

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0020386 (43) 공개일자 2012년03월08일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C08B 37/08 (2006.01) A61K 47/36 (2006.01)		(71) 출원인 충남대학교산학협력단 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(21) 출원번호 10-2010-0083967		(72) 발명자 허강무 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(22) 출원일자 2010년08월30일 심사청구일자 2010년08월30일		이정정 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
		(74) 대리인 장수영

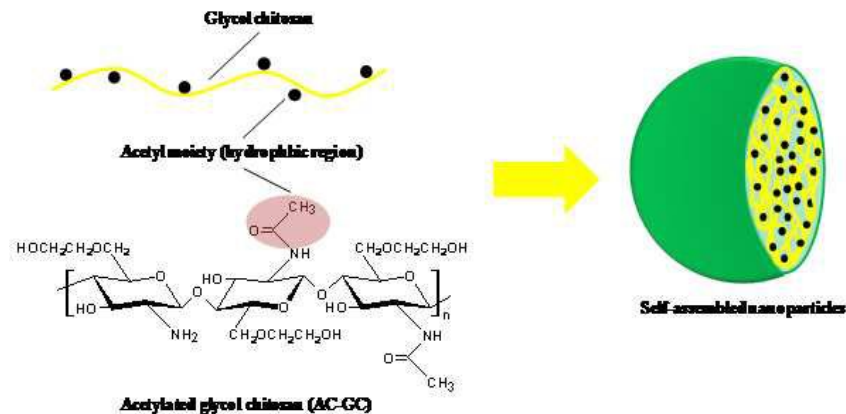
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 글리콜 키토산 유도체, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 약물 전달체

(57) 요약

본 발명은 글리콜 키토산 유도체, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 약물 전달체에 관한 것으로, 보다 상세하게는 나노 크기의 자기집합체를 형성할 수 있고, 온도감응성과 생분해성을 동시에 가져 약물전달체로 사용되기에 적합한 특성을 갖는 글리콜 키토산 유도체, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 약물 전달체에 관한 것이다.

대표도 - 도1

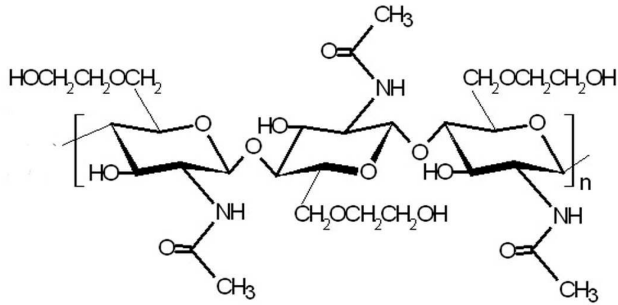


특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1의 구조를 갖는 온도감응성 글리콜 키토산 유도체:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

상기 n은 10 내지 10000의 정수이다.)

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 유도체의 아세틸화도는 20 내지 90%인 것인 유도체.

청구항 3

제1항에 있어서,

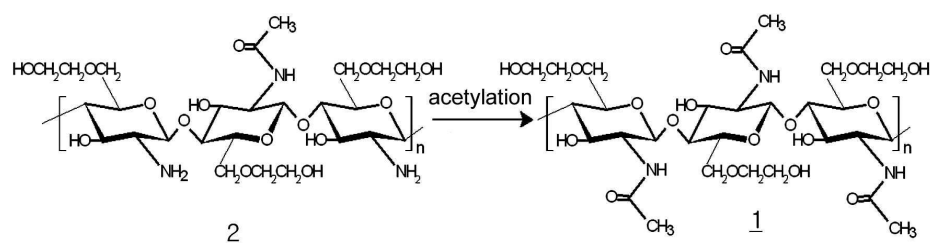
상기 유도체의 아세틸화도는 70 내지 80%인 것인 유도체.

청구항 4

하기 반응식 1에 나타낸 바와 같이,

화학식 2의 글리콜 키토산을 아세틸화제로 아세틸화 반응하여 화학식 1의 글리콜 키토산 유도체를 제조하는 방법:

[반응식 1]



(상기 반응식 1에서,

상기 n은 10 내지 10000의 정수이다.)

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 아세틸화제는 무수 아세트산인 것인 제조방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 글리콜 키토산 유도체의 아세틸화도는 20 내지 90% 인 것인 제조방법.

청구항 7

제1항의 키토산 유도체를 포함하는 약물 전달체.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 나노 크기의 자기집합체를 형성할 수 있고, 온도감응성과 생분해성을 동시에 가져 약물전달체로 사용되기에 적합한 특성을 갖는 글리콜 키토산 유도체, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 약물 전달체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 키토산은 게 껍질이나 새우와 같은 갑각류로부터 추출된 키틴으로부터 유래된 양이온성 다당류이다. 일반적으로 키토산은 키틴으로부터 C2의 아세트아미드에서 약 50% 이상 아세틸기를 제거하여 얻어진 것으로서, N-아세틸화도가 50% 미만이며, N-아세틸 D-글루코사민과 D-글루코사민 단위체가 β -1,4 글루코시드 결합되어 있다.

[0003] 최근 키토산은 생체적합성, 낮은 독성, 점막점착(mucoadhesive) 특성과 같은 다양한 이화학적 및 생리학적 특성이 있어, 식품, 농업, 의약, 약물 및 화장품과 같은 다양한 분야에 적용될 수 있는 기능성 생체 고분자로 주목받고 있다.

[0004] 그러나, 상술한 특징 및 장점을 갖는 키토산은 서로 이웃하는 분자가 강한 수소결합으로 견고하게 결합하여 물에 녹지 않는 불용성을 나타낸다. 따라서, 키토산의 의약 및 생명공학 분야에서 활용도를 높이기 위해 다양한 생리적 조건에서 용해될 수 있는 키토산 유도체의 개발이 필요하다.

[0005] 글리콜 키토산은 수용성 키토산 유도체 중 하나로, 친수성 에틸렌글리콜 기의 도입에 따라 중성 pH에서 수용성을 나타낸다. 이전의 연구에 따르면, 글리콜 키토산은 비세포 독성, 생체적합성을 나타내고, 낮은 농도에서 연골세포의 성장을 자극한다고 보고된바 있다(Carreno-Gomez. B, Duncan. R, *Int. J. Pharm.* **1997**, 148, 231; [8] D. K. Knight, S. N. Shapka, B. G. Amsden, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* **2007**, 83, 787).

[0006] 글리콜 키토산의 백본을 따라 존재하는 아민기는 생체 내 용도를 개선하기 위해 변형이 가능한 부위이다. 글리콜 키토산의 특성을 개선하거나 새로운 특성을 부여하기 위해 다양한 관능기 또는 분자를 글리콜 키토산 백본에 도입한 글리콜 키토산 유도체가 제안된 바 있다. 권 등은 담즙산(5 β cholanic acid or deoxycholic acid)을 공유접합(covalent conjugation)을 통해 글리콜 키토산에 결합시켜 소수성을 개선한바 있다(K. Kim, S. Kwon, J.H. Park, H. Chung, S.Y. Jeong, I.C. Kwon, I.S. Kim, *Biomacromolecules.* **2005**, 6, 1154; S. Kwon, J.H. Park, H. Chung, I.C. Kwon, S.Y. Jeong, *Langmuir.* **2003**, 19, 10188). 상기 글리콜 키토산 유도체는 동물실험 결과, 혈액 내 순환이 연장되고, 독소루비신, 파크리탁셀, 도세탁셀, 캄토테신과 시스플라틴과 같은 다양한 항암제를 전달함에서 높은 중앙 특이성을 나타냈다.

[0007] 이와 같이 글리콜 키토산 유도체에 대한 여러 가지 연구가 진행되었음에도 불구하고, 글리콜 키토산을 N-아세틸화한 유도체에 대한 보고는 현재까지 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에, 본 발명자들은 글리콜 키토산의 특성을 개선하기 위해 다양한 관능기를 도입한 유도체에 대해 예의 연구한 결과, 글리콜 키토산을 N-아세틸화하는 경우 소수성 아세틸기 도입에 따라 유기용매에 대한 용해도가 증가할 뿐만 아니라 양친성을 띄어 자기집합체 형성이 가능하고, 온도변화에 따른 졸/겔 상전이 거동을 나타냄을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

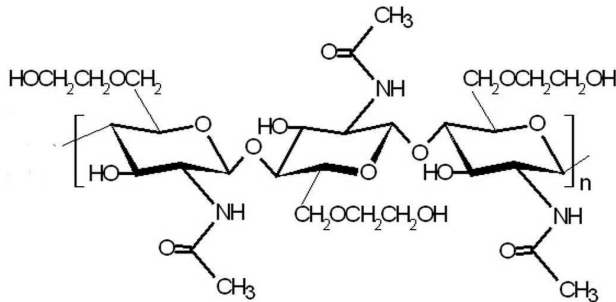
[0009] 본 발명의 과제는 유기용매에 대한 용해도가 개선되고, 자기집합체를 형성하며, 생분해성과 졸/겔 상전이 거동을 나타낼 수 있도록 한 글리콜 키토산 유도체 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 과제는 상기 글리콜 키토산 유도체의 약물 전달체로서의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 이를 위해 본 발명은 하기 화학식 1의 구조를 갖는 글리콜 키토산 유도체를 제공한다:

[0012] [화학식 1]



[0013]

[0014] (상기 화학식 1에서,

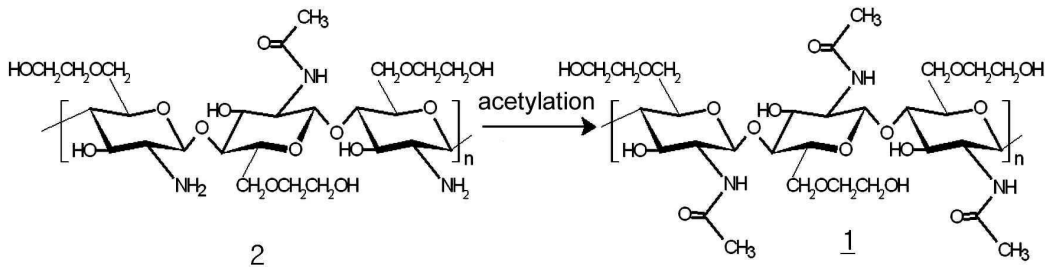
[0015] 상기 n은 10 내지 10000의 정수이다.)

[0016] 또한 본 발명은

[0017] 하기 반응식 1에 나타낸 바와 같이,

[0018] 화학식 2의 글리콜 키토산을 아세틸화제로 아세틸화 반응하여 화학식 1의 글리콜 키토산 유도체를 제조하는 방법을 제공한다.:

[0019] [반응식 1]



[0020]

[0021] (상기 반응식 1에서,

[0022] 상기 n은 10 내지 10000의 정수이다.)

[0023] 또한 본 발명은 상기 글리콜 키토산 유도체를 포함하는 약물 전달체를 제공한다.

발명의 효과

[0024] 본 발명에 따른 글리콜 키토산 유도체는 유기용매에 대한 향상된 용해도를 가질 뿐만 아니라 나노 크기의 자기 집합체 형성이 가능하며, 온도감응성 졸/겔 상전이 거동을 나타내므로 약물전달체로 사용되기에 적합한 특성이 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명에 따른 키토산 유도체의 자기집합 특성을 보여주는 모식도이다.

도 2는 글리콜 키토산, 본 발명에 따른 실시예 1, 실시예 2, 실시예 4 및 실시예 6의 글리콜 키토산 유도체의 FT-IR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 3은 글리콜 키토산, 본 발명에 따른 실시예 1, 실시예 2, 실시예 4 및 실시예 6의 글리콜 키토산 유도체의

^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 4는 글리콜 키토산, 본 발명에 따른 실시예 1, 실시예 2, 실시예 4 및 실시예 6의 글리콜 키토산 유도체의 라이소자임 존재하의 점도 변화를 관찰한 그래프이다.

도 5는 실시예 1의 글리콜 키토산 유도체가 자기집합에 의해 형성한 나노입자의 입자크기를 나타낸 그래프이다.

도 6은 실시예 1의 글리콜 키토산 유도체가 자기집합에 의해 형성한 나노입자를 관찰한 주사전자현미경 사진이다.

도 7은 실시예 2의 글리콜 키토산 유도체가 자기집합에 의해 형성한 나노입자의 입자크기를 나타낸 그래프이다.

도 8은 실시예 2의 글리콜 키토산 유도체가 자기집합에 의해 형성한 나노입자를 관찰한 주사전자현미경 사진이다.

도 9는 실시예 4의 글리콜 키토산 유도체가 자기집합에 의해 형성한 나노입자의 입자크기를 나타낸 그래프이다.

도 10은 실시예 4의 글리콜 키토산 유도체가 자기집합에 의해 형성한 나노입자를 관찰한 주사전자현미경 사진이다.

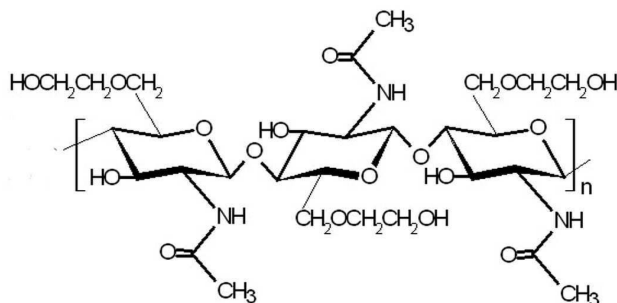
도 11은 본 발명에 따른 실시예 4의 글리콜 키토산 유도체와 글리콜 키토산의 온도에 따른 졸-겔 상전이 거동을 나타낸 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명에 따른 글리콜 키토산 유도체는 키토산 백본의 1차 아민기가 아세틸화된 것을 특징으로 한다.

[0027] 소수성 아세틸기가 도입된 글리콜 키토산 유도체는 양친성을 갖게 된다. 이에 따라 유기 용매에 대한 용해도가 개선되고, 아세틸기 사이 소수성 상호작용을 통해 수성 매질에서 자기집합체를 형성하고, 소수성 상호작용과 같은 분자 내 상호작용을 통해 온도변화에 따른 졸-겔 거동을 나타낸다.

[0028] 구체적으로, 본 발명의 글리콜 키토산 유도체는 하기 화학식 1로 표시된다:



[0029]

(상기 화학식 1에서,

[0030]

상기 n은 10 내지 10000의 정수이다.)

[0031]

[0032] 일반적으로 양친성 고분자는 표면자유에너지를 줄이기 위해 소수성 부분 끼기 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)을 통해 수용성 분위기에서 자기집합 나노입자를 형성할 수 있다. 이와 같은 자기집합(self-assembled) 나노입자는 소수성 코어를 친수성 셸이 덮고 있는 구조이다. 친수성 셸은 다른 세포, 단백질과 생체조직과 상호작용에 대한 배리어로 작용할 수 있고, 소수성 코어는 다양한 생화학 물질의 저장공간으로 작용할 수 있어, 약물의 효과적이고 장기적인 순환에 이용될 수 있다.

[0033] 본 발명에 따른 글리콜 키토산 유도체는 친수성인 글리콜 키토산에 소수성 아세틸기가 도입됨에 따라 양친성을 갖게 되고, 고분자 주쇄 사이의 소수성 상호작용이 일어나, 약물전달 분야에 적용되기 적합한 자기집합 나노입자가 형성될 수 있다.

[0034] 도 1은 본 발명에 따른 키토산 유도체의 자기집합 특성을 보여주는 모식도이다.

[0035] 도 1에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 키토산 유도체의 아세틸기는 소수성 코어로 작용하고, 글리콜 키토산은 친수성 쉘로 작용함에 따라 수성 매질(aqueous medium)에서 나노입자를 형성할 수 있다.

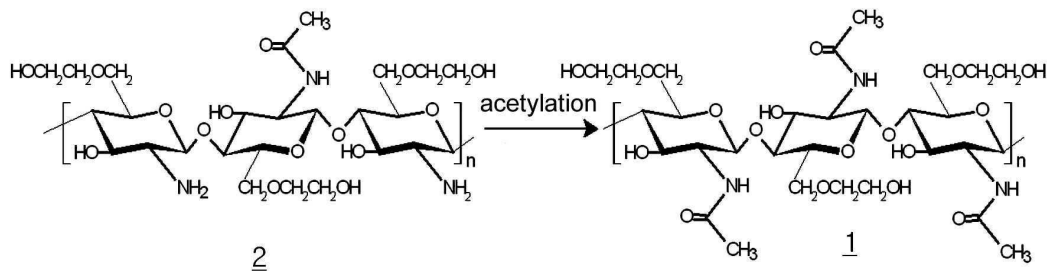
[0036] 이와 같이 도입된 아세틸기의 소수성 상호작용은 상기한 자기집합체 형성뿐 아니라 온도 변화에 따른 졸-겔 거동을 갖게 한다. 이에 따라 본 발명의 글리콜 키토산 유도체는 45 ± 5 °C에서 상전이 거동을 나타낸다. 이와 같이 하한임계온도가 생체의 체온 보다 높기 때문에 약물전달에 유용하게 사용될 수 있다.

[0037] 또한, 아세틸기는 라이소자임과 같은 생체 내 효소에 민감한 관능기로, 본 발명의 키토산 유도체는 아세틸기 도입에 따라 생분해성을 갖게 된다.

[0038] 본 발명에 따른 글리콜 키토산 유도체의 상기한 특성은 아세틸화도에 따라 조절될 수 있다. 일례로, 아세틸화도가 증가할수록 글리콜 키토산 유도체의 유기 용매에 대한 용해도는 감소하고, 생분해도는 증가한다. 상기 글리콜 키토산 유도체의 아세틸화도는 바람직하기로 20 내지 90%, 더욱 바람직하기로 70 내지 80% 범위 내에서 조절한다.

[0039] 이러한 본 발명의 글리콜 키토산 유도체는 하기 반응식 1에 도시한 것처럼, 화학식 2의 글리콜 키토산을 아세틸 화제로 아세틸화 반응하여 제조된다:

[0040] [반응식 1]



[0041]

[0042] (상기 반응식 1에서,

[0043] 상기 n은 10 내지 10000의 정수이다.)

[0044] 이와 같이 본 발명의 제조방법을 통해 화학식 2의 글리콜 키토산의 1차 아민기가 아세틸화 된다.

[0045] 이때 아세틸화제로는 아세트산 무수물 및 아세트산 클로라이드 중에서 선택 사용할 수 있다. 바람직하기로, 아세트산 무수물을 사용한다.

[0046] 상기한 아세틸화 반응을 수행함에 있어 별도의 반응용매를 사용하지 않아도 반응은 진행되나, 아세틸화제와 주쇄의 수산기 사이의 반응을 통한 O-아세틸화를 방지하기 위해 바람직하기로 메탄올을 사용한다. 반응온도는 -10 내지 60 °C이며, 바람직하기로는 15 내지 25 °C이고, 반응시간은 10 내지 50시간이며, 바람직하기로는 40 내지 50 시간이다.

[0047] 이와 같이 제조된 본 발명의 글리콜 키토산 유도체는 나노 크기의 자기집합체 형성이 가능하고, 온도에 따른 졸-겔 거동이 가능하여 약물 전달체로 적용될 수 있다.

[0048] 따라서, 본 발명은 상기 화학식 1의 글리콜 키토산 유도체를 포함하는 약물 전달체를 제공한다. 이때 상기 약물 전달체는 약제학적 유효성분을 필수적으로 포함한다. 바람직하기로, 화학요법제, 단백질 의약 또는 핵산 의약이 가능하다.

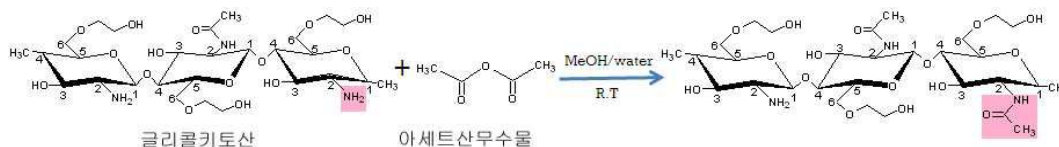
[0049] 실시예

[0050] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 기재한다. 하기 실시예는 본 발명을 보다 명확히 표현하기 위한 목적으로 기재될 뿐 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 실시예 1 내지 6: 글리콜 키토산 유도체 합성

[0052] 하기 반응식 2로 표시되는 바에 의해 글리콜 키토산으로부터 본 발명에 따른 글리콜 키토산 유도체를 제조하였다.

[0053] [반응식 2]



[0054]

[0055] 글리콜 키토산 0.2g(중량평균분자량 400 kDa, 아세틸화도 9.34 ± 2.50 %(^1H NMR 측정시), Sigma-Aldrich, Inc., USA)을 25 ml 증류수에 용해한 뒤, 25 ml을 메탄올을 첨가하여 희석하였다. 얻어진 용액에 미리 계산된 함량의 아세트산 무수물(Sigma-Aldrich, Inc., USA)을 자석 교반기로 교반하면서 첨가하였다. 상온에서 48시간 동안 계속 교반한 후, 차가운 아세톤으로 침전시켜 반응물을 얻고, 원심분리를 통해 백색 고체를 얻었다. 이어서 얻어진 반응물을 1mol/L 수산화 나트륨 용액으로 12시간 동안 처리하여 0-아세틸기를 제거하였고, 분획 분자량(Molecular Weight Cut-off) 2 kDa의 투석막을 사용하여 3일 동안 증류수로 투석한 뒤 이어서 동결건조하였다.

[0056] 얻어진 키토산 유도체는 D_2O 에 1 중량% 농도로 녹여 400 MHz에서 핵자기공명법(^1H NMR, JNM-AL400) 분석을 실시하였고, KBr 펠렛을 사용하여 적외선 흡수 스펙트럼 분석(FT-IR, MAGNA 560)을 실시하여 확인하였다. 그 결과는 도 2, 도 3 및 표 1에 나타내었다.

[0057] 도 2는 글리콜 키토산, 본 발명에 따른 실시예 1, 실시예 2, 실시예 4 및 실시예 6의 글리콜 키토산 유도체의 FT-IR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

[0058] 도 2를 참조하면, 3400 cm^{-1} 에서 OH 신축진동(stretching vibration)에 따른 넓은 밴드가 나타났고, 같은 위치에서 N-H 신축진동이 중첩되어 나타났다. 2890 cm^{-1} 에서는 글리콜 키토산과 본 발명에 따른 글리콜 키토산 유도체의 메텐과 메틸기의 C-H 신축에 의한 흡수 피크가 나타났다. 1655 cm^{-1} 와 1555 cm^{-1} 에서는 카보닐기의 신축과 아미노아세틸기의 아마이드 II 굽힘 진동(bending vibration)에 따른 흡수 밴드가 나타났다. 또한, 글리콜 키토산의 경우 1655 cm^{-1} 에서 NH_2 굽힘 진동에 따른 흡수피크가 나타났으나, 아민기가 N-아세틸화된 본 발명에 따른 키토산 유도체의 경우 이와 같은 특성 피크가 관찰되지 않았다. 한편, 1745 cm^{-1} 에서의 에스테르 카보닐기의 특성 밴드가 나타나지 않은 것으로 보아, 글리콜 키토산의 아세틸화가 0-위치의 하이드록시기가 아닌 아미노기에서 진행되었음을 확인할 수 있다.

[0059] 도 3은 글리콜 키토산, 본 발명에 따른 실시예 1, 실시예 2, 실시예 4 및 실시예 6의 글리콜 키토산 유도체의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다. HOD 신호(δ 4.65 ppm)를 참조로 하였다.

[0060] 도 3에 나타낸 바와 같이, 일반적으로 아세틸기의 메틸기 양성자로 인해 나타나는 1.89 ppm에서의 피크가 아세틸화도가 증가하면서 급격히 증가하였다. 일차 아민기의 양성자로 인한 2.6 ppm에서의 피크가 생겼고, 이는 아세틸화도가 증가함에 따라 점점 작아졌다. H-3 부터 H-8의 위치에 있는 양성자는 모두 산소 원자와 근접해 있는 탄소에 위치한다. 2 위치의 양성자는 상대적으로 아세틸기와 가까워서 downfield shift를 나타냈다. 이에 따라 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 (H-2 부터 H-8)의 위치에 있는 글루코피라노실 환의 양성자에 의해 3~4 ppm 사이의 중첩된 피크가 발생하였다. H-1 위치의 양성자는 두 개의 산소 원자와 근접한 탄소에 결합되어 있어, downfield에서 떨어진 4.38 ppm에서 피크가 나타났다.

[0061] 많은 연구에서 키토산의 아세틸화도를 계산하기 위해 ^1H NMR 분석을 이용하였고, 이는 글리콜 키토산에서 이용될

수 있다. 글리콜 키토산과 본 발명에 따른 글리콜 키토산 유도체의 평균 아세틸화도를 측정하기 위해, 문헌(A. Hirai, H. Odani, A. Nakajima, *Polymer Bulletin*, **1991**, 26, 8)에 기재된 방법에 따라 ^1H NMR을 수행하였다. 아세틸화도는 H-2 부터 H-8 위치의 양성자 신호(δ 3.55 ppm)와 메틸 양성자 신호(δ 1.89 ppm)의 적분 면적을 비교하여 계산하였다.

표 1

구분	아세트산 무수물/글루코사민 단위체 몰비	아세틸화도(%)	수득율(%)
글리콜 키토산	-	9.34 ± 2.50	-
실시예 1	0.2	30.78 ± 2.30	82.59
실시예 2	0.5	50.58 ± 3.70	78.41
실시예 3	1	62.19 ± 1.87	70.28
실시예 4	20	75.76 ± 2.60	73.24
실시예 5	60	81.30 ± 0.40	74.00
실시예 6	100	87.95 ± 3.22	77.39

위 표 1에 나타난 바와 같이, 반응에 첨가된 아세트산 무수물의 함량이 증가할수록 키토산 유도체의 아세틸화도 선형적으로 증가하였다. 그러나 실시예 4 내지 6과 같이 아세틸화가 높은 경우, 반응의 유효성이 감소하였다. 이는 N-아세틸화가 진행될수록 아민기에 접근하기가 더 어려워지기 때문이다.

실험예 1: 용해도 확인

글리콜 키토산, 실시예 1 내지 6의 글리콜 키토산 유도체의 증류수, DMSO, 포름아마이드, DMF, 메탄올과 THF에 대한 용해도를 확인하였다.

구체적으로, 각 용매에 3 mg/ml 농도로 시료를 용해하여 상온에서 방치하여 24시간 후 관찰하고, 그 탁도에 따라 용해도를 구분하였다. 그 결과는 아래 표 2에 나타내었다.

표 2

구분	아세틸화도 (%)	용해도					
		증류수	DMSO	포름아마이드	DMF	메탄올	THF
글리콜 키토산	9.34 ± 2.50	+	-	-	-	-	-
실시예 1	30.78 ± 2.30	+	+	+	-	-	-
실시예 2	50.58 ± 3.70	+	+	+	±	-	-
실시예 4	75.76 ± 2.60	+	±	-	±	-	-
실시예 6	87.95 ± 3.22	+	±	±	±	-	-
+ : 용해, ± : 부분 용해되거나 팽윤 - : 불용							

위 표 2를 참조하면, 실시예 1, 2, 4 및 6의 글리콜 키토산 유도체는 아세틸화도와 관계없이 친수성 에틸렌 글리콜기를 함유함에 따라 증류수에 모두 녹았다. 또한, 실시예 1과 2의 글리콜 키토산 유도체는 DMSO에 용해되었고, 본 발명에 따른 글리콜 키토산 유도체는 글리콜 키토산과 비교하여 유기용매에 대한 용해도가 개선되었음을 확인할 수 있다. 이와 같이 개선된 용해도는 본 발명의 키토산 유도체의 생물의학 및 의약분야에 있어서 적용분야를 확대할 수 있다.

이러한 결과는 글리콜 키토산 유도체에 아세틸기가 도입되고, 소수성 상호작용(hydrophobic interactions)이 증가함에 따라 고분자 사슬의 친수성이 감소하고, 글리콜 키토산의 아미노기 사이의 수소 결합을 방해하기 때문으로 생각된다.

실시예 4 및 6의 키토산 유도체는 유기용매에 대한 용해도가 개선되지 않았다. 이는 아세틸기가 많이 도입됨에 따른 입체 장애 때문이다. 아세틸기로 인해 고분자 체인의 회전을 제한하는 입체 장애가 생긴다. 즉, 아세틸

화도가 증가함에 따라, 고분자 체인의 강성(stiffness)이 증가하고, 반면, 유기 용매에 대한 용해도는 점점 감소하게 된다.

[0071] 실험예 2: 생분해성 확인

[0072] 본 발명에 따른 키토산 유도체의 생분해성은 라이소자임이 존재하에 고분자 용액의 점도 감소 정도에 따라 평가하였다. 라이소자임은 인간의 체액(혈장, 침, 눈물 등)에 다양하게 존재하기 때문에 여러 가지 효소 중에서 생분해 거동을 평가하기 위해 많이 사용되고 있다.

[0073] 구체적으로, 효소분해실험은 37 ℃, 인산완충식염수(PBS, 0.01M, pH 7.4)에서 실시하였다. 각 시료 40 mg을 20ml 인산완충식염수에 용해한 후 37 ℃까지 데웠다. 이후 라이소자임을 첨가한 후 최종 농도가 55 µg/ml이 되도록 하였다. 튜브를 37 ℃, 100 rpm 진탕향온수조(Series BS-21; Lab companion, Korea)에 넣고, 배양하였다. 혼합물의 점도 변화를 Schott-Gerate 자동 점도측정기(AVS350)로 측정하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다.

[0074] 도 4를 참조하면, 글리콜 키토산과 본 발명에 따른 글리콜 키토산 유도체 모두 라이소자임으로 인한 가수분해에 따라 10 분 이내에 점도가 두드러지게 감소하였다. 글리콜 키토산은 점도가 완만하게 감소하는 반면, 본 발명의 글리콜 키토산 유도체는 급격히 점도가 감소하였다. 이는 본 발명에 따른 키토산 유도체가 라이소자임에 민감한 N-아세틸 글루코사민 잔기의 함량이 더 많기 때문이다.

[0075] 이와 같은 결과는 키토산 유도체의 생분해성은 아세틸화도가 높을수록 생분해율이 더욱 빨라짐을 나타낸다. 정리하면, 아세틸화도는 키토산 유도체의 생분해도에 있어 중요한 역할을 하므로, 키토산 유도체의 아세틸화도를 조절함으로써 생물의약 분야에 있어 원하는 생분해율을 얻을 수 있다.

[0076]

[0077] 실험예 3: 자기집합(self-assembly) 특성 확인

[0078] 자기집합한 키토산 유도체의 나노입자의 형태를 주사전자현미경(FE-SEM; JSM-7000F; JEOL, Japan)을 이용하여 15 kV에서 관찰하였다. 자기집합한 키토산 유도체를 포함하는 증류수 한 방울을 실리콘 웨이퍼 표면에 놓고, 4분 동안 20 mA 금으로 스퍼터링하여 코팅한 후 관찰하였다.

[0079] 자기집합한 키토산 유도체 나노입자의 크기와 분포도를 파장 633 nm를 갖는 He-Ne 레이저 시스템 laser system을 사용하여 동적 광산란법(DLS; ELS-Z; OTSUKA, Japan)으로 측정하였다.

[0080] 도 5는 실시예 1의 키토산 유도체가 자기집합에 의해 형성한 나노입자의 입자크기를 나타낸 그래프이고, 도 6은 이를 관찰한 주사전자현미경 사진이다.

[0081] 도 7은 실시예 2의 키토산 유도체가 자기집합에 의해 형성한 나노입자의 입자크기를 나타낸 그래프이고, 도 8은 이를 관찰한 주사전자현미경 사진이다.

[0082] 도 9는 실시예 4의 키토산 유도체가 자기집합에 의해 형성한 나노입자의 입자크기를 나타낸 그래프이고, 도 10은 이를 관찰한 주사전자현미경 사진이다.

[0083] 도 5 내지 도 10에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 키토산 유도체가 수용성 매질 내에서 자기집합에 의해 형성한 나노입자는 수십에서 수백 nm의 크기를 갖는 둥근 구 모양의 입자 형태를 가진다.

[0084] 실험예 4: 온도감응성 졸-겔 상전이 확인

[0085] 본 발명에 따른 키토산 유도체의 졸-겔 전이온도를 test tube inverting 법으로 확인하였다.

[0086] 상온에서 키토산 유도체를 5 중량% 농도로 증류수에 용해한 용액을 준비하였다. 졸-겔 전이온도는 온도별로 시험 튜브를 뒤집어 흐르는 졸 상태와 흐리지 않는 겔 상태를 확인하여 측정하였다. 이때 승온 속도는 0.2 ℃/분으로 하였다.

[0087] 도 11은 본 발명에 따른 실시예 4의 글리콜 키토산 유도체와 글리콜 키토산의 온도에 따른 졸-겔 상전이 거동을 나타낸 사진이다.

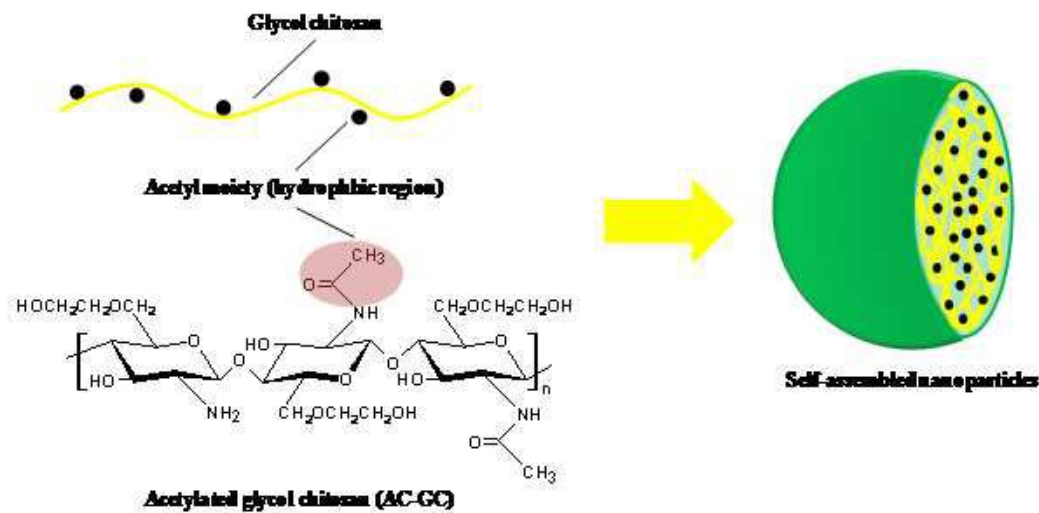
[0088] 도 11에 나타난 바와 같이, 실시예 4의 글리콜 키토산 유도체 수용액은 25 ℃에서는 졸 상태를 나타내었으나, 45 ℃에서는 겔 상태를 나타내었다. 반면 글리콜 키토산 수용액은 90 ℃에 이를 때까지도 졸-겔 상전이 거동을 나타내지 않았다. 이러한 결과는 본 발명의 글리콜 키토산 유도체의 졸-겔 상전이가 아세틸화도에 의존적임을 나타낸다. 이와 같은 글리콜 키토산 유도체의 졸-겔 상전이 거동은 고분자 내 아세틸기 사이의 소수성 상호작용으로 인한 것이다. 즉, 수소결합과 소수성 상호작용과 같은 분자 내 상호작용을 통해 물리적 가교(cross-link)가 발생하고, 이에 따라 형성된 접합 부위(junction zone)가 키토산 유도체 수용액의 졸-겔 거동의 형태학적 변화를 유도한다.

산업상 이용가능성

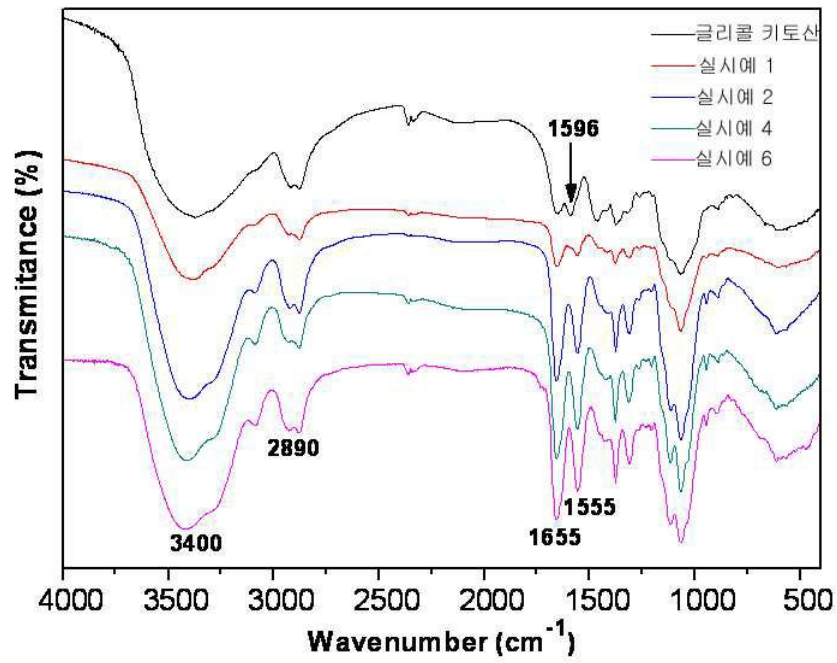
[0089] 본 발명의 글리콜 키토산 유도체는 약물전달체용 재료를 포함하여, 조직 공학과 관련된 다양한 산업 분야에서의 사용될 수 있다.

도면

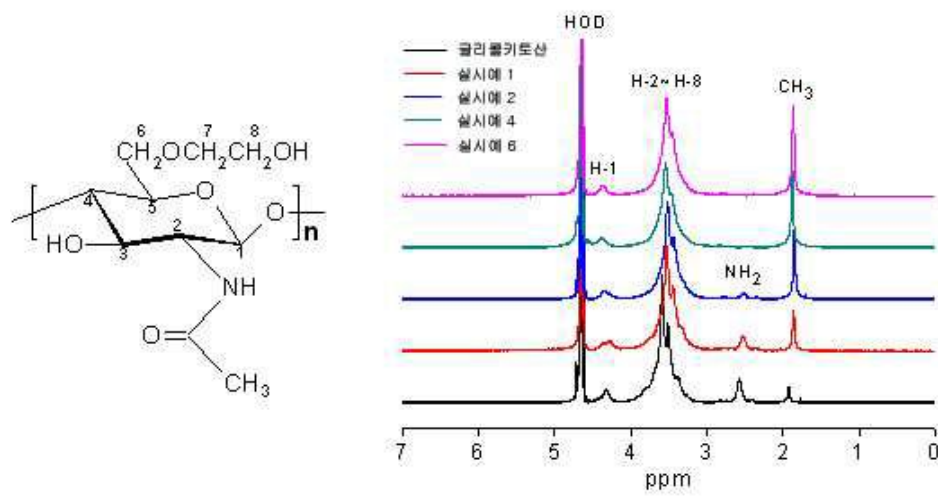
도면1



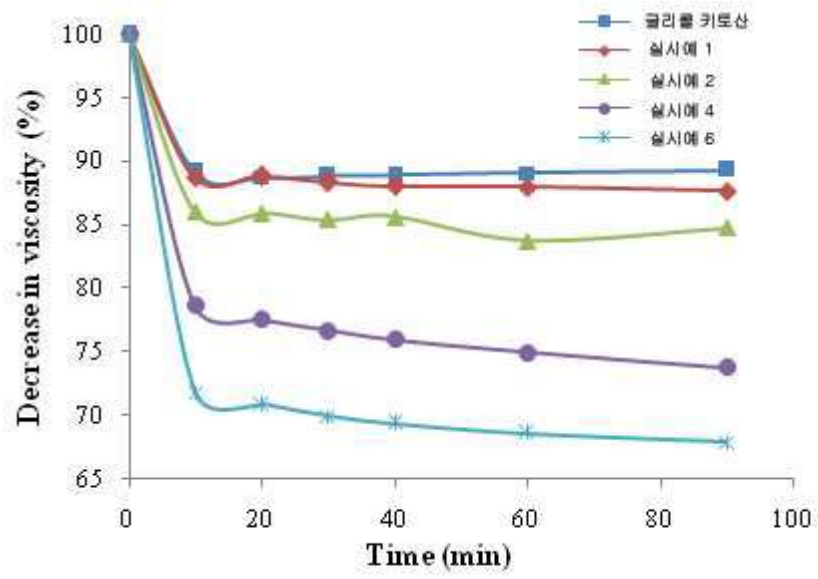
도면2



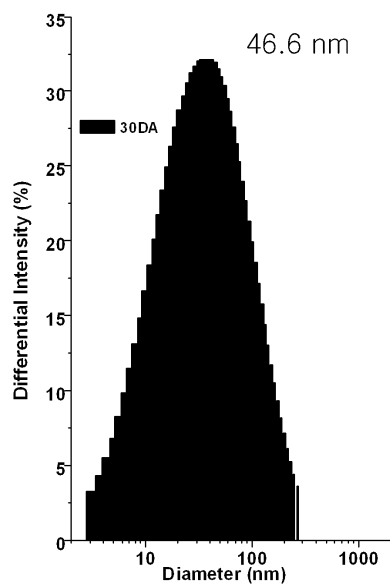
도면3



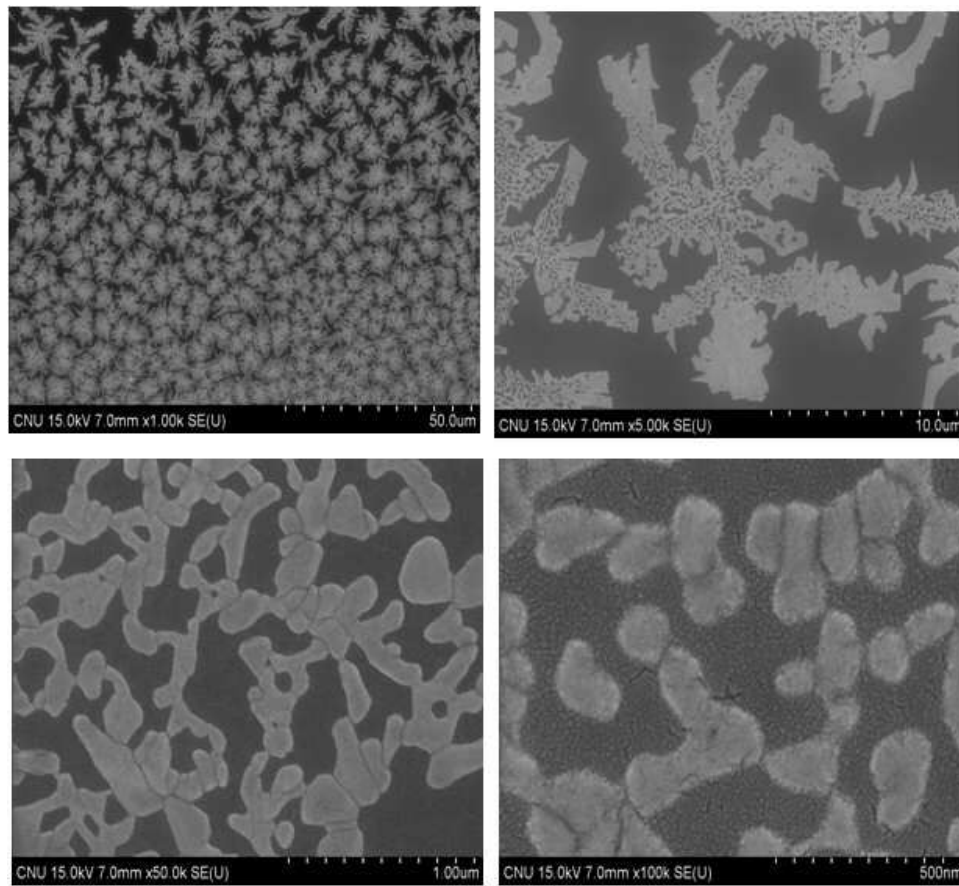
도면4



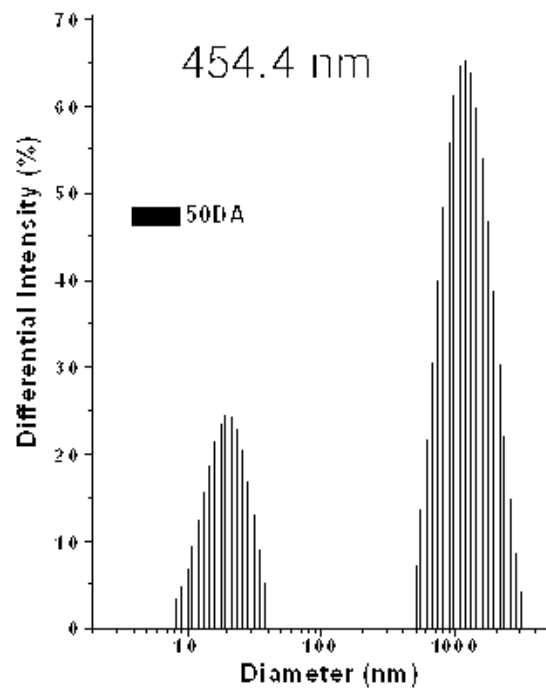
도면5



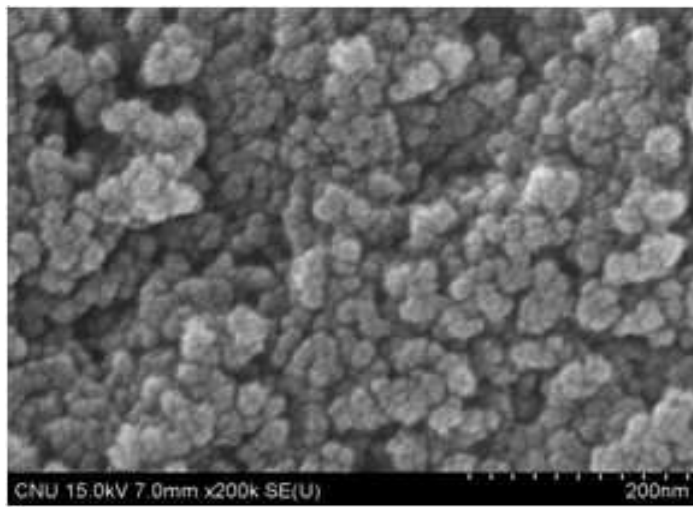
도면6



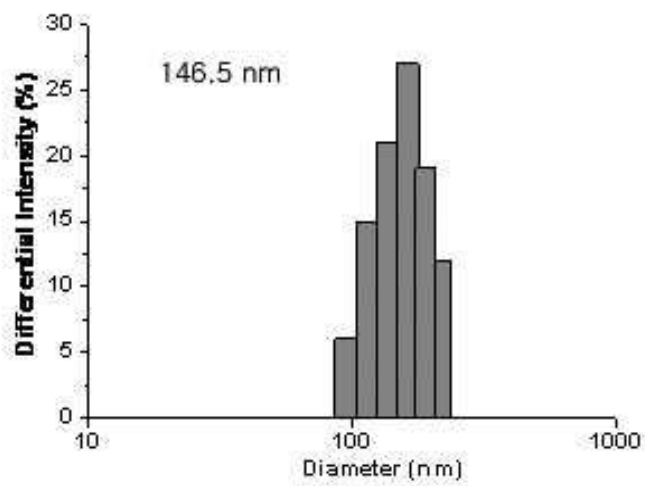
도면7



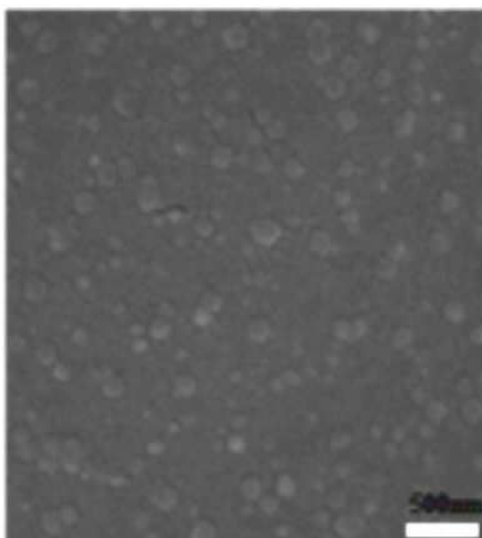
도면8



도면9



도면10



도면11

