(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 1 월 2 일 (02.01.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/004813 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 31/722 (2006.01) *A61P 7/04* (2006.01)
A61K 31/717 (2006.01) *A61L 26/00* (2006.01)
A61K 31/721 (2006.01) *A61L 31/14* (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01) *A61L 31/16* (2006.01)
A61K 9/06 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/006003

(22) 국제출원일: 2019 년 5 월 10 일 (10.05.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0074561 2018 년 6 월 28 일 (28.06.2018) KR

(71) 출원인: 에스케이바이오랜드 주식회사 (**SK BIOLAND CO., LTD.**) [KR/KR]; 31257 충청남도 천안시 동남구 병천면 송정리 2길 59, Chungcheongnam-do (KR).

(72) 발명자: 김다연 (**KIM, Da Yeon**); 18412 경기도 화성시 떡전골로 60, 130동 1002호., Gyeonggi-do (KR). 한민의 (**HAN, Min Eui**); 28123 충청북도 청주시 청원구 오창읍 오창중앙로 94, 805동 1604호, Chungcheongbuk-do (KR). 박기수 (**PARK, Ki Su**); 28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 양청택지 1길 46-5, 205호, Chungcheongbuk-do (KR). 주지훈 (**JOO, Ji Hoon**); 28165 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명3로 87, 501동 1604호., Chungcheongbuk-do (KR). 양은경 (**YANG, Eun Kyung**); 31168 충청남도 천안시 서북구 공원로 195, 101동 2705호, Chungcheongnam-do (KR).

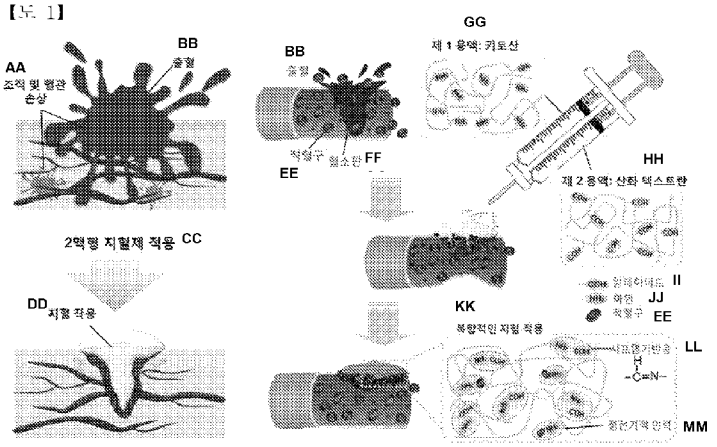
(74) 대리인: 이문섭 (**LEE, Moon-Sup**); 08793 서울시 관악구 남부순환로 1922, 청동빌딩 301호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ,

(54) **Title:** TWO-COMPONENT HEMOSTATIC COMPOSITION AND METHOD OF MANUFACTURING SAME

(54) **발명의 명칭:** 2액형 지혈제 조성물 및 그 제조방법

【도 1】



AA ... Damage to tissue and blood vessel
BB ... Bleeding
CC ... Application of two-component hemostatic agent
DD ... Hemostasis
EE ... Erythrocyte
FF ... Platelet
GG ... First solution: chitosan
HH ... Second solution: oxidized dextran
II ... Aldehyde
JJ ... Zinc
KK ... Complex hemostasis
LL ... Schiff base reaction
MM ... Electrostatic attraction

(57) **Abstract:** The present invention relates to a two-component hemostatic composition which can be adjunctively used for a wide range of bleeding and surgeries, and a method for manufacturing same. The two-component hemostatic composition according to the present invention comprises, without comprising a blood preparation: a first solution containing chitosan; and a second solution containing a glucose- or cellulose-based compound, and can be easily applied in a liquid form to a wound or a surgical bleeding site of a human body and instantly form a hydrogel on the bleeding site to help hemostasis and recovery.

WO 2020/004813 A1

[다음 쪽 계속]

LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(57) 요약서: 본 발명은 광범위한 출혈 및 수술 중 보조적으로 사용할 수 있는 2액형 지혈제 조성물 및 그 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 2액형 지혈제 조성물은 혈액제제를 포함하지 않고,키토산(chitosan)을 함유하는 제 1용액 과 글루코오스(glucose) 혹은 셀루로오스계(cellulose) 화합물을 함유하는 제 2 용액을 포함하는 것을 특징으로 하며, 액상형으로 인체의 상처나 수술 출혈 부위에 쉽게 도포되고 출혈부위에서 즉석으로 하이드로젤을 형성하여 지혈 및 회복에 도움을 줄수 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

2액형 지혈제 조성물 및 그 제조방법

【기술분야】

본 발명은 광범위한 출혈 및 수술 중 보조적으로 사용할 수 있는 2액형 지혈제 조성물 및 그 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 2액형 지혈제 조성물은 혈액제제를 포함하지 않고, 키토산(chitosan)을 함유하는 제 1 용액과 글루코오스(glucose) 혹은 셀루로오스계(cellulose) 화합물을 함유하는 제 2 용액을 포함하는 것을 특징으로 하며, 액상형으로 인체의 상처나 수술 출혈부위에 쉽게 도포되고 출혈부위에서 즉석으로 하이드로젤을 형성하여 지혈 및 회복에 도움을 줄 수 있다.

【배경기술】

일반적으로, 인간을 포함한 동물은 외과적 수술 및 신체적 외상들에 의해 혈관이 다치면 출혈이 발생한다. 경미한 출혈은 외부의 인위적인 도움 없이 생리학적 혈액 응고 작용에 의해 출혈을 정지시킬 수 있으나, 손상 정도에 따라 신체기능에 치명적 영향을 줄 수 있는 정도의 혈액 손실을 가져올 수 있다. 이러한 중증의 조직손상을 수반하는 과다 출혈은 생명을 순식간에 위태롭게 만들어 사망에 이르도록 만드는 중요한 원인 가운데 하나이며, 응급실 내원 환자 중 다발성 손상 환자의 사망원인 74%가 과다출혈로 인한 저혈량성 쇼크라는 학계에 보고된바 있다.

초기 효과적인 지혈로 혈액손실을 최소화하고 빠른 수술시야 확보로 수술시간을 단축하여 환자의 생존가능성을 크게 높일 수 있기에 수술실, 일반 응급상황, 전장에서 지혈제 사용은 필수적이다.

종래의 지혈제 형태에는 크게 3가지로 분류 가능하다. 액상형태로 도포하면 되는 글루(glue) 타입, 그물망 구조로 혈액을 흡수하여 상처부위를 압박하는 형태인 패치(patch 혹은 스폰지; sponge) 타입, 마지막으로 상처부위에 도포하는 분말(powder) 타입으로 분류된다. 액상 형태의 지혈제는 다양한 상처에 적용 가능한 반면 해동, 혼합 등의 준비시간이 필요하다는 점과 낮은 지혈

효과의 단점을 가지고 있으며, 패치 타입 지혈제는 준비시간이 필요 없고 보관에 용이하지만 제품 적용 시 추가적인 압박이 필요해 깊이 파인 상처에 대한 접근성이 낮다. 파우더 타입 지혈제는 불규칙적인 출혈 부위에 적용 가능한 반면 상처표면에 균일한 도포가 어려우며 도포된 지혈제 제거가 어렵다는 특징이 있다.

게다가, 트롬빈(thrombin), 피브리노겐(fibrinogen)과 같은 혈액제제를 함유한 지혈제와 콜라겐(collagen)을 함유한 지혈제는 가격이 높고, 사용성 및 보관성이 취약하다. 또한, 혈액제제 기반으로 HIV, HBV, HCV 및 CMV와 같은 바이러스성 병원체에 의한 감염 위험성과 과민 반응의 문제점도 가지고 있다.

현재 통상적으로 판매되고 있는 액상형 지혈제 플로실(Floseal, 박스터)은 수술현장에서 건조된 트롬빈과 염화칼슘 용액을 섞어 트롬빈 용액을 준비하고 마지막으로 젤라틴 매트릭스와 혼합 해야 하는 하는 사용의 불편함을 가지고 있으며, 혼합한 후에 2시간 내로 사용해야 하는 시간적 제약을 가지고 있다. 이러한 혈액제제를 기반으로 하는 액상형 지혈제는 단가가 높아 작은 환부에만 국한되어 사용되며, 보관이 취약하며 특정 질환의 감염위험이 있다. 또한, 혈액 응고기전을 활성화하는 원리로 지혈이 이루어지기 때문에 혈액응고시스템에 장애가 있는 혈우병, 당뇨병 환자와 항응고제 및 아스피린 복용 환자에 작동하지 않는 한계가 존재한다.

한편, 대표적인 양이온성 폴리사카라이드(polysaccharide)인 키토산은 혈액을 빠르게 응고되게 하는 기능을 가지고 있어 미국과 유럽에서는 이를 붕대에 첨가하거나 지혈제로 사용을 공식적으로 허가하였다. 키토산으로 만든 지혈 제품은 미국 해병대에서 빠른 지혈과 혈액손실 방지 실험에서 그 성능이 입증되었다. 또한, 자극성이 아주 적으며 항박테리아 특성을 가지고 있어 의료용으로 많이 사용되고 있다. 하지만, 키토산 단독으로 우수한 지혈효능을 기대하기 어렵고 또한 중성 용액에 대한 낮은 용해도와 산성용액에서 용해되는 문제점으로 의료용 이용 시 독성이 발생하여 실제적인 사용에 많은 제약이 따른다.

따라서, 종래에 개발되었던 지혈제보다 더 개선된 우수한 혈액응고 특성과 지혈성능을 갖는 지혈제의 개발이 여전히 요구되고 있는 실정이다.

이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 키토산(chitosan)을 함유하는 제 1 용액과 글루코오스(g

lucose) 혹은 셀루로오스계(cellulose) 화합물을 함유하는 제 2 용액을 포함하는 2액형 지혈제 조성물의 경우, 액상형으로 인체의 상처나 수술 출혈부위에 쉽게 도포되고 출혈부위에서 즉석으로 하이드로젤을 형성하여 혈액제제를 포함하지 않고도 우수한 혈액응고 특성과 지혈성능을 나타낼 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

【선행기술문헌】

(특허문헌 1) KR 10-1429455 B

(특허문헌 2) KR 10-1829136 B

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

따라서 본 발명에서 해결하려는 과제는 혈액제제(트롬빈, 피브리노겐)를 포함하지 않는 지혈제 조성물에 관한 것으로, 지혈작용을 유도하는 기능성 생체재료를 기반으로 출혈 부위에 쉽게 도포가 가능한 액상형 지혈제와 그 제조방법을 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 양이온성 아미노산이 측쇄에 결합된 키토산을 함유하는 제 1 용액과 산화에 의해 알데하이드기가 도입된 글루코오스 또는 셀루로오스계 화합물을 포함하는 제 2 용액을 포함하는 2액형 지혈제 조성물로서, 상기 제 1 용액 및 제 2 용액의 혼합시 상기 키토산 화합물과 글루코오스 또는 셀루로오스계 화합물의 상반되는 전하에 의한 정전기적 결합과 동시에 상기 키토산 화합물의 아민(amine, $-NH_2$) 작용기와 글루코오스 또는 셀루로오스계 화합물의 알데하이드(aldehyde, -CHO) 작용기 사이의 시프염기(schiff base) 반응에 의해 하이드로젤(hydrogel)이 형성되는 것을 특징으로 하는 2액형 지혈제 조성물을 제공한다.

본 명세서에서, 용어 '2액형' 이란 제 1 용액과 제 2 용액의 2개의 액체로 구성되었다는 것을 의미하며, 각각의 액체(액상)는 유동성을 가지므로 서로 혼합이 용이하다. 또한, 용어 "지혈제"란 혈액 또는 기타 체액과 접촉했을

때 출혈을 멈추게 하거나 감소시키는 응고(clot)나 막힘(plug)을 유발할 수 있는 물질을 의미한다. 또한, 용어 '하이드로젤' 이란 수용성 고분자가 물리적(수소결합 등) 혹은 화학적(공유결합 등)인 결합에 의해 3차원의 가교를 형성하고 있는 망상구조로서, 혈액과 섞여 혈액응고를 유도할 수 있고 출혈부위를 물리적으로 압박할 수도 있다. 본 명세서에서, 상기 제 1 용액에 함유된 양이온성 아미노산이 측쇄에 결합된 키토산을 제 1 성분, 상기 제 2 용액에 함유된 산화에 의해 알데하이드기가 도입된 글루코오스 또는 셀루로오스계 화합물을 제 2 성분으로 부른다.

본 발명에 있어서, 상기 제 1 용액 및 제 2 용액을 출혈부위에 도포하였을 때, 재료-재료(제 1 용액의 양이온 물질인 제 1 성분-제 2 용액의 음이온 물질인 제 2 성분), 재료-혈액(제 1 용액의 양이온 물질인 제 1 성분-혈액의 음이온성 적혈구) 간의 상반되는 전하특성을 이용하여 정전기적 인력으로 혈액응고를 유도하는 단계, 재료-재료(제 1 용액의 제 1 성분의 아민 작용기-제 2 용액의 제 2 성분의 알데하이드 작용기), 재료-혈액(제 2 용액의 제 2 성분의 알데하이드 작용기-혈액의 혈소판, 단백질) 간의 시프염기 반응으로 혈액응고를 유도하는 단계, 및 복합적인 반응으로 졸-젤 전이가 일어나 형성된 하이드로젤이 출혈부위를 물리적으로 압박하여 지혈하는 단계가 동시다발적으로 일어나는 것을 특징으로 하는 2액형 지혈제 조성물을 제공한다. 본 발명의 2액형 지혈제 조성물은 이러한 다기능 효과(multifunctional effects)로 인해 단일재료의 지혈제 보다 효과적인 지혈을 유도할 수 있다

본 발명에 있어서, 상기 제 1 용액의 키토산 화합물은 독립적으로 양이온성 특성을 가지며, 하나의 카르복시기와 하나 이상의 아민기를 포함하는 아르기닌, 히스티딘, 시스테인, 라이신 중에서 선택된 1종 이상의 양이온성 아미노산이 측쇄에 결합된 키토산 화합물로서, 중성 pH에 녹는 것을 특징으로 하는 2액형 지혈제 조성물을 제공한다. 개질전 키토산이 산성에서만 용해되는 반면, 본 발명의 양이온성 아미노산이 측쇄에 결합된 키토산은 중성 pH에서도 잘 용해되며, 그 아민기로 인해 알데하이드기와 시프 염기 반응을 일으킬 수도 있다.

본 발명에 있어서, 상기 제 2 용액의 글루코오스 또는 셀루로오스계 화합물은 독립적으로 중성 혹은 음이온성 특성을 가지며, 글루코오스 혹은 셀루

로오스계 화합물인 덱스트란, 히알루론산, 카르복시메틸 셀루로오스, 알지네이트, 또는 전분이 산화되어 알데하이드기가 도입된 화합물, 두 개의 알데하이드기를 포함하는 글루타르알데하이드 화합물 중에서 선택된 1종 이상의 화합물인 것을 특징으로 하는 2액형 지혈제 조성물을 제공한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 양이온성 아미노산이 측쇄에 결합된 키토산을 함유하는 증류수 혹은 생리 식염수(예컨대, PBS 등)에 용해시켜 제 1 용액을 준비하는 단계; 및 산화에 의해 알데하이드기가 도입된 글루코오스 또는 셀루로오스계 화합물을 증류수 혹은 생리 식염수에 용해시켜 제 2 용액을 준비하는 단계를 포함하는 본 발명에 따른 2액형 지혈제 조성물의 제조방법을 제공한다.

본 발명에 있어서, 상기 제 1 용액은 양이온성 아미노산이 측쇄에 결합된 키토산을 0.5 내지 5 중량%의 농도로 함유하고, 상기 제 2 용액은 산화에 의해 알데하이드기가 도입된 글루코오스 또는 셀루로오스계 화합물을 1 내지 15 중량%의 농도로 함유하는 것을 특징으로 한다. 또한, 상기 제 1 용액과 제 2 용액은 하이드로젤 형성을 위해 1:12 내지 12:1 부피비로 혼합되는 것을 특징으로 한다.

본 발명에 있어서, 상기 제 1 용액 및 제 2 용액은 각각 별도의 챔버에 저장되었다가 출혈부위에 도포시 서로 혼합되어 즉석에서 하이드로젤을 형성하는 것을 특징으로 하는 2액형 지혈제 조성물을 제공한다.

본 발명에 있어서, 상기 제 1 용액 및 제 2 용액은 듀얼챔버 주사기에 포함되고, 상기 듀얼챔버 주사기 입구에 니들(needle), 믹싱노즐(mixing nozzle), 스프레더(spreader), 또는 분사(spray)타입 보조도구 중 1종을 조립하여 도포방법을 선택하는 것을 특징으로 하는 2액형 지혈제 조성물을 제공한다.

본 발명에 있어서, 상기 제 1 용액 및 제 2 용액 중 어느 하나 또는 둘에 세포, 약물, 또는 유착방지 물질을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 2액형 지혈제 조성물을 제공한다.

본 발명에 있어서, 상기 2액형 지혈제 조성물은 세포를 포함하고 형성된 하이드로젤에 의해 조직공학적 지지체의 역할을 하는 것을 특징으로 하는 2액형 지혈제 조성물을 제공한다. 상기 세포는 조직공학적 지지체에 포함될 수 있는 배아줄기세포, 성체줄기세포 등 어떤 세포도 될 수 있으며, 상기 하이드로

젤은 상기 세포가 내부에서 배양되어 조직으로 분화될 수 있는 지지체의 역할을 할 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 2액형 지혈제 조성물은 약물을 포함하고 형성된 하이드로젤에 의해 약물전달체의 역할을 하는 것을 특징으로 하는 2액형 지혈제 조성물을 제공한다. 상기 약물은 인체에 투여하길 원하는 어떤 약물도 될 수 있으며, 상기 하이드로젤은 내부에 포함된 약물을 서서히 방출시킴으로써 약물전달체의 역할을 할 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 2액형 지혈제 조성물은 유착방지 물질을 포함하고 형성된 하이드로젤에 의해 유착방지제의 역할을 하는 것을 특징으로 하는 2액형 지혈제 조성물을 제공한다. 상기 유착방지 물질은 종래 사용되던 어떤 유착방지 물질도 사용될 수 있고 하이드로젤 자체가 유착방지 물질로서 작용할 수도 있으며, 상기 하이드로젤은 수술 후 조직간의 유착을 방지함으로써 유착방지제의 역할을 할 수 있다.

이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

본 발명의 조성물은 제 1 성분 키토산 화합물 및 제 2 성분 글루코오스 혹은 셀루로오스계 화합물 물질 2종 이상으로 구성되고, 액상형으로 인체의 상처나 출혈부위에 쉽게 도포되어 지혈 및 회복에 관여하는 특징이 있다.

여기서, 제 1 성분으로 폴리사카라이드인 키토산을 사용함으로써, 키토산 본연에 알려진 혈액응고 기능 유도하였으며, 더 나아가 키토산 측쇄에 양이온성 아미노산 화합물을 도입하였다. 양이온성 아미노산이 도입된 키토산은 중성에 용해되어 생체 적용시 독성문제를 해결할 수 있으며, 양이온성 생체친화성 고분자로 음이온성 적혈구와 혈소판을 정전기적 인력(electrostatic interaction)으로 혈액응고를 유도할 수 있다.

제 2 성분으로 글루코오스 혹은 셀루로오스계 화합물을 산화하여 알데하이드(aldehyde, -CHO) 작용기가 도입된 재료를 제조하였으며, 이 재료는 상기 제 1 성분 키토산 화합물의 아민(amine, $-NH_2$) 작용기와 반응즉시 시프염기(schiff base) 반응 일으켜 하이드로젤(hydrogel)을 형성할 수 있다. 출혈 부위에 액상형 지혈제를 도포하면 혈액과 재료가 혼합되면서 젤(gel)을 형성하여 순간적으로 혈액이 응고되고, 더 나아가 형성된 젤이 출혈부위를 물리적으로 압

박하여 지혈효과를 누릴 수 있다.

본 발명은 (A) 키토산 측쇄에 하나의 카르복시기(-COOH)와 하나 이상의 아민기(-NH_2)를 포함하는 아미노산이 결합된 키토산 화합물 제 1성분; 및 (B) 산화 글루코오스 혹은 셀루로오스계 화합물로 알데하이드를 포함하는 제 2 성분으로 구성하는 하이드로젤 타입 지혈제 조성물과 그 제조방법을 제공한다.

지혈 목적을 달성하기 위하여 하이드로젤 타입 지혈제는,

a) 아래에 실시예 기반으로 제 1성분과 제 2성분을 합성하여 화합물을 제조하는 단계; b) 제시된 구체적인 화합물 중에서 2종 이상이 선택되어 지혈 적용 부위 및 사용자의 요구에 맞게 농도를 조절하여 액상의 용액으로 제조되는 단계; c) 2종의 용액을 주사기를 비롯한 도포용 도구에 적용하는 단계; d) 출혈부위에 도포하여 지혈을 유도하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

여기서, 상기 단계 c)에서, 2종 용액의 혼합 부피비율은 1:12에서 12:1로 조절 되어 구성될 수 있으며, 상기 단계 d)에서, 도포방법은 도 1의 도식화한 모식도와 같이 이중주사기(dual/double/twin syringe)를 이용하여 출혈부위에 동시에 도포되는 것이 바람직하다.

이때, 혈액과 용액이 혼합되면서 순간적인 혈액응고 및 지혈효과를 나타낼 수 있다. 여기서 혈액응고 및 지혈은 재료-재료, 재료-혈액 간의 상반되는 전하의 특성을 이용하여 정전기적 인력으로 혈액응고를 유도하는 단계; 재료-재료, 재료-혈액 간의 시프염기 반응으로 혈액응고를 유도하는 단계; 복합적인 반응으로 졸-젤 전이가 일어나 형성된 하이드로젤이 출혈부위를 물리적으로 압박하여 지혈하는 단계가 동시다발적으로 일어나는 것을 특징으로 하며, 이러한 다기능 효과(multifunctional effects)로 단일재료의 지혈제 보다 효과적인 지혈을 유도한다.

본 발명의 제 1 성분의 주성분인 키토산은 게나 가재, 새우 등 갑각류에서 분리한 키틴(chitin)을 탈아세틸화(deacetylation) 시켜 얻어진 물질로 D-글루코사민(D-glucosamine)과 N-아세틸글루코사민(N-acetyl-glucosamine) 단량체로 이루어져 있으며, 일반적으로 60 - 97% 탈아세틸화도를 가진다. 키틴은 분자결합이 강하고 단단하여 물 및 유기용매에 불용성이기 때문에 탈아세틸화 공정으로 용해도를 부여하였으나 산에서 용해되는 단점이 여전히 남아있다. 키토산은 탈아세틸화도에 따라 글루코사민에 포함된 아민기의 함량이 달라지기

때문에 용해도와 생체효능의 차이를 나타내는 것으로 알려져 있으며, 측쇄의 다량의 아민기에 여러 기능을 부여할 수 있는 작용기를 컨주게이션(conjugation) 할 수 있다는 구조적 장점을 가지고 있다.

키토산은 대표적인 양이온성 천연 생체고분자로 이용되고 있지만, 산성에서 용해된다는 문제로 본 발명의 선행연구에서 지혈제 적용의 한계가 있었다. 예로 상반되는 전하의 재료로 구성하여 1% HCl 수용액에 용해된 키토산 용액과 중성의 글루코오스 또는 셀루로오스계 화합물 용액으로 혈액응고를 유도하였으나, 혼합 즉시 키토산 재료가 석출되거나 의도한 성능의 혈액응고 반응 일어나지 않았다(도 2의 비교예 1 내지 비교예 4).

또한, 키토산 측쇄의 아민기에 특이 작용기를 컨주게이션하여 키토산의 용해도 문제를 해결하는 연구를 수행하였다. 예로 Tan H. et al.의 문헌(Biomaterials. 2009;30(13):2499-506)을 기초하여 숙시닐화 키토산(succinyl modified chitosan)을 제조하고 산화 글루코오스 또는 셀루로오스계 화합물과 혼합하였으나, 불균일한 젤 및 미반응물이 관찰되어 지혈제로 적합하지 않았다(도 3의 비교예 5-1: 2.5% 숙시닐화 키토산과 10% CMC-Al의 반응, 비교예 5-2: 2.5% 숙시닐화 키토산과 10% DEX-Al의 혈액응고 반응). 다른 예로, Amidi M. et al.의 문헌(J Control Release. 2006;111(1-2):107-16)을 기초하여 트리메틸화 키토산(trimethyl chitosan)을 제조하고 산화 글루코오스 또는 셀루로오스계 화합물과 혼합하였으나 불균일한 젤 및 미반응물이 관찰되어 지혈제로 적합하지 않았다(도 3의 비교예 6-1: 2.5% 트리메틸화 키토산과 1% HA-Al, 비교예 6-2: 2.5% 트리메틸화 키토산과 10% CMC-Al의 혈액응고 반응). 상기 선행연구 결과에서 측쇄의 아민기에 작용기 도입 후 키토산의 양이온성 성질이 소실되어 키토산 고유의 성능이 저하되는 문제가 발생하여, 일부 젤을 형성하나 의도한 혈액응고가 유도되지 않았다.

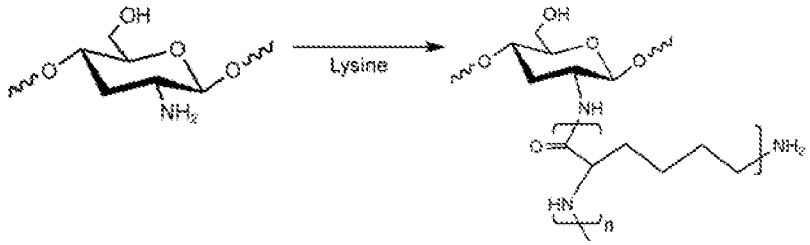
따라서, 본 발명의 하이드로젤 타입 지혈제로 사용되기 위해 키토산 측쇄에 결합되는 화합물은 키토산의 양이온성 특성을 유지하고, 결합에 의해 키토산이 중성 pH에서 용해되는 특성을 포함하도록 설계되었다. 물에 잘 용해되는 대표적인 양이온성 아미노산으로 하나의 카르복시기와 하나 이상의 아민기를 포함하는 아르기닌(arginine), 히스티딘(histidine), 시스테인(cysteine), 라이신(lysine) 중에 1종 이상을 키토산 측쇄에 결합할 수 있으며, 1개 이상의

아미노산이 아마이드 결합에 의해 반복하여 결합할 수 있다.

본 발명의 하이드로젤 타입 지혈제로 사용되기 위해 키토산 측쇄에 결합되는 아미노산은 라이신이 바람직하나 이에 한정되지 않으며, 지혈부위 성능 및 특성에 맞게 시스테인(cysteine) 아르기닌(arginine), 히스티딘(histidine)으로 선택될 수 있다.

하기 화학식 1은 키토산 측쇄에 라이신이 도입된 제 1 성분의 키토산 화합물이다.

[화학식 1]



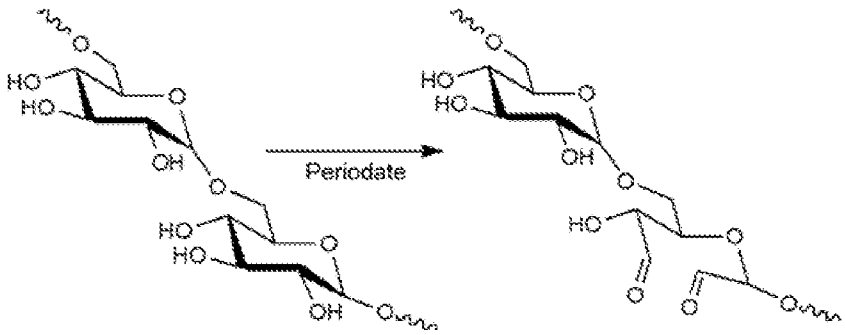
상기 화학식 1에서, n은 키토산 측쇄에 도입된 라이신의 반복단위를 나타내는 정수(0-20)이며, 바람직하게는 1-3의 정수이다.

제 1 성분 키토산 화합물 제조에 있어, 상기 명시된 아미노산을 키토산 측쇄에 결합하기 위하여 가교제(crosslinker)를 처리하는 과정을 포함한다. 이때, 키토산 측쇄의 아민기와 양이온성 아미노산 화합물의 카르복시기가 반응하여 양이온성 생체고분자인 키토산 화합물이 제조되며, 가교제로는 수용성 카보이미드계 화합물, 유기용매 가용성 카보이미드계 화합물, 알데하이드계 화합물, 이소시아네이트계 화합물에서 1종 이상 선택될 수 있고, 더욱 바람직하게는 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보이미드 하이드로클로라이드(1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide Hydrochloride; EDAC 혹은 EDC), N,N'-디사이클로헥실카보디이미드 (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide; DCC), N-하이드록시석신이미드(N-hydroxysuccinimide; NHS)를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 제 2 성분을 이루는 글루코오스 혹은 셀루로오스계 화합물은 덱스트란(dextran), 히알루론산(hyaluronic acid; HA), 카르복시메틸 셀루로오스(carboxymethyl cellulose; CMC), 알지네이트(alginate), 또는 전분(starch)이 있으며, 산화제인 과요오드산염(periodate)에 의해 산화되어 알데하이드(-C

HO)가 도입된 산화 덱스트란, 산화 히알루론산, 산화 카르복시메틸 셀루로오스, 산화 알지네이트, 또는 산화 전분 중 1종 이상을 포함한다. 이에 한정하지 않고 두 개의 알데하이드기를 가진 글루타르알데하이드(glutaraldehyde)로 구성될 수 있다.

[화학식 2]



상기 화학식 2는 제 2 성분 화합물로 산화 덱스트란을 나타낸다. 제 1 성분의 종류에 따라 제 2 성분은 산화 덱스트란, 산화 히알루론산, 산화 카르복시메틸 셀루로오스, 산화 알지네이트, 또는 산화 전분으로 선택되어 구성할 수 있다.

제 2 성분 화합물 중에서 산화 덱스트란이 제 1 성분 키토산 화합물과 반응속도, 하이드로젤의 물리적 특성, 혈액과 혼합의 균일성 등의 이유로 지혈제로 특히 바람직하다. 제 1 성분 및 제 2 성분의 평균분자량은 적용되는 출혈부위의 구체적인 요구성능 및 분해 기간에 따라 특정 평균분자량 분포를 선택할 수 있다. 본 발명의 실시예를 통해 분자량이 높은 경우 분해기간을 지연시킬 수 있는 반면 분자량이 낮은 경우 혈액응고의 반응속도를 높일 수 있음을 확인했다.

제 2 성분 산화 반응성은 온도, pH, 산화제의 농도에 영향을 받는다고 알려져 있다. 본 발명은 과요오드산염(periodate)으로 산화하여 알데하이드기 도입방법을 제공하며, 글루코오스 단위분자당 0.2 - 10 당량의 비율로 과요오드산염을 처리 할 수 있다. 본 발명의 제조예 4에 의해 제조한 산화 덱스트란의 지혈성능을 평가한 결과, 1.5 당량 이상에서는 산화도 및 물성이 증가하지 않고 수렴한다. 이에 일정 이상의 물성유도를 위해 1.5 당량 이상의 과요오드산염을 처리하는 것이 바람직하다. 결과는 도 7에 나타내었다.

【발명의 효과】

이와 같은 본 발명에 의하면, 하이드로젤 타입 지혈제는 트롬빈, 피브리노겐과 같은 혈액제제를 포함하지 않은 지혈제로써, 혈액응고시스템이 망가진 혈우병, 당뇨병 환자와 항응고제 및 아스피린 복용 환자에 적용하여 혈액응고 및 지혈작용 유도가 가능하다. 또한, 복합적인 반응이 동시다발적으로 일어나 보다 효과적인 지혈효과로 광범위한 외과 수술 영역에 지혈제로 사용할 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 하이드로젤 타입 지혈제를 출혈발생 부위에 도포하여 혈액응고 및 지혈을 유도하는 것을 도식화한 모식도이다.

도 2는 개질 전의 키토산과 글루코오스 혹은 셀루로오스계 화합물 용액의 혈액응고 반응평가로, 구체적으로 비교예 1 내지 4 이미지이다.

도 3은 본 발명과 다른 작용기 도입 키토산과 산화 글루코오스 혹은 셀루로오스계 화합물 용액의 혈액응고 반응평가로, 구체적으로 비교예 5-1 내지 6-2 이미지이다.

도 4는 본 발명의 제 1 용액과 제 2 용액의 혈액응고 반응평가로, 구체적으로 실시예 3-1 내지 3-14 이미지이다.

도 5는 본 발명의 제 1 용액과 제 2 용액의 혈액응고 반응평가로, 구체적으로 실시예 3-15 내지 3-21 이미지이다.

도 6은 본 발명의 제 1 용액과 제 2 용액의 혈액응고 반응평가로, 구체적으로 실시예 3-22 내지 3-26 이미지이다.

도 7은 글루코오스 단위분자당 산화제 비율에 따른 레오미터 물성 측정 그래프(A)와 이를 frequency 1일 때 저장탄성률 비교한 그래프(B)이다.

도 8은 산화 덱스트란 분자량에 따른 레오미터 물성 측정 그래프(A)와 이를 frequency 1일 때 저장탄성률(B), 점도(C)를 비교한 그래프이다.

도 9는 액상형 지혈제 티씰의 혈액응고 평가 이미지(A)와 듀얼 챔버 주사기와 어플리케이션 캐뉼라를 이용한 이미지(B)이다.

도 10은 액상형 지혈제 티씰의 레오미터 물성 측정 그래프(A)와 이를 frequency 1일 때 저장탄성률(B), 점도(C)를 실시예 3-1과 비교한 그래프이다.

도 11은 제 1용액과 제 2용액의 지혈용액 및 이를 이중주사기에 적용한 이미지이다.

【발명의 실시를 위한 형태】

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

<제조예 1> 라이신이 결합된 키토산 제조 (CHI-Ly)

본 제조예는 평균분자량과 탈아세틸화도가 상이한 키토산 원료를 이용하여 제 1 성분을 제조하는 것으로, 구체적인 반응원료의 사양 및 반응조건은 하기 표 1에 열거하였다. 우선 키토산 1 g을 1%(v/v) HCl 수용액 150 ml에 충분히 녹여 키토산 용액을 제조하였다. 키토산 용액에 1 M의 NaOH 수용액을 천천히 떨어뜨려 pH 5로 맞춘다. 하기 표 1에 의해 단위분자당 반응 몰비에 맞게 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보이미드 하이드로클로라이드(EDAC)을 증류수에 녹여 천천히 첨가 하였다. 1 M의 HCl 수용액으로 pH 4~5로 적정한 뒤 라이신을 HCl 수용액에 녹여 천천히 첨가하였다. 다시 한번 pH를 확인하여 pH 4~5로 적정한 뒤 6시간 동안 상온에서 교반하여 반응을 수행하였으며, 반응 후 얻어진 화합물은 72시간 이상 투석을 실시하여 반응부산물 및 미반응물을 제거하였다. 영하 80 ℃의 온도로 냉각시키고 동결 건조하여 제 1 성분인 라이신이 결합된 키토산 화합물을 제조하였다.

【표 1】

No.	키토산 평균분자량 (kDa)	탈아세틸화도 (%)	반응비율* (몰비) 단위 분자 : 라이신	라이신 중량** (g)
1	3 - 20 kDa 키토올리고당	70%	1 : 0.5	0.294
			1 : 1	0.589
			1 : 2	1.178
2	50 - 190 kDa	80%	1 : 0.5	0.345
			1 : 1	0.690
			1 : 2	1.379
3	110 - 150 kDa	95%	1 : 0.5	0.425

			1 : 1	0.851
			1 : 2	1.701
4	200 kDa	85%	1 : 0.5	0.371
			1 : 1	0.742
			1 : 2	1.484
5	150 - 250 kDa	95%	1 : 0.5	0.425
			1 : 1	0.851
			1 : 2	1.701
6	190 - 310 kDa	80%	1 : 0.5	0.345
			1 : 1	0.690
			1 : 2	1.379
7	300 - 340 kDa	95%	1 : 0.5	0.425
			1 : 1	0.851
			1 : 2	1.701
8	310 - 375 kDa	75%	1 : 0.5	0.319
			1 : 1	0.639
			1 : 2	1.277

*반응비율은 키토산의 N-아세틸글루코사민을 제외한 글루코사민 단위 분자당 라이신 반응 몰비율

**라이신 중량은 *반응비율에 의해 계산된 키토산 1g당 첨가된 라이신 중량

<제조예 2> 시스테인이 결합된 키토산 제조 (CHI-Sh)

키토산 1 g을 1%(v/v) HCl 수용액 150 ml에 충분히 녹여 키토산 용액을 제조하였다. 1%(v/v) HCl 수용액 50 ml에 시스테인을 1.51, 0.76, 0.30 g을 각각 녹여 천천히 첨가한 후 1 M의 NaOH 수용액을 천천히 떨어뜨려 pH 5로 적정하였다. EDAC를 증류수 30 ml에 2.4, 1.2, 0.5 g을 각각 녹여 20분 동안 천천히 첨가하였다. 다시 한번 pH를 확인하여 pH 4~5로 적정한 뒤 6시간 동안 상온에서 교반하여 반응을 수행하였으며, 얻어진 화합물은 72시간 이상 투석을 실시하여 반응부산물 및 미반응물을 제거하였다. 영하 80 ℃의 온도로 냉각시키고 동결 건조하여 제 1 성분인 시스테인이 결합된 키토산 화합물을 제조하였다.

<제조예 3> 아르기닌이 결합된 키토산 제조 (CHI-Ar)

키토산 1 g을 1%(v/v) HCl 수용액 150 ml에 충분히 녹여 키토산 용액을 제조하였다. 1%(v/v) HCl 수용액 50 ml에 아르기닌을 1.64, 0.82, 0.41 g을 각각 녹여 천천히 첨가한 후 1 M의 NaOH 수용액을 천천히 떨어뜨려 pH 5로 적정하였다. EDAC를 증류수 30 ml에 2.17, 1.08, 0.54 g을 각각 녹여 20분 동안 천천히 첨가하였다. 다시 한번 pH를 확인하여 pH 4~5로 적정한 뒤 6시간 동안 상온에서 교반하여 반응을 수행하였으며, 얻어진 화합물은 72시간 이상 투석을 실시하여 반응부산물 및 미반응물을 제거하였다. 영하 80 ℃의 온도로 냉각시키고 동결 건조하여 제 1 성분인 아르기닌이 결합된 키토산 화합물을 제조하였다.

<제조예 4> 산화 덱스트란 제조 (DEX-Al)

본 제조예는 평균분자량이 상이한 덱스트란 원료를 이용하여 제 2 성분을 제조하는 것으로, 구체적인 반응원료의 사양 및 반응조건은 하기 표 2에 열거하였다. 우선 덱스트란 5 g을 증류수 100 ml에 충분히 녹여 덱스트란 용액을 제조하였다. 하기 표 2에 의해 단위분자당 반응 몰비에 맞게 과요오드산나트륨(sodium periodate; $NaIO_4$)을 증류수에 녹여 빛이 차단된 환경에서 천천히 첨가하였다. 상온, 빛이 차단된 환경을 유지하면서 6시간 동안 교반하여 반응을 수행한 후 5ml 에틸렌글리콜(ethylene glycol) 첨가하고 1시간 교반하여 반응을 종결하였다. 반응 후 얻어진 화합물은 72시간 이상 투석을 실시하여 반응부산물 및 미반응물을 제거하였다. 영하 80 ℃의 온도로 냉각시키고 동결 건조하여 제 2 성분인 알데하이드기가 포함된 산화 덱스트란을 제조하였다.

【표 2】

No.	덱스트란 평균분자량 (kDa)	반응비율# (몰비) 단위 분자 : 산화제	산화제 중량## (g)
1	9 -11 kDa	1 : 0.5	0.39
		1 : 1	0.78
		1 : 1.5	1.17
		1 : 2	1.56
2	35 - 45 kDa	1 : 0.5	0.39
		1 : 1	0.78
		1 : 1.5	1.17
		1 : 2	1.56

3	40 kDa	1 : 0.5	0.39
		1 : 1	0.78
		1 : 1.5	1.17
		1 : 2	1.56
4	70 kDa	1 : 0.5	0.39
		1 : 1	0.78
		1 : 1.5	1.17
		1 : 2	1.56
5	150 kDa	1 : 0.5	0.39
		1 : 1	0.78
		1 : 1.5	1.17
		1 : 2	1.56
6	200 kDa	1 : 0.5	0.39
		1 : 1	0.78
		1 : 1.5	1.17
		1 : 2	1.56

#반응비율은 덱스트란의 글루코오스 단위 분자당 산화제 반응 몰비율

##산화제 중량은 #반응비율에 의해 계산된 덱스트란 1g 당 첨가된 산화제 중량

<제조예 5> 산화 히알루론산 (HA-A1)

평균분자량 700, 3000 kDa인 히알루론산을 500 ml 증류수에 각각 1%, 0.5%의 농도로 2일 이상 교반하여 히알루론산 용액을 제조하였다. 과요오드산나트륨 0.6 g을 증류수에 녹여 빛이 차단된 환경에서 천천히 첨가하였다. 상온, 빛이 차단된 환경을 유지하면서 3시간 동안 교반하여 반응을 수행한 후 5ml 에틸렌글리콜을 첨가하고 1시간 추가 교반하여 반응을 종결하였다. 반응 후 얻어진 화합물은 72시간 이상 투석을 실시하여 반응부산물 및 미반응물을 제거하였다. 영하 80 ℃의 온도로 냉각시키고 동결 건조하여 제 2 성분인 알데하이드기가 포함된 산화 히알루론산을 제조하였다.

<제조예 6> 산화 카르복시메틸 셀루로오스 (CMC-A1)

평균분자량 90, 250, 700 kDa인 카르복시메틸 셀루로오스 2 g을 증류수 50 ml에 충분히 녹여 카르복시메틸 셀루로오스 용액을 제조하였다. 카르복시메틸 셀루로오스 용액에 과요오드산나트륨 1.1 g을 증류수 10 ml에 녹여 빛이 차

단된 환경에서 천천히 첨가하였다. 상온, 빛이 차단된 환경을 유지하면서 6시간 동안 교반하여 반응을 수행한 후 5ml 에틸렌글리콜을 첨가하고 1시간 추가 교반하여 반응을 종결하였다. 반응 후 얻어진 화합물은 72시간 이상 투석을 실시하여 반응부산물 및 미반응물을 제거하였다. 영하 80 ℃의 온도로 냉각시키고 동결 건조하여 제 2 성분인 알데하이드기가 포함된 산화 카르복시메틸 셀루로오스를 제조하였다.

<제조예 7> 산화 알지네이트 (ALG-Al)

평균분자량 120 - 190 kDa인 알지네이트 5 g을 에탄올 25 ml에 충분히 녹여 알지네이트 용액을 제조하였다. 알지네이트 용액에 과요오드산나트륨 1.6 g을 증류수 25 ml에 녹여 빛이 차단된 환경에서 천천히 첨가하였다. 상온, 빛이 차단된 환경을 유지하면서 3시간 동안 교반하여 반응을 수행한 후 5 ml 에틸렌글리콜을 첨가하고 1시간 추가 교반하여 반응을 종결하였다. 반응 후 얻어진 화합물은 72시간 이상 투석을 실시하여 반응부산물 및 미반응물을 제거하였다. 영하 80 ℃의 온도로 냉각시키고 동결 건조하여 제 2 성분인 알데하이드기가 포함된 산화 알지네이트를 제조하였다.

<실시예 1> 지혈 용액 제조

상기 제조방법으로 제조되는 화합물은 스폰지 혹은 분말의 형태로 준비될 수 있다. 제 1 성분, 제 2 성분의 화합물을 각각 증류수 혹은 PBS에 녹여 지혈 용액(제 1 용액 및 제 2 용액)을 제조하였다. 1.25% 2.5% 키토산-라이신(CHI-Ly), 1.25%, 2.5 % 키토산-시스테인(CHI-Sh), 2.5 % 키토산-아르기닌(CHI-Ar), 8%, 9%, 20% 산화 덱스트란 (DEX-Al), 2% 산화 히알루론산(HA-Al), 10% 산화 카르복시메틸 셀루로오스(CMC-Al), 10% 산화 알지네이트(ALG-Al) 용액을 제조하고 4 ℃, 24시간 동안 안정화 이후 평가에 사용하였다. 제 1 성분, 제 2 성분 용액의 농도는 분자량, 용액 점성을 고려하여 사용자의 요구에 맞게 조절될 수 있다.

<실시예 2> 제타전위 측정평가

상기 실시예 1에서 제조된 지혈용액(CHI-Ly, CHI-Sh, DEX-Al, HA-Al, CM

C-Al, ALG-Al)을 증류수로 50배 희석하여 측정용액을 제조하였으며, 지혈용액과 비교하기 위하여 2.5% 키토산 용액(CHI)과 8% 덱스트란 용액(DEX)에 50배 희석하여 준비하였다. 이때, 키토산 용액은 1%(v/v) HCl 수용액 녹인 후 증류수에 50배 희석하였다. ELSZ-1000(Otsuka Electronics; Japan) 기기를 이용하여 각 화합물의 제타전위(zeta potential)를 측정하였으며, 그 결과는 표 3에 나타내었다.

표 3에 나타난 바와 같이, CHI, CHI-Ly, CHI-Sh은 양전하, HA-Al, CMC-Al, ALG-Al, DEX, DEX-Al은 음전하의 특성을 보인다. 이러한 결과는 제 1 성분과 제 2 성분의 용액이 상반되는 전하를 가져 정전기적 인력으로 젤 형성이 가능함을 보여준다. 추가로 CHI-Ly와 DEX-Al를 혼합하여 제타 전위를 측정한 경우 양전하(37.2 ± 1.1)의 특성을 보여, 2액형 지혈제로 음전하인 혈액성분을 정전기적 인력으로 혈액응고가 유리함을 보여준다.

【표 3】

지혈 생체재료		No.			평균	비고
		1	2	3		
1	키토산 (CHI)	54.4	56.0	56.5	55.6 ± 1.1	양전하
2	덱스트란 (DEX)	- 5.0	-7.1	-8.1	-6.7 ± 1.6	음전하
3	키토산-라이신 (CHI-Ly)	47.7	46.8	49.0	47.8 ± 1.1	양전하
4	산화 덱스트란 (DEX-Al)	-3.6	-4.4	-2.6	-3.5 ± 0.9	음전하
5	산화 히알루론산 (HA-Al)	-54.5	-53.2	-52.4	-53.4 ± 1.1	음전하
6	산화 카르복시메틸셀루로오스 (CMC-Al)	-43.8	-44.3	-46.8	-45.0 ± 1.6	음전하
7	산화 알지네이트 (ALG-Al)	-53.7	-53.3	-56.3	-54.5 ± 1.6	음전하

<실시예 3> 혈액응고 반응평가

상기 실시예 1에서 제조된 지혈용액의 혈액응고 평가를 실시하여 지혈제로 이용 가능함을 확인하였다. 혈액응고 평가는 상기 실시예 1에서 제조된 제 1 용액, 제 2 용액과 혈액을 각 1 : 1 : 1 비율(각 200 μl)로 혼합하여 반응을 평가하였다. 혈액은 혈액응고와 혈소판 응집 방지하는 항-응고제인 EDTA가 포함된 것 사용되었다. 지혈용액 및 혈액을 혼합하여 반응 30초 후 지혈제의 반응속도, 하이드로젤의 물성(육안), 미반응 혈액량, 혈액과 혼합의 균일성을 관찰하여 혈액응고 성능을 판단하였으며, 그 결과는 도 2, 도3, 도4에 나타내었

다.

비교예 1 내지 4는 실시예 3과 동일한 방법으로 실시하되, 1% 아세트산에 녹인 개질전 키토산 용액과 덱스트란, 카르복시메틸 셀루로오스, 히알루론산 용액을 제조하여 혈액응고 반응 평가를 실시하였다. 그 결과는 도 2에 나타내었으며, 구체적으로 비교예 1은 2.5% 키토산(Mw 50-190 kDa)과 8% 덱스트란(40 kDa), 비교예 2는 2.5% 키토산(Mw 50-190 kDa)과 8% 덱스트란(150 kDa), 비교예 3은 2.5% 키토산(Mw 50-190 kDa)과 10% 카르복시메틸 셀루로오스(90 kDa), 비교예 4는 2.5% 키토산(Mw 50-190 kDa)과 1% 히알루론산(700 kDa) 용액의 혈액응집 결과로 응집이 일어나지 않음을 확인하였다.

비교예 5-1 내지 6-2는 실시예 3과 동일한 방법으로 실시하되, 본 발명과 다른 작용기를 도입한 키토산 용액과 산화 글루코오스 혹은 셀루로오스계 화합물 용액을 제조하여 혈액응고 반응 평가를 실시하였다. 그 결과는 도 3에 나타내었으며, 구체적으로 비교예 5-1은 2.5% 숙시닐화 키토산과 10% CMC-Al의 반응이고, 비교예 5-2는 2.5% 숙시닐화 키토산과 10% DEX-Al의 혈액응고 반응이고, 비교예 6-1은 2.5% 트리메틸화 키토산과 1% HA-Al의 혈액응고 반응이고, 비교예 6-2는 2.5% 트리메틸화 키토산과 10% CMC-Al의 혈액응고 반응으로, 불균일한 젤 및 미반응물이 관찰되어 지혈제로 적합하지 않았다. 즉, 측쇄의 아민기에 작용기 도입 후 키토산의 양이온성 성질이 소실되어 키토산 고유의 성능이 저하되는 문제가 발생하여, 일부 젤을 형성하나 의도한 혈액응고가 유도되지 않았다.

실시예 3-1 내지 3-10은 동일한 방법으로 혈액응고 반응을 실시하되, CHI-Ly와 DEX-Al 용액을 사용하였다. 구체적으로 실시예 3-1은 2.5% CHI-Ly(Mw 50-190 kDa)과 20% DEX-Al(10 kDa), 실시예 3-2는 1.25% CHI-Ly(Mw 190-310 kDa)과 20% DEX-Al(10 kDa), 실시예 3-3은 2.5% CHI-Ly(Mw 50-190 kDa)과 8% DEX-Al(40 kDa), 실시예 3-4는 1.25% CHI-Ly(Mw 310-375 kDa)과 8% DEX-Al(40 kDa), 실시예 3-5는 2.5% CHI-Ly(Mw 50-190 kDa)과 8% DEX-Al(150 kDa), 실시예 3-6은 1.25% CHI-Ly(Mw 310-375 kDa)과 8% DEX-Al(150 kDa), 실시예 3-7은 2.5% CHI-Ly(Mw 50-190 kDa)과 9% DEX-Al(10 kDa), 실시예 3-8은 1.25% CHI-Ly(Mw 190-310 kDa)과 9% DEX-Al(10 kDa), 실시예 3-9는 2.5% CHI-Ly(Mw 50-190 kDa)과 8% DEX-Al(200 kDa), 실시예 3-10은 2.5% CHI-Ly(Mw 190-310 kDa)과 8% DEX

-Al(200 kDa) 용액으로 평가하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었으며, 재료의 분자량과 농도에 따라서 혈액응고 성능의 차이를 보였다.

실시예 3-11 내지 3-14는 동일한 방법으로 혈액응고 반응을 실시하되, CHI-Ly와 HA-Al, CMC-Al 용액을 사용하였다. 구체적으로 실시예 3-11은 2.5% CHI-Ly(Mw 50-190 kDa)과 2% HA-Al(3000 kDa), 실시예 3-12는 1.25% CHI-Ly(Mw 190-310 kDa)과 2% HA-Al(3000 kDa), 실시예 3-13은 2.5% CHI-Ly(Mw 50-190 kDa)과 10% CMC-Al(90 kDa), 실시예 3-14는 1.25% CHI-Ly(Mw 190-310 kDa)과 10% CMC-Al(90 kDa) 용액으로 평가하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었으며, 빠른 시간 내에 하이드로젤을 형성하나 미반응 혈액량이 관찰되었다.

실시예 3-15 내지 3-17은 동일한 방법으로 혈액응고 반응을 실시하되, CHI-Sh와 DEX-Al, HA-Al, ALG-Sh 용액을 사용하였다. 구체적으로 실시예 3-15는 2.5% CHI-Sh(Mw 190-310 kDa)과 8% DEX-Al(150 kDa), 실시예 3-16은 2.5% CHI-Sh(Mw 190-310 kDa)과 2% HA-Al(700 kDa), 실시예 3-17은 2.5% CHI-Sh(Mw 190-310 kDa)과 10% ALG-Sh(120-190 kDa) 용액으로 평가하였다. 그 결과는 도 5에 나타내었으며, 빠른 시간 내에 혈액응집 반응이 일어났으며, 산화글루코오스의 종류에 따라 응고 정도가 달라지는 것을 관찰하였다.

실시예 3-18 내지 3-21은 동일한 방법으로 혈액응고 반응을 실시하되, CHI-Sh와 DEX-Al 용액을 사용하였다. 구체적으로 실시예 3-18은 2.5% CHI-Sh(Mw 50-190 kDa)과 8% DEX-Al(40 kDa), 실시예 3-19는 2.5% CHI-Sh(Mw 3-20 kDa)과 8% DEX-Al(40 kDa), 실시예 3-20은 2.5% CHI-Sh(Mw 50-190 kDa)과 9% DEX-Al(40 kDa), 실시예 3-21은 2.5% CHI-Sh(Mw 3-20 kDa)과 9% DEX-Al(40 kDa) 용액으로 평가하였다. 그 결과는 도 5에 나타내었으며, 빠른 시간 내에 혈액응집 반응을 확인할 수 있었다.

실시예 3-22는 동일한 방법으로 혈액응고 반응을 실시하되, CHI-Ar과 DEX-Al, CMC-Al 용액을 사용하였다. 구체적으로 2.5 % CHI-Ar(Mw 50-190 kDa)와 8% DEX-Al(40 kDa) 용액으로 평가하였으며, 그 결과는 도 6에 나타내었다.

실시예 3-23 내지 3-24는 동일한 방법으로 혈액응고 반응을 실시하되, 대표적인 양이온성 고분자 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine; PEI)과 DEX-Al, CMC-Al 용액을 사용하였다. 구체적으로 실시예 3-23은 25% PEI(Mw 20 kDa)와 10% CMC-Al(9 kDa), 실시예 3-24는 25% PEI(Mw 20 kDa)과 8% DEX-Al(Mw 40 kDa

) 용액으로 평가하였다. 그 결과는 도 6에 나타내었으며, 제 2성분에 따라 종류에 따라 응고성능이 현저하게 달라짐을 알 수 있다.

실시예 3-25 내지 3-26는 동일한 방법으로 혈액응고 반응을 실시하되, CHI-Ly와 ALG-Al 용액을 사용하였다. 구체적으로 실시예 3-25는 2.5% CHI-Ly(Mw 50-190 kDa)와 10% ALG-Al(Mw 120-190 kDa), 실시예 3-26은 1.25% CHI-Ly(Mw 190-310 kDa)과 10% ALG-Al(Mw 120-190 kDa) 용액으로 평가하였다. 그 결과는 도 6에 나타내었으며, 부분적으로 혈액응고 반응을 보이나 다소 미반응 혈액량이 관찰되었다.

<실시예 4> 하이드로젤 물성 평가

상기 실시예 1에서 제조된 제 1 용액과 제 2 용액의 점도(viscosity), 저장탄성율(storage modulus; G'), 손실탄성율(loss modulus; G") 등을 측정하여 지혈용액의 물성을 정량적으로 평가하였다. 또한, 지혈용액에 의하여 혈액응집으로 생성되는 피 덩어리의 물성을 측정하기 위해 제 1 용액, 제 2 용액과 혈액을 각 1 : 1 : 1 비율로 반응시켜 물성을 측정하였다.

레오미터는 Anton-Paar(MCR 102) 기기를 이용하였으며, 지혈용액 및 혈액은 직경 25 mm 플레이트에 로딩하여 플레이트 간격(gap)은 0.5 mm, 0.1-10 Hz frequency sweep, 1% oscillating frequency strain, 측정온도 37℃ 조건으로 고정하여 측정을 실시하였다.

물성 측정은 상기 실시예를 통해 피 덩어리를 형성하는 재료의 구성으로 선별하여 진행하였으며, frequency 1일 때의 저장탄성률과 점도 값을 통해 정량적인 평가를 실시하였다. 구체적으로 실시예 3-1은 $5.7*10^3$ Pa, 실시예 3-3은 $2.0*10^3$ Pa, 실시예 3-5는 $1.6*10^3$ Pa, 실시예 3-9는 $8.3*10^2$ Pa, 실시예 3-15는 $6.3*10^2$ Pa, 실시예 3-16은 $1.5*10^2$ Pa, 실시예 3-17은 $1.2*10^2$ Pa, 실시예 3-23는 $2.0*10^3$ Pa으로 저장탄성률이 측정되었다. 또한, 실시예 3-1은 $9.0*10^2$ Pa·s, 실시예 3-3은 $3.2*10^2$ Pa·s, 실시예 3-5는 $2.5*10^2$ Pa·s, 실시예 3-9는 $1.3*10^2$ Pa·s, 실시예 3-15는 $1.0*10^2$ Pa·s, 실시예 3-16은 $2.0*10^1$ Pa·s, 실시예 3-17은 $7.8*10^1$ Pa·s, 실시예 3-23는 $3.2*10^2$ Pa·s으로 점도가 측정되었다.

도 7의 결과에 따르면, 산화제인 과요오드산염을 처리하여 알데하이드기

를 도입한 제 2 성분은 반복 단위분자당 산화제 비율이 증가할 때 산화도 및 물성이 증가하였다. 구체적으로 단위분자당 산화제가 0.5 당량 일 때 $9.2*10^2$ Pa, 1 당량 일 때 $1.6*10^3$ Pa, 1.5 당량 일 때 $1.7*10^3$ Pa, 2일 때 $1.7*10^3$ Pa으로 저장탄성률이 측정되어, 단위분자당 1.5 당량 이상의 과요오드산염을 처리하는 것이 바람직하다.

도 8의 결과에 따르면, 지혈 용액의 다른 변수를 고정하고 산화 덱스트란의 분자량(실시예 3-3, 3-5, 3-9)에 따른 피딩어리의 물성을 측정하였을 때 분자량이 낮을수록 높은 물성을 나타내었으며, 제 1성분의 키토산의 경우에도 같은 결과를 나타내었다.

<실시예 5> 액상형 지혈제(Tisseel)과 하이드로젤 타입 지혈제 비교평가

상기 실시예 3과 동일한 방법으로 시판되고 있는 액상형 지혈제인 티씰(Tisseel, Baxter)의 혈액응집 실험을 실시하여 비교 평가하였다. 티씰은 혈액성분을 포함하며 국소지혈, 봉합, 조직접착 등의 효과를 가지는 2액형 지혈제이다. 제 1 용액 피브린실러는 피브리노겐, 아프로티닌과 사람알부민을 비롯한 첨가제로 구성되어 있으며, 제 2 용액 트롬빈액은 사람트롬빈, 염화칼슘이수화물과 사람알부민을 비롯한 첨가제로 구성되어 있다. 제 1 용액, 제 2 용액, 혈액을 각 1 : 1 : 1 비율(각 100 μl)로 혼합하여 30초 후 반응속도, 하이드로젤의 물성(육안), 미반응 혈액량, 혈액과 혼합의 균일성 등을 판단하였다.

그 결과는 도 9(A)에 나타내었으며, 수초 내에 반응이 일어나지만 혈액과 구성성분이 균일하게 혼합되지 않고 제 1 용액과 제 2 용액이 반응이 먼저 일어나 혈액이 겉돌게 되어 미반응 혈액이 관찰된다. 또한, 도 9(B)에서 더블챔버 주사기와 어플리케이션 캐뉼라를 이용한 평가에서도 유사한 결과가 관찰되었다.

상기 실시예 4와 동일한 방법으로 레오미터 기기를 이용하여 액상형 지혈제 티씰과 혈액을 혼합한 피 덩어리의 물성을 평가하였다. 실시예 3-1과 비교한 결과를 도 10에 나타내었으며, 실시예의 구성이 비교적 높은 물성을 나타내었다. 구체적으로 frequency 1일 때 티씰의 저장탄성률과 점도는 각각 $6.2*10^2$ Pa, $1.0*10^2$ Pa·s으로 측정되었다. 또한, 티씰은 혈액과 혼합하여 응고반응 뒤 물성이 감소하는 반면, 실시예 3-1의 경우 물성이 증가하여 혈액성분과

반응으로 혈액응고가 유도됨을 확인하였다.

본 발명의 제 1 용액과 제 2 용액은 혼합하기 전에는 유동성을 가진 투명한 액체이고, 이들을 이중주사기에 적용하여 필요시 혼합된 상태로 도포가능함을 도 11에 나타내었다.

본 발명에 대해 상기 실시예를 참조하고 설명하였으나, 이는 예시적인 것에 불과하며, 본 발명에 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 타 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호범위는 첨부된 특허 청구 범위의 기술적 사항에 의해 정해져야 할 것이다.

【산업상 이용가능성】

이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면, 하이드로젤 타입 지혈제는 트롬빈, 피브리노겐과 같은 혈액제제를 포함하지 않은 지혈제로써, 혈액응고시스템이 망가진 혈우병, 당뇨병 환자와 항응고제 및 아스피린 복용 환자에 적용하여 혈액응고 및 지혈작용 유도가 가능하다. 또한, 복합적인 반응이 동시다발적으로 일어나 보다 효과적인 지혈효과로 광범위한 외과 수술 영역에 지혈제로 사용할 수 있다.

【청구의 범위】

【청구항 1】

양이온성 아미노산이 측쇄에 결합된 키토산을 함유하는 제 1 용액과 산화에 의해 알데하이드기가 도입된 글루코오스 또는 셀루로오스계 화합물을 포함하는 제 2 용액을 포함하는 2액형 지혈제 조성물로서, 상기 제 1 용액 및 제 2 용액의 혼합시 상기 키토산 화합물과 글루코오스 또는 셀루로오스계 화합물의 상반되는 전하에 의한 정전기적 결합과 동시에 상기 키토산 화합물의 아민(amine, $-NH_2$) 작용기와 글루코오스 또는 셀루로오스계 화합물의 알데하이드(aldehyde, -CHO) 작용기 사이의 시프염기(schiff base) 반응에 의해 하이드로젤(hydrogel)이 형성되는 것을 특징으로 하는 2액형 지혈제 조성물.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 제 1 용액 및 제 2 용액을 출혈부위에 도포하였을 때, 재료-재료, 재료-혈액 간의 상반되는 전하의 특성을 이용하여 정전기적 인력으로 혈액응고를 유도하는 단계, 재료-재료, 재료-혈액 간의 시프염기 반응으로 혈액응고를 유도하는 단계, 및 복합적인 반응으로 졸-젤 전이가 일어나 형성된 하이드로젤이 출혈부위를 물리적으로 압박하여 지혈하는 단계가 동시다발적으로 일어나는 것을 특징으로 하는 2액형 지혈제 조성물.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 제 1 용액의 키토산 화합물은 독립적으로 양이온성 특성을 가지며, 하나의 카르복시기와 하나 이상의 아민기를 포함하는 아르기닌, 히스티딘, 시스테인, 라이신 중에서 선택된 1종 이상의 양이온성 이미노산이 측쇄에 결합된 키토산 화합물로서, 중성 pH에 녹는 것을 특징으로 하는 2액형 지혈제 조성물.

【청구항 4】

제 1항에 있어서, 상기 제 2 용액의 글루코오스 또는 셀루로오스계 화합물은 독립적으로 중성 혹은 음이온성 특성을 가지며, 글루코오스 혹은 셀루로

오스계 화합물인 덱스트란, 히알루론산, 카르복시메틸 셀루로오스, 알지네이트, 또는 전분이 산화되어 알데하이드기가 도입된 화합물, 두개의 알데하이드기 포함하는 글루타르알데하이드 화합물 중에서 선택된 1종 이상의 화합물인 것을 특징으로 하는 2액형 지혈제 조성물.

【청구항 5】

양이온성 아미노산이 측쇄에 결합된 키토산을 함유하는 증류수 혹은 생리 식염수에 용해시켜 제 1 용액을 준비하는 단계; 및 산화에 의해 알데하이드기가 도입된 글루코오스 또는 셀루로오스계 화합물을 증류수 혹은 생리 식염수에 용해시켜 제 2 용액을 준비하는 단계를 포함하는 제 1항에 따른 2액형 지혈제 조성물의 제조방법.

【청구항 6】

제 1항에 있어서, 상기 제 1 용액 및 제 2 용액은 각각 별도의 챔버에 저장되었다가 출혈부위에 도포시 서로 혼합되어 즉석에서 하이드로젤을 형성하는 것을 특징으로 하는 2액형 지혈제 조성물.

【청구항 7】

제 6항에 있어서, 상기 제 1 용액 및 제 2 용액은 듀얼챔버 주사기에 포함되고, 상기 듀얼챔버 주사기 입구에 니들(needle), 믹싱노즐(mixing nozzle), 스프레더(spreader), 또는 분사(spray)타입 보조도구 중 1종을 조립하여 도포방법을 선택하는 것을 특징으로 하는 2액형 지혈제 조성물.

【청구항 8】

제 1항에 있어서, 상기 제 1 용액 및 제 2 용액 중 어느 하나 또는 둘에 세포, 약물, 또는 유착방지 물질을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 2액형 지혈제 조성물.

【청구항 9】

제 8항에 있어서, 상기 2액형 지혈제 조성물은 세포를 포함하고 형성된

하이드로젤에 의해 조직공학적 지지체의 역할을 하는 것을 특징으로 하는 2액형 지혈제 조성물.

【청구항 10】

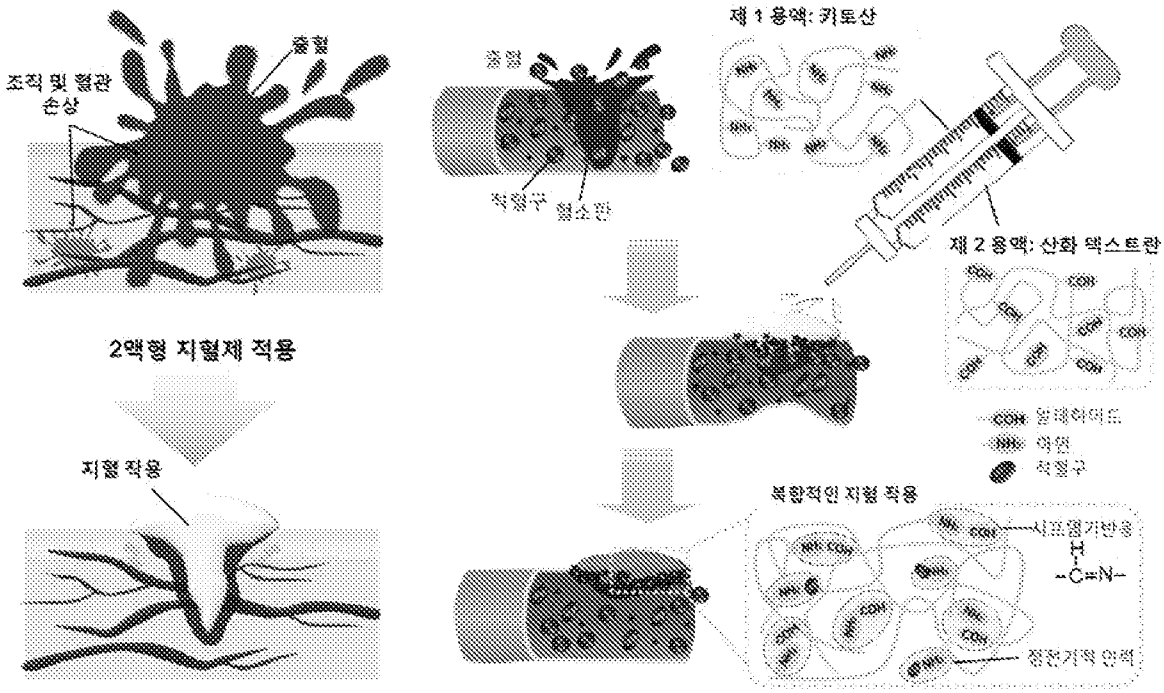
제 8항에 있어서, 상기 2액형 지혈제 조성물은 약물을 포함하고 형성된 하이드로젤에 의해 약물전달체의 역할을 하는 것을 특징으로 하는 2액형 지혈제 조성물.

【청구항 11】

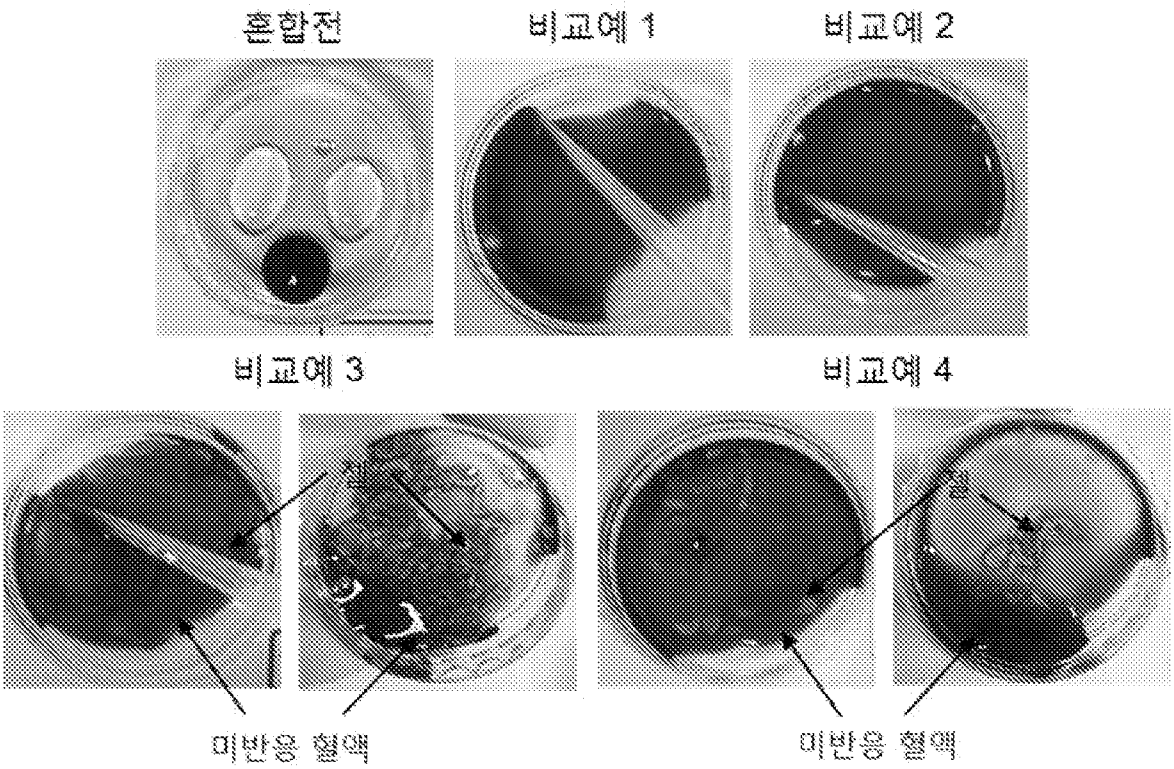
제 8항에 있어서, 상기 2액형 지혈제 조성물은 유착방지 물질을 포함하고 형성된 하이드로젤에 의해 유착방지제의 역할을 하는 것을 특징으로 하는 2액형 지혈제 조성물.

【도면】

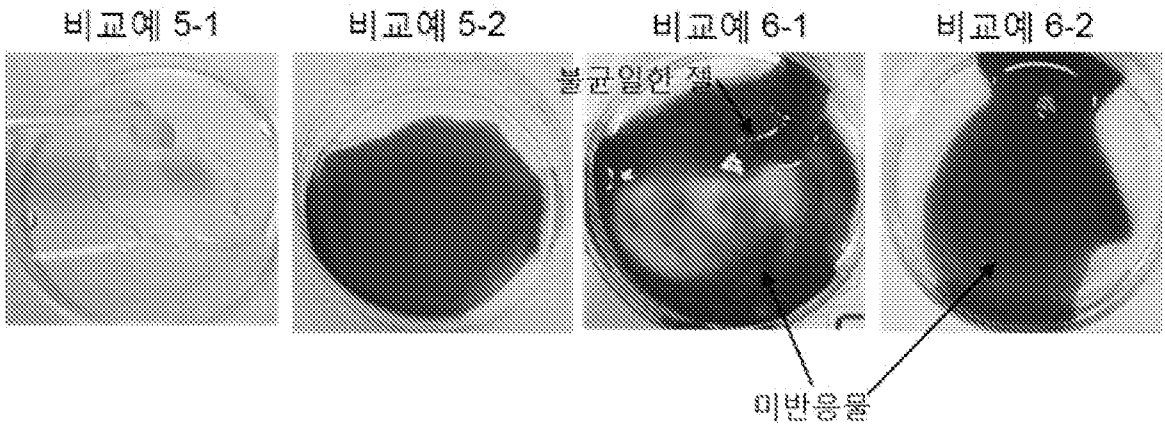
【도 1】


출혈
조직 및 혈관 손상
2액형 지혈제 적용
지혈 작용
제 1 용액: 키토산
출혈
적혈구
혈소판
제 2 용액: 산화 덱스트란
알데하이드
아민
적혈구
복합적인 지혈 작용
시프염기반응
-C=N-
정전기적 인력

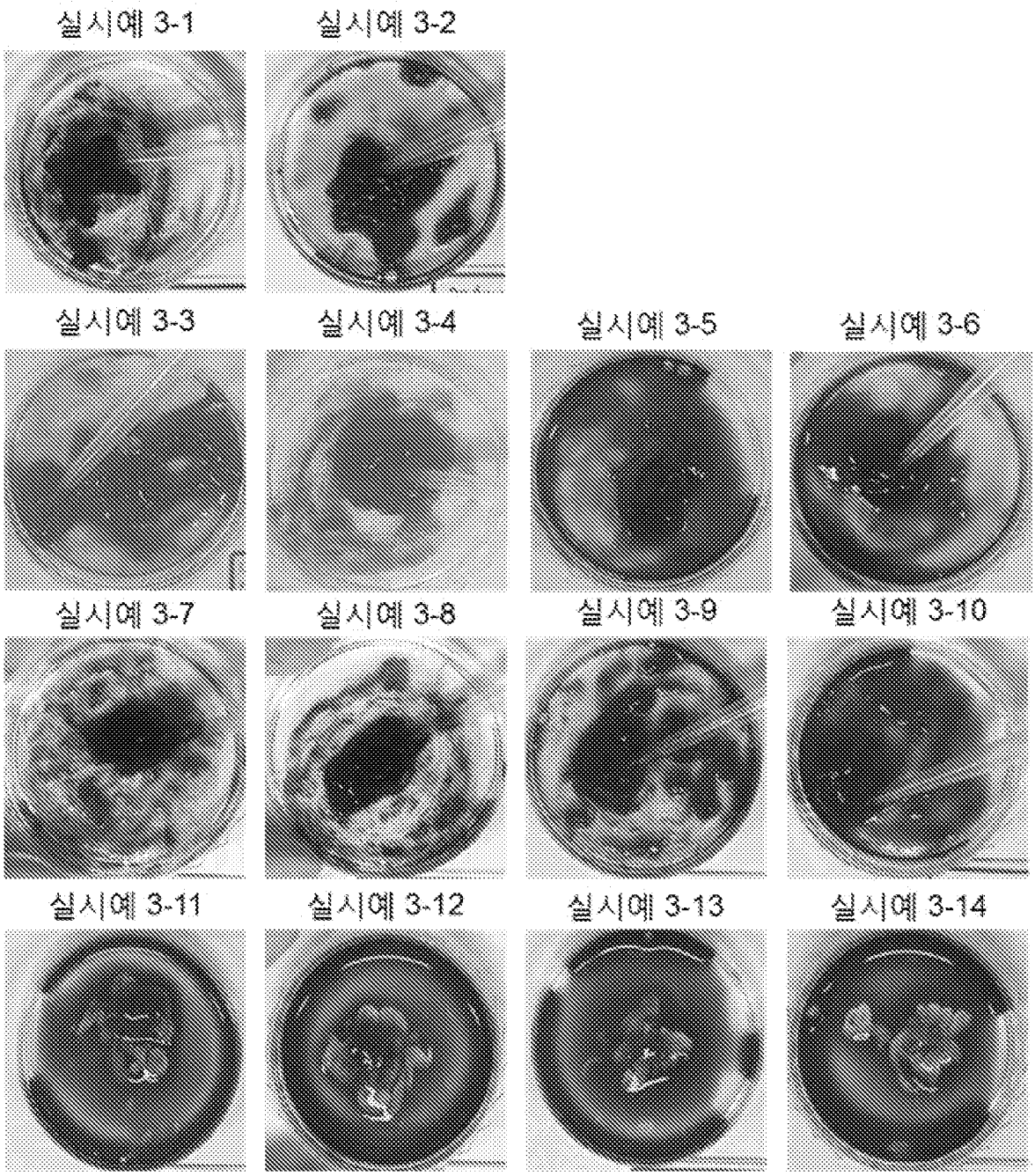
【도 2】


혼합전
비교예 1
비교예 2
비교예 3
비교예 4
미반응 혈액
미반응 혈액

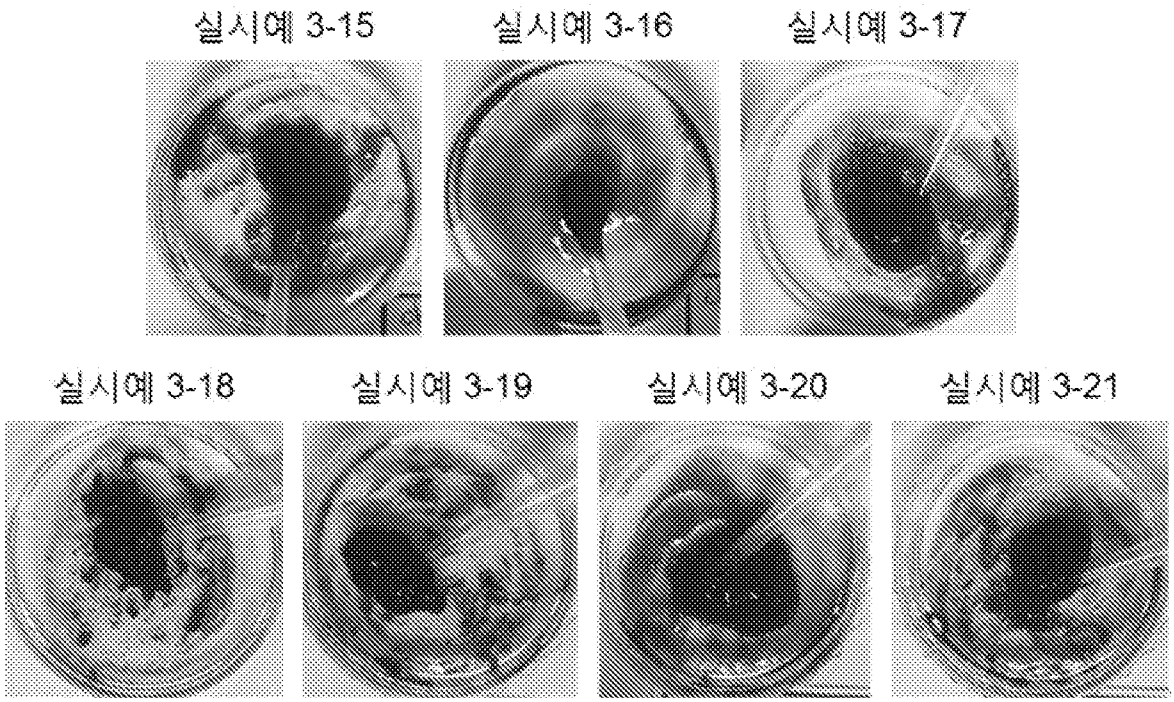
【도 3】


비교예 5-1
비교예 5-2
비교예 6-1
비교예 6-2
불균일한 젤
미반응물

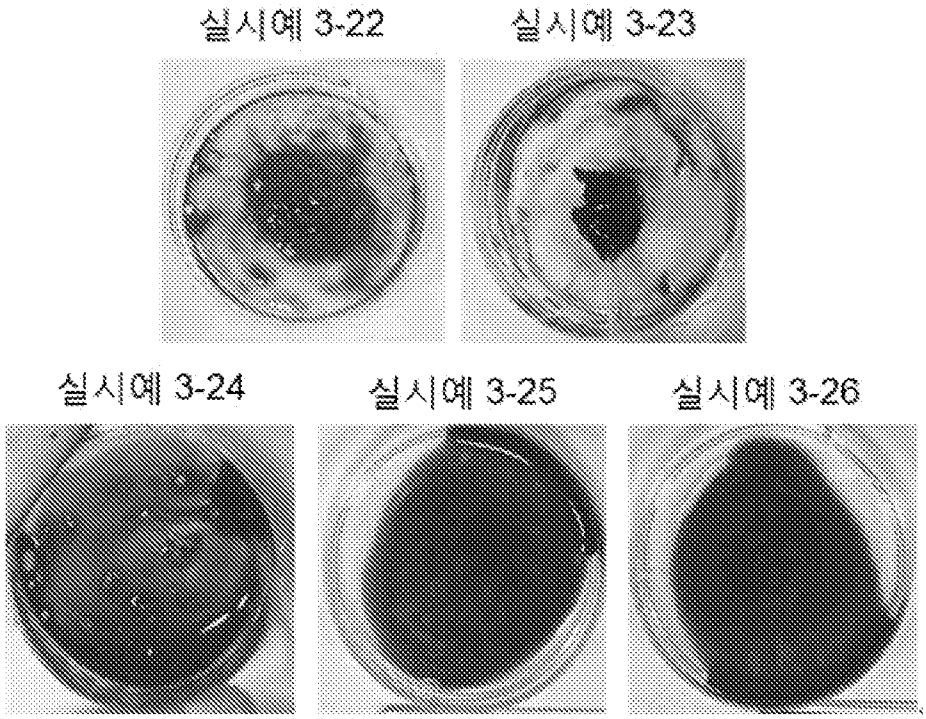
【도 4】


실시예 3-1
실시예 3-2
실시예 3-3
실시예 3-4
실시예 3-5
실시예 3-6
실시예 3-7
실시예 3-8
실시예 3-9
실시예 3-10
실시예 3-11
실시예 3-12
실시예 3-13
실시예 3-14

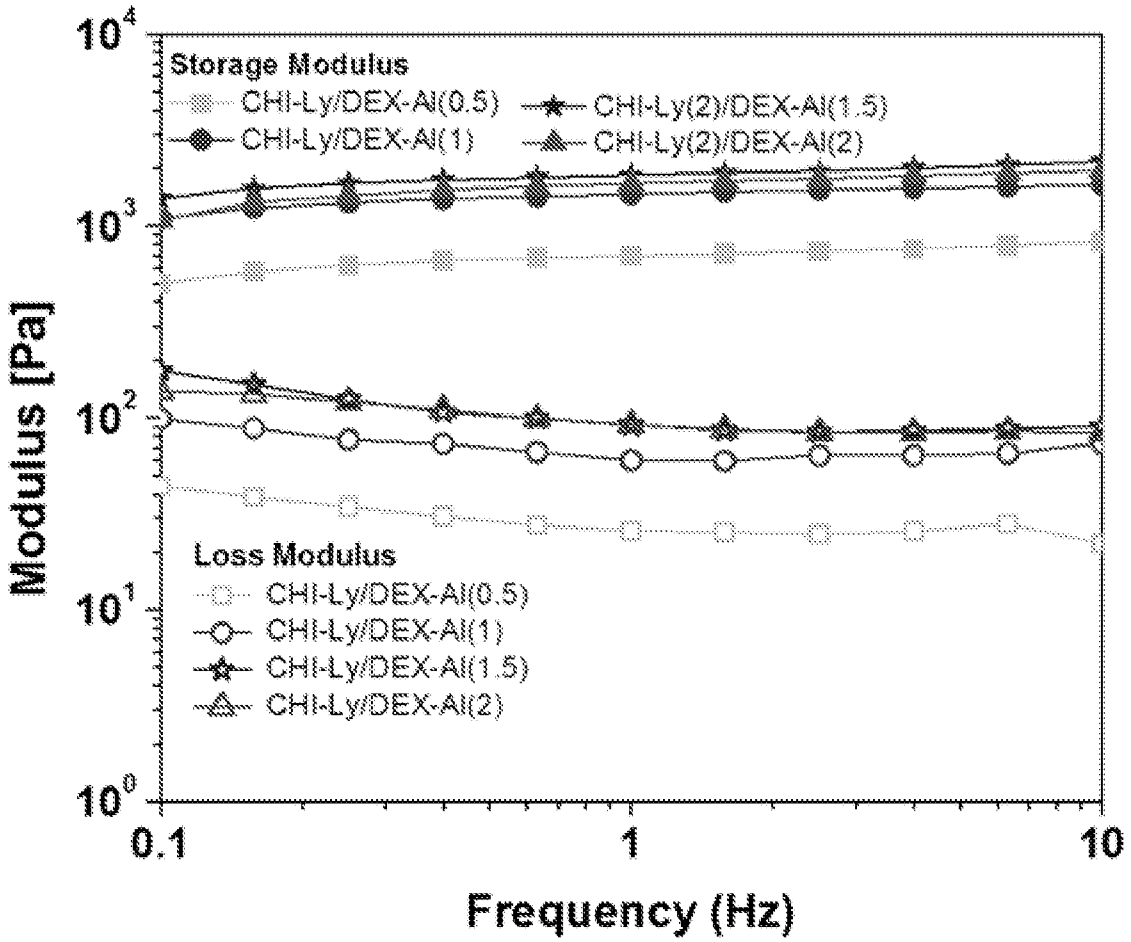
【도 5】


실시예 3-15
실시예 3-16
실시예 3-17
실시예 3-18
실시예 3-19
실시예 3-20
실시예 3-21

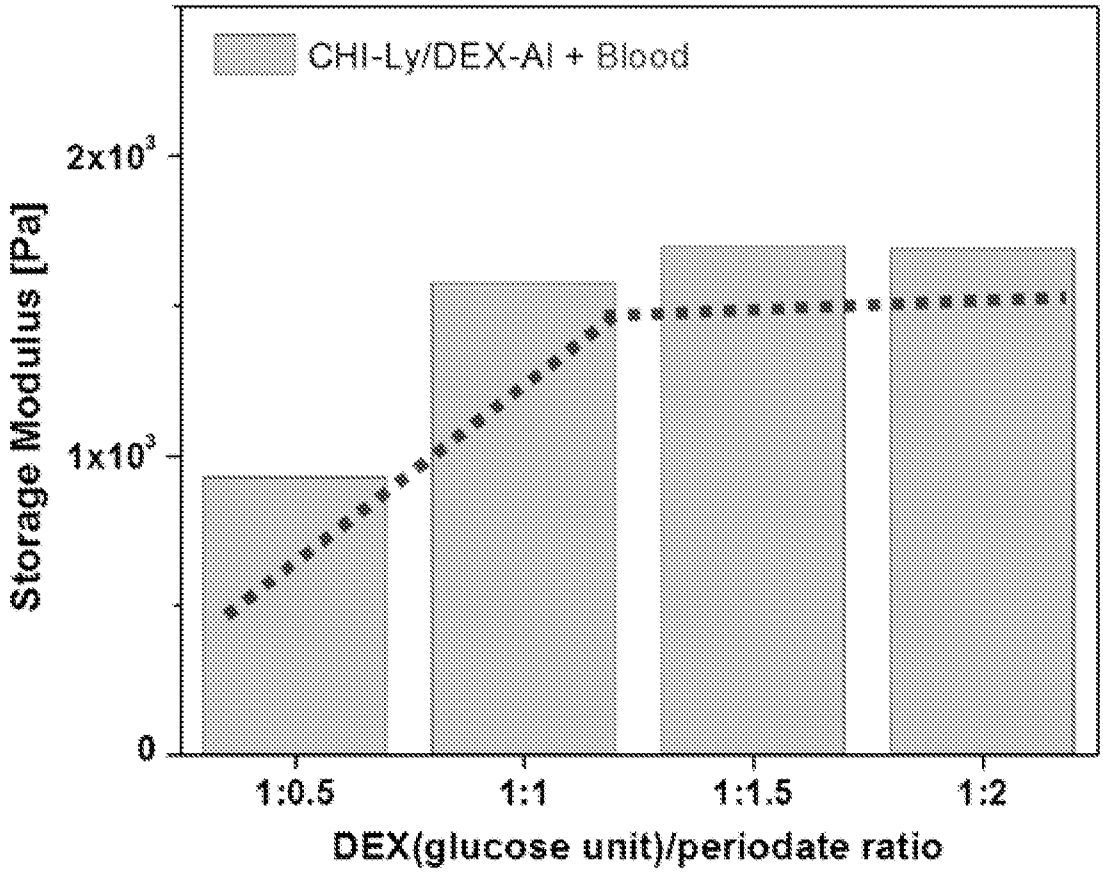
【도 6】


실시예 3-22
실시예 3-23
실시예 3-24
실시예 3-25
실시예 3-26

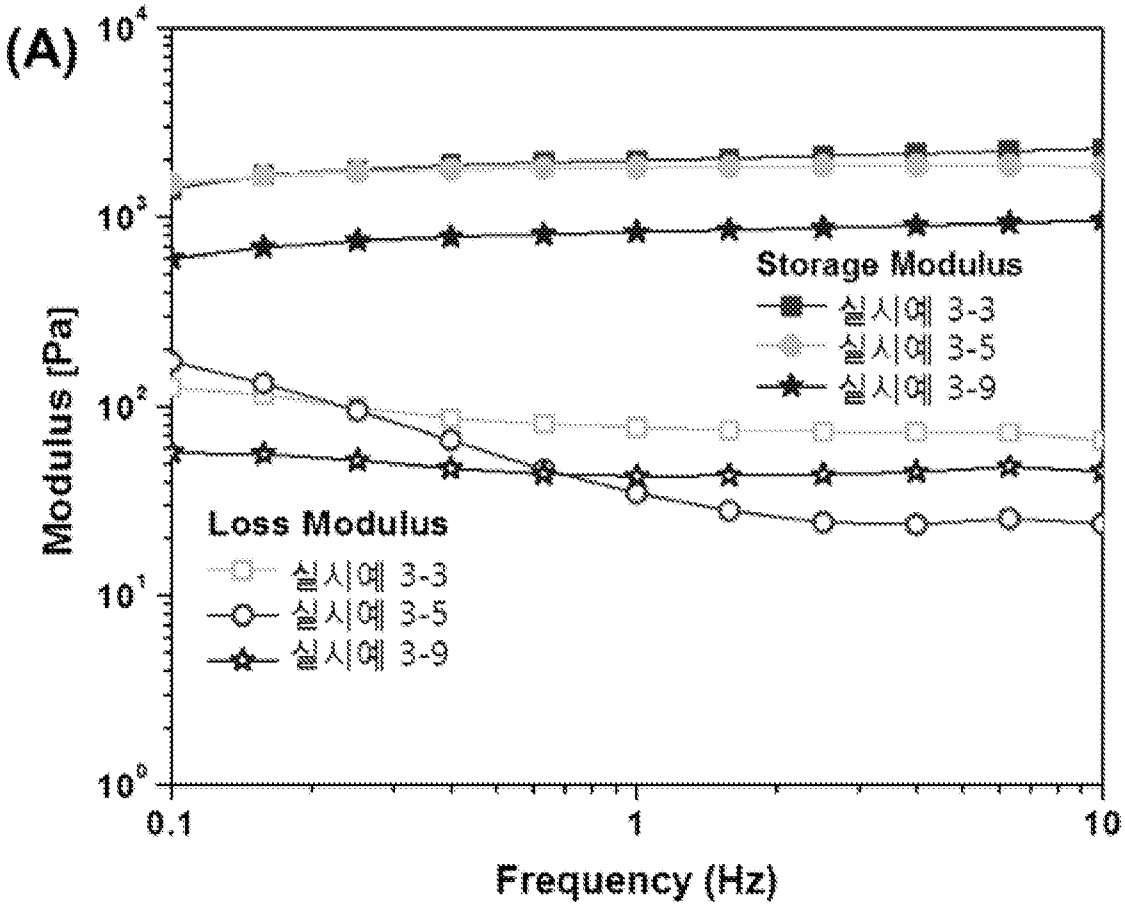
【도 7a】


Storage Modulus
CHI-Ly/DEX-Al(0.5)
CHI-Ly/DEX-Al(1)
CHI-Ly(2)/DEX-Al(1.5)
CHI-Ly(2)/DEX-Al(2)
Loss Modulus
CHI-Ly/DEX-Al(0.5)
CHI-Ly/DEX-Al(1)
CHI-Ly/DEX-Al(1.5)
CHI-Ly/DEX-Al(2)
Modulus [Pa]
Frequency (Hz)
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
0.1
1
10

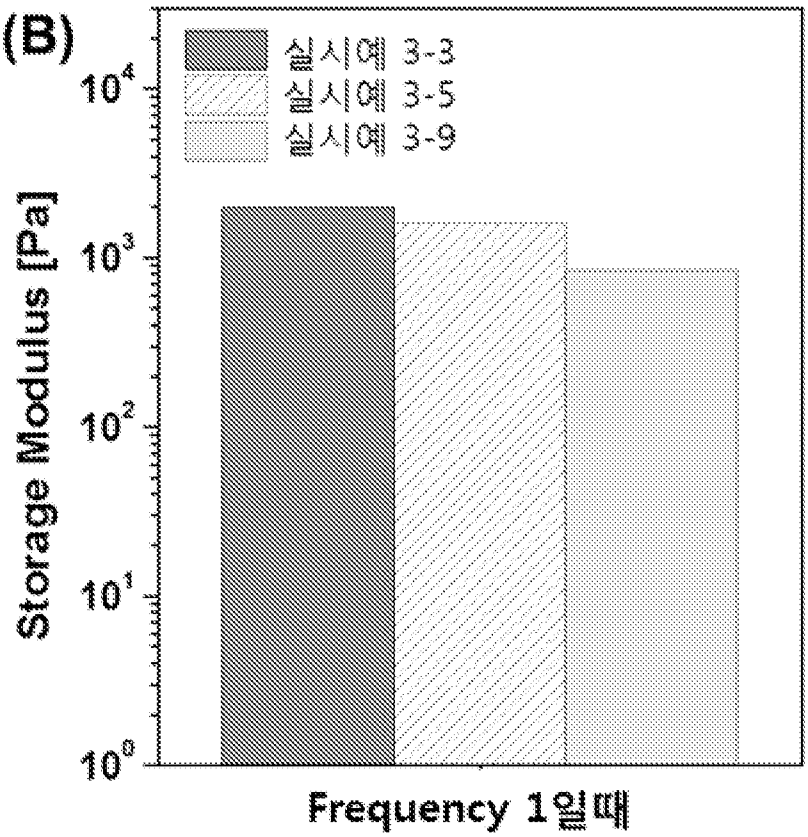
【도 7b】


CHI-Ly/DEX-Al + Blood
Storage Modulus [Pa]
2x10³
1x10³
0
1:0.5
1:1
1:1.5
1:2
DEX(glucose unit)/periodate ratio

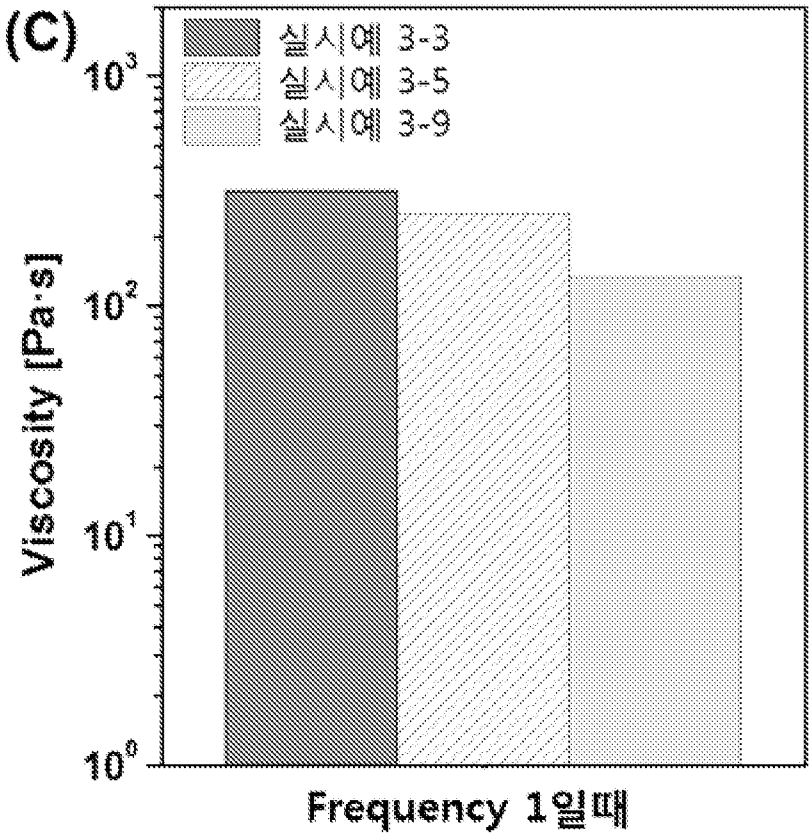
【도 8a】


(A)
Modulus [Pa]
Frequency (Hz)
Storage Modulus
실시예 3-3
실시예 3-5
실시예 3-9
Loss Modulus
실시예 3-3
실시예 3-5
실시예 3-9

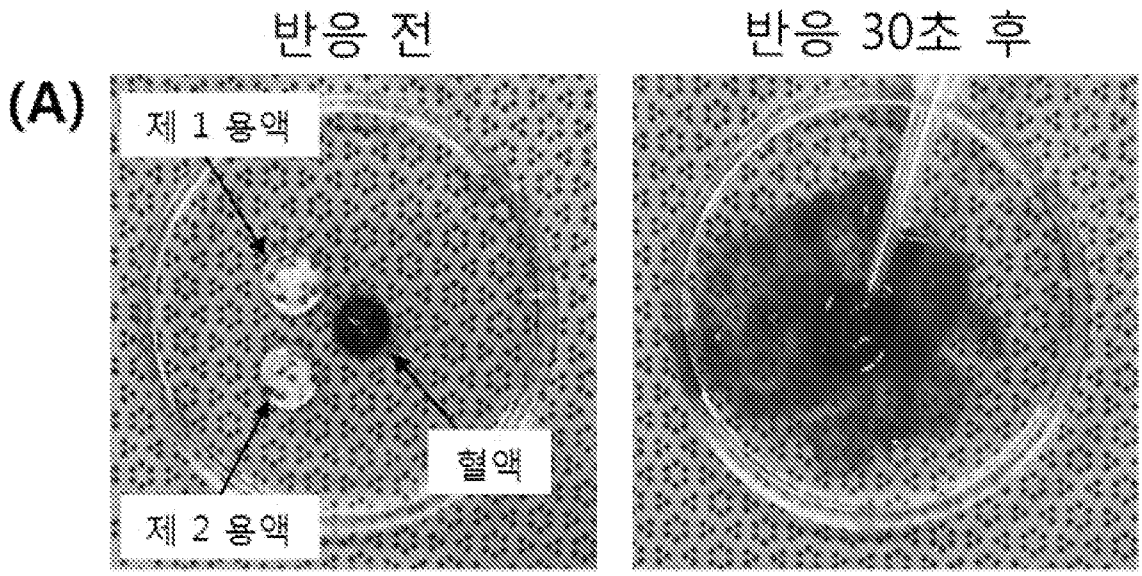
【도 8b】


(B)
실시예 3-3
실시예 3-5
실시예 3-9
Storage Modulus [Pa]
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
Frequency 1일때

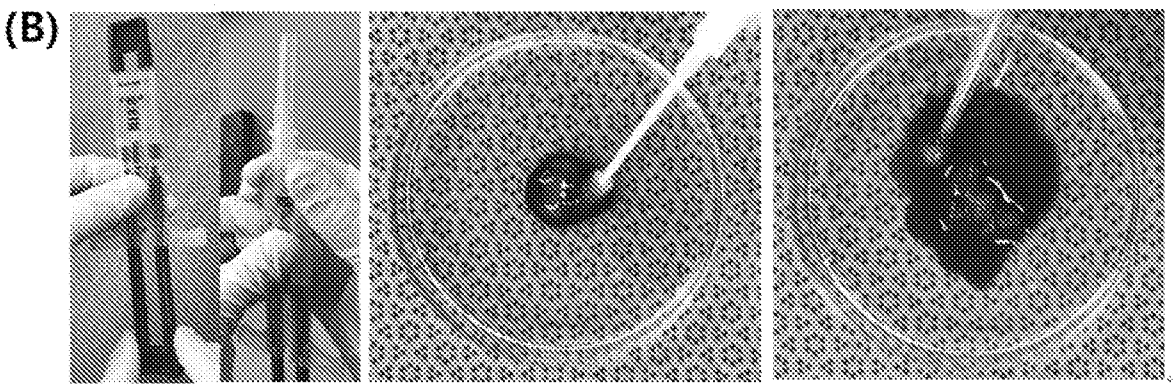
【도 8c】


(C)
실시예 3-3
실시예 3-5
실시예 3-9
Viscosity [Pa·s]
10³
10²
10¹
10⁰
Frequency 1일때

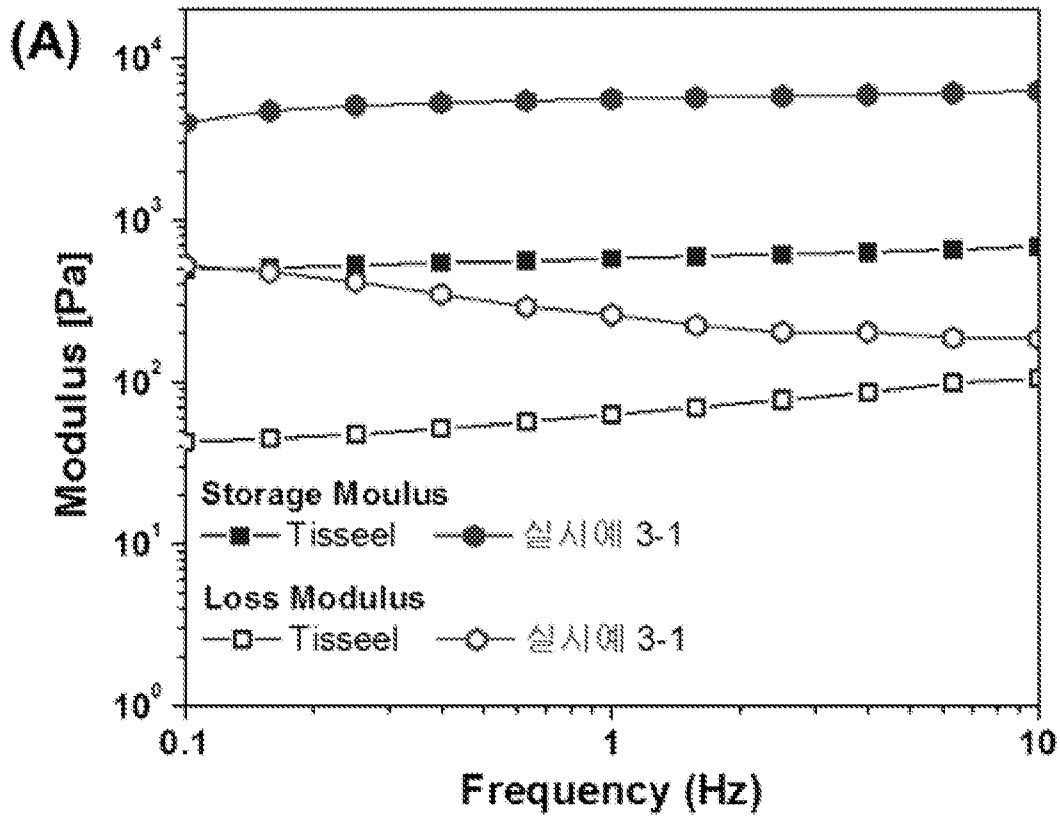
【도 9a】



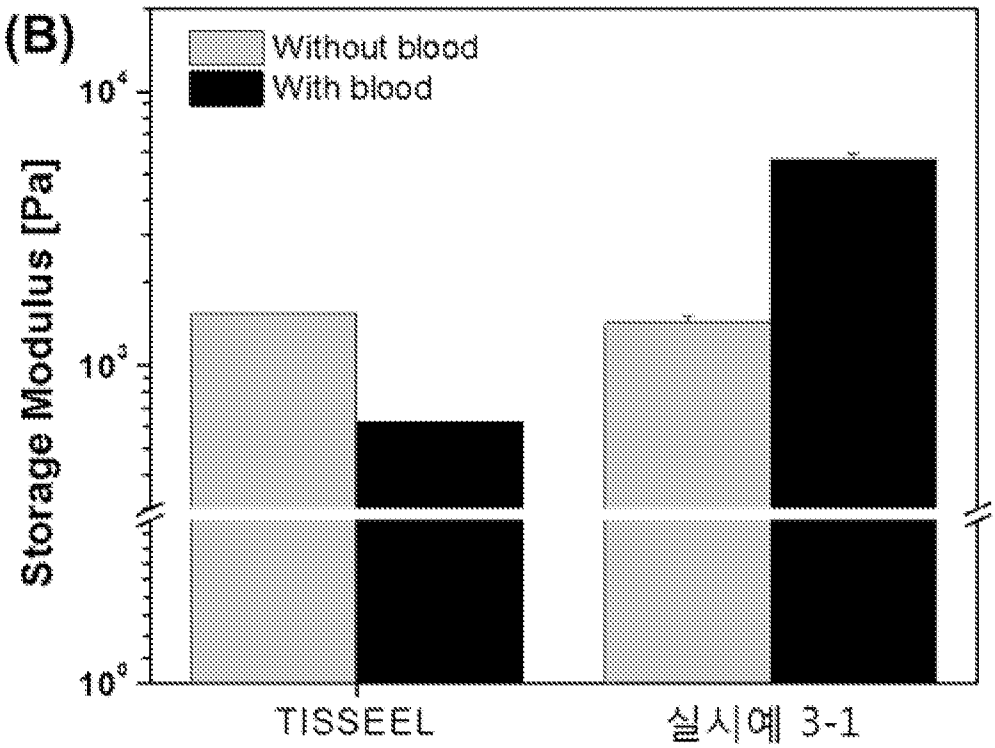
【도 9b】



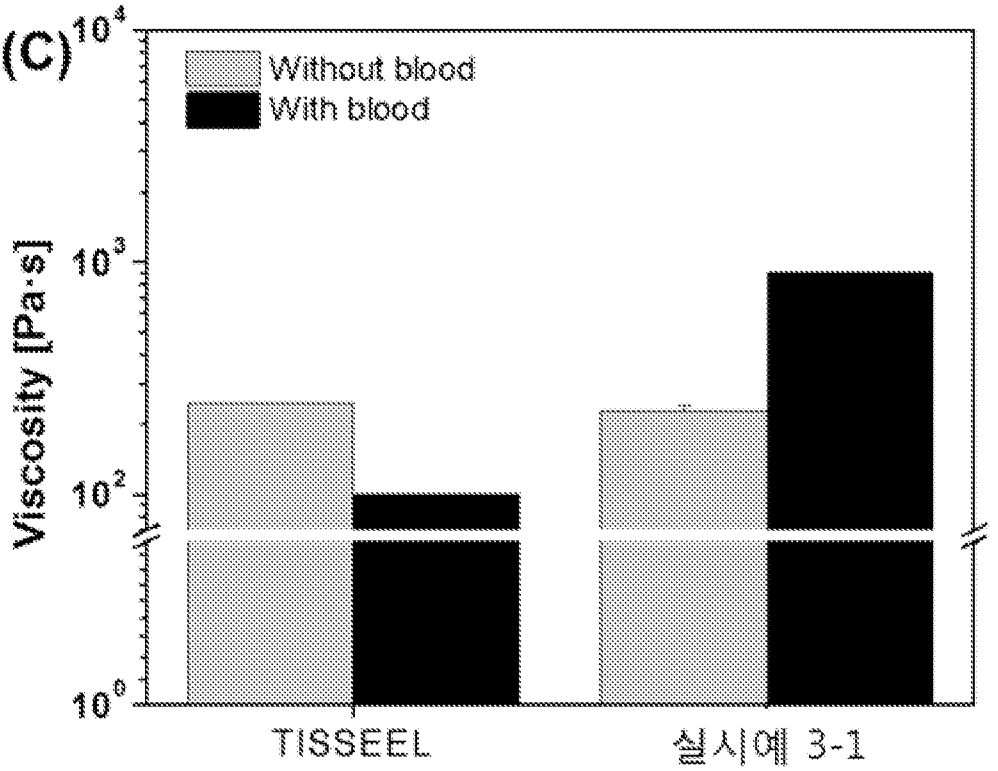
【도 10a】


(A)
Modulus [Pa]
Storage Moulus
Tisseel
실시예 3-1
Loss Modulus
Tisseel
실시예 3-1
Frequency (Hz)

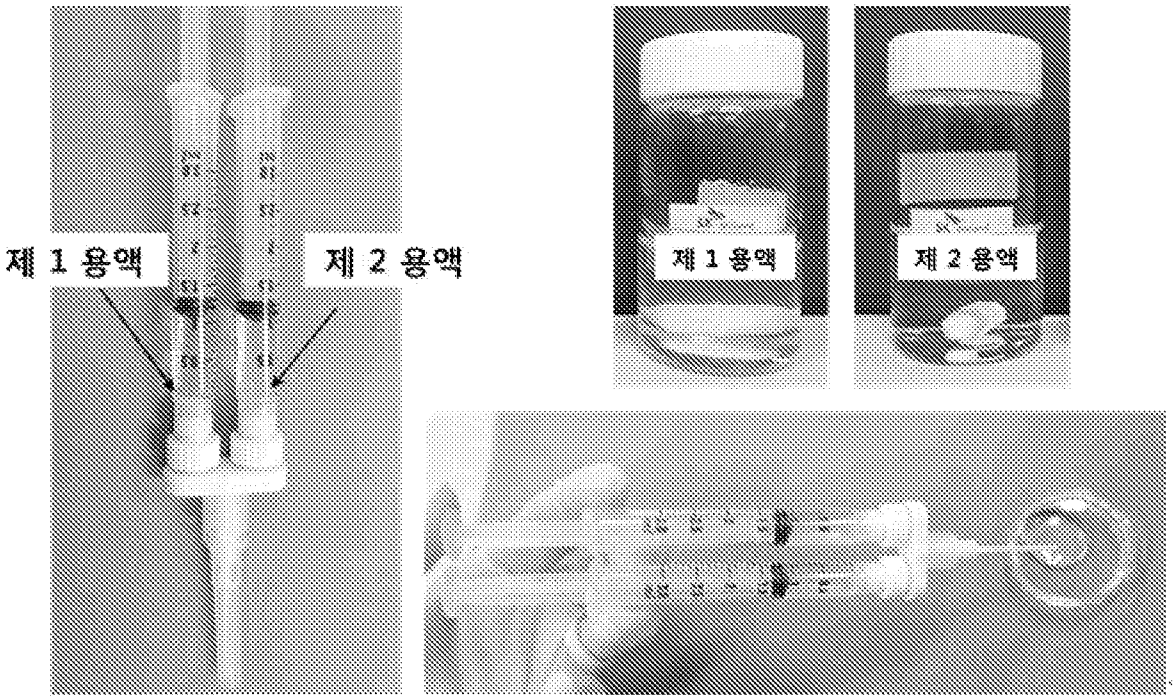
【도 10b】


(B)
Without blood
With blood
Storage Modulus [Pa]
TISSEEL
실시예 3-1

【도 10c】


(C)
Without blood
With blood
Viscosity [Pa·s]
10^4
10^3
10^2
10^0
TISSEEL
실시예 3-1

【도 11】


제 1 용액
제 2 용액
제 1 용액
제 2 용액

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/006003

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K 31/722(2006.01)i, A61K 31/717(2006.01)i, A61K 31/721(2006.01)i, A61K 31/728(2006.01)i, A61K 9/06(2006.01)i, A61P 7/04(2006.01)i, A61L 26/00(2006.01)i, A61L 31/14(2006.01)i, A61L 31/16(2006.01)i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K 31/722; A61K 47/36; A61K 47/40; A61K 9/06; A61K 9/127; A61L 27/52; A61L 31/04; A61L 31/14; A61K 31/717; A61K 31/721; A61K 31/728; A61P 7/04; A61L 26/00; A61L 31/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: cationic amino acid, chitosan, aldehyde group, glucose/cellulose based compound, hydrogel, two component type hemostatic composition

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WU, Yu et al. A soft tissue adhesive based on aldehyde-sodium alginate and amino-carboxymethyl chitosan preparation through the Schiff reaction. Frontiers of Materials Science. 2017, vol. 11, no. 3, pages 215-222 See abstract; pages 216, 217; and figure 7.	1-11
Y	KR 10-2014-0107429 A (AGRATECH INTERNATIONAL, INC.) 04 September 2014 See paragraphs [0030], [0036]; and claims 1, 2.	1-11
Y	KR 10-1783308 B1 (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION et al.) 29 September 2017 See claims 8-16.	7-11
A	JP 2005-536496 A (BIO SYNTECH CANADA INC.) 02 December 2005 See the entire document.	1-11
A	KR 10-2017-0056423 A (SOGANG UNIVERSITY RESEARCH & BUSINESS DEVELOPMENT FOUNDATION) 23 May 2017 See the entire document.	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 AUGUST 2019 (28.08.2019)	**28 AUGUST 2019 (28.08.2019)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2019/006003

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2014-0107429 A	04/09/2014	CA 2892904 A1	20/06/2013
		CN 104114178 A	22/10/2014
		EP 2790709 A1	22/10/2014
		EP 2790709 A4	29/07/2015
		JP 2015-504867 A	16/02/2015
		US 2014-0336147 A1	13/11/2014
		WO 2013-090357 A1	20/06/2013
KR 10-1783308 B1	29/09/2017	US 2017-0281781 A1	05/10/2017
JP 2005-536496 A	02/12/2005	CA 2493083 A1	22/01/2004
		CA 2493083 C	06/11/2012
		EP 1536837 A1	08/06/2005
		EP 1536837 B1	15/09/2010
		JP 2012-092137 A	17/05/2012
		JP 5614913 B2	29/10/2014
		JP 5670872 B2	18/02/2015
		US 2006-0127873 A1	15/06/2006
		US 2009-0202430 A1	13/08/2009
		WO 2004-006961 A1	22/01/2004
KR 10-2017-0056423 A	23/05/2017	KR 10-1846271 B1	06/04/2018
		US 2018-0353657 A1	13/12/2018
		WO 2017-082538 A1	18/05/2017

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2019/006003

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/722(2006.01)i, A61K 31/717(2006.01)i, A61K 31/721(2006.01)i, A61K 31/728(2006.01)i, A61K 9/06(2006.01)i, A61P 7/04(2006.01)i, A61L 26/00(2006.01)i, A61L 31/14(2006.01)i, A61L 31/16(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 31/722; A61K 47/36; A61K 47/40; A61K 9/06; A61K 9/127; A61L 27/52; A61L 31/04; A61L 31/14; A61K 31/717; A61K 31/721; A61K 31/728; A61P 7/04; A61L 26/00; A61L 31/16

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 양이온성 아미노산(cationic amino acid), 키토산(chitosan), 알데하이드기 (aldehyde group), 글루코오스/셀룰로오스계 화합물(glucose/cellulose compound), 하이드로겔(hydrogel), 2액형 지혈제 조성물(two component type hemostatic composition)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	WU, YU 등, "A soft tissue adhesive based on aldehyde-sodium alginate and amino-carboxymethyl chitosan preparation through the Schiff reaction", Frontiers of Materials Science, 2017, 11권, 3호, 페이지 215-222 요약; 페이지 216, 217; 및 도면 7 참조.	1-11
Y	KR 10-2014-0107429 A (아그라테크 인터내셔널, 인코포레이티드) 2014.09.04 단락 [0030], [0036]; 및 청구항 1, 2 참조.	1-11
Y	KR 10-1783308 B1 (아주대학교산학협력단 등) 2017.09.29 청구항 8-16 참조.	7-11
A	JP 2005-536496 A (BIO SYNTECH CANADA INC.) 2005.12.02 전체 문헌 참조.	1-11
A	KR 10-2017-0056423 A (서강대학교산학협력단) 2017.05.23 전체 문헌 참조.	1-11

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2019년 08월 28일 (28.08.2019)	2019년 08월 28일 (28.08.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
이기철
전화번호 +82-42-481-3353

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/006003

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2014-0107429 A	2014/09/04	CA 2892904 A1	2013/06/20
		CN 104114178 A	2014/10/22
		EP 2790709 A1	2014/10/22
		EP 2790709 A4	2015/07/29
		JP 2015-504867 A	2015/02/16
		US 2014-0336147 A1	2014/11/13
		WO 2013-090357 A1	2013/06/20
KR 10-1783308 B1	2017/09/29	US 2017-0281781 A1	2017/10/05
JP 2005-536496 A	2005/12/02	CA 2493083 A1	2004/01/22
		CA 2493083 C	2012/11/06
		EP 1536837 A1	2005/06/08
		EP 1536837 B1	2010/09/15
		JP 2012-092137 A	2012/05/17
		JP 5614913 B2	2014/10/29
		JP 5670872 B2	2015/02/18
		US 2006-0127873 A1	2006/06/15
		US 2009-0202430 A1	2009/08/13
		WO 2004-006961 A1	2004/01/22
KR 10-2017-0056423 A	2017/05/23	KR 10-1846271 B1	2018/04/06
		US 2018-0353657 A1	2018/12/13
		WO 2017-082538 A1	2017/05/18