



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0043451
(43) 공개일자 2024년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C08L 29/04 (2006.01) A61L 26/00 (2006.01)
C08J 3/075 (2006.01) C08J 3/24 (2006.01)
C08L 5/00 (2006.01) C08L 5/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C08L 29/04 (2013.01)
A61L 26/0014 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0122564

(22) 출원일자 2022년09월27일

심사청구일자 2022년09월27일

기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인

국립부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)

(72) 발명자

정원교

부산광역시 남구 분포로 112, 엘지메트로 141동 2004호

스리 랑가 데니야 돈 파타벤디지 밀란 파툼 찬디카

부산광역시 남구 유엔평화로 41번길 95 401호

(74) 대리인

위병갑

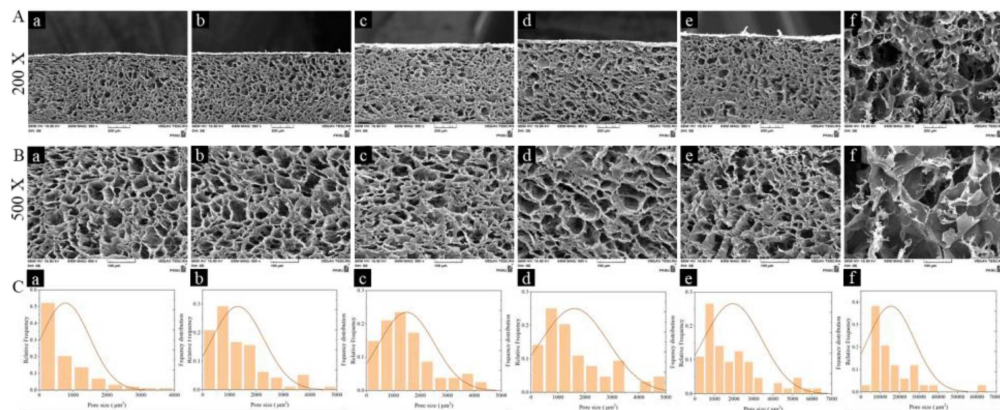
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 삼중 가교 하이드로겔 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 COS로 캡슐화된 변형된 생체고분자(k-CaMA) 및 합성 고분자(PVA) 기반의 복합 상처 드레싱 하이드로겔 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명의 하이드로겔은 더 많은 기공 구조, 더 우수한 체액 흡수 및 보유 능력 및 적합한 기계적 안정성을 갖는다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61L 26/008 (2013.01)

C08J 3/075 (2013.01)

C08J 3/246 (2013.01)

C08L 5/00 (2013.01)

C08L 5/08 (2013.01)

A61L 2300/62 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345350472
과제번호	2021R1A6A1A03039211
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	해양바이오닉스융합기술센터
기 여 율	50/100
과제수행기관명	부경대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525013423
과제번호	20220128
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	해양수산부산물 바이오 소재화 기술개발
연구과제명	해양수산부산물 바이오 소재화 기술개발
기 여 율	50/100
과제수행기관명	한국해양과학기술원
연구기간	2022.04.01 ~ 2027.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

PVA (Poly(vinyl alcohol));
 κ -CaMA (methacrylate kappa-carrageenan); 및
COS (chitooligosaccharide);
를 포함하는, 삼중 가교 하이드로겔.

청구항 2

제 1 항에 있어서,
상기 하이드로겔은 상기 COS로 캡슐화된 PVA- κ -CaMA 복합구조인 것인, 삼중 가교 하이드로겔.

청구항 3

제 1 항에 있어서,
상기 PVA 및 κ -CaMA를 9 내지 1 : 1 내지 9의 부피비로 포함하는 것인, 삼중 가교 하이드로겔.

청구항 4

제 1 항에 있어서,
상기 PVA 및 κ -CaMA에 대하여 상기 COS를 0.5 내지 5%(w/v) 포함하는 것인, 삼중 가교 하이드로겔.

청구항 5

PVA, κ -CaMA, COS 및 광개시제(photo-initiator)를 혼합하는 단계(단계 1);
상기 혼합물을 0℃ 내지 -100℃에서 냉동하는 단계(단계 2);
상기 동결된 혼합물을, 실온에서 UV 조사한 후 해동시키는 단계(단계 3);
0℃ 내지 -100℃에서 냉동 및 실온에서 해동을 2회 내지 5회 반복하여 이중 교차결합 하이드로겔을 수득하는 단계(단계 4); 및
상기 이중 교차결합 하이드로겔을 KCl 용액을 사용하여 교차결합시키는 단계(단계 5); 를 포함하는, 삼중 가교 하이드로겔의 제조방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,
상기 단계 1에서 상기 PVA 및 κ -CaMA를 9 내지 1 : 1 내지 9의 부피비로 혼합하는 것인, 삼중 가교 하이드로겔의 제조방법.

청구항 7

제 5 항에 있어서,
상기 단계 1에서 상기 PVA 및 κ -CaMA에 대하여 0.5 내지 5%(w/v)의 COS 및 0.1 내지 1%(w/v)의 광개시제를 혼합하는 것인, 삼중 가교 하이드로겔의 제조방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 따른 삼중 가교 하이드로겔을 포함하는, 상처 드레싱.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 PVA (Poly(vinyl alcohol)); κ -CaMA (methacrylate kappa-carrageenan); 및 COS (chitooligosaccharide)를 포함하는, 삼중 가교 하이드로겔 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 하이드로겔은 기본적으로 수분을 많이 함유하고 상처 부위의 습윤 환경을 유지시키고, 기체 교환을 가능케하여 상처회복을 촉진시킨다. 이러한 장점으로 인해 하이드로겔은 창상피복재로 개발될 뿐만 아니라 최근 화장품 및 의료산업에서 많은 관심을 받고 있다. 여러 가지 합성 고분자 중, 폴리비닐알코올(Polyvinyl alcohol, PVA)는 폴리비닐 아세테이트의 가수분해에 의해 제조된다. 폴리비닐알코올은 수산화기를 함유하고 있으며, 생체적합성, 높은 수용성 및 비독성을 특징으로 지녀 의료용 분야에서 널리 사용되고 있다. 또한, 폴리비닐알코올은 화학물질을 사용하지 않고 Freezing/Thawing 방식을 활용하여 물리적인 방법만으로 가교결합을 형성할 수 있다. 이러한 특성으로 인해 폴리비닐알코올 하이드로겔에 세포의 부착, 성장, 증식 및 분화를 촉진시키는 생리활성물질들을 첨가한 기계적 성질이 우수한 하이드로겔 제작에 널리 활용되고 있다.

[0003] 저분자 키토올리고당(Chitooligosaccharide, COS)은 키토산을 활용하여 분자량을 1-3 kDa 범위로 분리한 것으로, 물에 대한 높은 용해성, 생분해성 및 생체적합성을 보유하고 있어 키토산보다 제약 및 의료분야에서 더 많은 활용이 이루어지고 있다. 이러한 키토산과 저분자 키토올리고당의 항균활성은 일반적으로 분자량 및 탈아세틸화 저도에 좌우되는 것으로 알려져 있는데, 키토올리고당의 항균활성이 키토산보다 높다고 알려져 있다. 또한, 키토올리고당은 항산화 효능 등 다양한 생리활성을 보유하고 있는데, 항산화 억제농도가 상대적으로 높은 편에 속한다.

[0004] 카라기난(κ -carrageenan, κ CaMA)은 홍조류로부터 확보되는 수용성 천연 다당류로, 우수한 겔 형성 능력, 높은 유체 흡수 및 보유 능력, 생체 적합성, 생분해성 등 다양한 특징을 보유하고 있어 다양한 분야에서 활용되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1829136호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에, 본 발명의 발명자들은 COS 로 캡슐화된, 변형된 생체고분자(κ -CaMA) 및 합성 고분자(PVA) 기반의 복합 상처 드레싱 하이드로겔(이하 "P κ -CaC"라 함)을 비-독성 물리적, 광화학적 및 이온성 교차결합을 통해 제조하여 본 발명을 완성하였다.

[0007] 이에 따라, 본 발명은 PVA (Poly(vinyl alcohol)); κ -CaMA (methacrylate kappa-carrageenan); 및 COS (chitooligosaccharide)를 포함하는, 삼중 가교 하이드로겔 및 이의 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 PVA (Poly(vinyl alcohol)); κ -CaMA (methacrylate kappa-carrageenan); 및 COS (chitooligosaccharide)를 포함하는, 삼중 가교 하이드로겔을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 PVA, κ -CaMA, COS 및 광개시제(photo-initiator)를 혼합하는 단계(단계 1); 상기 혼합물을 0℃ 내지 -100℃에서 냉동하는 단계(단계 2); 상기 동결된 혼합물을, 실온에서 UV 조사한 후 해동시키는 단계(단계 3); 0℃ 내지 -100℃에서 냉동 및 실온에서 해동을 2회 내지 5회 반복하여 이중 교차결합 하이드로겔을 수득하는 단계(단계 4); 및 상기 이중 교차결합 하이드로겔을 KCl 용액을 사용하여 교차결합시키는 단계(단계 5)를

포함하는, 삼중 가교 하이드로겔의 제조방법을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 삼중 가교 하이드로겔을 포함하는 상처 드레싱을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 삼중 가교 하이드로겔은 반복적인 냉동-해동 방식 및 광가교를 기반으로 하여 제조됨으로써, 균일하게 분포된 다공성 미세구조, 우수한 유체 흡수 및 보유, 적절한 방출 속도, 높은 기계적 안정성, 열 안정성, 반결정 구조 및 우수한 세포 적합성을 갖는 균일한 두께 구조를 가질 수 있어, 피부재생 분야에 마스크팩 또는 창상 피복재 등으로 이용 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 하이드로겔 시료의 (A) 200 X 및 (B) 500 X 배율의 SEM 현미경 이미지, 및 (C) 기공 크기 분포를 나타낸 것이다: (a) PVA (b) PCOS (c) P κ -CaC 8:2 (d) P κ -CaC 6:4 (e) P κ -CaC 2:8, 및 (f) κ -CaMA.

도 2는 본 발명에 따른 상처 드레싱 하이드로겔의 평균 다공성을 나타낸 것이다.

도 3은 (A) Deuterated water (D₂O)에 용해된 순수한 κ -Ca 및 변형된 κ -CaM의 50 °C에서의 1H NMR 스펙트럼 및 (B) 순수한 κ -Ca, PVA, COS, κ -CaMA, 및 복합 하이드로겔의 FTIR 스펙트럼을 나타낸 것이다. 데이터는 37 °C에서 취득되었다.

도 4는 순수 물질 및 복합 하이드로겔의 (A) X-선 회절 프로파일, (B) 시차주사열량측정법 결과 곡선, 및 (C) 열중량 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 37 °C에서 1X PBS (pH 7.4) 중에 용해시킨 하이드로겔의 (A) 겔 분율, (B) 방출 프로파일 (C), 팽창 (D), 및 수분 보유 능력을 나타낸 것이다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타냈다 (n=4).

도 6은 동역학적 (A) shear storage (G') 모듈러스, (B) shear loss (G'') 모듈러스, 및 (C) loss tangent를 사용하여 평가한 하이드로겔의 점탄성 거동, 및 UTM을 사용하여 측정한 압축 기계적 특성: (D) 압축 응력 변형 곡선 및 (E) 압축 스트레스를 나타낸 것이다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타냈다 (n=4).

도 7은 (A) (a) NHDF-neo 및 (b) HaCaT 세포에서 하이드로겔 추출물의 간접 세포독성 (수치는 평균 $\pm$ 표준편차 (n=3)로 나타냈다), 및 (B) NHDF-neo 및 (C) HaCaT 세포와 직접 접촉시킨 하이드로겔의 세포독성 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 ICR 마우스의 전측 절개 상처 봉합을 나타낸 것이다: (A) 0, 2, 4, 7, 및 14일의 상처의 이미지; (B) 이미지 분석 소프트웨어를 사용하여 측정된 평균 수술후 상처 영역; (C) 흉터 및 완전히 발달된 조직을 비롯한 상처의 중심에서 수득한 H&E 염색된 조직의 이미지. 화살표는 stratum corneous (sc), stratum granulosum (sg), stratum spinosum (ss), sebaceous gland (seb), hair root (hr), hair canals (hc), hair follicles (hf), blood vessels (bv), 및 subcutaneous layer (s)를 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ SD로 나타냈다 (n=6).

도 9는 본 발명에 따른 상처 드레싱 하이드로겔의 항균 활성을 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명에 따른 하이드로겔의 제조 공정을 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 의해 본 발명이 한정되지 않으며 본 발명은 후술할 청구 범위에 의해 정의될 뿐이다.

[0014] 덧붙여, 본 발명에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시 예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 본 발명의 명세서 전체에서 어떤 구성요소를 '포함'한다는 것은 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있다는 것을 의미한다.

[0016] 본 발명은 PVA (Poly(vinyl alcohol)); κ -CaMA (methacrylate kappa-carrageenan); 및 COS (chitooligosaccharide)를 포함하는, 삼중 가교 하이드로겔에 관한 것이다.

[0017] 상기 하이드로겔은 상기 COS로 캡슐화된 PVA- κ -CaMA 복합구조일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0018] 상기 하이드로겔은 PVA 및 κ -CaMA를 9 내지 1 : 1 내지 9의 부피비로 포함할 수 있으며, 예를 들어, PVA 및 κ -CaMA를 8 : 2, 6 : 4, 4 : 6 또는 2 : 8의 부피비로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 상기 하이드로겔은 상기 PVA 및 κ -CaMA에 대하여 상기 COS를 0.5 내지 5%(w/v) 포함할 수 있으며, 예를 들어 1%(w/v) 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 상기 하이드로겔은 PVA, κ -CaMA, COS 및 광개시제(photo-initiator)를 혼합하는 단계(단계 1); 상기 혼합물을 0 °C 내지 -100 °C에서 냉동하는 단계(단계 2); 상기 동결된 혼합물을, 실온에서 UV 조사한 후 해동시키는 단계(단계 3); 0°C 내지 -100°C에서 냉동 및 실온에서 해동을 2회 내지 5회 반복하여 이중 교차결합 하이드로겔을 수득하는 단계(단계 4); 및 상기 이중 교차결합 하이드로겔을 KCl 용액을 사용하여 교차결합시키는 단계(단계 5)를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 이하, 본 발명의 삼중 가교 하이드로겔의 제조방법을 바탕으로, 본 발명의 삼중 가교 하이드로겔을 설명한다.
- [0022] 먼저, 본 발명의 삼중 가교 하이드로겔의 제조방법은 PVA, κ -CaMA, COS 및 광개시제(photo-initiator)를 혼합하는 단계(단계 1)을 포함한다.
- [0023] 상기 단계 1에서 상기 PVA 및 κ -CaMA를 9 내지 1 : 1 내지 9의 부피비로 혼합할 수 있으며, 예를 들어, PVA 및 κ -CaMA를 8 : 2, 6 : 4, 4 : 6 또는 2 : 8의 부피비로 혼합할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0024] 상기 단계 1에서 상기 PVA 및 κ -CaMA에 대하여 0.5 내지 5%(w/v)의 COS 및 0.1 내지 1%(w/v)의 광개시제를 혼합할 수 있으며, 예를 들어 1%(w/v)의 COS 및 0.25%(w/v)의 광개시제를 혼합할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 상기 광개시제는 본 분야에서 사용되는 것이라면 제한없이 사용할 수 있으며, 예를 들어 2-hydroxy-1-(4-(hydroxyethoxy)phenyl)-2-methyl-1-propanone photo-initiator (Irgacure 2959), lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate, Eosin Y [(EY)]/triethanolamine (TEOA)/ vinyl caprolactam (VC), 1-Hydroxy-cyclohexyl-phenyl-ketone (IRGACURE 184), 2-Hydroxy-2-methyl-1-phenyl-1-propanone (DAROCUR 1173), Methylbenzoylformate (DAROCUR MBF), 2-Benzyl-2-(dimethylamino)-1-[4-(4-morpholinyl) phenyl]-1-butanone (IRGACURE 369) 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 다음으로, 본 발명의 삼중 가교 하이드로겔의 제조방법은 0°C 내지 -100°C에서 냉동하는 단계(단계 2); 상기 동결된 혼합물을, 실온에서 UV 조사한 후 해동시키는 단계(단계 3); 0°C 내지 -100°C에서 냉동 및 실온에서 해동을 2회 내지 5회 반복하여 이중 교차결합 하이드로겔을 수득하는 단계(단계 4);를 포함한다.
- [0027] 상기 단계 2에서, 냉동은 0°C 내지 -100°C, 예를 들어, 0°C 내지 -50°C, -5°C 내지 -3 °C에서 실시될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 상기 단계 3에서, 실온에서 320 내지 400 nm의 파장 및 1 내지 7 nW/cm²의 조도를 갖는 UV를 10분 내지 1시간 동안 조사할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 상기 단계 4에서 냉동은 0°C 내지 -100°C, 예를 들어, 0°C 내지 -50°C, -5°C 내지 -30°C에서 실시할 수 있으며, 냉동 및 해동 과정을 예를 들어, 3 회 내지 4 회 반복하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 마지막으로, 본 발명의 삼중 가교 하이드로겔의 제조방법은 상기 이중 교차결합 하이드로겔을 KCl 용액을 사용하여 교차결합시키는 단계(단계 5)를 포함한다.
- [0031] 상기 단계 5에서는 화학적 교차결합을 통해 삼중 가교 구조를 완성할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 또한, 본 발명은 본 발명의 삼중 가교 하이드로겔을 포함하는 상처 드레싱에 관한 것이다.

[0035] 실시예

[0036] 재료준비

[0037] 저분자량 (MW) COS (1-3kDa)은 Kitto life Co. (Seoul, Korea)에서 구입하였다. κ -Ca (sulfated linear plant polysaccharide, composed of repeated 1,3-linked β -D-galactopyranose 및 1,4-linked 3,6-anhydro-D-galactopyranose units), PVA (MW 89,000-98,000; 99 + % hydrolyzed), methacrylic anhydride (MA), 2-

hydroxy-1-(4-(hydroxyethoxy)phenyl)-2-methyl-1-propanone photo-initiator Irgacure 2959 (PI), fluorescein diacetate (FDA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT), deuterium oxide (D2O)은 Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Hoechst 33342는 Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하고, 우태아혈청(FBS), 트립신(250 U/mg), 페니실린/스트렙토마이신, Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), 및 세포 배양에 사용된 그 외 물질은 GIBCO™, Invitrogen Corporation(USA)에서 구입하였다. 물은 탈이온화하여 사용하였으며, 그외 모든 화합물 및 용매는 분석 등급을 사용하였다.

실시예 1. 삼중 가교결합 PVA/κ-CaMA/COS 하이드로겔의 제조

도 10에 도시된 바와 같은 공정에 따라 삼중 가교결합 PVA/κ-CaMA/COS 하이드로겔을 제조하였다.

우선, 5% PVA 및 동결건조된 κ-CaMA (methacrylate kappa-carrageenan)을 각각 80℃ 및 50℃에서 DW에 용해시켰다. 다른 비율의 두 용액을 실온에서 마그네틱 교반기를 사용하여 1% (w/v) COS(chitoooligosaccharide) 및 0.25% (w/v) PI(2-hydroxy-1-(4-(hydroxyethoxy)phenyl)-2-methyl-1-propanone photo-initiator Irgacure 2959)와 혼합하였으며, 또한, 비교예로서 PVA와 COS만을 혼합하였다 (표 1). 균질화된 Pκ-CaC 용액을 1mm 두께의 겔 카세트에 주입하고 -20℃에서 18시간 동안 냉동한 후 UV (365 nm, 4nW/cm²)에서 30분 동안 해동시켰다. 하이드로겔 카세트 내의 κ-CaMA 모노머를 실온에서 30분간 카세트의 양 면에 대해 365 nm, 4 nW/cm²에서 UV 노출하여 광 가교결합시킨 후, 비교예를 제외한 Pκ-CaC 카세트만 6시간 동안 해동시켰다. 그런 다음 광결합 단계를 제외하고 하이드로겔의 냉동-해동 사이클을 3회 더 실시하였다(18: 6h). 삼중 가교결합 하이드로겔을 얻기 위해, 이중 교차결합된 하이드로겔을 카세트에서 탈착시키고 5% (w/v) KCl 용액을 첨가하여 이온성 교차결합시켰다.

표 1

하이드로겔의 조성

PVA (%)	κ-CaMA (%)	COS (%)	PI (%)	하이드로겔
100	0	1	0	PCOS
80	20	1	0.25	Pκ-CaC 8:2
60	40	1	0.25	Pκ-CaC 6:4
40	60	1	0.25	Pκ-CaC 4:6
20	80	1	0.25	Pκ-CaC 2:8

실험예 1. 하이드로겔의 물리-화학적 특성화

미세구조 특성화

동결건조된 하이드로겔의 단면 구조를 Emi-Tech K500X를 사용하여 은 박막으로 스퍼터-코팅한 후 5 kV에서 scanning electron microscope (FE-SEM, Hitachi S-2700, Japan)을 사용하여 확인하였다. 이미지를 ImageJ

(ImageJ Wayne, Rsband)로 분석하고, 기공을 원형으로 가정하고 하기 식에 따라 지름을 계산하였다. 하기 식에서 D 및 A 는 각각 기공의 지름 및 면적을 나타낸다.

$$D = [4 \times A] / \pi]^{1/2}$$

다공성

제조된 하이드로겔의 다공성을 확인하기 위해 에탄올 침윤 방법(ethanol infiltration method)을 사용하였다. 동결건조된 하이드로겔을 실온 및 감압 하에서 무수 에탄올에 담겨 공기 방울을 제거하고 5시간 동안 에탄올이 채워지게 한 후 꺼내어 표면 에탄올을 닦아냈다. 다공성은 하기 식으로 계산하였으며, 하기 식에서 W_0 는 동결건조 중량, W_1 은 에탄올이 침윤된 하이드로겔 중량, ρ 는 에탄올의 밀도(0.789 mg/ml), 및 V_S 는 기하학적 부피이다.

$$\rho \text{ (%) } = [(W_1 - W_0) / \rho V_S] \times 100$$

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) 분석

FTIR spectroscopy을 실시하여 순수한 물질인 κ -CaMA와 본 발명의 하이드로겔의 화학적 특성을 확인하였다. 모든 스펙트럼은 실온에서 FTIR-Perkin-Elmer Spectrum(GX Washington DC, USA) spectrometer를 사용하여 4000-650 cm^{-1} 의 주파수에서 4 cm^{-1} 의 해상도에서 기록하였다.

X-ray diffraction 분석 (XRD)

순수한 생물질 및 복합 P κ -CaCs를 36 kV 및 200 mA에서 생성된 CuK α 방사선으로 X-ray diffraction (Philips X' pert MPD diffractometer, Eindhoven, Netherland)을 사용하여 특성화하였다; 회절각도(2θ)는 6° /min의 스캐닝 속도에서 10 내지 60° 의 범위로 작동하였다.

열 특성

PVA 및 복합 하이드로겔의 열 특성을 질소 기체 하에서 10 °C/min의 일정한 가열 속도로 50 내지 700°C의 온도 범위 내에서 Thermogravimetric analysis(TGA) Pyris 1 TGA analyzer (Perkin Elmer TGA-7, Waltham, MA, USA)로 측정하였다. 하이드로겔의 용융 거동을 10 °C/min의 가열 속도 및 50 mL/min의 아르곤 가스 유속 하에서 상온 내지 250°C의 온도 범위 내에서 differential scanning calorimetry (DSC) (Perkin Elmer, Diamond, Waltham, MA, USA)으로 확인하였다.

겔 분율 (gel fraction)

냉동건조된 하이드로겔 (0.8 mm 지름)의 중량(W_i)을 측정 한 후 37°C에서 24시간 동안 1X phosphate buffer saline (PBS) (pH 7.4)에 담구었다. 평형 팽창(equilibrium swelling) 후, 하이드로겔을 냉동건조하고 중량(W_f)을 측정했다. 겔 분율은 하기 식에 따라 계산하였다.

$$\text{gel fraction (\%)} = (W_i / W_f) \times 100$$

팽창 특성

냉동건조된 하이드로겔을 37°C에서 평형화가 될 때까지 1X PBS (pH 7.4)에 담구었다. 표면의 습기를 블롯팅 페

이퍼로 제거하고 1분 동안 두어 표면 물기를 완전히 제거한 후 중량을 측정했다. 평형-팽창 퍼센트를 하기 식으로 계산하였으며, 하기 식에서 W_d 및 W_s 는 각각 스캐폴드의 냉동건조 및 팽창 상태의 중량을 나타낸다.

$$\text{Swelling (\%)} = [(W_s - W_d) / W_d] \times 100$$

수분 보유 특성

1X PBS (pH 7.4)에서 평형 팽창에 다다른 냉동건조된 하이드로겔을 37℃에서 옥외(상대 습도 40%)에 다양한 시간 동안 두었다. 수분 보유 비율을 하기 식에 따라 계산하였으며, 하기 식에서 W_s 는 특정 시간에서 팽창된 하이드로겔의 중량이고, W_d 는 건조된 하이드로겔의 중량이고, W_i 는 완전히 팽창된 하이드로겔의 중량이다.

$$\text{Water retention (\%)} = [(W_s - W_d) / (W_i - W_d)] \times 100$$

방출 거동

하이드로겔의 방출 거동을 phenol-Sulfuric assay를 실시하여 확인하였다. 하이드로겔을 37℃에서 1 X PBS에 담그고, microplate reader (Gen 5(Gen 5 TM ELISA BioTek, USA)를 사용하여 490 nm에서 방출의 동역학을 기록한 후 표준 곡선의 흡광도에 근거하여 계산하였다.

<결과>

미세구조 특성화

PVA 및 삼중 가교결합 복합 하이드로겔 시료의 미세구조 형태를 SEM 현미경으로 연구하였다. 도 1A에서 볼 수 있는 바와 같이, 최적 하이드로겔-제조 공정 조건 하에서, PVA에서 Pκ-CaC 2:8까지의 순서로 상승하는 초기 로딩 두께에 비해 동결건조된 하이드로겔 시료에서 약간의 균일한 수축이 관찰되었다. 도 1B에 나타난 확대된 SEM 현미경 이미지는 하이드로겔 시료 모두 서로 연결되고 균일한 다공 구조를 가짐을 보인다. PVA 기반 하이드로겔은 동결 건조 후에 고분자 네트워크의 변형 및 불규칙적인 배열을 보였으며, 물의 재-흡수 후에도 초기 상태로 돌아가지 않았다. 그러나, 본 발명의 방법에 따라 제조된 하이드로겔은 동결건조 후에도 매우 균일한 구조를 보였으며, 이는 캐스팅 방법 때문이다. 순수한 PVA 하이드로겔의 기공 크기는 $1002.5 \pm 762.7 \mu\text{m}^2$ 으로 다른 시료에 비해 더 밀집되고 균질한 다공 구조를 보였으며, 평균 기공 크기는 복합 PCOS, Pκ-CaC 8:2, Pκ-CaC 6:4, 및 Pκ-CaC 4:6에서 각각 1308.9 ± 968.5 , 1486.4 ± 1016.8 , 1607.3 ± 1240.4 , 및 $1935.1 \pm 1476.8 \mu\text{m}^2$ 이었다. Pκ-CaC 2:8은 $15,517.9 \pm 11,976.9 \mu\text{m}^2$ 의 극도로 큰 기공 크기를 보였는데, 이는 κ-CaMA 내의 광-및 이온성 교차 결합이 유지되는 동안 PVA 사이의 물리적 교차결합이 상당히 감소하였기 때문일 수 있다. 결과적으로, 고분자 용액의 로딩 두께는 교차결합 후에 변함없이 유지되었다. 기공 크기 분포는 또한 복합 하이드로겔 시료 내에 κ-CaMA의 증가로 인해 더 큰 기공 크기로 변화됨을 나타낸다(도 1C).

하이드로겔의 다공성 구조는 상처 표면으로부터 흘러나오는 삼출물을 흡수하고 적절한 수분 환경을 유지하면서 상처 부위로 영양소 및 치유 촉진제가 분산되도록 돕는다. 도 2는 PVA 하이드로겔에 κ-CaMA를 첨가했을 때, PVA (65.7 ± 2.1)의 다공성이 Pκ-CaC 8:2, Pκ-CaC 6:4, Pκ-CaC 4:6, 및 Pκ-CaC 2:8 하이드로겔 시료에서 각각 68.1 ± 2.5 , 71.3 ± 1.3 , 75.4 ± 7.3 , 및 88.5 ± 2.0 로 증가함을 보였다. 종합하면, 이러한 결과들은 κ-CaMA의 존재로 인해 κ-CaMA 내에서 광-및 이온성 교차-결합이 증가하여 하이드로겔 구조가 느슨해짐을 보이는 것으로, 고수준의 κ-CaMA이 결과적으로 제조된 하이드로겔의 구조적 및 기계적 안정성을 감소시켜 상처 드레싱에서 사용되기에 적합하지 않도록 할 수 있음을 제시하는 것이다.

¹H NMR 및 FTIR spectroscopy

- [0083] κ -Ca는 이후의 UV-매개 교차 결합을 촉진하기 위해 MA로부터 히드록시기가 메타크릴레이트기로 치환되어 변형되었다. κ -CaMA의 ^1H NMR 분광 분석 (도 3A)으로 도입된 메타크릴레이트의 비닐 양성자에 해당하는 6.3 및 5.9 ppm에서 특징적인 이중 피크를 가지고 있어 메타크릴레이트 부분의 존재를 통해 κ -Ca의 변화를 확인할 수 있었다. 2 ppm에서의 단일 피크는 메타크릴레이트의 메틸 양성자에 해당하는 것으로, 이는 κ -Ca의 성공적인 변형을 나타내는 것이고, 이는 이전의 연구 결과와도 일치한다.
- [0084] 그런 다음, 순수 PVA, κ -Ca, COS, 합성된 κ -CaMA, 및 복합 하이드로겔 시료 PCOS, P κ -CaC 8:2, P κ -CaC 6:4, P κ -CaC 4:6, 및 P κ -CaC 2:8의 기능기를 FTIR으로 특성화하였다 (도 3B). PVA 스펙트럼은 -OH 스트레칭 진동에 의해 3305 cm^{-1} 에서 특징적인 넓은 흡광 피크를 보였으며, 히드록시기의 -OH 벤딩 진동에 의한 1416 cm^{-1} 에서의 피크, 비대칭 -CH₂ 스트레칭 진동에 의한 2915 cm^{-1} 에서의 피크 및 C-O 및 C-C 스트레칭 진동에 의해 각각 1088 cm^{-1} 및 842 cm^{-1} 에서 피크를 보였다. 순수한 COS의 스펙트럼은 각각 C-H 스트레칭 진동, 구아니딘기의 N-H 스트레칭 진동, 및 이차 아민의 N-H 벤딩 진동에 의해 2890 cm^{-1} , 1373 cm^{-1} , 및 1033 cm^{-1} 에서 특정 피크를 보였다. 또한, N-H 비틀림 진동을 나타내는 1508 cm^{-1} 에서의 밴드가 PCOS 및 복합 시료 모두에서 관찰되었으며, 이는 COS의 존재를 확인해주는 것이다.
- [0086] **X-ray 회절 및 열 특성**
- [0087] 순수한 PVA, κ -Ca, COS, 합성된 κ -CaMA, 및 복합 하이드로겔 시료 PCOS, P κ -CaC 8:2, P κ -CaC 6:4, P κ -CaC 4:6, 및 P κ -CaC 2:8의 회절 패턴을 도 4A에 나타냈다. PVA의 XRD 프로파일은 $2\theta = 19.5^\circ$ 에서 특징적인 반-결정 회절 피크를 보였으며, 이는 PVA 사슬 사이의 강한 분자간 및 분자내 수소 결합의 결과로서 격자면의 회절 때문이다. κ -Ca, COS, 및 변형된 κ -CaMA의 diffractogram은 $2\theta = 20^\circ$ 근처에서 약하고 넓은 피크를 보이는데, 이는 이들이 자연적으로 모두 무정형임을 나타내는 것이다. 복합 시료에서, PVA 결정의 회절에 기인하는 $2\theta = 19.5^\circ$ 에서의 피크는 κ -CaMA에서의 증가에 따라 더 낮은 강도를 가지며, 이는 이들의 반-결정 구조의 약화 및 무정형 성질의 증가를 나타내는 것이다. 이러한 결과들은 또한 PVA 및 κ -CaMA 사이에 분자간 수소 결합이 우세하고, κ -CaMA의 화학적 교차결합이 PVA 내의 물리적 교차결합을 감소시키고 하이드로겔의 결정도를 감소시킴을 나타내는 것이다.
- [0089] 순수 물질 및 교차결합된 복합 하이드로겔 시료 PCOS, P κ -CaC 8:2, P κ -CaC 6:4, P κ -CaC 4:6, 및 P κ -CaC 2:8에 대한 DSC thermogram을 도 4B에 나타냈다. PVA의 주요 열 변이에 대한 발열성 피크, 유리 전이 온도(T_g), 및 용융 온도(T_m)를 복합 드레싱과 비교하였다. 하이드로겔 시료의 상대적 열 안정성을 $50\text{--}700^\circ\text{C}$ 온도 범위에 걸친 중량의 손실을 비교하여 평가하였다.
- [0090] 도 4C는 순수한 PVA, COS, κ -CaMA, 및 복합 하이드로겔에서의 열적 열화 프로파일 결과를 나타낸 것이다. DSC thermogram에서 T_m 에서의 주요 발열성 피크는 고분자 및 복합체의 결정성을 확인하기 위해 사용되었으며, T_g 는 복합체 내의 고분자의 혼화성 및 상호작용을 확인하기 위해 사용되었다. $110\text{--}140^\circ\text{C}$ 범위 내에서 관찰된 더 작은 발열성 피크는 T_g 에 의한 것으로, 이는 PVA, κ -CaMA, 및 COS가 완전히 혼화되어 균질한 복합 하이드로겔을 형성함을 제시하는 것이다. 이는 복합체 내 κ -CaMA의 증가시 더 높은 온도에 따라 T_g 피크에서 약간의 시프트가 일어나는 것으로 확인되었으며, 이는 이전에 보고된 PVA 및 키토산을 함유한 복합체에서 T_g 에서의 시프트와 유사하다. T_m 에 해당하는 발열성 피크는 순수 PVA에 대해 230°C 에서 관찰되고 PCOS, P κ -CaC 8:2, P κ -CaC 6:4, P κ -CaC 4:6, 및 P κ -CaC 2:8에 대해 각각 228°C , 212°C , 205°C , 202°C , 및 197°C 에서 관찰되었으며, 이는 κ -CaMA의 증가에 따라 더 낮은 온도로 약간 시프트됨을 입증하는 것이다. 이는 더 많은 κ -CaMA를 함유할수록 반-결정질에서 무정형으로 하이드로겔 시료가 전이됨을 명백히 설명하는 것으로, XRD 결과를 입증한다. 더 낮은 온도에서의 T_m 의 시프트는 복합체에서 일반적으로 나타났으며, 이는 구과상 크기 및 표면 에너지의 감소에 의한 것이고, 또한, 무정형 부분이 결정질 매트릭스에 포획되거나 근처로 위치하는 것에 의해 복합체의 결정질 부분의 가능성 있는 억제에 의한 것이다.
- [0091] PVA의 열 분해 프로파일은 결합된 수분의 손실에 의해 시작되어 3%의 적은 중량 손실을 보였으며, 뒤이어 250°C

및 470℃ 사이에서 90%의 중량 손실을 보였는데, 이는 골격 내의 결합의 분해로 인한 PVA의 화학적 분해에 의한 것이다. 반대로, 별개의 2단계 열 분해 과정 후 COS 및 κ -CaMA에서 나타난 열 손실은 하기와 같다: 결합된 수분의 손실로 인해 50℃ 내지 200℃에서 10%의 중량 손실 및 당 고리 탈수, 크래킹 유닛의 분자 사슬 아세트아미노펜 및 N-디아세틸화 및 고분자 골격에 부착된 펜던트 κ -CaMA 사슬로부터 $-\text{SO}_3^-$ 기의 손실에 의해 200℃ 내지 450℃에서 약 50%의 중량 손실. PVA, 광중합 κ -CaMA, 및 COS-통합 복합 하이드로겔 시료의 TGA 곡선은 순수한 PVA 및 κ -CaMA 및 COS 사이에 있으며, 3개의 구별되는 분해 단계를 갖는다. 순수한 PVA 및 복합 하이드로겔은 470℃ 근처에서 최대 이차 상 분해를 보였으며, PCOS, P κ -CaC 8:2, P κ -CaC 6:4, P κ -CaC 4:6, 및 P κ -CaC 2:8가 순수한 PVA에 비해 각각 4.9%, 10.1, 16.8, 23.5, 및 31.8%의 잔류 중량 퍼센트 차이를 보였다. 이러한 결과는 복합체에서 κ -CaMA의 증가가 하이드로겔의 열 안정성을 증가시킴을 제안하는 것이다.

[0093] 겔 분율, 방출, 팽창, 및 수분 보유 특성

[0094] 하이드로겔 시료의 교차결합 효율을 간접적으로 정량하기 위해 겔 분율 실험을 실시하고 불용성 물질의 존재를 결정하였다.

[0095] 도 5A는 제조된 하이드로겔의 충분한 겔 분율 (>70 %)을 보이며, 이는 안정한 하이드로겔이 형성되고 교차결합 기술이 성공적으로 이행되었음을 나타내는 것이다. 예상된 바와 같이, PCOS는 순수한 PVA보다 약 6% 낮은 겔 분율을 보이며, 이는 COS가 PVA와의 약한 결합을 형성하여 하이드로겔로부터 방출됨을 나타내는 것으로, 상처의 더 빠른 회복에 유리하다. 하이드로겔로 κ -CaMA가 혼입되었을 때 겔 분율에 크게 영향을 미치지 않는 고분자 비율을 갖는 경우 PCOS와 비교했을 때 많이 낮지 않은 겔 분율을 보였으며, 삼중 교차결합 공정 때문에 PCOS에 비해 약 5% 낮은 수치를 유지하였다. 이는 COS가 PVA 내 약한 물리적 상호작용 및 더 많은 κ -CaMA를 가질수록 기공 크기가 증가하는 것에 의해 예상한 바와 같이 방출될 수 있음을 제시하는 것이다. 또한, 광-교차결합 스캐폴드에 대한 이전 문헌에 기재된 바와 같이 (Tytgat et al., 2019), κ -CaMA가 풍부한 하이드로겔의 겔 분율이 물리학적 상호작용이 낮아질수록 증가하는 PVA의 방출, κ -CaMA 사이의 면밀한 제한된 광-교차결합 및 하이드로겔 내의 κ -CaMA의 분해에 의해 낮은 것으로 추측된다.

[0096] 겔 분율 결과를 뒷받침하기 위해, 그리고 COS 방출의 지표로서, 하이드로겔 시료로부터 탄수화물의 누적 방출을 평가하였다. 도 5B는 PCOS로부터 P κ -CaC 2:8까지 κ -CaMA의 증가에 따른 방출 비율이 초기 24시간 동안 증가하고, 이후 24시간 동안 약간 증가함을 나타냈다. P κ -CaC 8:2, P κ -CaC 6:4, P κ -CaC 4:6, 및 P κ -CaC 2:8의 방출 비율은 PCOS에 비해 각각 3.3, 7.0, 9.6, 및 11.8% 차이가 있었으며, 이는 겔 분율 결과와 일치하고 시료의 교차결합 효율을 간접적으로 입증하는 것이다.

[0097] 하이드로겔의 팽창 거동은 상처의 삼출물을 흡수하고 감염을 막는 능력에 직접적으로 관련되어 있어 습윤 상처-치유 물질로 사용시 가장 중요한 특징 중 하나로서, 완전히 팽창했을 때 이의 기계적 안정성에도 영향을 줄 수 있다. 도 5C에 도시된 바와 같이, 모든 하이드로겔 상처 드레싱은 PBS와 접촉한 후 처음 1시간 이내에 400%를 넘는 높은 수분 흡수를 보였으며, 24시간 이내에 포화되고 24시간 후에는 팽창 평형을 유지하였다. 24시간 후에, PVA, PCOS, P κ -CaC 8:2, P κ -CaC 6:4, P κ -CaC 4:6, 및 P κ -CaC 2:8의 팽창 비율은 건조된 하이드로겔 무게 대비 각각 498.6 ± 21.7 , 649.2 ± 28.3 , 797.1 ± 11.9 , 964.8 ± 55.5 , 1213.3 ± 79.6 , 및 $3690.1 \pm 268.7\%$ 이었으며, 이는 팽창 비율이 하이드로겔 시료의 구성에 영향을 받음을 의미한다. 또한, 하이드로겔 팽창 속도는 하이드로겔의 구조적 밀도와 직접적으로 관련되어 있어, 기공 크기가 작아질수록 더 낮은 팽창 속도를 보였으며, 이는 SEM 현미경 관찰 결과와 일치한다.

[0098] 상처 드레싱에 하이드로겔을 일반적으로 사용하는 것을 고려했을 때, 수분 보유 능력은 상처 부위의 수분 환경을 유지하는데 중요하다. 복합 하이드로겔 시료의 수분 보유 측정 결과는 도 5D에 도시했다. 이들 결과는 하이드로겔의 PVA 중량 비율이 증가할수록 수분 보유 비율이 감소함을 나타냈으며, 이는 기공 크기에도 해당된다. 또한, 고농도의 κ -CaMA를 갖는 하이드로겔 시료에서 더 높은 수분 보유 비율이 관찰되었으며, 이는 수분이 κ -CaMA와 강하게 상호작용함을 나타내는 것이다.

[0100] 실험예 2. 역학적 거동

[0101] 유동학적 측정

[0102] 동적 유동학적 실험을 8 mm diameter parallel plate geometry (TA instrument, USA)을 갖는 Discovery HR-2

hybrid Rheometer를 사용하여 실시하였다. 하이드로겔을 정하중(static load) (0.05 N)으로 로딩하고 0.1 Hz 내지 10 Hz의 동적 주파수 범위에 걸친 인장 진폭에서 변형시켜 25℃에서 적절한 압박(5%) 하에서 스토리지(storage) 및 손실(loss) 모듈을 얻었다.

[0104] 압축 강도

[0105] 하이드로겔의 압축 강도를 universal tensile machine (UTM) (LR5K Plus, Lloyd Instruments)를 사용하여 측정하였다. 5 mm 높이 및 8 mm 지름을 갖는 원통형의 하이드로겔을 고정하고 0.1 N으로 사전설치한 후 실온에서 20 mm/min의 크로스헤드 속도로 구동하였다.

[0107] <결과>

[0108] 유동학적 거동 및 압축 강도

[0109] Oscillatory shear 실험을 실시하여 복합 하이드로겔 시료의 점탄성 특성을 확인하였다. 하이드로겔 시료의 점탄성 거동에서 생물질 조성 및 교차결합 정도의 차이로 인한 효과를 dynamic shear storage (G') 및 shear loss (G'') 모듈러스를 사용하여 평가하였다(G' 는 탄성 거동을 설명하며 G'' 는 점성 거동을 설명함). 도 6A 및 6B에 도시된 바와 같이, 모든 시료는 높은 G' 및 낮은 G'' 를 가졌으며, 이는 액상형 거동에 비해 더 고상 및 탄성 거동임을 나타내는 것으로, 이들이 최소한의 변형으로 완전히 회복될 가능성이 있음을 나타내는 것이다. G' 수치는 주파수에 대해 독립적이고 선형으로, 이는 모든 하이드로겔이 강하게 교차결합되어 강한 네트워크를 가짐을 의미한다. 게다가, 스위프(sweep) 주파수 범위 내에서, 하이드로겔 시료의 G' 는 COS 및 κ -CaMA의 도입으로 특징적인 감소를 보였으며(즉, PVA, PCOS, P κ -CaC 8:2, P κ -CaC 6:4, P κ -CaC 4:6, 및 P κ -CaC 2:8), 이는 PVA와의 분자내 및 분자간 수소결합의 강도의 감소를 나타내는 것이다. 그러나, κ -CaMA 하이드로겔은 κ -CaMA가 UV 조사 및 K^+ 이온을 사용하여 교차결합되므로 높은 G' 를 갖는다. 또한, loss tangent ($\tan \delta = G''/G'$)로 규정되는 손실 및 저장 모듈러스 사이의 비율을 사용하여 하이드로겔 시료의 전체 점탄성 거동을 1 이하의 $\tan \delta$ 로 묘사하였으며, 이는 점성 거동보다 고상 또는 탄성 거동이 더 많음을 의미하는 것이다. 도 6C는 모든 하이드로겔이 점성보다 탄성이 높으며, 탄성 특성이 PVA, PCOS, P κ -CaC 8:2, P κ -CaC 6:4, P κ -CaC 4:6, 및 P κ -CaC 2:8의 순서로 조금씩 감소함을 보였다.

[0110] 하이드로겔 시료의 지지력(load-bearing capacity)을 평가하기 위해, 하이드로겔이 망가질 때까지 단축 압축 실험을 실시하였다. 모든 시료는 정체기의 관찰 없이 압축 응력 및 변형 사이에 지수적 관련성을 보였다(도 6D). 도 6E는 하이드로겔 시료의 최대 압축 응력을 나타낸 것으로, PVA로의 COS의 도입은 압축 응력 또는 최대 변형에 유의미한 영향을 미치지 않음을 보였다. 그러나, κ -CaMA의 포함에 의해 압축 응력은 영향을 받았으며, P κ -CaC 8:2 하이드로겔은 PVA 또는 PCOS와 유의미한 차이를 보이지 않았는데, 이는 삼중 교차결합 기술이 효과적인을 나타내는 것이다. 그러나, 고농도의 κ -CaMA는 하이드로겔의 압축 응력 및 변형을 상당히 감소시켰다.

[0112] 실험예 3. 생물학적 활성 평가

[0113] 간접 및 직접 세포 독성

[0114] 하이드로겔의 직접 세포독성을 International Organization for Standardization (ISO) 10993-5 (Iso, 2009)에 따라 5% CO₂의 습식 대기 및 37℃의 인큐베이터 내에서 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 DMEM 내에서 HDF 및 HaCaT 세포를 사용하여 확인하였다.

[0116] 항균 활성

[0117] Staphylococcus aureus (KCTC 1916)는 Korean Collection for Type Cultures (KCTC, Daejeon, Korea)에서, Staphylococcus epidermidis (KCCM 40003)는 Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM, Sudaemun Seoul, Korea)에서 수득하여, tryptic soy broth (TSB; Difco Laboratory Inc., Detroit, MI, USA)에서 밤새 배양하였다. 박테리아 세포 배양물을 TSB에 희석하여(1:100) 600 nm에서 0.05의 OD가 되게 하였다. 희석된 세포 배양물을 하이드로겔 시료를 포함하는 튜브에 넣고 24시간 동안 37℃에서 인큐베이션한 후, 세포 배양물을 멸균

TSB로 10-8 희석까지 계열희석하고 tryptone soya agar (TSA) 플레이트에 도말하였다. 그런 다음, 플레이트를 37℃에서 인큐베이션하여 콜로니가 형성되게 한 후 colony-forming units (CFUs)를 계수하였다.

<결과>

간접 및 직접 세포독성

상처를 치료할 때, 피부의 케라티노사이트 및 섬유아세포가 상처 드레싱과 직접적으로 접촉하게 된다. 이러한 이유로, 하이드로겔의 세포독성을 HDF 및 HaCaT 세포를 사용하여 ISO 10993-5 standards (Iso, 2009)에 따라 직접 및 간접 접촉 테스트로 평가하였다. 세포를 각 하이드로겔 시료의 용출액과 1일 또는 3일간 인큐베이션한 후 세포 생존도를 MTT assay로 분석하였으며, 그 결과 HDF 및 HaCaT 세포군 둘 다에서 약 100%의 세포 생존도를 보여 세포독성이 없음을 확인하였다. 또한, HDF 및 HaCaT 세포 및 하이드로겔 시료 사이의 직접 접촉 테스트를 통해 하이드로겔이 독성이 없으며, 살아있는 세포에 대해서는 FDA 형광염료를, 세포 핵에 대해서는 Hoechst 33342를 사용하여 명시야 하에서 관찰했을 때 대조 및 PVA 그룹에 비해 복합 하이드로겔 시료로 치료한 후 세포의 수가 증가함을 확인하였다. 종합하면, 세포독성 결과는 본 발명의 하이드로겔이 생체적합적이고 세포 성장을 촉진함을 나타냈다.

항균 활성

S. aureus 및 *S. epidermidis*에 대한 하이드로겔의 항균 활성을 평가하고 그 결과를 도 9에 나타냈다. 결과들은 *S. aureus* 및 *S. epidermidis* 콜로니가 복합 Pk-CaC 8:2 하이드로겔 처리 후 상당히 감소하였음을 보였다. Pk-CaC 8:2 하이드로겔은 대조군, PVA, 및 k-CaMA 그룹에 비해 병원균 둘 다의 CFUs 수 (~1.0 log CFU)를 상당히 감소시켰다(도 9의 A 및 B). TSA 플레이트 이미지는 *S. aureus* (도 9C) 및 *S. epidermidis* (도 9D) 콜로니의 수가 복합 Pk-CaC 8:2 하이드로겔로 처리 후에 상당히 감소함을 보였다. 이전 연구에서 키토산 및 이의 유도체 COS가 그람-양성 및 그람-음성 병원성 박테리아 둘 다에 항균 활성을 보임을 보고하였으며 (Jafari, Bernaerts, Dodi, & Shavandi, 2020; Khan, Lee, Pham, & Kim, 2019; Khan et al., 2020; Liaquat & Eltem, 2018), 이는 본 발명의 결과와 일치한다. 따라서, Pk-CaC 8:2 하이드로겔의 항균 활성은 COS의 존재에 의한 것으로 볼 수 있으며, PVA 및 k-Ca의 존재에 의해 항균 효과가 증가된 것일 수 있다. 하이드로겔이 상당한 항균 효과를 보였지만, 사용된 COS의 농도(1%)가 낮기 때문에 박테리아 세포를 완전히 박멸하지는 못했다. 하이드로겔에서 COS의 농도를 증가시키면 항균 특성을 증가시킬 수 있으나, 고농도의 COS의 사용시 하이드로겔의 물리적 기계적 특성이 약해지므로, 본 발명에서는 COS 농도를 1%로 한정하였다. 상기 결과에 근거하여, Pk-CaC 8:2 하이드로겔의 항균 활성이 감염된 상처 환경에서도 상처 회복을 가능하게 할 수 있다는 결론을 내렸다.

실험예 4. *In vivo* 동물 실험

In vivo 상처 치유 실험을 8주령 정상 수컷 ICR 마우스를 사용하여 실시하였다. 마우스는 그룹 당 6마리이며, 제어된 환경 (relative humidity: 40-70%, temperature: 20-24℃) 하에서 7일간 적응시킨 후 체중이 30g이었다. 등의 털을 면도하고, 포비돈-요오드 및 70% 에탄올로 피부 표면을 소독하였다. 5 mm 생검 펀치를 사용하여 등 표면에 피부 전층이 절개된 상처를 내고 에피덤, PVA, Pk-CaC 8:2 및 Pk-CaC 6:4으로 드레싱한 후 모든 그룹에 2차로 투명한 테가덤 및 거즈로 고정하였다. 모든 실험 과정은 마우스에게 이소프로판올 중의 20% 이소플루란을 흡입시켜 마취시킨 상태에서 실시하였다. 모든 실험군의 상처 봉합을 수술 후 0, 2, 4, 5, 7, 및 14일에 디지털 카메라로 촬영하고, 상처 봉합을 초기 상처 크기의 상대적 퍼센트로 표시하였다.

상처 부위 및 주위 조직을 수집하여, 절개된 조직 샘플의 조직학적 평가를 실시하였다. 상처 부위 및 주위 조직을 수집하여 10% 포르말린 용액에 고정한 후, 고정된 조직을 Leica TP1020 tissue processor (Leica Biosystems, Nussloch, Germany)를 이용해 알코올, 크실렌 및 침윤된 왁스를 연쇄적으로 사용하여 탈수시켰다. 그런 다음 조직을 파라핀으로 포매하여 5μm 두께로 절개하였다. 조직 섹션을 슬라이드에 올려놓고 알코올로 탈왁스 및 재수화시킨 후 핵을 헤마톡신으로 염색하였다. 과량의 헤마톡신을 세척하고 에오신으로 대조염색하였다. 그런 다음, 섹션을 등급 알코올로 100%로 적용하여 탈수하고, 크실렌으로 세척하였다. 염색된 조직 슬라이드를 봉입제를 사용하여 커버-슬립으로 덮어 조직을 보호하고 광학 현미경 (Leica Microsystems UK Ltd, Milton Keynes, UK)으로 촬영하였다.

<결과>**절개 상처-치유 모델**

8주령 ICR 마우스의 등쪽 피부에 전층 원형 절개 상처에 대해 P κ -CaC 8:2 및 P κ -CaC 6:4 하이드로겔의 상처-치유 특성을 평가하였다. 상처부위는 부상 후 규칙적으로 촬영하고 상처 및 흉터의 크기의 변화를 초기 상처 크기에 대비하여 평가하였다 (도 8A 및 B). 모든 그룹에서 상처의 재-상피화가 일어났지만, 상처 치유는 하이드로겔 처리군이 대조군에 비해 더 빨리 진행되었으며, 대조군에서는 남아있는 흉터도 더 두드러졌다. 대조군은 4일에 77.0%, 7일에 42.1%, 및 14일에 8.9%의 상처 크기를 보였으며, P κ -CaC 8:2 그룹에서는 65.0, 27.1, 및 5.2%, 에피덤 그룹에서는 58.6, 21.4, 및 4.9%의 상처 크기를 보였다. P κ -CaC 6:4 하이드로겔 상처 드레싱 그룹 또한 대조군 및 PVA 그룹에 비해 더 빨리 상처 봉합을 촉진시켰으며, 4일, 7일 및 14일에 각각 68.4, 29.4, 및 5.6%의 상처 크기를 보였는데, 이는 복합 하이드로겔 상처 드레싱이 기존에 보고된 리그닌-키토산-PVA (LCP) 복합 하이드로겔과 같이 상처 봉합을 가속화시킴을 나타내는 것이다. 대조군과 비교했을 때, LCP는 상처 봉합이 완료되는데 15일 걸리고, 키토산-PVA 드레싱 그룹은 중간 정도의 회복 속도를 보이는데, 이는 천연 고분자로서 키토산이 우수한 생물학적 활성 및 높은 체액 흡수 및 보유 능력을 가지고 있어 상처가 더 잘 치유되게 함을 나타내는 것이다. 상기 결과들은 복합 P κ -CaC 하이드로겔에서 상처 치유, 항균, 및 항산화물 비롯한 COS의 다양한 생물학적 활성 및 κ -Ca의 체액 흡수 능력이 상처 봉합 속도를 증가시켜 상처가 완전히 치유되는데 14일이 걸림을 제시하였다.

조직학적 특성화

상처 치유는 여러 중복되는 단계들로 구성된 복합 생리학적 공정이다: 지혈 및 염증, 과립화, 상처 수축, 콜라겐 형성, 상피화, 및 흉터 리모델링. 피부 조직 재생에서의 본 발명의 하이드로겔 효과를 평가하기 위해, 손상 후 14일째에 상처의 중심에서 조직의 조직학적 평가를 H&E 염색을 사용하여 실시하였다 (도 8C). 치료와 관계없이, 모든 그룹은 완전한 재-상피화를 보였으나, 흉터 및 리모델링된 조직에 있어서는 차이가 있었다. 대조군에서, 상처 영역은 완전히 상피화되었으나, 얇고 넓은 흉터 조직과 흉터 조직에 밀집된 모세혈관이 있었다. 이와 달리, PVA 그룹에서는 비교적 두꺼운 흉터 조직이 있으나 모세혈관은 더 적었으며, 이는 치료가 치유 과정을 증진시킴을 나타내는 것이다. 에피덤, P κ -CaC 8:2, 및 P κ -CaC 6:4 그룹에서는 더 많은 재-상피화, 더 적은 흉터 조직 및 조직 주위의 명백한 리모델링이 두드러졌다. 대조군 및 PVA 그룹과 달리, P κ -CaC 8:2 그룹은 피지샘, 땀샘, 모낭, 및 혈관이 적절히 분포된, 밀집되고 넓고 완전히 분화된 진피를 보였으며, 이는 복합 드레싱이 치유 과정을 개선시킴을 나타내는 것이다. 종합하면, 전층 상처의 더 빠른 상처 봉합, 완전한 재-상피화, 및 리모델링은 본 발명의 하이드로겔 상처 드레싱이 효과적인 상처 치유를 위한 적절한 환경을 제공함을 입증하는 것이다.

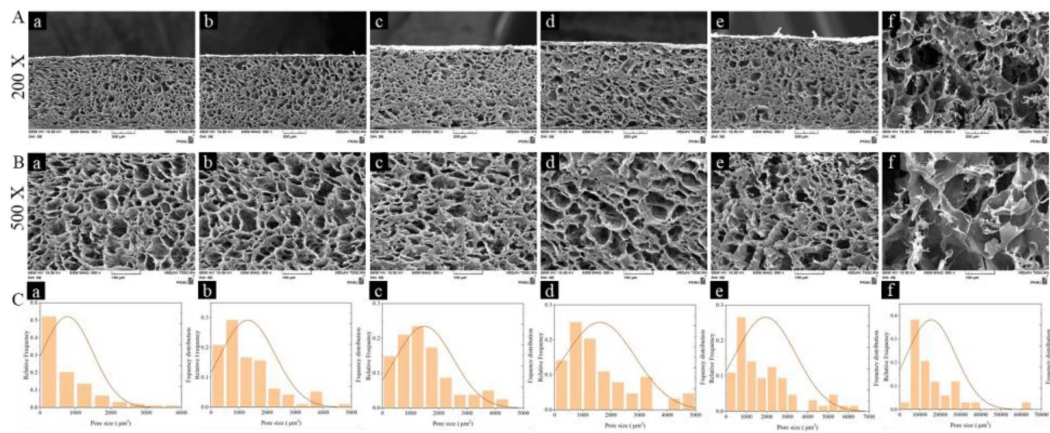
실험예 5. 통계 분석

모든 정량 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타냈으며, 신선한 시약을 사용하여 적어도 3회 개별 실험하였다. 그룹 당 유의차는 ANOVA 및 PASW Statistics 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하는 Duncan's test를 사용하여 평가하였다. 차이는 $p < 0.05$ 에서 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

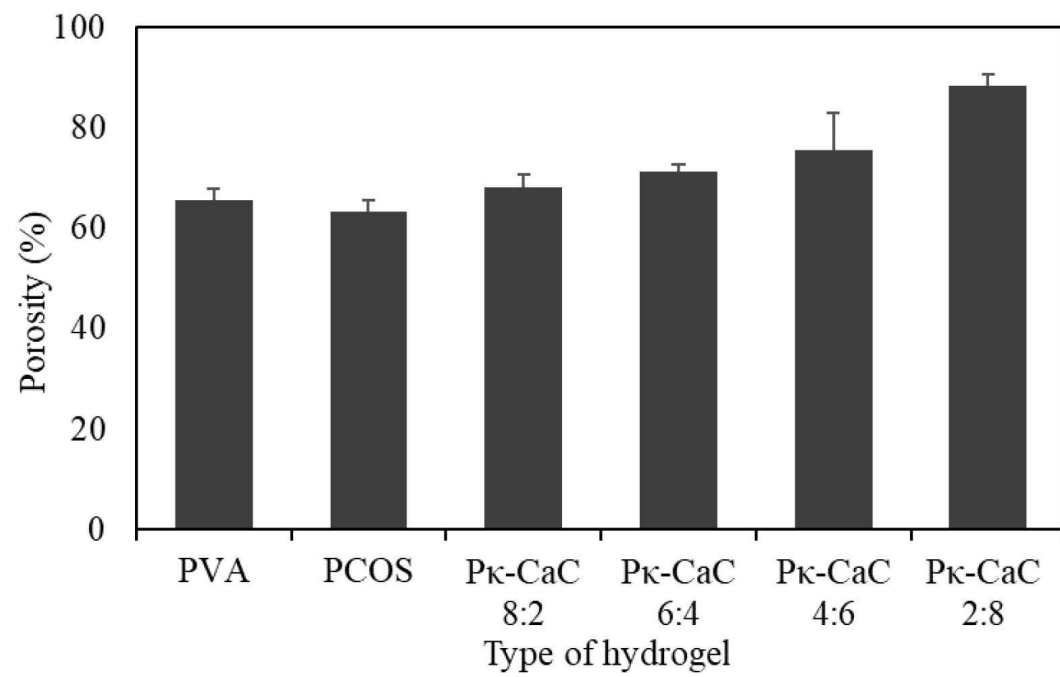
이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

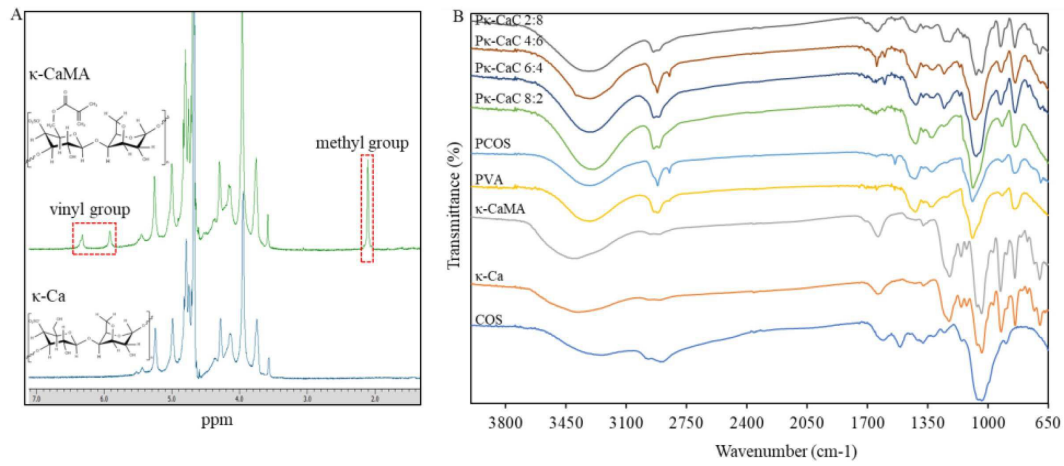
도면1



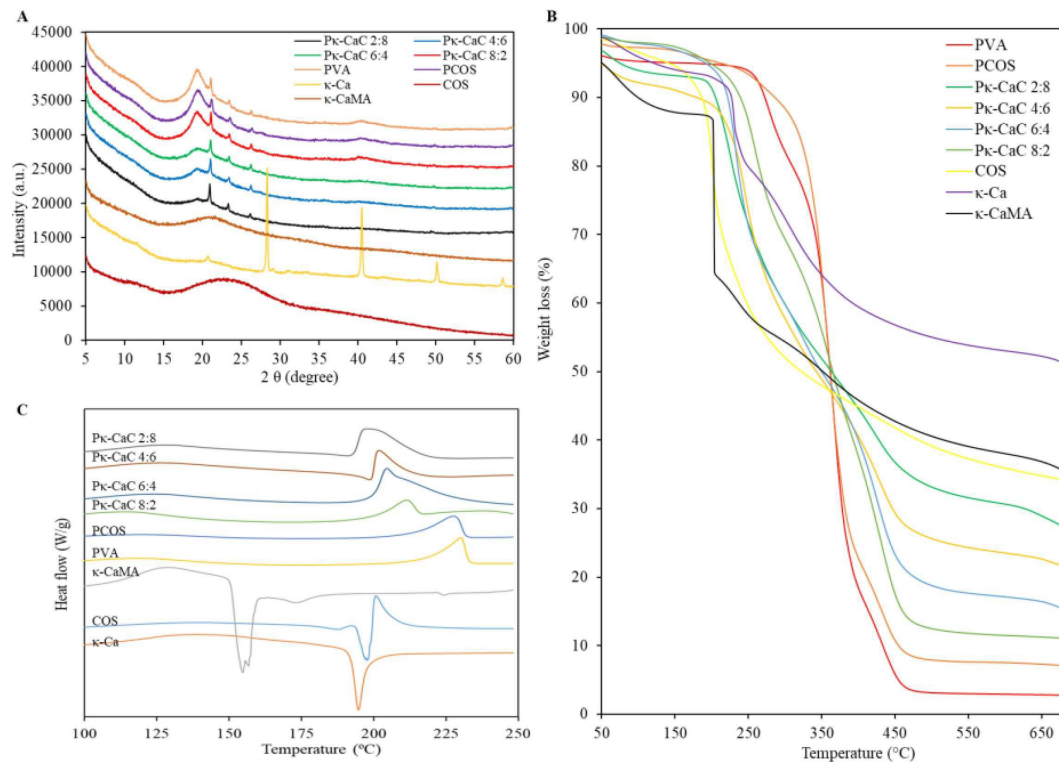
도면2



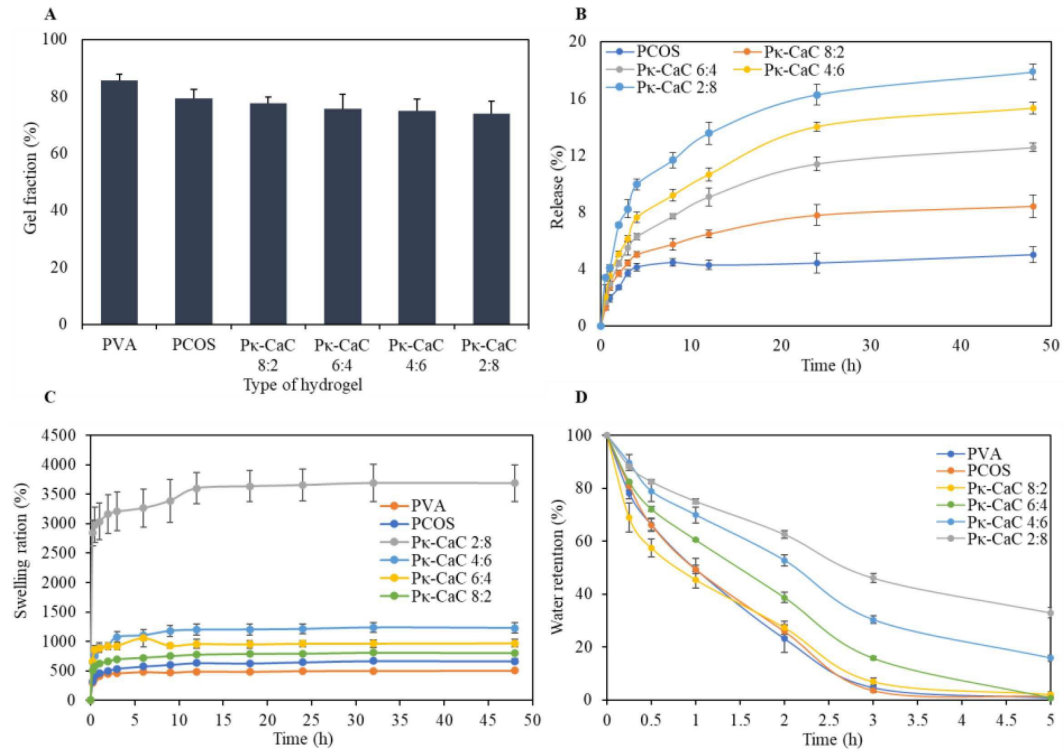
도면3



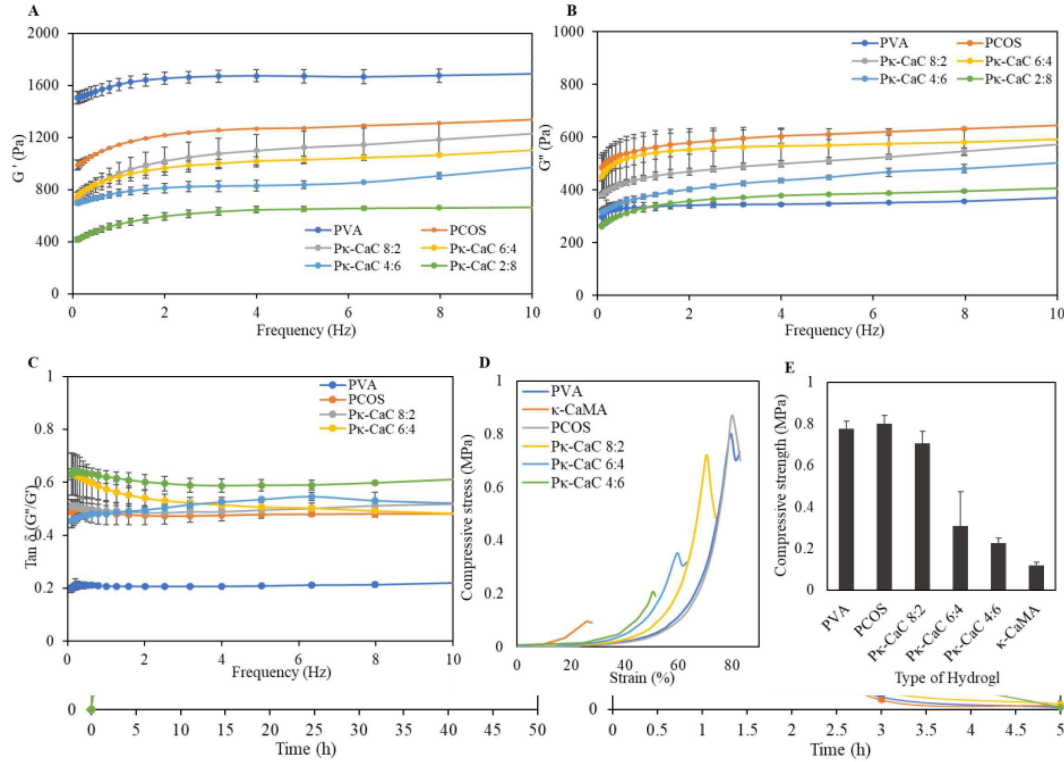
도면4



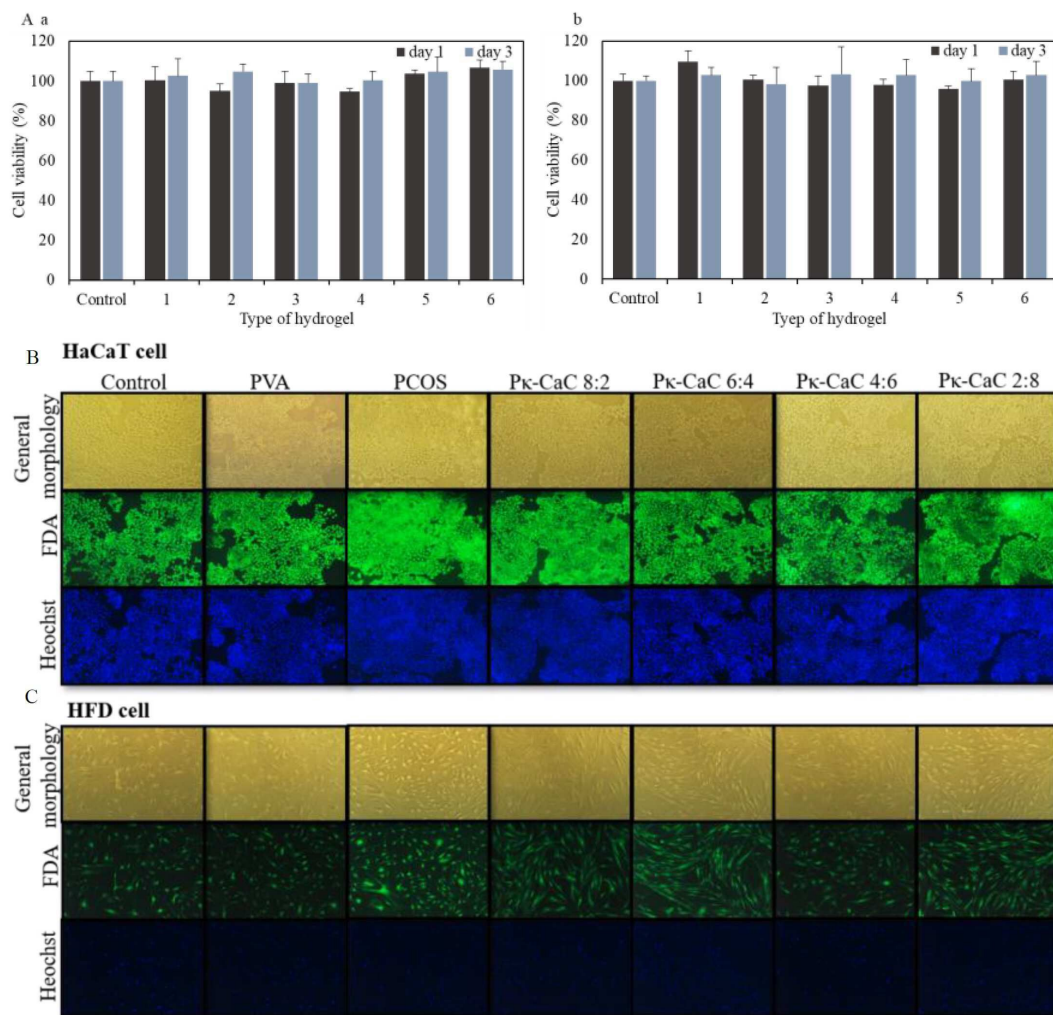
도면5



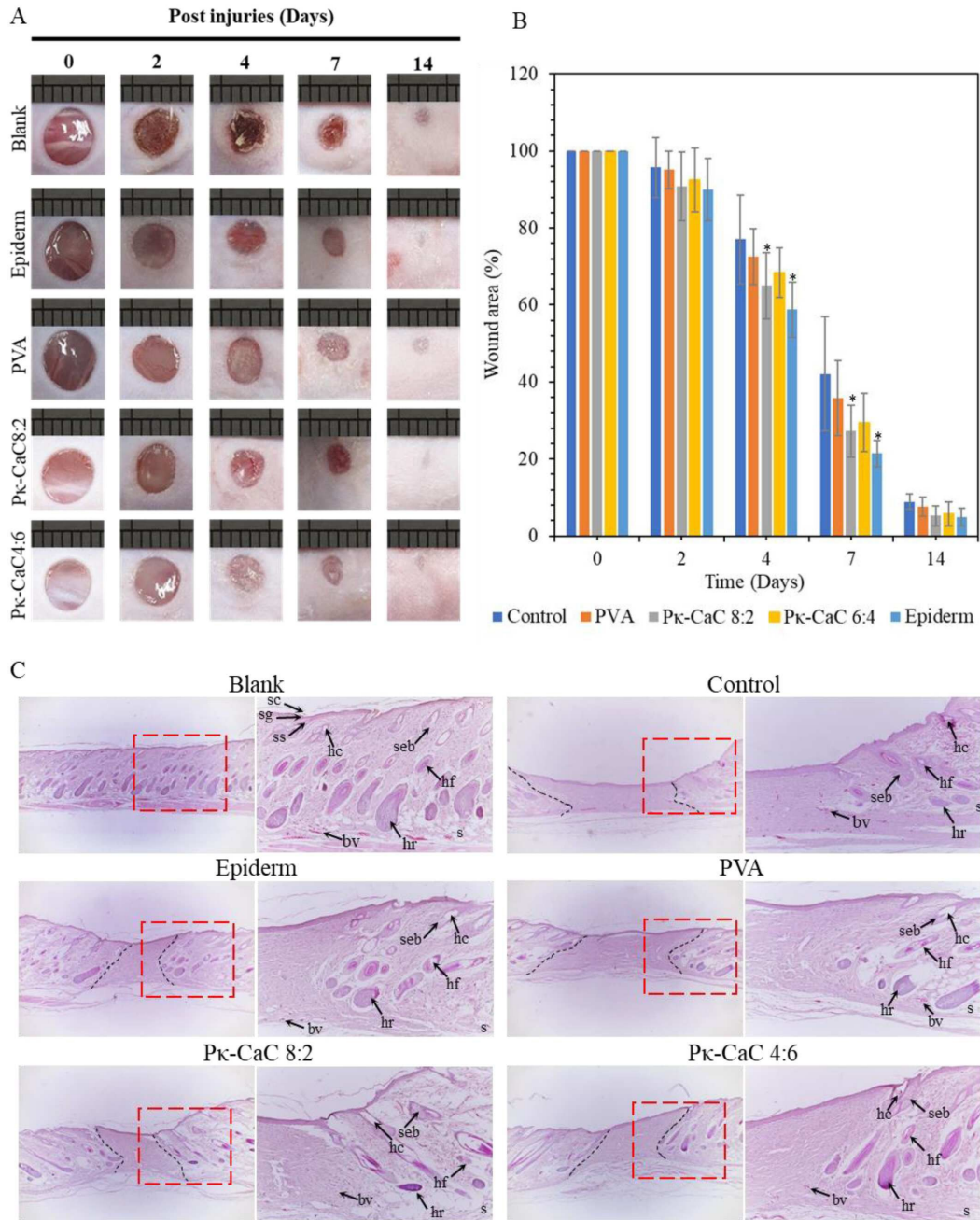
도면6



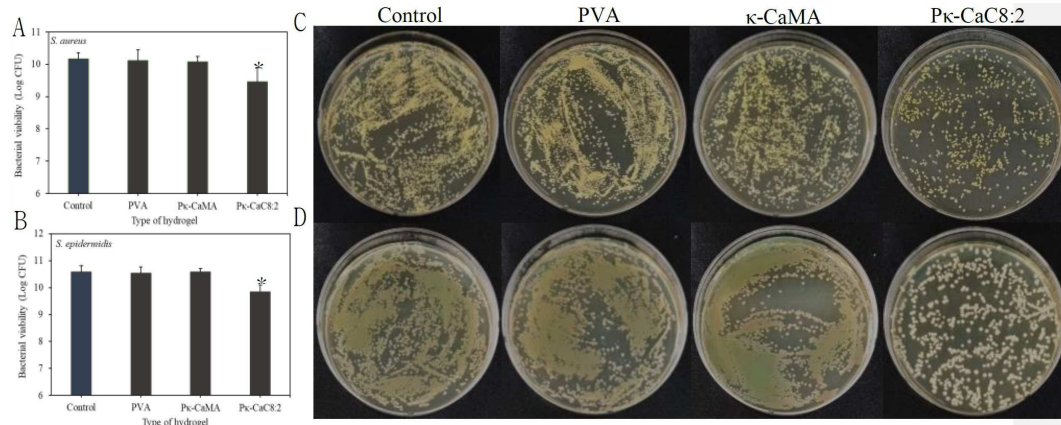
도면7



도면8



도면9



도면10

