 고분자를 이용하여 제작되었다. 폴리에틸렌글리콜 디아크릴레이트 하이드로젤과 폴리에틸렌글리콜 디아크릴아마이드 하이드로젤은 20wt% 농도를 갖게, HMPP의 광개시제와 UV 광원을 이용하여 제조하였다. 200 μl 부피의 각 하이드로젤은 5mL 부피의 0.1M 농도를 갖는 염화수소 수용액과 수산화나트륨 용액에 분산된 뒤, 무게 측정을 통해 각 수용액에 대한 분해도를 계산하고, 안정성을 분석하였다. 결과적으로는 폴리에틸렌글리콜 디아크릴레이트 하이드로젤은 0.1M 농도의 염화수소 수용액과 수산화나트륨 수용액에서 각각 1주일, 3시간 만에 완전히 분해되는 것을 확인하였다. 반면에 폴리에틸렌글리콜 디아크릴아마이드 하이드로젤은 4주 이상 분해되지 않고 무게를 유지하는 것을 확인하여, 우수한 재질 안정성을 포함함을 확인하였고, 장기간 삽입되는 안내 렌즈에 장착될 하이드로젤 센싱 모듈의 재질로 적합함을 확인할 수 있다. 이때, 아크릴아마이드의 아마이드 결합은 상대적으로 아크릴레이트의 에스테르 결합보다 가수분해에 안정하여, 약산, 강산, 약염기, 강염기 조건에서 상대적으로 향상된 재질 안정성을 나타내는 것을 확인하였다.

[0066] 추가적으로, 폴리에틸렌글리콜 디아크릴아마이드 하이드로젤의 안내 체액인 방수와 유사한 조성을 갖는 용액에서 안정성을 분석하였다. 이때 방수와 유사한 조성을 갖는 용액은 안내 수술에 이용되는 Alcon 사의 BSS 버퍼를 이용하였다. 200 μl 부피의 하이드로젤은 5mL 부피의 BSS 용액에 분산되었고, 무게 측정을 통해 분해도 및 안정성을 분석하였다. 그 결과 3주 이상 재질 안정성을 확인하였고, 안내 환경에서 안정함을 유추할 수 있다.

[0068] **실시예 2. PEGDAAm 하이드로젤의 세포 독성 테스트(도 7 및 8)**

[0069] 소의 각막 내피 세포 (Bos Taurus cornea endothelial cells line, BCE C/D1b obtained from ATCC®)에 대한 PEGDAAm 하이드로젤의 재질 안전성을 확인하였다. 소의 각막 내피 세포는 완전 배지 (complete growth medium)에서 배양하였고, 완전 배지의 조성은 10% fetal bovine serum (FBS), human corneal growth supplement (HCGS) and 1% antibioticantimycotic (Gibco®, Life Technologies, Grand Island, NY, USA)이다. 하이드로젤의 세포 독성 테스트를 위해, PEGDAAm 고분자 모노머를 완전 배지에 0~50mM 농도로 1/10 순차 희석한 뒤, 모노머가 첨가된 완전 배지액에서 소의 각막 내피 세포 생존률을 MTT 분석을 이용하여 분석하였다. 구체적으로 96 well plate의 각 well에 각막 내피 세포 1×10^4 개씩 완전 배지와 함께 분주한 뒤, 5% CO₂ 배경에서 37 °C로 24 시간 동안 배양하였다. 완전 배지를 제거한 뒤, 1/10배 씩 순차 희석한 PEGDAAm 모노머가 포함된 완전배지를 분주한 뒤, 1, 3, 5, 7일차에 각각 세포 증식률을 분석하였다. 이때 분석은 각 well에 0.5mg/ml 농도의 MTT 용액 (Thermo 사)이 첨가된 serum-free 배지를 분주하고 37°C에서 2시간 반응한 뒤, DPBS를 이용하여 세척하였다.

그 후, 50 μ l의 MTT 용액을 분주한 뒤 2시간 동안 추가 반응하였다. 100 μ L 부피의 DMSO를 이용하여 잔류 불순물을 제거한 뒤, 570nm 흡광도 (O.D.)를 측정하여 세포 증식률을 분석하였다.

[0071] 세포 독성을 MTT assay로 확인한 결과, 5mM 이하의 하이드로젤 농도에서 안구상피세포의 생존률이 80% 이상 유지되어 하이드로젤의 안전성을 확인하였다. 한편, 모노머를 하이드로젤로 중합한 다음, 미반응한 PEGDAAm 모노머의 농도를 NMR을 통해 분석한 결과, 약 300 μ M 농도임을 확인하였고 이는 안정한 모노머 농도 범위에 속하며, 또한 정제과정 없이 분석하였기 때문에, 몇 차례에 걸친 정제/살균 과정을 통해 더욱더 우수한 세포 안전성을 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[0073] **실시예 3. PEGDAAm 하이드로젤에서의 단백질 확산 테스트(도 8 내지 10)**

[0074] 제조예 1에서 제시된 방법으로 준비된 5~20 wt%의 농도로 준비된 PEGDAAm 하이드로젤의 단백질 분자량에 따른 확산 (또는 투과도) 분석을 진행하였다. 2.5, 5, 10, 그리고 20 wt% 농도의 PEGDAAm 하이드로젤을 SDS page 분석에 사용되는 10~250 kDa 크기의 재조합 단백질 조성을 갖는 표준 용액 100 μ l에 12시간 동안 분산하였다. 하이드로젤 내부로 투과하지 않은 상층액을 제거하고, 몇차례에 걸쳐 100 μ l 부피의 PBS 용액을 이용한 워싱하여 추가적인 미반응 단백질을 제거하였다. 그 후, 50 μ l 부피의 PBS에 12시간 동안 분산되어 하이드로젤 내부에 투과한 단백질을 추출하였고, 하이드로젤 내부로부터 추출된 단백질을 SDS page를 이용하여 분석하였다.

[0075] 모노머 양을 5~20 wt%까지 조절하여 분석한 결과, 5wt% 농도의 하이드로젤은 약 100kDa 크기의 단백질까지, 10wt% 농도의 하이드로젤은 약 50kDa 크기의 단백질까지, 20wt% 농도의 하이드로젤은 약 15kDa 크기의 단백질까지 투과 가능하였다 (도 9).

[0076] 하이드로젤 센싱 모듈의 MMP-9에 대한 반응성은 (빨간 바) 20wt% 농도 이상의 하이드로젤에 대해서는 급격하게 감소하였는데, 이는 사용한 39kDa 크기의 MMP-9 이 20wt% 이상의 하이드로젤에선 투과할 수 없어, 하이드로젤 내부의 펩타이드 프로브와 반응하지 못하는 것으로 판단할 수 있었다.

[0077] 따라서, 바이오 마커(MMP-9)을 분석하기 위한 최적 하이드로젤 농도는 5wt%로 설정하였고, 이러한 설정값은 설정되는 타겟 바이오마커의 크기에 따라 가변적으로 적용할 수 있다(도 10).

[0079] **실시예 4. PEGDAAm 하이드로젤 기반 센싱 모듈의 제조방법에 따른 효과 비교 (도 3)**

[0080] 상기 제조예 1 및 비교예 1를 통해 제조된 하이드로젤 센싱 모듈에 대하여 MMP-9에 대한 펩타이드 프로브의 활성을 측정한 결과, 제조예 1과 같은 공정으로 제조된 하이드로젤 센싱 모듈에서만 펩타이드 프로브 활성이 나타남을 확인하였다. 이는 비교예 2와 같이 펩타이드 프로브에 먼저 알릴아민을 결합한 후 PEGDAAm와 중합하여 하이드로젤을 제조하는 경우에는 중합반응이 펩타이드 프로브의 형광부위에 영향을 주기 때문인 것으로 판단할 수 있었다. 따라서, 상기 하이드로젤을 합성하는 순서도 하이드로젤의 활성에 영향을 줄을 확인하였다.

[0082] **실시예 5. PEGDAAm 하이드로젤 기반 센싱 모듈의 검출 능력 및 선택성 분석 (도 11)**

[0083] MMP-9 검출용 하이드로젤 센싱 모듈의 검출 한계 및 선택성 분석을 위해, 제조한 하이드로젤 센싱 모듈을 서로 다른 농도를 갖는 MMP-9 용액과, 서로 다른 종류의 효소 (MMP-3, -7, -9, BACE-1)가 첨가된 용액과 각각 반응시켜 형광 변화를 분석하였다. 그 결과, MMP-9 검출용 하이드로젤 센싱 모듈의 검출한계 값은 365.7 pM 농도임을 확인하였다. 또한 선택성과 관련하여, 서로 다른 효소인 MMP-3, MMP-7, BACE-1 효소와 비교하여 각각 2.12, 2.27, 1.85배 높은 형광 신호를 나타내어, MMP-9에 대해 특이적으로 반응함을 확인하였다.

[0085] **실시예 6. 제조예 2에 따라 제작된 안내 렌즈 센서의 활성 분석(도 14 및 15)**

[0086] MMP-9 검출용 안내 렌즈 센서의 MMP-9에 대한 활성이 안내 렌즈에 적용 후에도 유지되는지 분석하였다. 제조한 안내 렌즈 센서를 0~20nM 농도 범위(0, 5, 10, 20nM)를 갖는 MMP-9과 반응한 뒤, 시간에 따른 형광 변화를 분석하였다. 구체적으로는, 48 well plate 각 well에 배치된 안내 렌즈 센서는 200 μ l 부피의 반응 용액에 37℃에서 1시간 반응 전 활성화된 뒤, 제시된 농도를 갖는 MMP-9 용액을 첨가하고 시간 경과에 따른 형광 신호 분석을 실시하였다.

[0087] 그 결과, 제작한 효소 검출용 안내렌즈의 하이드로젤 센싱 모듈의 형광 신호는 MMP-9의 농도가 증가함에 따라 증가함을 확인하였다(도 14). 또한 효소와 반응 시간이 증가할수록 형광 신호 값은 증가함을 확인하였다(도 15).

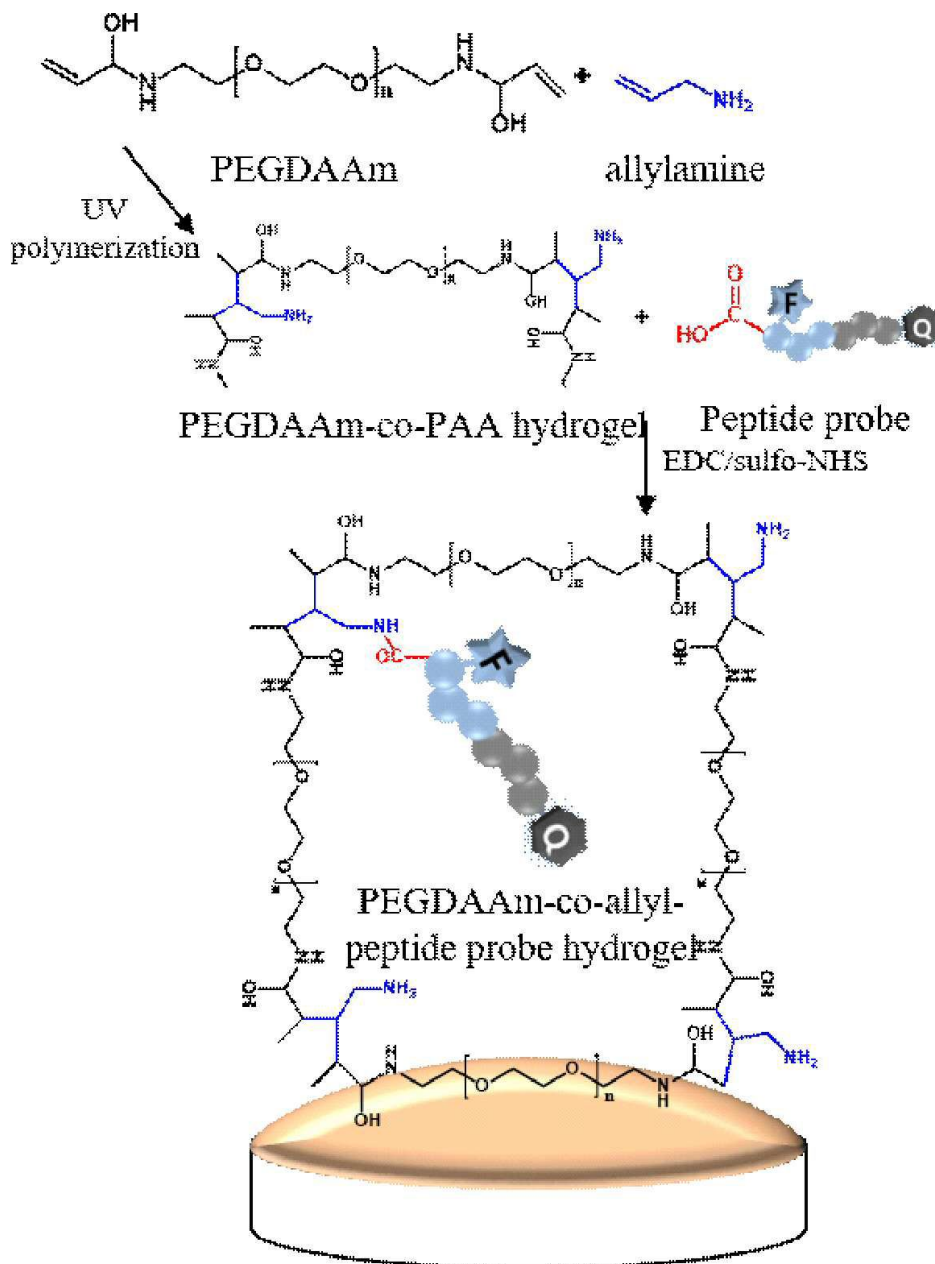
[0089] **실시예 7. 제조예 2에 따라 제작된 안내 렌즈 센서의 전임상 동물 실험 분석 (도 16)**

[0090] 제작된 MMP-9 검출용 안내 렌즈 센서를 토끼의 후방에 삽입하는 전임상 실험을 진행하였다. 이때, 안내 렌즈 삽입 수술 절차는 통상적으로 시행되는 백내장 수술 진행 과정과 동일하게 진행되었다. 토끼 안구 내에 삽입되어 안정하게 안내 렌즈 센서의 형태 및 모양을 유지하는 것을 세극등 현미경을 이용하여 확인할 수 있었다. 또한 토끼 안구 내에 삽입되어 있는 안내 렌즈 센서 부분에 코발트 블루 필터링 된 빛을 조사한 사진을 분석한 결과, 안내 렌즈 부분에서 초록색으로 형광을 나타내는 것을 세극등 현미경 사진을 통해 확인할 수 있었고, 초록색 형광 빛은 포토샵 등의 이미지 처리 방법을 통해 정량적으로 나타내어 질 수 있음을 확인하였다 (도 16).

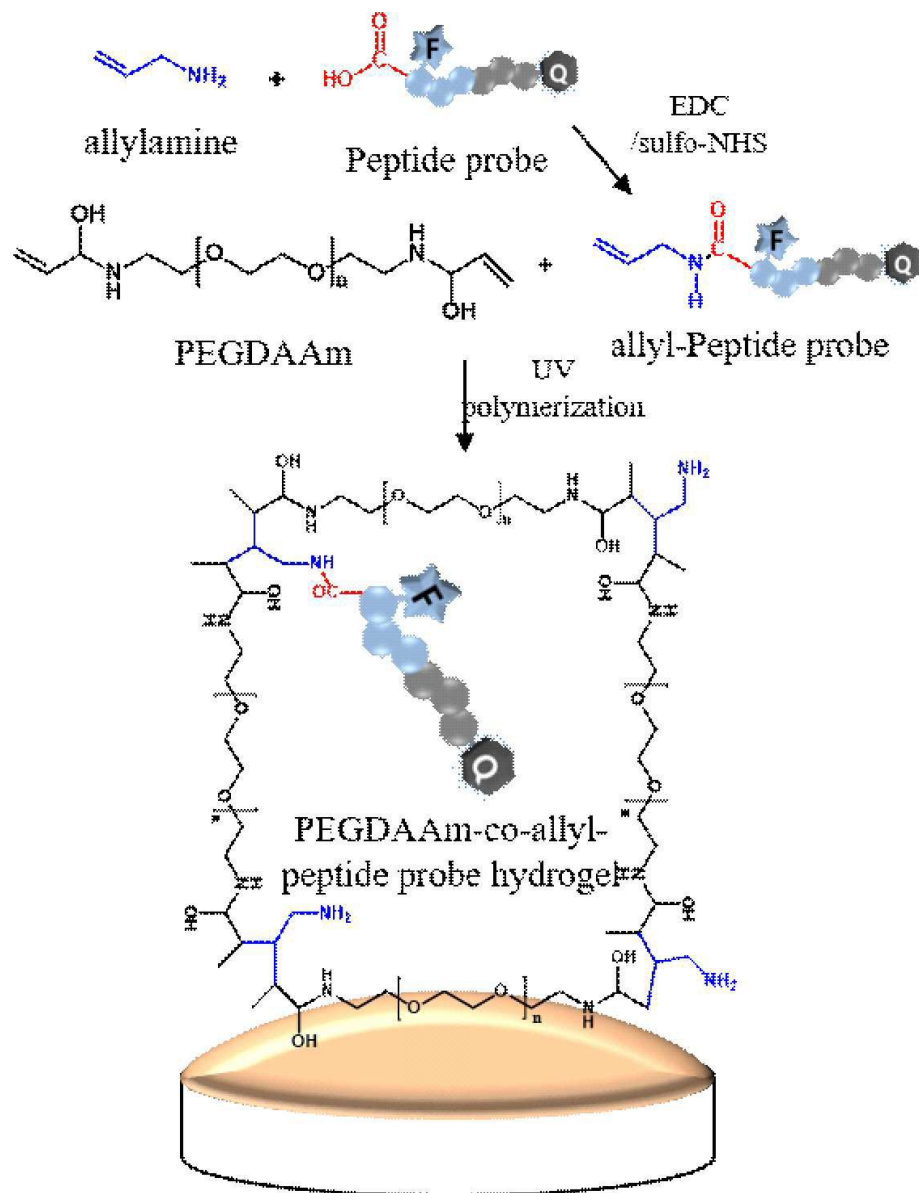
[0091] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

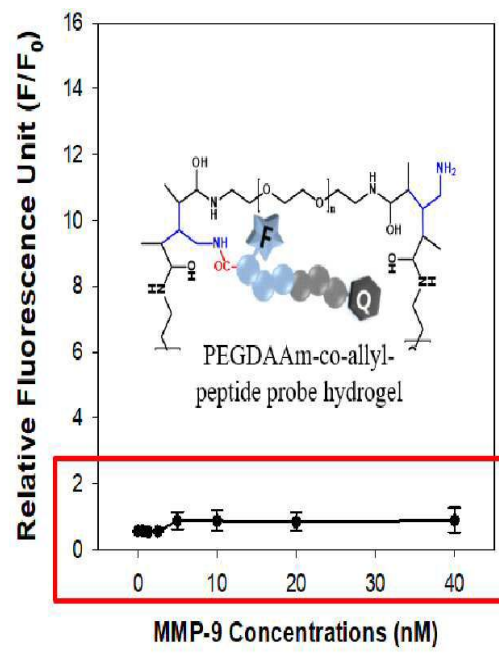
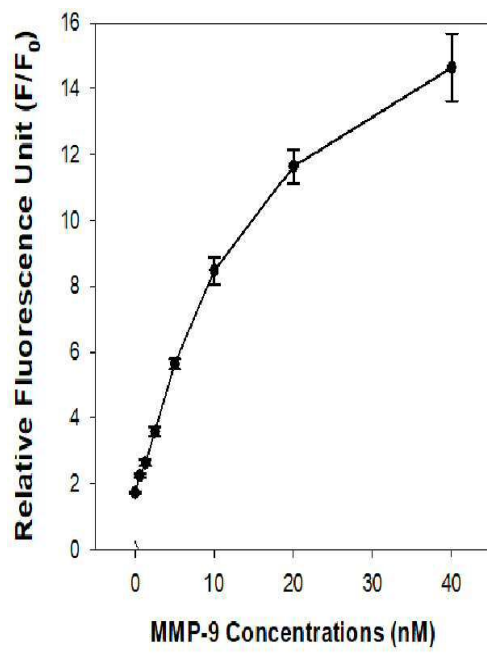
도면1



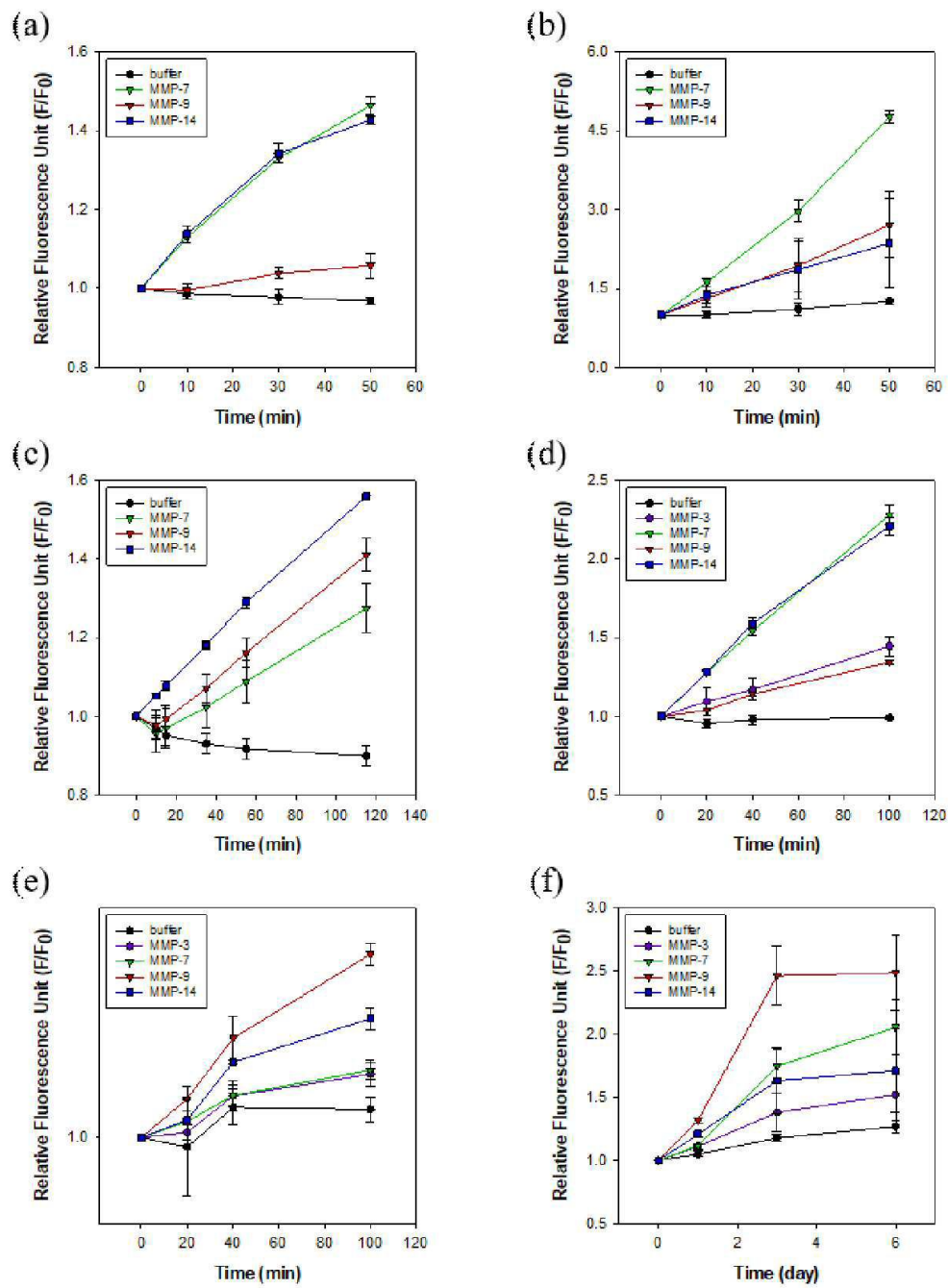
도면2



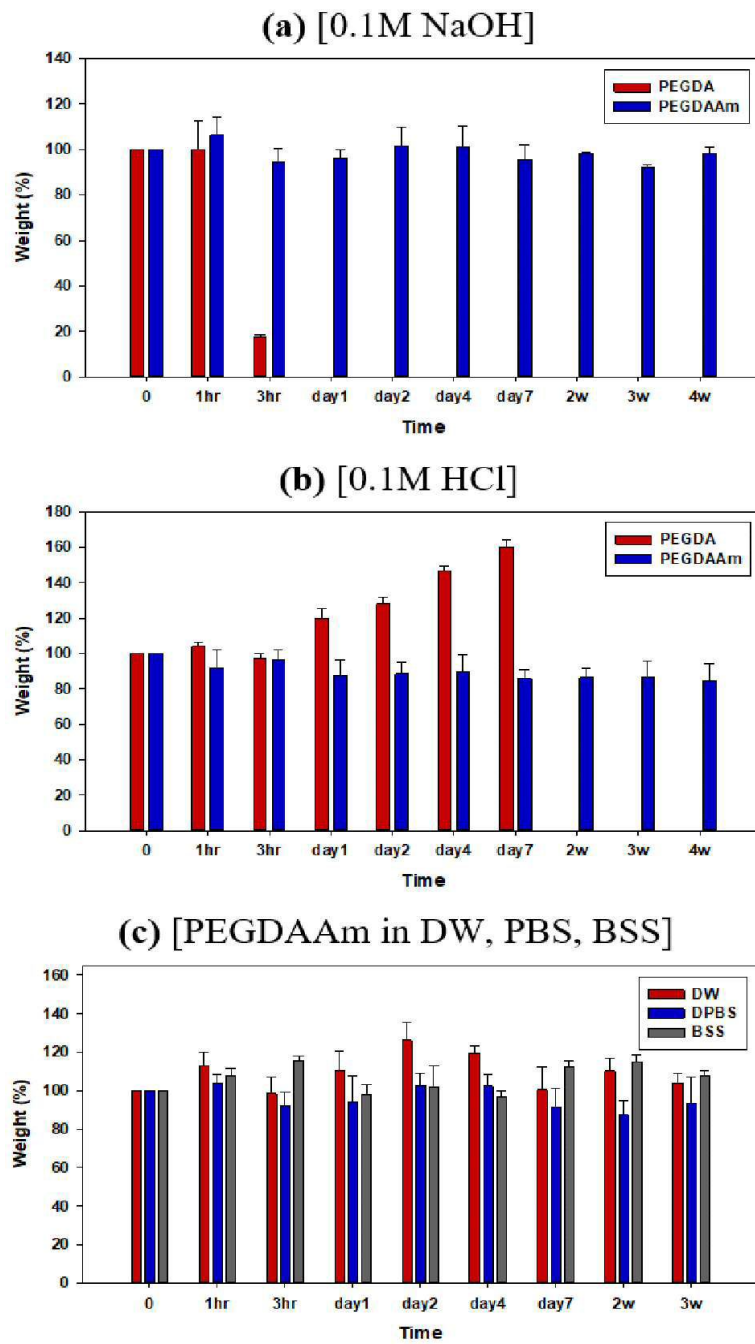
도면3



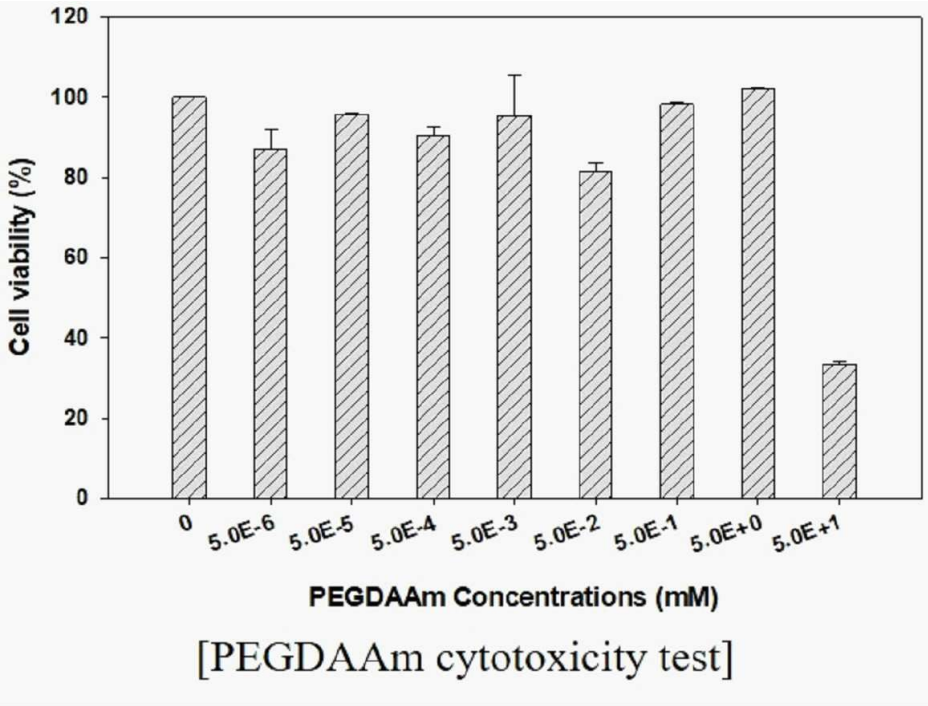
도면4



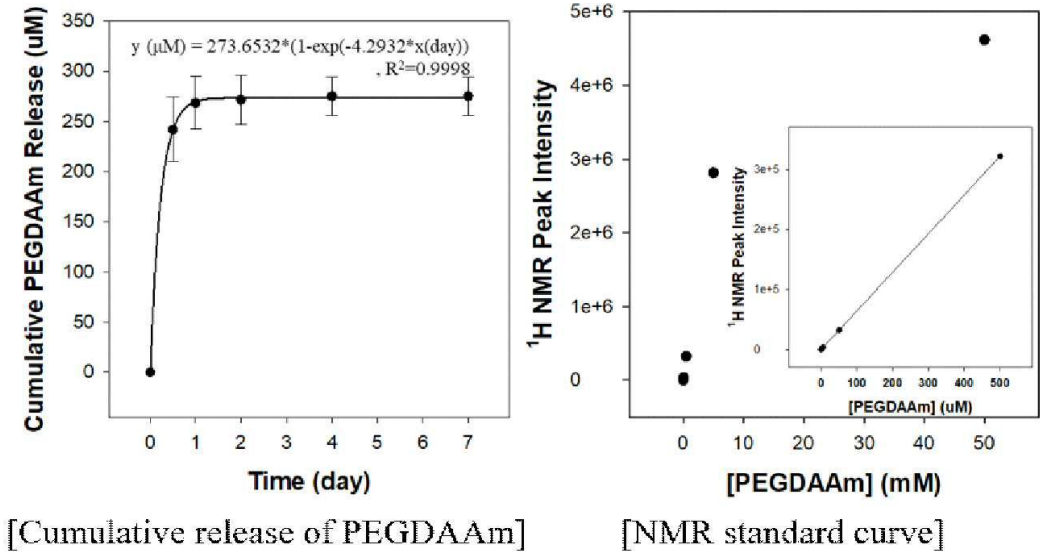
도면5



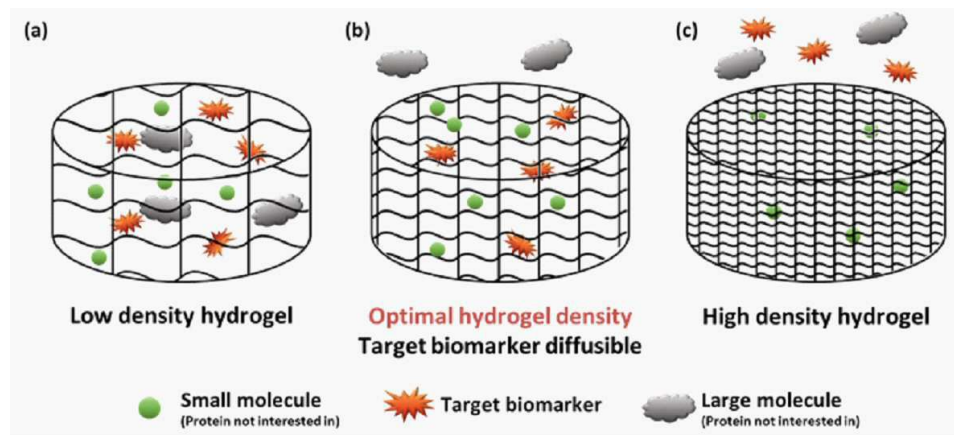
도면6



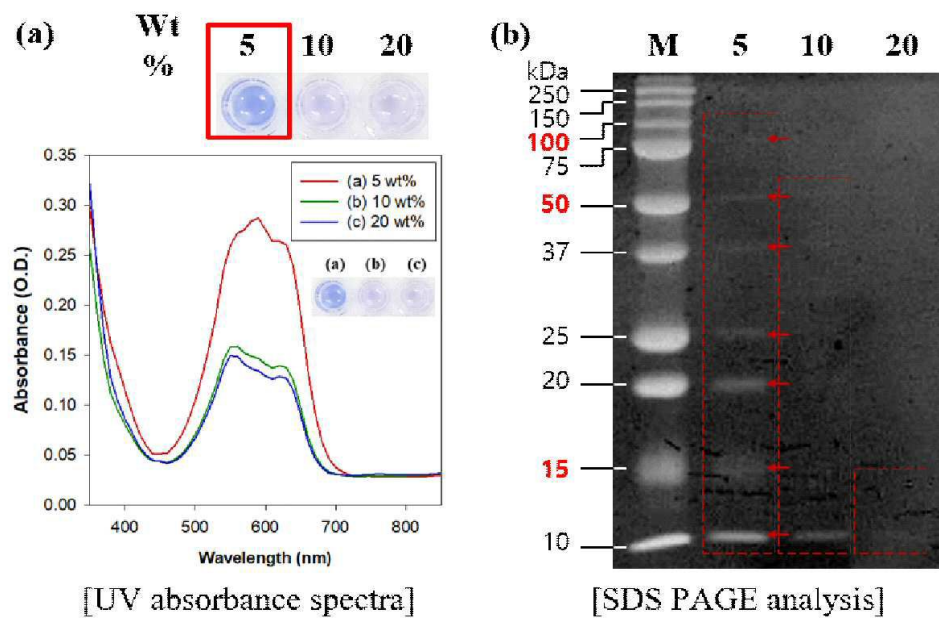
도면7



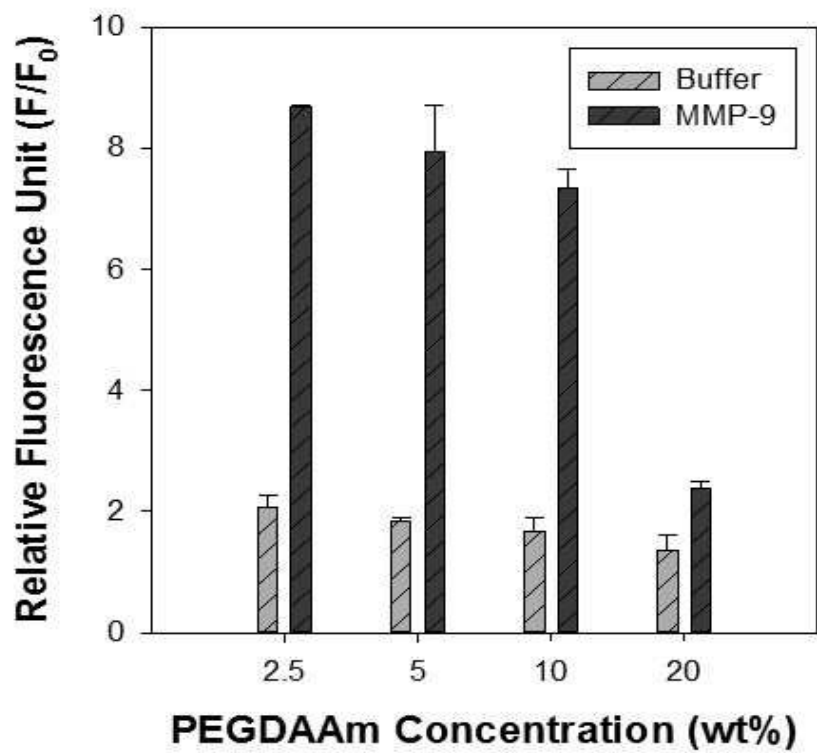
도면8



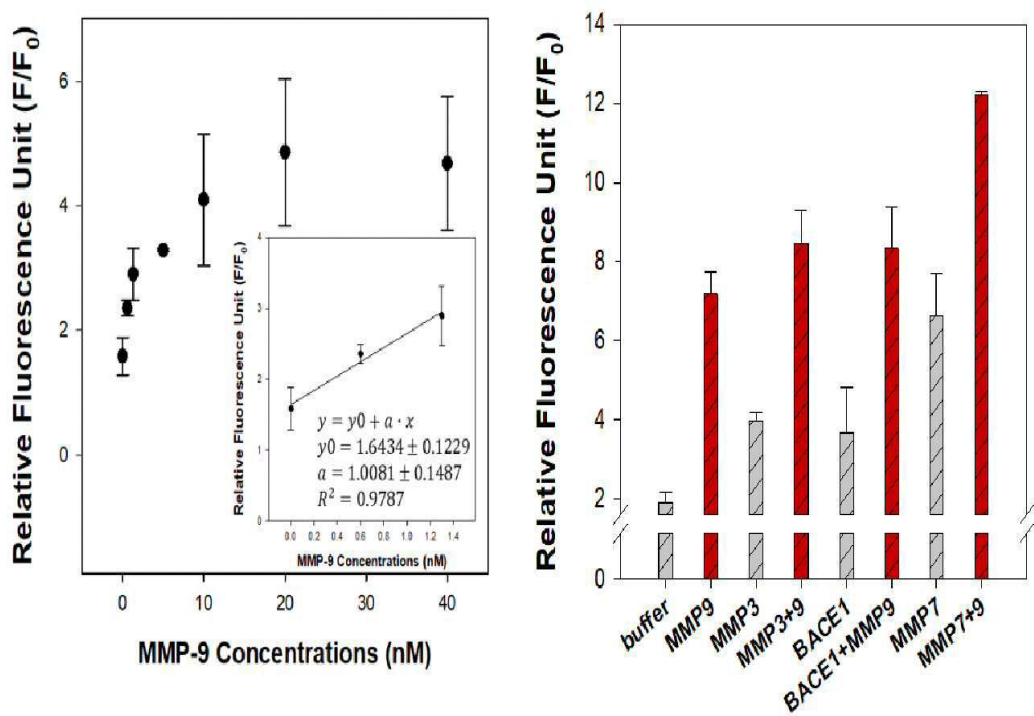
도면9



도면10



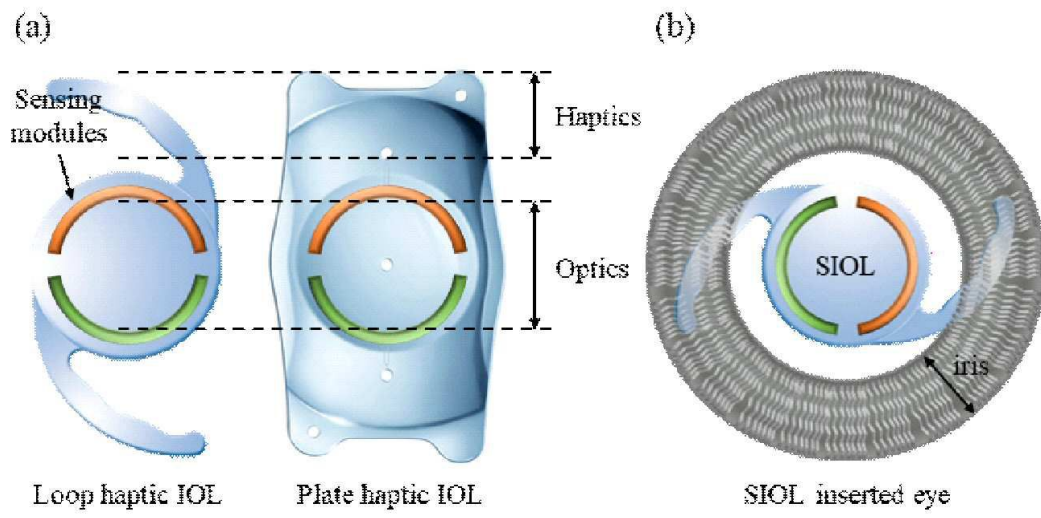
도면11



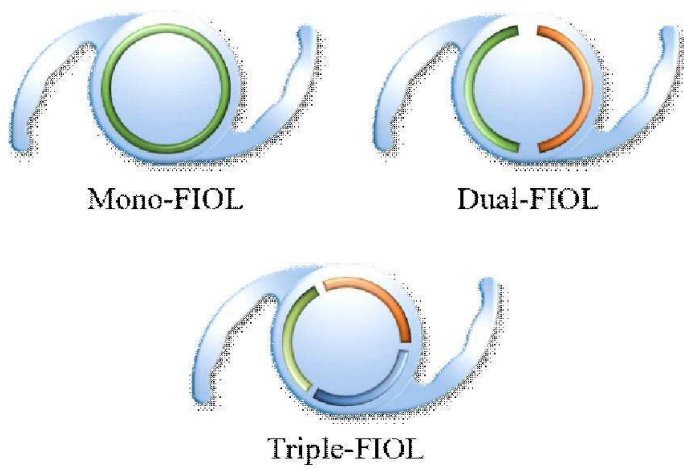
[Limit of detection of the probe with MMP-9]

[Investigation of selectivity of the probe]

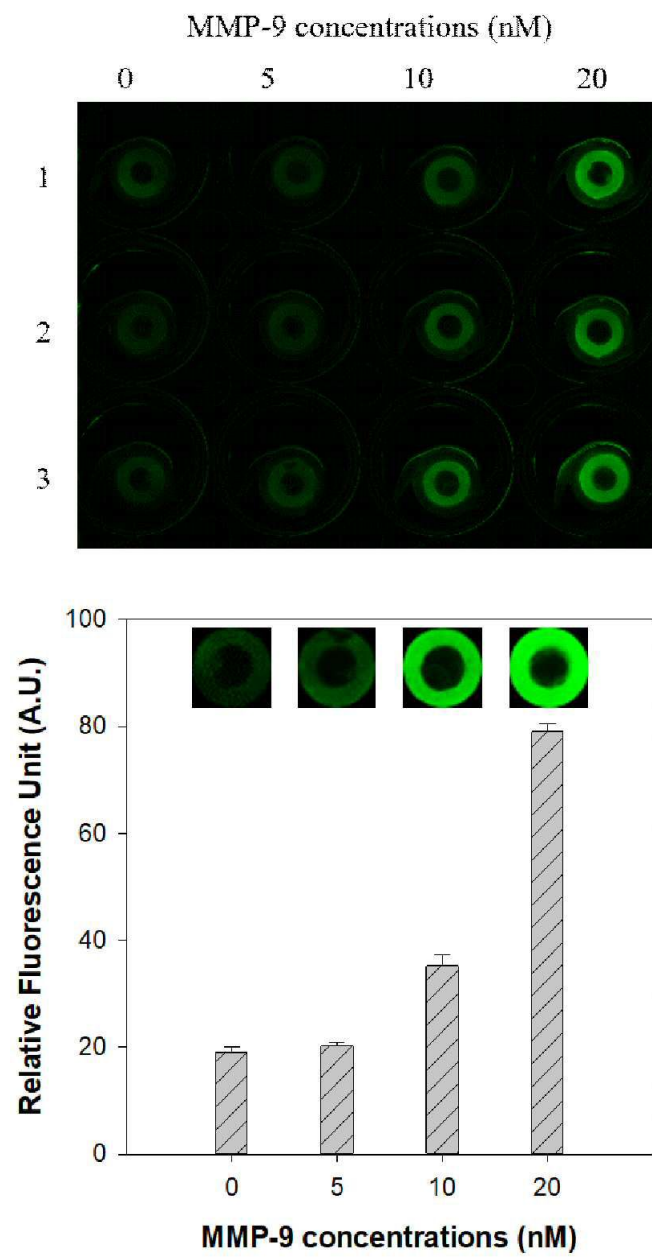
도면12



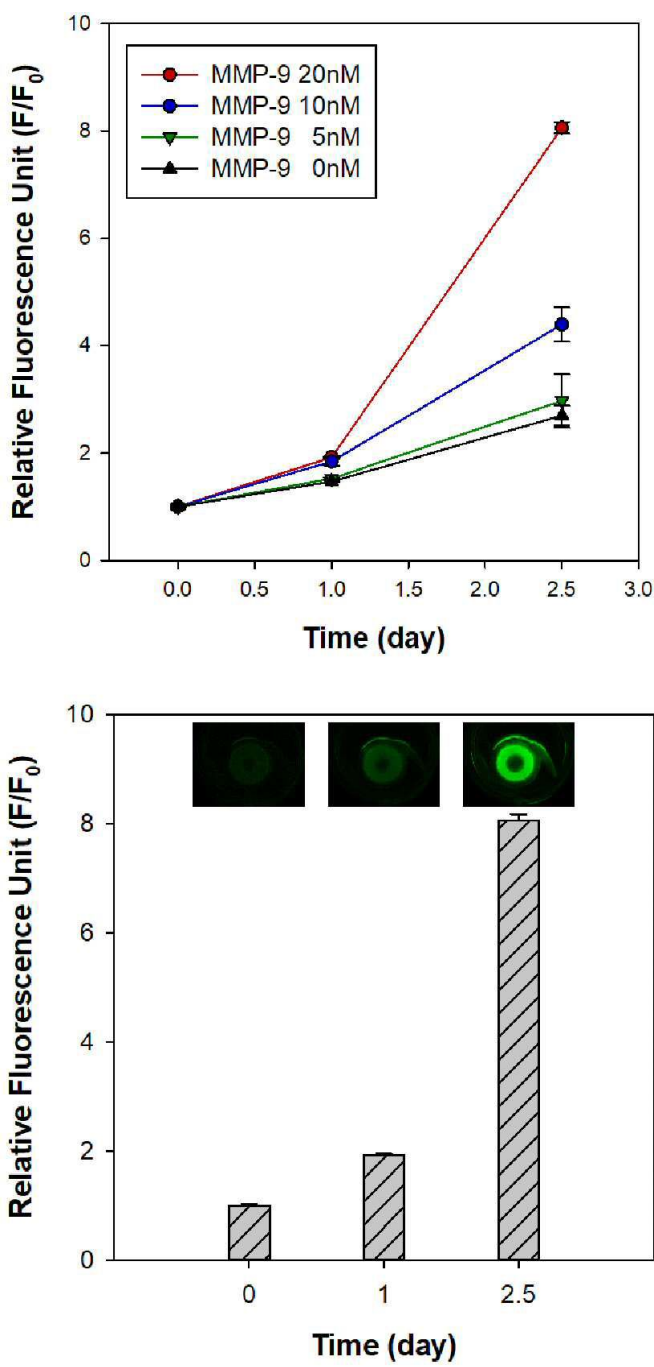
도면13



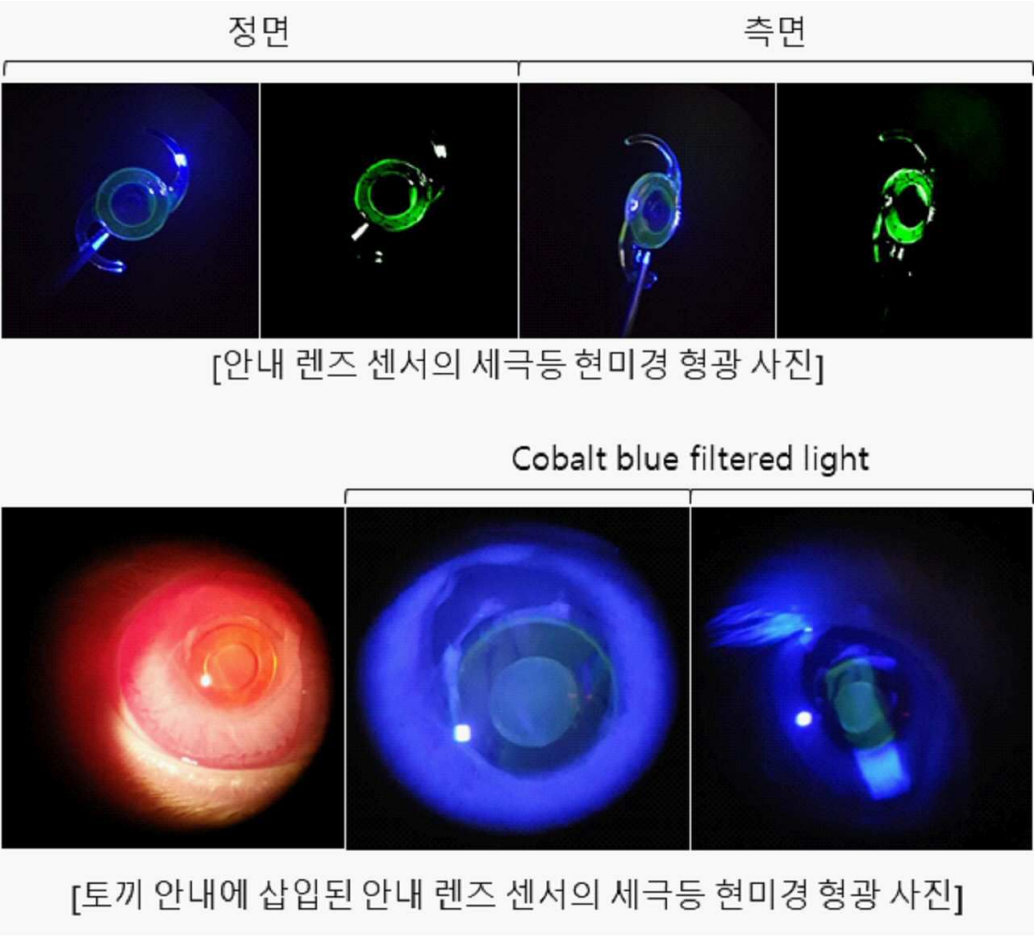
도면14



도면15



도면16



서 열 목 록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Composition for diagnosing inflammatory diseases and intra ocular lens sensor comprising the same
- <130> P18U16C1795
- <160> 5
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> MMP-specific peptide probe
- <400> 1
- Gly Pro Leu Pro Leu Arg Ser Trp Gly Leu Lys
- 1 5 10
- <210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-specific peptide probe

<400> 2

Pro Leu Gly Leu Ala Arg

1 5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-specific peptide probe

<400> 3

Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly Gly Lys

1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-specific peptide probe

<400> 4

Trp Tyr Pro Ala Gly Leu Arg Met Val Lys

1 5 10

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-specific peptide probe

<400> 5

Gly Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln Leu Lys

1 5 10