



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0084432
(43) 공개일자 2008년09월19일

(51) Int. Cl.

C12N 11/08 (2006.01) *C12N 11/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0026148

(22) 출원일자 2007년03월16일

심사청구일자 2007년03월16일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

(72) 발명자

박진원

서울 양천구 신정동 314 목동신시가지아파트
104-702

고원건

서울 관악구 봉천동 1703 동아아파트 105-502

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

백남훈, 이학수, 김영우

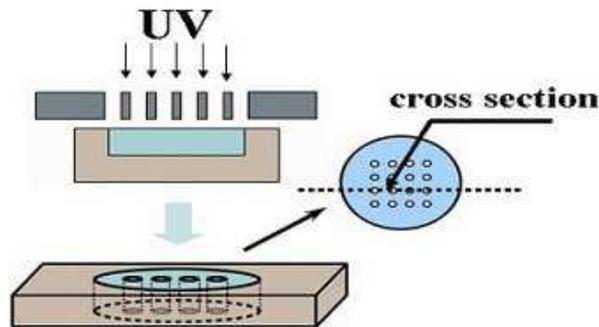
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 포토리소그래피를 이용한 다공성 생체적합 고분자 하이드로겔과 이를 이용한 효소반응기

(57) 요약

본 발명은 포토리소그래피를 이용한 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔과 이를 이용한 효소반응기에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 양 말단에 광반응성을 갖는 비닐기가 도입된 생체적합 고분자를 패터닝된 포토마스크를 이용한 자외선 노광방법으로 일정 간격의 세공이 하이드로 겔을 관통하는 원기둥 형상을 유지하는 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔과, 상기 생체적합 고분자와 효소를 동시에 사용하여 상기 효소가 하이드로 겔에 물리·화학적으로 고정화되어 종래에 비해 효소의 고정화력이 우수한 효소반응기에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

최동길

경기 의왕시 내손동 791번지 내손주공아파트
104-703

이우진

충남 서산시 고북면 기포리 410번지

이열

서울 구로구 개봉3동 359-7

김대년

서울 강남구 일원본동 샘터마을아파트 105-803

특허청구의 범위

청구항 1

일정 간격으로 세공이 패터닝된 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔로서,

상기 생체적합 고분자는 양 말단에 비닐기가 도입되어 있고,

상기 세공은 하이드로 겔을 관통하는 원기둥의 형상을 유지하는 것을 특징으로 하는 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 하이드로 겔은 비표면적이 100 ~ 2000 mm² 범위이고, 두께가 1 ~ 2000 μm 범위인 것을 특징으로 하는 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 비닐기는 아크릴기, 스티렌기, 및 에폭시기 중에서 선택된 것을 특징으로 하는 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔.

청구항 4

생체적합 고분자 10 ~ 90 중량%, 비닐기 유도체 10 ~ 90 중량%, 광개시제 0.1 ~ 2 중량% 및 링커제 0.1 ~ 2 중량%를 혼합하여 주형에 주입한 후,

포토마스크를 통하여 자외선에 1 ~ 60 초 동안, 0.01 ~ 10 WATT 범위로 노광시켜 일정 간격으로 간격으로 원기둥 형상의 세공을 갖는 하이드로 겔을 제조하는 것을 특징으로 하는 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔의 제조방법.

청구항 5

청구항 1 내지 3 중에서 선택된 어느 한 항의 방법으로 제조된 하이드로 겔을 지지체로 사용하여 효소가 물리·화학적으로 고정화된 효소반응기.

청구항 6

생체적합 고분자 10 ~ 90 중량%, 비닐기 유도체 10 ~ 90 중량%, 광개시제 0.1 ~ 2 중량%, 효소 1 ~ 10 중량% 및 링커제 0.1 ~ 2 중량%를 혼합하여 주형에 주입한 후,

포토마스크를 통하여 자외선에 1 ~ 60 초 동안, 0.01 ~ 10 WATT 범위로 노광시켜 일정 간격으로 원기둥 형상의 세공을 갖는 하이드로 겔에 효소가 물리·화학적으로 결합되어 이루어진 것을 특징으로 하는 효소반응기의 제조방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<10> 본 발명은 포토리소그래피를 이용한 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔과 이를 이용한 효소반응기에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 양 말단에 광반응성을 갖는 비닐기가 도입된 생체적합 고분자를 패터닝된 포토마스크를 이용한 자외선 노광방법으로 일정 간격의 세공이 하이드로 겔을 관통하는 원기둥 형상을 유지하는 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔과, 상기 생체적합 고분자와 효소를 동시에 사용하여 상기 효소가 하이드로 겔에 물리·화학적으로 고정화되어 종래에 비해 효소의 고정화력이 우수한 효소반응기에 관한 것이다.

<11> 효소는 생물학적으로 중요한 반응에 촉매로 작용하는 단백질, 당단백질 및 RNA 분자이다. 효소는 작용 특이성, 기질 특이성, 입체 특이성, 광학적 특이성, 기하학적 특이성, 군 특이성 등 다양한 특이성을 갖고 있는 생

촉매이다. 특히, 효소에서 단백질의 3차 구조는 효소의 특이적 작용에 결정적인 영향을 준다.

- <12> 실제 효소반응을 상업화하는데 있어서 이러한 단백질의 3차 구조가 문제가 되는데, 즉 그 고유의 구조가 잘 유지될 수 있도록 적절한 환경이 구성되어 있지 않으면, 효소는 활성을 잃어버리게 된다. 하이드로 겔(hydrogel)은 이러한 효소의 활성을 적절한 수준으로 유지시키는데 큰 도움을 주는 물질이다.
- <13> 일반적으로 효소를 고정하는 방법으로는 크게 지지체의 외부에 고정하는 표면 고정 방법(adsorption, covalent linkage)과, 내부에 가두는 방법(entrainment, encapsulation)으로 나누어진다. 이러한 방법들은 각각의 장 단점을 갖고 있는데, 효소를 표면에 고정하는 방법은 효소가 기질에 노출되어 있어 반응속도가 빠른 반면에 효소의 구조적 변화가 일어나기 쉽다는 단점을 갖고 있으며, 내부에 가두는 방법은 반응속도가 느린 반면, 효소의 안정성을 도모할 수 있다는 장점을 갖고 있다.
- <14> 한편, 하이드로 겔(hydrogel)은 높은 수분을 유지할 수 있는 특성을 갖고 있기 때문에 기질의 확산이 다른 물질에 비해 상대적으로 유리하다는 특징을 갖고 있다. 더욱이 다공성 하이드로 겔(hydrogel)을 제조하게 되면 확산 속도가 한층 더 빨라지게 되는데, 일반적으로 이러한 다공성 하이드로 겔(porous hydrogel)을 제조하기 위한 방법으로 포로젠(porogen)을 이용하여 기공(pore)을 형성하는 방법이 널리 활용되고 있다.
- <15> 이는 포로젠(porogen)과 전구용액(precursor solution)을 혼합하여 하이드로 겔(hydrogel)을 제조한 후 포로젠(porogen)을 물리, 화학적으로 제거하여 기공을 만드는 2단계 반응으로 구성된다.
- <16> 이미 1999년 일본 kansai 대학의 Takashi Miyata와 2인이 항원(antigen)과 항체(antibody)를 하이드로 겔(hydrogel) 안에 고정화하여 생물의학응용 기술을 선보인 바 있으며[nature vol 399 : 766 ~ 769, 1999], 같은 해 Texas A&M 대학의 Micheal V. Pishko 그룹에서 텍스트란(dextran)과 organophosphorus hydrolase(OPH) 효소를 하이드로 겔(hydrogel) 안에 화학적으로 고정하여 형광을 이용한 바이오센서로의 응용 가능성을 보여주기도 했다.
- <17> 다공성 하이드로 겔(porous hydrogel)의 발명은 2003년 1월 Petra Eiselt 외 5인이 전구용액(precursor solution) 안에 기체를 주입해 거품을 만들고, 겔을 합성한 후 기체를 제거하여 기공을 만든 예가 있다[미국 특허 제 6,511,650호 B1]. 또한, 같은 해 3월 Petra Kuzma와 Harry Quandt가 다공성 하이드로 겔(porous hydrogel)을 약물전달 시스템에 활용하기도 했다[미국 특허 제 6,361,797호 B1].
- <18> 폴리에틸렌글리콜(PEG) 하이드로 겔(hydrogel)은 미국식품의약국으로부터 인체 내 도입이 가능한 물질로 승인 받은 바 있어, 체내에 삽입할 수 있는 생물반응기(bioreactor)로 활용이 가능하며, 합성 조건을 변화시킴으로써 손쉽게 물성을 조절할 수 있다는 장점을 갖고 있다.
- <19> 상기에서 살펴본 바와 같이 공지된 하이드로 겔은 두 단계의 공정을 수행해야만 목적으로 하는 구조의 하이드로 겔을 제조할 수 있으며, 더욱이 세공의 구조가 하이드로 겔 막 전체를 관통하지 못할 뿐만 아니라 그 분포가 불규칙하여 유효 비표면적이 한정적이라 그 사용이 제한적이었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <20> 이에 본 발명자들은 상기와 같이 종래의 하이드로 겔의 불규칙한 세공 구조와 제조 공정상의 문제를 개선하기 위하여 연구 노력하였다. 그 결과, 양 말단에 광반응성을 갖는 비닐기가 도입된 생체적합 고분자를 패터닝된 포토마스크를 이용하여 자외선 노광시키면, 상기 포토마스크에 의해 일정간격을 가진 세공이 형성되며, 또한 상기 세공이 하이드로 겔을 관통하는 원기둥의 형상을 유지한다는 것을 알게 되어 본 발명을 완성하게 되었다.
- <21> 또한, 본 발명은 상기 양 말단에 광반응성을 갖는 비닐기가 도입된 생체적합 고분자와 효소를 동시에 혼합한 후, 이를 패터닝된 포토마스크를 이용하여 자외선 노광시키면, 포토마스크에 의해 일정간격을 가진 세공이 하이드로 겔을 관통하는 원기둥의 형상을 유지하게 되면서 상기 효소가 하이드로 겔에 물리·화학적으로 고정화되어 종래에 비해 효소의 고정화력이 우수하다는 것을 알게 되어 본 발명을 완성하게 되었다.
- <22> 따라서, 본 발명은 포토리소그래피를 이용하여 일정간격을 가진 세공이 하이드로 겔을 관통하는 원기둥의 형상을 유지하는 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔과, 상기 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔에 효소가 물리·화학적으로 고정화된 효소반응기를 제공하는 데 그 목적이 있다.

발명의 구성 및 작용

- <23> 본 발명은 일정 간격으로 세공이 패터닝된 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔로서, 상기 생체적합 고분자는

양 말단에 비닐기가 도입되어 있고, 상기 세공은 하이드로 겔을 관통하는 원기둥의 형상을 유지하는 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔에 그 특징이 있다.

- <24> 또한, 본 발명은 생체적합 고분자 10 ~ 90 중량%, 비닐기 유도체 10 ~ 90 중량%, 광개시제 0.1 ~ 2 중량% 및 링커제 0.1 ~ 2 중량%를 혼합하여 주형에 주입한 후, 포토마스크를 통하여 자외선에 1 ~ 60 초 동안, 0.01 ~ 10 WATT 범위로 노광시켜 규칙적인 간격으로 원기둥 형상의 세공을 갖는 하이드로 겔을 제조하는 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔을 제조하는 방법에 또 다른 특징이 있다.
- <25> 이하, 본 발명을 상세하게 설명하면 다음과 같다.
- <26> 본 발명은 양 말단에 광반응성을 갖는 비닐기가 도입된 생체적합 고분자를 특정하게 패터닝된 포토마스크를 이용하여 자외선 노광시키면, 상기 포토마스크에 의해 일정간격을 가진 세공이 형성되며, 또한 상기 세공이 하이드로 겔을 관통하는 원기둥의 형상을 유지하는 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔에 관한 것이다.
- <27> 즉, 본 발명은 세공이 하이드로 겔을 관통하고 있어 유효 비표면적이 현격히 향상되고 세공의 형상 및 분포 조절 등의 제한요소들을 개선했으며, 또한 종래 2단계 공정, 구체적으로 하이드로 겔 제조 및 포로젠(porogen) 제거의 공정을 자외선 노광의 1단계 공정으로 수행하여 공정을 단축화 하였다.
- <28> 본 발명에 따른 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔을 제조하는 방법을 보다 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- <29> 먼저, 생체적합 고분자 10 ~ 90 중량%, 비닐기 유도체 10 ~ 90 중량%, 광개시제 0.1 ~ 2 중량% 및 링커제 0.1 ~ 2 중량%를 혼합하여 전구용액을 제조한다.
- <30> 상기 생체적합 고분자는 당 분야에서 일반적으로 사용되는 것으로 특별히 한정하지는 않으나, 폴리아크릴산, 폴리하이드록시에틸메타아크릴레이트, 폴리우레탄 및 폴리글리콜계 등을 사용할 수 있으며, 바람직하기로는 수분 함량이 매우 높고 생체 적합성이 뛰어나 생체 내에서 면역작용을 배제할 수 있는 폴리에틸렌글리콜을 사용하는 것이 좋다. 이러한 폴리에틸렌글리콜은 상기와 같은 본연의 특성과 함께, 일정 간격의 세공이 하이드로 겔을 관통하는 형상을 유지하는 하이드로 겔인 경우 효소반응의 속도조절이 자유로워 보다 바람직하다. 이때, 상기 폴리에틸렌글리콜은 분자량이 500 ~ 20,000 범위인 것을 사용하는 바, 상기 사용량이 500 미만이면 조밀한 네트워크 구조로 인해 확산이 제한 20,000 범위를 초과하는 경우에는 네트워크 구조가 견고하지 못하여 기계적 강도가 감소하는 문제가 있으므로 상기 범위를 유지하는 것이 좋다.
- <31> 이러한 생체적합 고분자는 10 ~ 90 중량%, 바람직하기로는 10 ~ 50 중량% 사용하는 바, 사용량이 10 중량% 미만이면 상기한 것과 마찬가지로 기계적 강도가 감소하고 90 중량%를 초과하는 경우에는 기질의 확산이 제한되는 문제가 발생하므로 상기 범위를 유지하는 것이 좋다.
- <32> 상기 비닐기 유도체는 당 분야에서 일반적으로 사용되는 것으로 광에 의해 화학적 활성이 우수한 것을 사용할 수 있는 바, 구체적으로 아크릴기, 스티렌기, 및 에폭시기 등을 사용할 수 있다. 본 발명은 아크릴기 유도체를 사용하는 바, 이는 개질이 용이한 면에서 보다 유리하다. 이러한 아크릴기 유도체는 구체적으로 폴리아크릴아마이드, 폴리아크릴산 및 폴리하이드록시에틸메타아크릴레이트 등을 사용할 수 있다.
- <33> 이러한 비닐기 유도체는 10 ~ 90 중량%, 바람직하기로는 1 ~ 50 중량% 사용하는 바, 사용량이 10 중량% 미만이면 고분자 네트워크의 구조가 불완전하고 90 중량%를 초과하는 경우에는 생체물질의 활성에 악영향을 미치는 미반응 단량체의 문제가 발생하므로 상기 범위를 유지하는 것이 좋다.
- <34> 광개시제 또한 당 분야에서 일반적으로 사용되는 것으로 특별히 한정하지는 않으나, 구체적으로 2,2-디메톡시-2-페닐-아세토페논, 2-하이드록시-2-메틸 프로피오페논 등을 사용할 수 있다.
- <35> 이러한 광개시제는 0.1 ~ 2 중량% 사용하는 바, 사용량이 0.1 중량% 미만이면 반응 진행속도가 현저히 낮고 2 중량%를 초과하는 경우에는 생체물질에 독성을 갖고 있는 미반응 단량체가 남는 문제가 발생하므로 상기 범위를 유지하는 것이 좋다.
- <36> 링커제는 단백질의 리신기와 NHS기 간의 아마이드 결합을 유도하기 위하여 당 분야에서 일반적으로 적용되는 것으로, 구체적으로 아크릴로일(폴리에틸렌글리콜)₁₁₀ N-하이드록시 숙신아마이드 에스테르(Acryl-PEG-NHS), 아지드-활성-에스테르(azide-active-ester) 및 Acryl-PEG-COOH 등을 사용할 수 있다.
- <37> 이러한 링커제는 0.1 ~ 2 중량% 사용하는 바, 사용량이 0.1 중량% 미만이면 충분한 아마이드 결합을 유도할 수 없고, 2 중량%를 초과하는 경우에는 하이드로겔의 물성에 문제가 발생할 수 있으므로 상기 범위를 유지하는 것

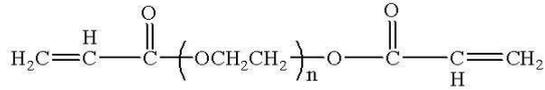
이 좋다.

- <38> 상기 성분은 동시에 혼합하여 사용하기도 하고, 생체적합 고분자와 비닐기 유도체를 화학반응하여 생체적합 고분자의 양 말단에 비닐기를 도입한 고분자를 사용할 수 있다.
- <39> 다음으로, 상기 혼합물을 주형에 주입한 후, 포토마스크를 통하여 자외선에 노광시켜 규칙적인 간격으로 원기둥 형상의 세공을 갖는 하이드로 겔을 제조한다. 구체적으로, 양 말단에 비닐기를 도입한 생체적합 고분자에 자외선(UV) 조사시 광개시제로 부터 생성된 라디칼에 의해 비닐기의 탄소이중결합이 끊어지며 교차결합이 생성된다.
- <40> 상기 주형 및 세공간격이 조절된 포토마스크는 제조되는 목적으로 하는 하이드로 겔에 따라 조절이 가능하므로 별다른 제약을 받지 않는다.
- <41> 상기 자외선은 1 ~ 60 초 동안, 0.01 ~ 10 WATT 범위로 노광시키는 바, 상기 광의 세기가 0.01 WATT 미만이면 중합도가 감소하고 10 WATT을 초과하는 경우에는 고분자에 과한 에너지가 전달되어 구조적 문제가 발생할 위험이 있으며, 상기 시간이 1초 미만이면 반응에 참여할 충분한 라디칼이 형성되지 못하고, 60 초를 초과하는 경우에는 마찬가지로 과에너지 문제가 발생하므로 상기한 범위를 유지하는 것이 바람직하다.
- <42> 상기에서 제조된 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔은 세공이 상기 하이드로 겔을 관통하는 원기둥의 형상을 유지하고, 상기 원기둥의 지름이 20 ~ 100 μm 범위를 유지하고, 두께가 1 ~ 2000 μm 범위이며, 비표면적이 200 ~ 2000 mm^2 범위를 유지한다.
- <43> 한편, 본 발명은 상기에서 제조된 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔을 지지체로 사용하여 효소가 물리·화학적으로 고정화된 효소반응기에 그 특징이 있다.
- <44> 또한, 본 발명은 생체적합 고분자 10 ~ 90 중량%, 비닐기 유도체 10 ~ 90 중량%, 광개시제 0.1 ~ 2 중량%, 효소 1 ~ 10 중량% 및 링커제 0.1 ~ 2 중량%를 혼합하여 주형에 주입한 후, 포토마스크를 통하여 자외선에 1 ~ 60 초 동안, 0.01 ~ 10 WATT 범위로 노광시켜 일정 간격으로 원기둥 형상의 세공을 갖는 하이드로 겔에 효소가 물리·화학적으로 결합되어 이루어진 효소반응기를 제조하는 방법에 또 다른 특징이 있다.
- <45> 본 발명은 양 말단에 광반응성을 갖는 비닐기가 도입된 생체적합 고분자와 효소를 동시에 혼합한 후, 이를 패터닝된 포토마스크를 이용하여 자외선 노광시키면, 포토마스크에 의해 일정 간격으로 세공이 형성된 하이드로 겔을 관통하는 원기둥의 형상을 유지하게 되면서 상기 효소가 하이드로 겔에 물리·화학적으로 고정화되어 종래에 비해 효소의 고정화력이 우수한 효소 반응기에 관한 것이다.
- <46> 본 발명에 따른 효소 반응기를 제조하는 방법을 보다 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- <47> 상기 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔 제조와 동일하게 수행하되, 전구 용액의 제조 시에 효소를 추가하여 사용한다.
- <48> 일반적으로 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔을 이용한 효소 반응기는 지지체에 효소를 담지시키는 방법으로 수행되는 바, 본 발명은 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔의 제조와 동시에 효소가 상기 하이드로 겔에 고정화되게 된다.
- <49> 효소의 활성은 하이드로 겔 내부에 고정화 정도에 따라 달라지므로 상기 고정화도가 효소 활성의 중요한 변수로 작용한다. 본 발명은 효소의 아민기가 링커체인 아크릴로일(폴리에틸렌글리콜)₁₁₀ N-하이드록시 숙신아마이드 에스테르(Acryl-PEG-NHS)의 NHS기와 공유결합을 형성하고, 아크릴기는 생체적합 고분자의 백본(Backbone)과 공유결합하여 하이드로 겔 내부에 고정하게 되는 물리·화학적 고정화가 수행되므로 종래 단순히 담지시키는 물리적 고정화보다 견고한 결합구조를 형성하게 된다.
- <50> 이때 효소는 당 분야에서 일반적으로 사용되는 모든 것이 사용될 수 있는 바, 특히 가수분해 반응을 위한 효소에서 유리하게 작용될 수 있다. 이러한 효소는 1 ~ 10 중량% 범위로 사용되며, 사용량이 1 중량% 미만으로 미미하면 효소의 활성을 기대하기 어렵고, 목적으로 하는 생성물의 생산량이 부족하며, 10 중량%를 초과하는 경우에는 공유결합하지 못한 초과 효소의 과다 문제가 발생하므로 상기 범위를 유지하는 것이 좋다.
- <51> 이하 본 발명을 다음 실시예에 의거하여 더욱 상세하게 설명하겠는 바, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.
- <52>

<53> 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔

<54> 실시예 1 : 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔

<55> 분자량이 3400인 폴리에틸렌글리콜 10 g과 아크릴로일클로라이드 4 mL를 질소노출 상태에서 테트라하이드로퓨란 100 mL에 섞어 60 °C로 가열하는 방법으로 합성하여 다음 화학식으로 표시되는 아크릴기가 양 말단에 도입된 폴리에틸렌글리콜을 제조하고 이를 수용액에 용해시켰다.



<56>

<57> 1 g/ml 농도의 상기 화학식으로 표시되는 폴리에틸렌글리콜(PEG) 수용액 1 mL, 광개시제로 2-하이드록시-2-메틸프로피오페논(97 %) 20 μl 및 아크릴로일(폴리에틸렌글리콜)₁₁₀ N-하이드록시 숙신아마이드 에스테르(Acryl-PEG-NHS) 수용액 100 μl을 혼합하여 전구용액을 제조하였다. 상기에서 제조된 전구용액 100 μl를 취하여 직경 10 mm, 높이 1 mm의 실린더 모양의 실리콘 주형에 넣고, 지름 50 μm, 간격 25, 50 및 100 μm의 원형 배열 패턴(pattern)의 포토마스크(photomask)를 통해 약 1초간 자외선(UV)에 노광시켰다. 이때, 상기 자외선의 세기는 10 WATT 정도를 유지하였다.

<58> 상기와 같은 방법으로 규칙적인 간격으로 원기둥 형상의 세공을 갖는 하이드로 겔을 제조하였다. 상기에서 제조된 하이드로 겔의 형상의 확인은 다음 도 2(a)와 도 2(b)의 전자 주사 현미경으로 확인하였다.

<59> 실시예 2

<60> 상기 실시예 1과 동일하게 실시하되, 상기 폴리에틸렌글리콜 대신에 2-하이드록시에틸 아크릴레이트를 사용하여 규칙적인 간격으로 원기둥 형상의 세공을 갖는 하이드로 겔을 제조하였다.

<61> 실시예 3

<62> 상기 실시예 1과 동일하게 실시하되, 폴리에틸렌글리콜 대신에 폴리(아크릴산)을 사용하여 규칙적인 간격으로 원기둥 형상의 세공을 갖는 하이드로 겔을 제조하였다.

<63> 상기 실시예 2 및 3에서 제조된 하이드로 겔의 형상의 확인은 다음 도 3(2-하이드록시에틸 아크릴레이트) 및 도 4(폴리(아크릴산))의 전자 주사 현미경으로 확인하였다.

<64> 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔을 이용한 효소반응기

<65> 실시예 4 : 효소반응기

<66> 분자량이 3400인 폴리에틸렌글리콜 10 g과 아크릴로일클로라이드 4 ml를 용매 테트라하이드로퓨란(THF)에 혼합하여 60 °C로 가열 반응시켜 아크릴기가 양 말단에 도입된 폴리에틸렌글리콜을 제조하고 이를 수용액에 용해시켰다.

<67> 상기에서 제조된 1 g/ml 농도의 아크릴기가 양 말단에 도입된 폴리에틸렌글리콜(PEG) 수용액 1 ml에, 1 mg/ml 농도의 글루코오스산화효소(glucose oxidase) 수용액 100 μl, 광개시제로 2-하이드록시-2-메틸프로피오페논(97 %) 20 μl 및 1 mg/ml 농도의 아크릴로일(폴리에틸렌글리콜)₁₁₀ N-하이드록시 숙신아마이드 에스테르(Acryl-PEG-NHS) 수용액 100 μl을 혼합하여 전구용액을 제조하였다. 상기에서 제조된 전구용액 100 μl를 취하여 직경 10 mm, 높이 1 mm의 실린더 모양의 실리콘 주형에 넣고, 지름 50 μm, 간격 50 μm의 원형 배열 패턴(pattern)의 포토마스크(photomask)를 통해 약 1초간 자외선(UV)에 노광시켰다. 이때, 상기 자외선의 세기는 10 WATT를 유지하였다.

<68> 상기와 같은 방법으로 규칙적인 간격으로 원기둥 형상의 세공을 갖는 하이드로 겔에 효소가 물리·화학적으로 결합되어 이루어진 효소반응기를 제조하였다.

<69> 다음 도 5는 형광물질이 부착된 효소를 다공성 하이드로 겔 내부에 물리·화학적으로 결합한 후 형광현미경으로 사진을 나타낸 것이다.

<70> 비교예 1

<71> 상기 실시예 4와 동일하게 실시하되, 아크릴로일(폴리에틸렌글리콜)₁₁₀ N-하이드록시 숙신아마이드 에스테르

(Acryl-PEG-NHS) 수용액을 배제하고 반응을 수행하여 효소반응기를 제조하였다.

<72> 상기 실시예 4와 비교예 1의 효소반응기에 고정화된 효소의 양을 측정하여 다음 표 1에 나타내었다.

표 1

구 분	반응에 참여한 총 효소량	반응 후 고정된 효소량
acryl-PEG-NHS	1 mg/5.0 cm ²	0.59 mg/5.0 cm ²
링커 사용하지 않음	1 mg/5.0 cm ²	0.09 mg/5.0 cm ²

<74> 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따라 링커제(acryl-PEG-NHS)를 사용한 실시예 의 하이드로 겔이, 사용하지 않은 비교예 1의 하이드로 겔에 비해 고정된 효소의 양이 월등히 많다는 것을 확인할 수 있었다. 이는 링커제에 의해 효소가 하이드로 겔에 물리·화학적으로 결합되어 있음을 보여주는 결과라 할 수 있다.

<75> 실시예 5 ~ 8 : 세공 분포에 따른 영향

<76> 실시예 4와 동일하게 실시하되, 다음 표 2에 나타난 바와 같이 세공의 지름을 50 μm로 고정된 후 생체적합 고분자의 세공 간 간격을 달리하여 효소반응을 수행하였다.

표 2

구 분	생체적합 고분자의 종류	제조된 하이드로 겔 두께	세공 간격	비표면적
실시예 5	폴리에틸렌글리콜 (분자량 : 3,400)	1 mm	-	188.50 mm ²
실시예 6	폴리에틸렌글리콜 (분자량 : 3,400)	1 mm	25 μm	334.12 mm ²
실시예 7	폴리에틸렌글리콜 (분자량 : 3,400)	1 mm	50 μm	539.96 mm ²
실시예 8	폴리에틸렌글리콜 (분자량 : 3,400)	1 mm	100 μm	844.59 mm ²

<78> 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 생체 적합 고분자의 세공의 분포를 다르게 함에 따라 비표면적이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

<79> 또한, 도 6은 본 발명에 따라 실시예 5 ~ 8에서 제조된 생체적합 고분자 하이드로 겔의 반응시간 20분 후 기공 분포에 따른 반응 생성물의 상대적 UV 흡광도를 나타내는 것으로, 세공의 분포가 조밀함에 따라 효소반응이 활발히 진행되었음을 확인할 수 있다.

<80> 실시예 9 ~ 11 : 세공 분포에 따른 영향

<81> 실시예 4와 동일하게 실시하되, 다음 표 3에 나타난 바와 같이 세공의 지름과 세공 간 간격을 각 50 μm로 고정된 후 생체적합 고분자의 분자량을 달리하여 효소반응을 수행하였다.

표 3

구 분	생체적합 고분자의 종류	제조된 하이드로 겔 두께	세공 간격	비표면적
실시예 9	폴리에틸렌글리콜 (분자량 : 3,400)	1 mm	50 μm	539.96 mm ²
실시예 10	폴리에틸렌글리콜 (분자량 : 8,000)	1 mm	50 μm	539.96 mm ²
실시예 11	폴리에틸렌글리콜 (분자량 : 20,000)	1 mm	50 μm	539.96 mm ²

<83> 상기 표 3의 조건으로 효소반응을 수행한 결과, 다음 도 7에 나타난 바와 같이 생체 적합 고분자의 분자량이 커

짐에 따라 반응속도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

<84> **실시예 12 ~ 13 : 효소의 조건에 따른 영향**

<85> 상기 실시예 4와 동일하게 실시하되, 표 4와 같이 효소의 종류, 사용량, 기질의 종류 및 농도 등을 달리하여 광 반응을 수행하였다.

표 4

구분	효소의 종류	효소 사용량 μl(1mg/mL)	기질	기질 농도 (mM)
실시예 12	알칼리포스파타아제 (Alkaline phosphatase)	50	p-니트로페닐포스파테 (p-nitrophenylphosphate)	0.1 ~ 1.6
실시예 13	우레아제(urease)	50	우레아(urea)	0.1 ~ 0.6

<87> 도 8에 나타난 바와 같이 다양한 효소가 기질의 농도에 비례하여 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

<88> **비교예 2**

<89> 세공이 없는 폴리에틸렌글리콜 하이드로 겔에 글루코오스산화효소(glucose oxidase) 10 μl가 함유된 효소반응기.

<90> 도 9는 본 발명에 따라 실시예 4에서 제조된 세공의 지름과 간격이 각 50 μm인 생체적합 고분자 하이드로 겔의 효소반응기와 비교예 2에서 제조된 세공이 없는 효소반응기의 반응시간에 따른 생성물의 흡광도를 나타내는 것으로, 세공으로 인해 효소의 활성이 증가한다는 것을 확인할 수 있었다.

발명의 효과

<91> 본 발명에 따른 효소 반응기는 체내의 면역 시스템으로부터 인식되지 않는 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 구조체로 활용함으로써 질병 치료 및 기타 효소기질 반응을 목적으로 하는 효소의 인체 내 도입을 가능하게 하는 한편, 고분자 구조체를 다공성화 함으로써 효소의 반응속도를 획기적으로 빠르게 하는 이점이 있으며, 생체적합고분자 특히 폴리에틸렌글리콜(PEG)의 분자량을 조절함으로써 손쉽게 네트워크 구조의 격자크기(mesh size)를 변화시켜, 반응속도와 물성 조절이 가능하다.

<92> 뿐만 아니라 종래 포로젠(porogen)을 이용한 다공성(porous) 하이드로 겔(hydrogel) 제조에 소요되는 2단계 반응을 간소화하여 손쉽게 한차례 노광으로써 다공성(porous) 하이드로 겔(hydrogel)을 제조가 가능하여 공정상의 간편성 확보가 가능하다.

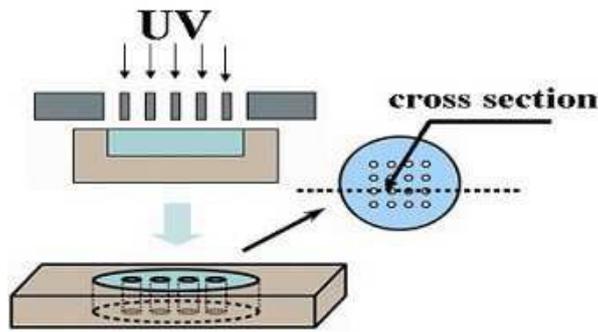
도면의 간단한 설명

- <1> 도 1은 본 발명에 따른 생체적합 고분자 하이드로 겔의 제조공정의 개략도를 나타낸 것이다.
- <2> 도 2는 본 발명에 따라 실시예 1에서 제조된 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔의 단면(2a)과 주사 전자 현미경(2b)을 나타낸 것이다.
- <3> 도 3은 본 발명에 따라 실시예 2에서 제조된 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔의 주사 전자 현미경을 나타낸 것이다.
- <4> 도 4는 본 발명에 따라 실시예 3에서 제조된 다공성 생체적합 고분자 하이드로 겔의 주사 전자 현미경을 나타낸 것이다.
- <5> 도 5는 본 발명에 따라 실시예 4에서 형광물질이 부착된 효소를 다공성 하이드로 겔 내부에 물리·화학적으로 결합한 후의 형광현미경을 나타낸 것이다.
- <6> 도 6은 본 발명에 따라 실시예 5 ~ 8에서 제조된 생체적합 고분자 하이드로 겔의 반응시간 20분 후 기공크기에 따른 상대적 UV 흡광도를 나타내는 것이다.
- <7> 도 7은 본 발명에 따라 실시예 9 ~ 11에서 제조된 생체적합 고분자 하이드로 겔의 폴리에틸렌글리콜(PEG) 분자량별 기질의 농도에 따른 반응속도의 변화를 나타내는 것이다.

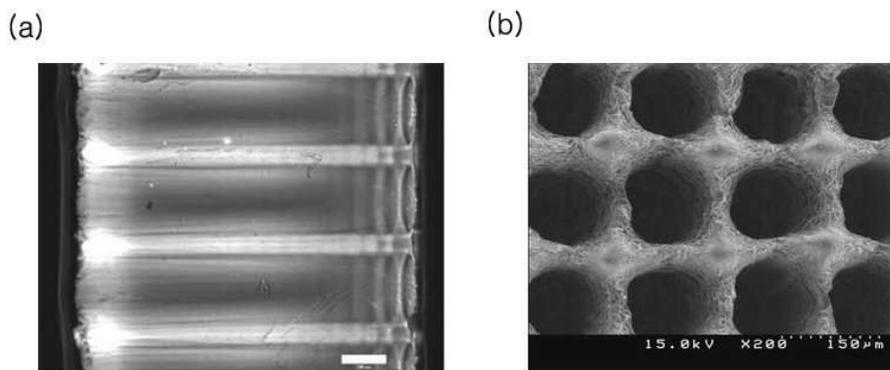
- <8> 도 8은 본 발명에 따라 실시예 12 ~ 13에서 제조된 생체적합 고분자 하이드로 겔의 효소 조건에 따른 활성변화를 나타내는 것이다.
- <9> 도 9는 본 발명에 따라 실시예 4에서 제조된 지름 50 μm 세공의 생체적합 고분자 하이드로 겔의 효소반응기와, 비교예 2에서 제조된 세공이 없는 효소반응기의 반응시간에 따른 생성물의 흡광도를 나타내는 것이다.

도면

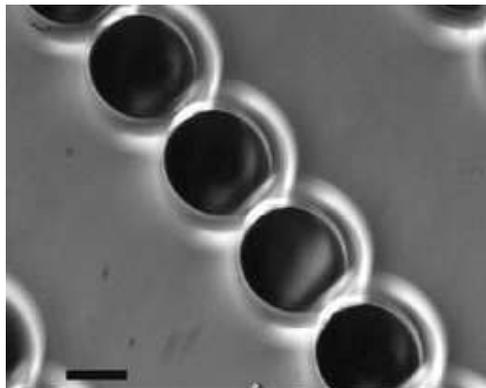
도면1



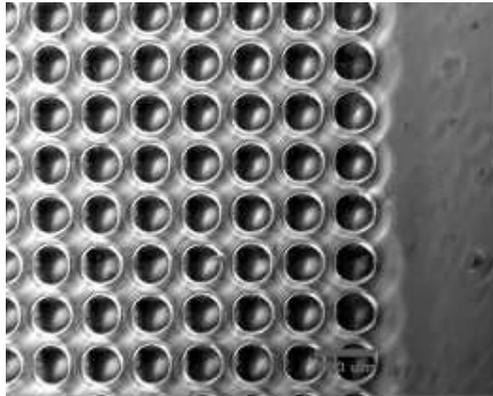
도면2



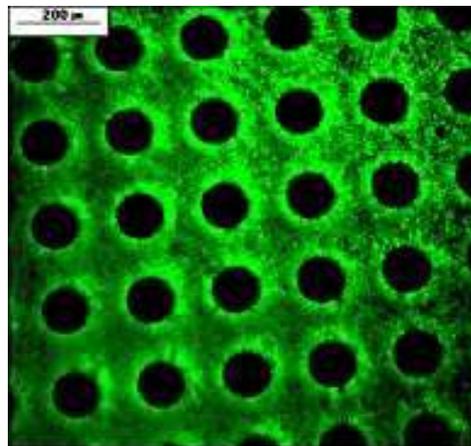
도면3



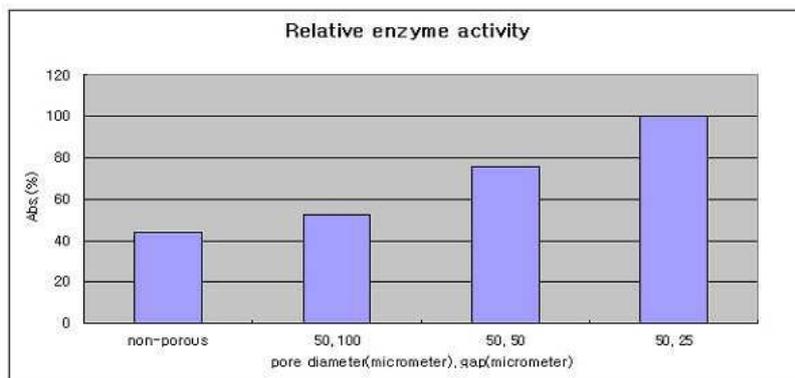
도면4



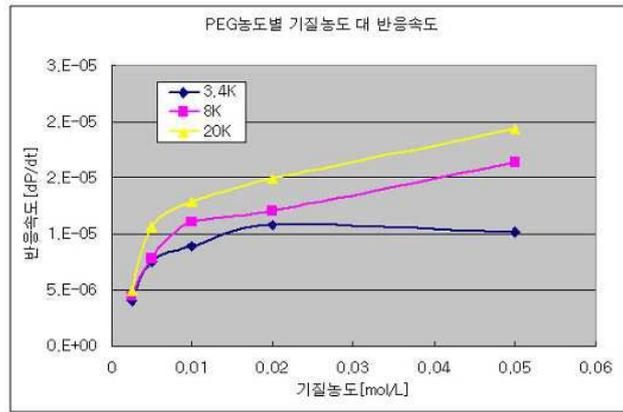
도면5



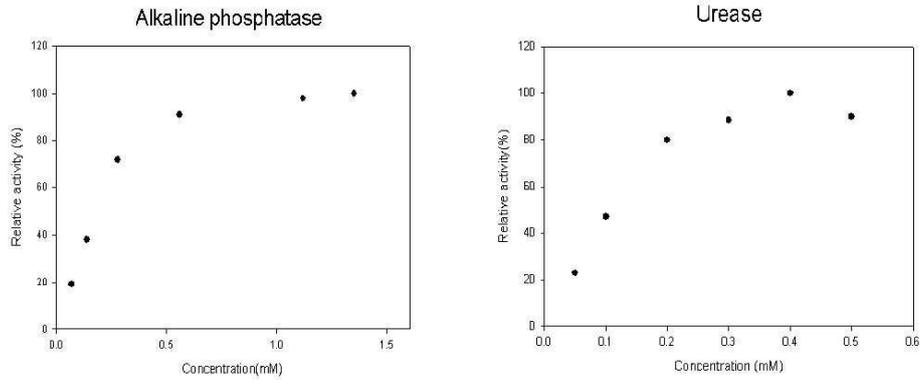
도면6



도면7



도면8



도면9

