(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0057168
(43) 공개일자 2023년04월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 24/10 (2006.01) *A61L 24/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61L 24/106 (2013.01)
A61L 24/0031 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0141280
(22) 출원일자 2021년10월21일
심사청구일자 2021년10월21일

(71) 출원인
청주대학교 산학협력단
충청북도 청주시 청원구 대성로 298 (내덕동)
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김소연
경상북도 김천시 용전1로 9, 101동 1101호(율곡동, 힐스테이트 율곡)
황유식
경기도 남양주시 별내3로 285, 1609동 1602호(별내동, 남양주 별내 아이파크)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김정수

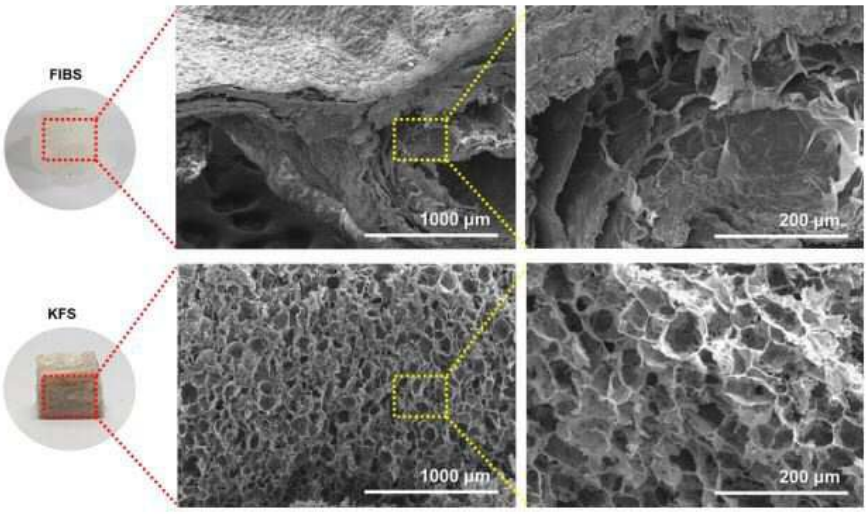
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔을 유효성분으로 포함하는 지혈제 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 케라틴과 피브리노겐이 결합되어 있는 케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔을 유효성분으로 포함하는 지혈제 조성물 및 케라틴과 피브리노겐이 결합되어 있는 케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔을 혈액의 지혈에 사용하는 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 상기 케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔을 포함하는 지혈제 조성물은 물리적인 작용을 통해 혈액응고 성분의 손실 없이 활성화되도록 도와 주는 역할을 한다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A61L 24/108 (2013.01)
A61L 2400/04 (2013.01)
(72) 발명자
안성영
서울특별시 중랑구 망우로36길 38, 506호(상봉동, 베스트엘리시온)
강현정
서울특별시 동대문구 회기로 161-11, 201호(회기동)
김우경
경기도 하남시 미사강변한강로 30, 102동 1902호(선동, 리버스위트칸타빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711104324
과제번호 2019R1F1A1061704
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 생애기본연구(기초연구)
연구과제명 구강의약품 및 치과재료의 생물학적 안전성/유효성 스크리닝을 위한 조직공학적 3차원 구강점막 조직모델 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 청주대학교산학협력단
연구기간 2019.06.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1415172614
과제번호 20008650
부처명 산업통상자원부
과제관리(전문)기관명 한국산업기술평가관리원
연구사업명 바이오산업핵심기술개발(R&D)
연구과제명 연조직 수복용 재조합 케라틴 단백질 바이오신소재 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 경희대학교산학협력단
연구기간 2020.04.01 ~ 2024.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

케라틴과 피브리노겐이 결합되어 있는 케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔을 유효성분으로 포함하는 지혈제 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 케라틴은 인모 유래인 것을 특징으로 하는 지혈제 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 케라틴과 피브리노겐이 3~6 : 1의 몰비로 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 지혈제 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 케라틴과 피브리노겐이 6 : 1의 몰비로 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 지혈제 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔을 상기 지혈제 조성물의 전체 중량 대비 0.01~50 중량% 포함하는 것을 특징으로 하는 지혈제 조성물.

청구항 6

케라틴과 피브리노겐이 결합되어 있는 케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔을 혈액의 지혈에 사용하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 케라틴은 인모 유래인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 케라틴과 피브리노겐이 3~6 : 1의 몰비로 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 케라틴과 피브리노겐이 6 : 1의 몰비로 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔을 유효성분으로 포함하는 지혈제 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 케라틴과 피브리노겐이 결합되어 있는 케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔을 유효성분으로 포함하는 지혈제 조성물 및 케라틴과 피브리노겐이 결합되어 있는 케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔을 혈액의 지혈에 사용하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 지혈제는 출혈은 수술이나 외과적 외상으로 인해 발생할 때 혈액의 지혈을 촉진시키는 의료용 재료를 말한다.

[0003] 통제되지 않는 출혈은 외상 후에 따르는 개인의 주요 사망 원인 중의 하나이다. 응고 시스템은 손상된 조직의 세포외 기질(ECM)의 기저에 혈소판이 부착(adhesion)되어 시작되는 1차 지혈과 후속적인 응고 캐스케이드의 활성화인 2차 지혈로 나눌 수 있다.

[0004] 지혈성 생체물질을 분류하는 몇 가지 방법이 있다. 제품의 종류에 따라 분말형, 미세 섬유형, 스펀지형, 부직포형, 사출형, 폴리머 또는 섬유형 제품이 주로 사용된다.

[0005] 케라틴은 모발 부속물에서 파생된 천연 단백질 그룹이다. 혈액 응고를 위해 가장 먼저 케라틴을 사용하는 것은 1500년대 한의학에서 열분해 모발이 출혈을 멈추는 데 사용되었다.

[0006] 종래의 케라틴 지혈성 생체물질에 관한 연구는 하이드로겔, 상업용 케라틴 드레싱 및 면 거즈와 같은 조직 복구에 사용되는 재료 플랫폼으로 제한된다.

[0007] 한편, 지혈성 생체물질 중 피브리노겐은 혈액 응고 및 창상 치유에 널리 사용되고 있으나, 피브리노겐 지혈제의 흡수율은 단일 물질이 상대적으로 낮아 지혈이 어렵다는 단점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2017-0007024호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 케라틴 결합 피브리노겐(KRT-FIB) 결합 지혈성 생체물질의 구조, 세포 거동 및 표면 형태를 평가하고, 혈액 흡수 및 종합적인 지혈 평가를 조사한 결과, 상기 케라틴 결합 피브리노겐이 구강 조직 재생에 적용할 수 있는 유망한 지혈성 생체물질임을 알아내고, 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔을 유효성분으로 포함하는 지혈제 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔의 지혈 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 케라틴과 피브리노겐이 결합되어 있는 케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔을 유효성분으로 포함하는 지혈제 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 구현예로 상기 케라틴은 인모 유래일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일 구현예로 상기 케라틴과 피브리노겐은 3~6 : 1의 몰비로 결합되어 있을 수 있다.

[0015] 본 발명의 일 구현예로 상기 케라틴과 피브리노겐은 6 : 1의 몰비로 결합되어 있을 수 있다.

[0016] 본 발명의 일 구현예로 상기 케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔을 상기 지혈제 조성물의 전체 중량 대비 0.01~50 중량% 포함할 수 있다.

[0017] 또한, 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 케라틴과 피브리노겐이 결합되어 있는 케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔을 혈액의 지혈에 사용하는 방법을 제공한다.

[0018] 본 발명의 일 구현예로 상기 케라틴은 인모 유래일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 구현예로 상기 케라틴과 피브리노겐은 3~6 : 1의 몰비로 결합되어 있을 수 있다.

[0020] 본 발명의 일 구현예로 상기 케라틴과 피브리노겐은 6 : 1의 몰비로 결합되어 있을 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 따른 케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔을 포함하는 지혈제 조성물은 물리적인 작용을 통해 혈액응고 성분의 손실 없이 활성화되도록 도와준다. 특히 케라틴은 혈소판 부착력을 활성화시켜 1차적인 지혈 효과를 가지면, 상기 부착 성분인 트롬빈과 피브리노겐은 생리적 지혈 과정 및 지혈의 마지막 단계이며, 조직을 고정시키는 역할을 한다.

[0022] 또한, 본 발명에 따른 케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔을 포함하는 지혈제 조성물은 피브린과 가교된 케라틴의 밀도가 환자의 상처 모양을 맞춤화하여 의료 환경에 적합한 드레싱을 창조해 내는 잇점을 갖는다.

[0023] 따라서, 본 발명에 따른 케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔을 포함하는 지혈제 조성물은 시술 전 사전 준비가 필요 없고, 시술 시간이 단축되며 감염을 최소화함으로써, 지혈 시간을 단축하고 치료비를 낮추는 잇점을 가지고 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 개발된 흡수성 KRT-FIB 생체물질의 유형에 따른 지혈제의 개략도를 나타낸 것이다.

도 2는 GPC를 통해 케라틴과 피브리노겐 사이의 화학반응에 의한 모발 케라틴-피브린(KF)의 형성을 확인한 결과를 나타낸 것이다. 도 2의 a는 케라틴(KRT), 피브리노겐(FIB) 및 케라틴-피브리노겐(KF)의 결과를 나타낸 것으로서, KFS의 TGA 분석은 FIB보다 약간 더 높은 열적 안정성을 보였다. 도 2의 b는 KRT, FIB 및 KF 전구체의 TGA 다이어그램을 나타낸 것으로서, 각 화살표는 주요 체중 감소가 시작되는 온도를 나타낸다.

도 3은 다른 배율에서 KFS-6 및 FIBS의 디지털 사진 및 SEM 이미지(스케일 바 = 각각 1000㎛ 및 200㎛)를 나타낸 것이다.

도 4는 KFS 지혈성 생체물질과 상용 제품(Taqhosil®)의 흡혈 사진 및 접촉각을 나타낸 것이다.

도 5는 Tachosil®과 비교한 KFS의 종합적인 지혈 평가 결과를 나타낸 것이다. 도 5의 a는 혈액 응고 테스트, 도 5의 b는 대조군 및 시료군의 BCI, 도 5의 c는 대조군과 시료의 흡수율, 도 5의 d는 지혈 효율 대조군 및 시료군이고며, 모든 통계 데이터는 평균±표준편차(n = 3, P < 0.005)으로 표시된다.

도 6의 a 및 도 6의 b는 캡슐화된 HDF 세포의 살아있거나 죽은 염색 이미지(스케일 바 = 200 ㎛)을 나타낸 것이고, 도 6의 c 및 도 6의 d는 3일간의 실험후 DAPI/Phalloidin(F-액틴) 염색으로 표지된 캡슐화된 HDF 세포의 공초점 사진(스케일러 바 = 50 ㎛)을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명의 제1 구현예는 케라틴과 피브리노겐이 결합되어 있는 케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔을 유효성분으로 포함하는 지혈제 조성물을 제공한다.

[0026] 일반적으로 천연고분자를 이용한 지혈성 생체물질은 세포 및 주변 조직과 생체적합성이 매우 높고, 염증이 덜하다. 그 종류로는 젤라틴, 알부민, 셀룰로오스, 히알루론산, 피브리노겐, 알지네이트, 키토산을 포함한다.

[0027] 특히, 피브리노겐은 혈관 신생 및 뼈 재생의 조절에서 핵심 단백질이다. 전형적으로 피브린(fibrin) 지혈제는 트롬빈에 의해 생성되며, 피브리노겐은 트랜스글루타미나제 인자 XIII와 칼슘 이온이 피브린을 형성한다.

[0028] 지혈 효과를 지속적으로 충분히 발휘하기 위해서는 다양한 종류의 시트 및 거품 제형이 요구된다. 지혈 제품의 경우 콜라겐, 트롬빈, 젤라틴, 셀룰로오스 및 복합 제형이 개발되고 있다.

[0029] 그러나, 모발 케라틴과 피브리노겐이 가교되는 지혈 성분이나 제형은 없다. 따라서 피브리노겐 지혈제의 흡수율은 단일 물질이 상대적으로 낮아 지혈이 어렵다는 단점이 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 피브리노겐과 케

라틴으로 흡수력이 향상되었다.

[0030] 여기에서 본 발명자들은 섬유소 구조의 변화를 확인하고, KRT-FIB 지혈제의 구조적 특성을 평가하였다. 본 발명자들은 지혈 효능을 테스트하기 위하여 높은 흡수성과 표면 친수성을 가지고 있어서 모세관 네트워크 형성을 통한 시너지 효과로 창상 치유를 촉진하는 임상적으로 관련된 혈액 공급원을 사용하였다.

[0031] 또한, 본 발명은 시판되는 피브리노겐 결합 Tachosil®의 비교를 통하여 혈액 응고와 혈소판의 상호 작용에 대한 통찰력을 제공한다. 따라서 본 발명은 환자의 통증 및 치료비를 낮추고, 회복 시간을 줄이기 위해 개발된 흡수 가능한 인간의 모발 케라틴-피브리노겐 지혈제에 대해 설명한다.

[0032] 본 발명에서는 혈액 응고를 촉진하는 케라틴과 피브린 고분자에 의해 가교된 신규 흡수성 시트 및 거품 타입의 케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔(KRT-FIB) 지혈제(KFS)가 개발되었다(도 1).

[0033] 케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔 지혈제의 친수성 표면 형성을 위하여, 인간의 모발 유래 케라틴 단백질은 손쉬운 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드(EDC) 반응을 통하여 FIB 단백질과 공유 결합되어 있다.

[0034] 생성된 KRT-FIB 전구체(KF 전구체)는 THR의 존재하에 가교 결합되어 다공성 KFH 하이드로겔을 형성한다. KRT : FIB의 몰비가 6:1인 KFS 지혈성 생체물질이 혈액 흡수 측정에 의해 최적화되었고, KFS 지혈성 생체물질의 응고력 및 표면 형태가 조사되었다.

[0035] 우수한 흡수력, 혈액응고, 낮은 용혈률은 흡수성 KFS 지혈제가 높은 임상적 응용성과 함께 창상 치유를 위한 유망한 플랫폼임을 나타낸다.

[0036] 본 발명의 제1 구현예에 따른 상기 지혈제 조성물에서, 상기 케라틴은 인모 유래일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명의 제1 구현예에 따른 상기 지혈제 조성물에서, 상기 케라틴과 피브리노겐은 3~6 : 1의 몰비로 결합되어 있을 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명의 제1 구현예에 따른 상기 지혈제 조성물에서, 상기 케라틴과 피브리노겐은 6 : 1의 몰비로 결합되어 있을 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명의 제1 구현예에 따른 상기 지혈제 조성물은 상기 케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔을 상기 지혈제 조성물의 전체 중량 대비 0.01~50 중량%, 바람직하게는 0.1~20 중령%, 보다 바람직하게는 1~10 중량% 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명의 제1 구현예에 따른 상기 케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔을 포함하는 지혈제 조성물은 약제약학적으로 허용되는 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0041] 상기 희석제로는 약제학적으로 허용되는 수성 유체, 예를 들어 약제학적인 등급의 탈이온수 또는 특정 이온 및/또는 완충제를 함유한 약제학적인 등급의 수용액이다.

[0042] 본 발명의 제1 구현예에 따른 상기 케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔을 포함하는 지혈제 조성물은 부형제를 더 포함할 수 있는데, 상기 부형제로는 인간 알부민, 만니톨 및 아세트산 나트륨을 예로 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0043] 본 발명의 제1 구현예에 따른 상기 케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔을 포함하는 조혈제 조성물은 안정화제를 더 포함할 수 있는데, 상기 안정화제로는 아스코르브산, 아스코르브산 나트륨, 아스코르브산의 기타 염, 또는 산화방지제를 예로 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 또한, 본 발명은 제2 구현예로 케라틴과 피브리노겐이 결합되어 있는 케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔을 혈액의 지혈에 사용하는 방법을 제공한다.

[0045] 본 발명의 제2 구현예에 따른 상기 방법에서, 상기 케라틴은 인모 유래일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명의 제2 구현예에 따른 상기 방법에서, 상기 케라틴과 피브리노겐은 3~6 : 1의 몰비로 결합되어 있을 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0047] 본 발명의 제2 구현예에 따른 상기 방법에서, 상기 케라틴과 피브리노겐은 6 : 1의 몰비로 결합되어 있을 수 있

으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0048] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] <실시예>

[0051] **1. 재료 및 방법**

[0052] **(1). 인모 케라틴 재료 추출**

[0053] KRT 단백질은 인모 케라틴(human hair keratin)에서 추출되었다 인모 시료(50g)를 세척하고 70%(v/v) 에탄올과 증류수로 철저히 수세하였다. 수세한 머리카락을 클로로포름과 메탄올(2:1; v/v)의 혼합물에 24시간 동안 담가서 지질을 제거한 후 공기로 건조시켰다. 이전에 공지된 방법에 따라 인모 케라틴을 추출하였다.

[0054] 간단히 말해서, 탈지된 모발에 37℃에서 24시간 동안 2%(v/v) 과아세트산(Sigma)을 처리한 후, PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 다음, 300rpm에서 교반하면서 72시간 동안 5%(v/v) 2-메르캅토에탄올, 5M 우레아, 2.6M 티오우레아 및 25mM Tris pH 8.5를 함유하는 Shindai 용액으로 모발(20g)을 처리하였다.

[0055] 생성된 혼합물을 4,500g로 20분간 원심분리한 후, 상등액을 2.5μm의 공극을 갖는 여과지로 여과하였다. 5,5'-dithio-bis 138(2-nitrobenzoic acid)(DTNB) 방법(Ellman 시약)을 사용하여 투석액에서 2-머캡토에탄올이 검출되지 않을 때까지 얻어진 용액을 12-14 kDa 컷오프 투석막(Spectra/Por®)을 사용하여 투석하였다.

[0056] 얻어진 용액을 동결건조하여 케라틴 분말을 얻었다. 인간 혈장 피브리노겐(FIB)(Merckmillipore, USA) 및 인간 플라즈마 트롬빈(THR) (Calbiochem, USA)을 사용하여 피브린 겔을 제조하였다.

[0057] Dulbecco의 인산염 완충 식염수(DPBS)는 Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA, USA)에서 입수하였다. 카르보디이미드/N-히드록시숙신이미드(EDC/NHS), 트리스 완충 식염수(TBS), 수산화나트륨(NaOH), 염화칼슘($CaCl_2$)은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 혈액은 Innovative Research(USA)에서 구입하였고, Tachosil®은 (Baxter, USA)에서 구입하였다.

[0059] **(2). 계측 및 분석**

[0060] 일련의 KRT-FIB 전구체(KF 전구체)의 열적 특성 및 상응하는 하이드로겔(KFH 하이드로겔)은 질소 가스 흐름 및 온도 범위 20~600℃, 10℃/min의 가열 속도 하에서 열중량 분석(TGA, SDT Q600, TA Instruments, USA)으로 결정되었다.

[0061] 금 코팅된 주사 전자현미경(SEM, S-4700, Hitachi, Japan)으로 하이드로겔의 형태를 관찰하였다. Waters 2414 굴절률 검출기, HPLC 펌프 및 3개의 연속 Styragel® 컬럼으로 장착된 겔 침투 크로마토그래피(GPC)를 사용하여 분자량 분포를 결정하였다. 용리액은 1mL/min 유속의 PEO이었다.

[0063] **(3). KRT 단백질의 석시닐화(KRT-COOH)**

[0064] 50mM PBS(pH 6-7) 100mL에 녹인 KRT(200mg) 용액에 PBS에 용해된 무수물 숙신산 25mg을 적가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 1시간 및 증류수(DW)에 대해 4시간 동안 교반하였다. 정제된 KRT-COOH을 동결 건조하고 나중에 사용할 때까지 -20℃에서 보관하였다.

[0066] **(4). EDC/NHS 커플링을 통한 KRT-FIB 전구체(KF 전구체)의 합성**

[0067] 일련의 KRT-FIB 전구체(KF 전구체)를 합성하기 위하여, 다른 양의 KRT-COOH(0, 5, 10, 30, 60 mg)가 EDC/NHS의 존재하에 활성화되었다. 먼저 EDC 19.25mg을 100mL PBS 중 KRT-COOH의 용액에 첨가하였다. 그런 다음 상기 혼합 용액에 22 mg의 설포-NHS를 첨가하고 실온에서 15분간 교반하였다. 62.5 μL의 2-메르카포에탄올을 적가하였다.

[0068] 이어서, 10X PBS(5ml)을 첨가하여 생성된 혼합물의 pH를 7.0으로 조정하고, FIB 100mg을 실온에서 교반하면서

상기 혼합 용액에 첨가하였다. 반응을 2시간 동안 진행시키고 Tris를 첨가하여 퀜칭하였다.

[0069] 1N NaOH를 첨가하여 상기 퀜칭된 용액의 pH를 8.0으로 증가시켰다. 생성된 KF 전구체 용액을 MWCO=25,000g/mol인 투석막(Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA, USA)에 놓고 3일간 투석하였다. 그런 다음 정제된 KF 전구체를 동결건조하고, 나중에 사용할 때까지 -20℃에서 보관하였다.

[0071] **(5). KRT-FIB 지혈성 생체물질(KFS)의 제조**

[0072] 상이한 KRT 함량(KF-1, 3, 6)을 갖는 상응하는 KF 전구체(KF-1, 3, 6)를 사용하여 일련의 KRT-FIB 지혈제(KFS-1, 3, 6)를 제조하였다. 우선 각 KF 용액 전구체(20mg/mL), THR(10IU/mL) 및 $CaCl_2$(2.5mg/mL)를 준비하였다.

[0073] 상기 두 물질을 섞은 후 -70℃에서 동결 건조하였다. 대조군으로 FIB 지혈제를 상기 FIB 용액(20 mg/mL)과 동일한 방법에 따라 제조하였다.

[0075] **(6). 접촉각 측정**

[0076] 접촉각 측정은 주변의 온도(22-25℃) 및 상대 습도(20-40%)에서 VCA Optima XE로 수행되었다. 교차 오염을 방지하기 위하여 각 시험 액체에 대해 전용의 시험용 주사기를 사용하였다. 2 μL의 액체 방울이 주사기의 끝부분에 형성되어 시료 표면에 조심스럽게 증착되었다.

[0077] 주사기를 빼내고, 전하가 결합된 카메라에 의해 3초 이내에 액침(liqiud depostion)의정지 접촉각 이미지를 촬영하였다. 공급업체에서 제공한 소프트웨어로 접촉각을 계산하였다. 보고된 접촉각 값은 5-8 반복에 근거한다.

[0079] **(7). 혈액 응고 지수**

[0080] 혈액 응고 지수(BCI)는 Shih et al.에 의해 수정된 방법에 따라 수행되었다. 먼저 FIBS, KFS, Tachosil® 지혈제를 1.0 × 1.0 × 0.1 cm^3 입방체로 잘라 바이알에 넣고, 37℃에서 5분 동안 예열하였다.

[0081] 두번째로, 200μL의 혈액을 즉시 드레싱에 떨어뜨렸다. 세번째로 시료를 37℃에서 2분 동안 배양한 후, 총 50mL의 탈이온수를 첨가하고 50rpm에서 10분 동안 흔들어 clot에 달라붙지 않은 적혈구(RBC)를 용해시켰다.

[0082] 생성된 헤모글로빈 용액 시료의 흡광도는 Jasco V-630 분광광도계(Jasco Company, JPN)으로 540 nm에서 측정되었다. 5.0mL의 탈이온수 중의 200μL의 응고된 전혈(whole blood)의 흡광도를 비교로 사용하였다.

[0083] 마지막으로 하기 식을 사용하여 FIBS, KFS, Tachosil® 시료를 계산하였다.

[0084] $$BCI = \frac{A_{smple}}{A_{smple}} \times 100\%$$

[0086] **(8). 세포 생존력(cell viability)**

[0087] Live/dead 분석을 사용하여 캡슐화된 HDF 세포의 생존 가능성을 조사하기 위하여 Live/dead assay가 사용되었다. 시료의 캡슐화 직후 및 3일 후 배양후의 시료를 37℃에서 30분 동안 calcein-AM/ethidium homodimer 용액에서 배양하였다.

[0088] calcein-AM/ethidium homodimer Live/dead assay를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 세포 생존력을 정량화하였다. 세포 형태는 형광 현미경(IX71; Olympus Life Life Science; Tokyo, Japan)을 사용하였다.

[0090] **(9). 공초점 레이저 스캐닝 현미경(CLSM)**

[0091] HDF 세포를 지혈성 생체물질에 접종하였다. 3일 배양 후 캡슐화 세포를 고정하고, rhodamine-phalloidin (Invitrogen) 및 2-(4-아미디노페닐)-1H 인돌-6-카르복사미딘(DAPI)으로 염색하여 F-액틴 필라멘트와 세포 핵을 각각 시각화하였다.

[0092] Airyscan 2(Carl Zeiss, Jena, Germany)와 함께 LSM 980을 사용하여 형광 이미지를 얻었다. 40x 대물렌즈와 슬라이스 두께 및 총 두께 205㎛를 가진 침지 렌즈로 imaging setup을 측정하였다.

[0093] 형광 방출 강도를 사용하여 전체 부피의 하이드로겔 이미지를 얻고, 이미지 가공 소프트웨어((ZEN black software, Germany)를 사용하여 3D 볼륨으로 결합시켰다.

[0095] **(10). 통계 분석**

[0096] 통계 분석은 유의성을 위한 Tukey's post-hoc analysis와 함께 일원 분산 분석(ANOVA)에 의해 수행되었다. 0.05보다 작은 p-값은 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. 레올로지 및 이미지 분석을 위하여, Origin(Origin Software, San Diego, CA)에서 통계적 유의성을 분석하였다.

[0098] **2. 실험 결과**

[0099] **(1). KRT-FIB 전구체(KF)의 합성**

[0100] 인간의 모발 유래 KRT 단백질은 먼저 석시닐화되어 말단 작용기로 카르복실산을 도입한다. 생성된 KRT-COOH의 카르복실기는 EDC/NHS 반응을 통해 FIB 상의 아민기에 결합을 가능하게 한다.

[0101] KRT와 FIB의 다양한 몰비로 일련의 KF 전구체를 제조하고, KRT:FIB가 1:1, 3:1 및 6:1 몰비인 KF-1, KF-3 및 KF-6으로 약칭하였다.

[0102] GPC 분석은 피브리에 대한 최대의 케라틴 조성비가 6:1로 측정되었고, 합성된 폴리머의 분자량이 변한다는 것을 보여주었다(도 2의 a 참조). 반응 중 KT 전구체의 분자량의 변화를 연구하기 위하여 GPC 분석이 수행되었다(도 2 a 참조).

[0103] 열분석을 통한 열안정성 분석: 피브리노겐, 케라틴, 케라틴-피브리노겐, 5mg의 비교 물질 및 5mg의 시료를 각각 알루미늄 셀에 넣고, 50ml/min으로 흘려보냈다. 동일한 조건으로 비교 물질과 시료의 온도를 변화시켜 실온에서 600℃까지 분당 10℃로 가열하였다. 물질의 온도 차이를 계속적으로 측정하고, 두 물질의 온도 변화에 따른 중량 손실 변화를 비교하였다.

[0104] 실온에서 600℃까지 열을 가하고, 두 물질을 비교하고 측정하였다. 결합된 KFS가 더 고열에서 변화하는 안정적인 구조적 특성을 가지는 것으로 나타났다(도 2의 b 참조).

[0106] **(2). 최적화된 중량비를 갖는 KFS-6의 생체물질 구조 및 흡수 특성**

[0107] SEM 이미지는 비다공성인 FIBS와 비교하여 KFS가 10~100㎛ 직경의 고다공성 구조(>95% 공극율)를 갖는다는 것을 보여준다(도 3 참조). 이러한 결과는 KFS 지혈성 생체물질의 흡수율은 지혈제의 다공성 형태에 크게 의존한다는 것을 나타낸다.

[0108] 기공 구조 및 기공 표면의 주사전자현미경 사진은 케라틴 결합 지혈제가 기존의 피브린 지혈제보다 균일한 기공을 갖는 내부 구조를 발달시킨다는 것을 보여주었다.

[0110] **(3). 최적화된 제형을 갖는 흡수성 KFS의 특성화**

[0111] 표면의 접촉각을 측정하여 혈액 흡수능을 평가하였다. 도 4에서 보는 바와 같이, 케라틴의 가교 몰비가 낮을수록 접촉각이 낮아졌고, 특히 KFS-6 시료에서 53.96° ±1.1° 로 낮았다.

[0112] 이러한 우수한 친수성과 흡수성은 지혈제를 사용하여 출혈을 멈추고 창상 치유를 촉진하는데 도움이 된다.

[0113] 최적화된 KFS-6 지혈제는 우수한 것으로 입증되었다. 개발된 지혈제는 친수성 표면으로 변형되어 액체를 흡수하는 특성을 개선하고, 혈소판, 적혈구 및 출혈 부위의 혈액 내 응고 인자는 상처 부위에 응집된다.

[0115] **(4). 최적화된 제형을 갖는 KFS의 인 비트로 지혈 및 생체적합성**

[0116] 최적화된 KFS-3 및 KFS-6 시료는 우수한 것으로 입증되었다. 2분 이내에 혈액이 완전히 응고되었다(도 5의 a 참조). 기존의 지혈 제품의 지혈 성능을 평가하는 방법으로서, 응고시간은 돼지와 같은 대형동물의 모델이나 혈액을 이용하여 측정되었다.

[0117] 따라서, 동물 모델은 혈액 응고 및 피브린 분해에 관한 연구에 널리 사용된다. 본 발명에서, 구연산 나트륨이 보충된 돼지 혈액이 지혈능을 평가하기 위하여 사용되었다.시험받은 지혈제 Tachosil®보다 용혈 지수가 낮았고, 케라틴 가교 밀도에 의존적이었다(도 5의 c 참조).

[0118] KFS는 실제로 더 우수한 지혈 특성을 제공하였다(도 5의 d 참조). 이것은 표면에 다공성 구조를 형성허고 흡수를 증가시키며 보다 우수한 접촉을 제공하는 것에 의해 다른 시험받은 Tachosil®보다 케라틴이 혈소판 응고에 더 효과적이라는 것을 보여준다(도 5의 f 참조).

[0119] 따라서, 이러한 발견은 새로운 지혈 재료 개발을 위한 잠재적인 미래의 방향을 열어준다.

[0121] **(5). 케라틴 결합 피브린 지혈제 세포독성 연구에서의 HDF 생존력**

[0122] 지혈성 생체물질은 인체 체액과 직접 접촉하는 의료용 재료이고, 세포독성 시험을 통한 생물학적 안전성의 검증이 필수적이다. 인간 진피 섬유아세포(HDF)의 배양 환경에서 지혈성 생체물질의 세포 독성을 정성적으로 평가하였다(도 6 참조).

[0123] FIBS, 2.5 mg/mL $CaCl_2$ 및 10 unit/mL 트롬빈을 함유하는 KFS 지혈제에 봉입된 세포는 배양 48시간 이후에서도 높은 생존력을 보였다.

[0125] **3. 결론**

[0126] 본 발명에 따른 지혈제 조성물의 유효성분인 케라틴과 피브리노겐이 결합되어 있는 케라틴 결합 피브리노겐 하이드로겔은 흡수 및 지혈 특성이 개선되었으며, 강도는 선행기술에서 연구된 피브린 지혈성 생체물질보다 훨씬 우수하고, 다양한 크기와 모양을 가지고 있다.

[0127] 본 발명에 따른 지혈제 조성물은 주로 조직 결합에 관여하고, 물리적인 작용을 통해 혈액응고 성분의 손실 없이 활성화되도록 도와준다. 특히 케라틴은 혈소판 부착력을 활성화시켜 1차적인 지혈 효과를 가지면, 상기 부착 성분인 트롬빈과 피브리노겐은 생리적 지혈 과정 및 지혈의 마지막 단계이며, 조직을 고정시키는 역할을 한다.

[0128] 또한, 본 발명에 따른 지혈제 조성물은 피브린과 가교된 케라틴의 밀도가 환자의 상처 모양을 맞춤화하여 의료환경에 적합한 드레싱을 창조해 내는 잇점을 갖는다.

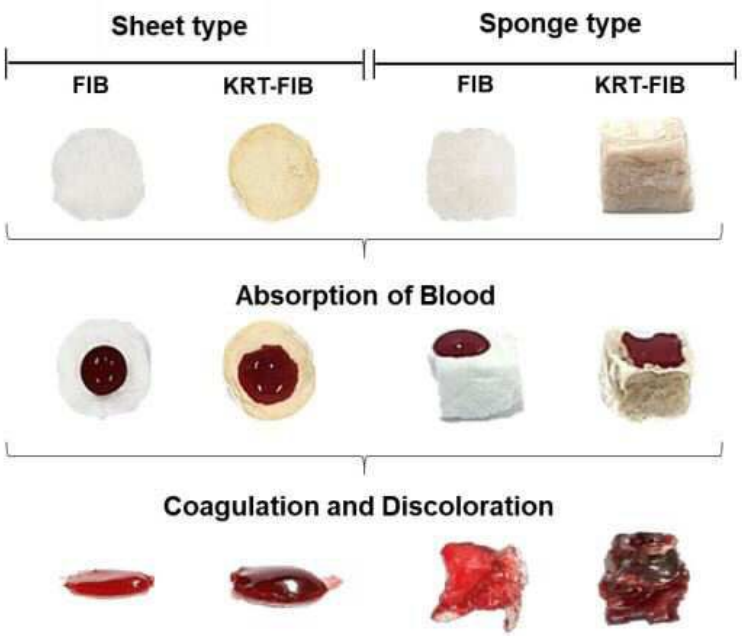
[0129] 따라서, 본 발명에 따른 지혈제 조성물은 시술 전 사전 준비가 필요 없고, 시술 시간이 단축되며 감염을 최소화함으로써, 지혈 시간을 단축하고 치료비를 낮추는 잇점을 가지고 있다.

[0131] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다.

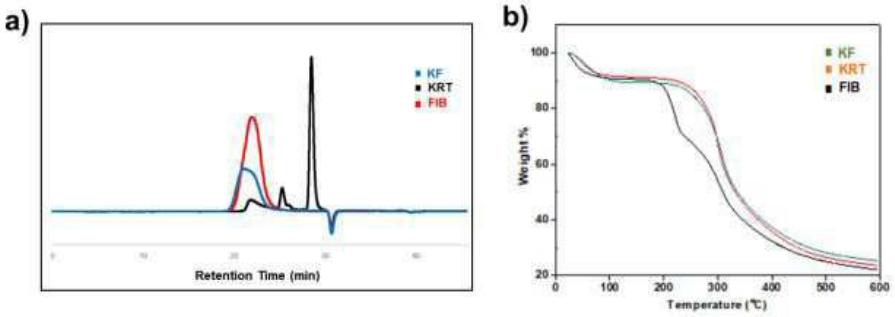
[0132] 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다. 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 용이하게 이용될 수 있으며, 이러한 변형이나 변경은 모두 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.

도면

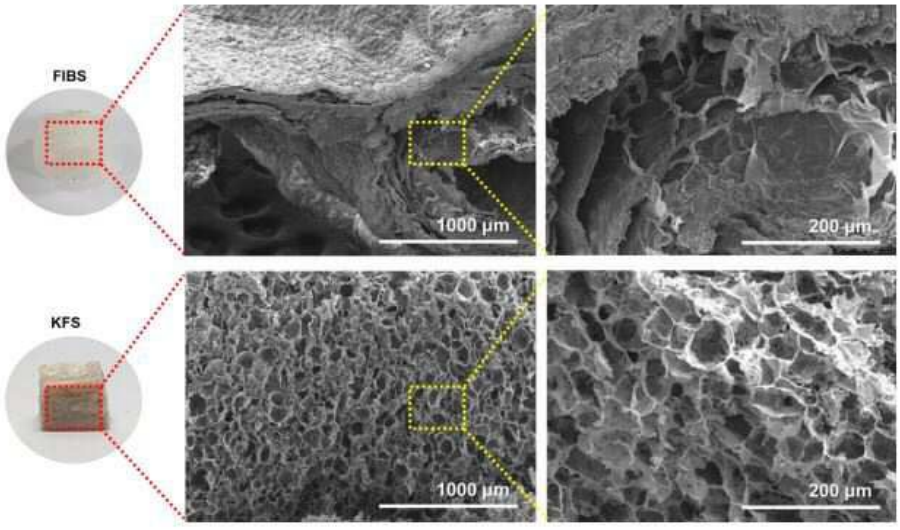
도면1



도면2



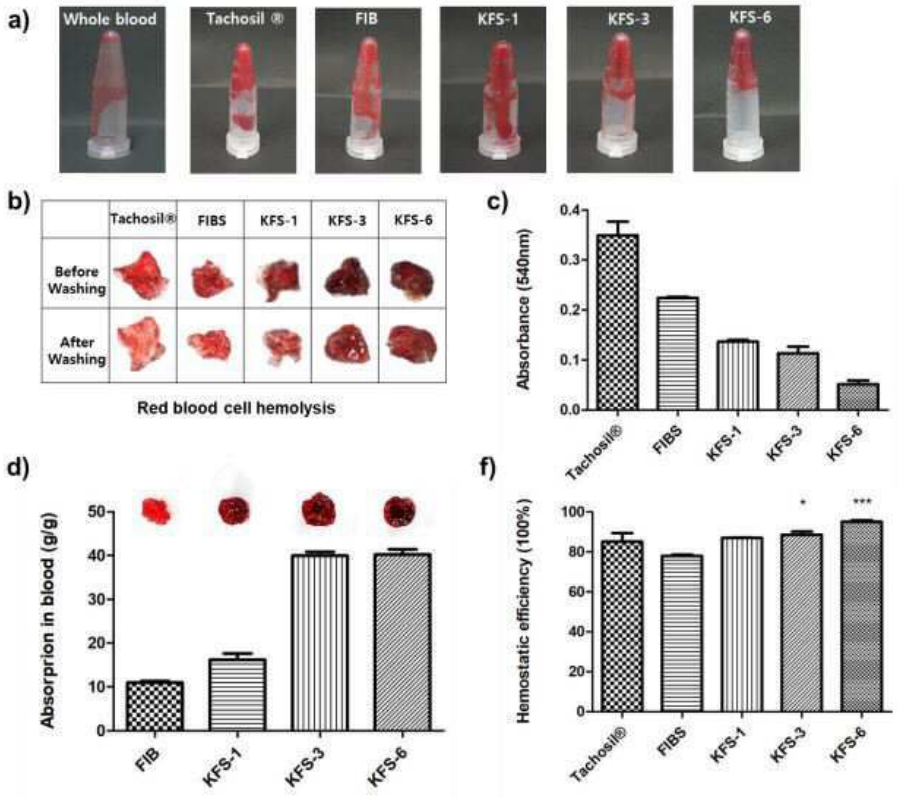
도면3



도면4


Tachosil®
FIBS
KFS-1
KFS-3
KFS-6
Before Asorption
After Asorption
Contact Angle
88.91
93.85
69.83
56.59
53.96

도면5


a)
Whole blood
Tachosil ®
FIB
KFS-1
KFS-3
KFS-6
b)
Tachosil®
FIBS
KFS-1
KFS-3
KFS-6
Before Washing
After Washing
Red blood cell hemolysis
c)
Absorbance (540nm)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Tachosil®
FIBS
KFS-1
KFS-3
KFS-6
d)
Absorprion in blood (g/g)
50
40
30
20
10
0
FIB
KFS-1
KFS-3
KFS-6
f)
Hemostatic efficiency (100%)
100
80
60
40
20
0
*
***
Tachosil®
FIBS
KFS-1
KFS-3
KFS-6

도면6

