

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0052068

(43) 공개일자 2021년05월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C08B 37/08 (2006.01) C08J 3/12 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C08B 37/003 (2013.01)

C08J 3/12 (2021.05)

(21) 출원번호 10-2019-0138150

(22) 출원일자 2019년10월31일

심사청구일자 2019년10월31일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

권일근

서울특별시 성북구 월계로36길 27, 104동 1705호 (장위동, 꿈의숲대명루첸아파트)

이재서

서울특별시 동대문구 이문로13길 18, 301호(이문동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인(유한)아이시스

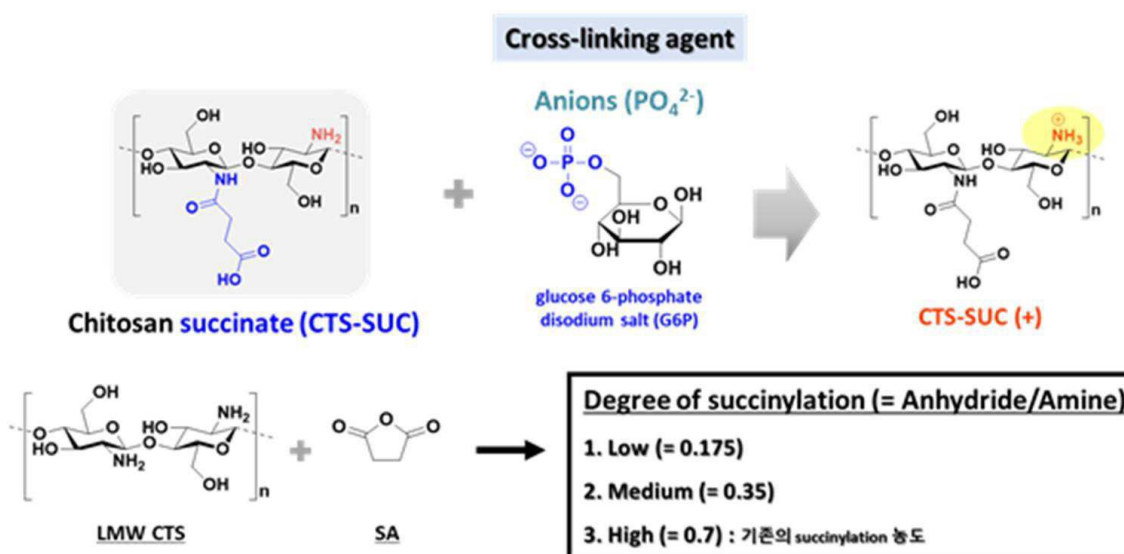
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 숙신화 키토산의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 용해성과 생체 적합성이 우수한 숙신화 키토산의 제조방법 및 이에 따라 제조된 숙신화 키토산에 관한 것으로, 본 발명에 따른 숙신화 키토산의 제조방법은 간단한 공정으로 친수성, 세포 증식률, 세포 친화성 및 세포 확산 성능이 뛰어나 생체 내 이용적합성이 우수한 키토산 기반의 생체 소재를 제조할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

문호진

서울특별시 강동구 천호대로 1092, 816호(성내동, 에스케이이브진)

이동현

대구광역시 동구 금강로21길 30, 108동 2603호(괴전동, 안심역코오롱하늘채)

나하람

경기도 고양시 일산서구 강선로 187, 1006동 701호(일산동, 후곡마을10단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711082378
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발(R&D)
연구과제명	치아조직재생을 위한 기능성 바이오소재 기술 개발 및 실용화 기반 구축
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 키토산을 약산에 용해하고 교반하여 키토산 용액을 제조하는 단계;
- (b) 상기 키토산 용액을 원심 분리하고 동결 건조하여 키토산 아세테이트를 수득하는 단계;
- (c) 상기 수득된 키토산 아세테이트를 탈이온수에 용해하는 단계;
- (d) 상기 용해물에 숙신산 무수물(Succinic anhydride)을 실온에서 첨가하여 혼합물을 제조하는 단계;
- (e) 상기 혼합물을 교반하면서 NaOH를 첨가하여 pH 7 내지 8로 조절하여 반응시키는 단계; 및
- (f) 상기 반응물을 투석하고, 투석된 용액을 동결 건조하는 단계;를 포함하는 숙신화 키토산의 제조방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 약산은 아세트산인 것을 특징으로 하는 숙신화 키토산의 제조방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 투석은 3000 내지 3500Da 의 투석 튜브를 사용하는 것을 특징으로 하는 숙신화 키토산의 제조방법.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 따라 제조된 숙신화 키토산.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 용해성과 생체 적합성이 우수한 숙신화 키토산의 제조방법 및 이에 따라 제조된 숙신화 키토산에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 키토산은 게, 새우의 껍질과 오징어 뼈, 곰팡이, 버섯 균사체 및 미생물의 세포벽과 같은 자연계에 존재하는 키틴을 탈아세탈화하여 얻어지는 아미노폴리사카라이드의 일종이다. 키토산은 독성이 없고, 생분해가 가능하며, 생체친화성이 우수하여, 또한 생리적인 효능이 있는 물질로 알려지면서 1990년대부터 의료용으로 응용되어 키토산을 이용한 상처치료제, 인공피부, 혈액응고제, 면역증강제, 항균 및 항산화제 등이 개발되어 왔다.

[0003] 그러나, 종래에 사용되어온 키토산은 분자 내에 분자 간 수소결합이 매우 강한 아세틸아미노기를 가지고 있어서 물과 유기 용매에도 용해되지 않기 때문에 산업에 응용하는데 어려운 문제점이 많았다. 물에 용해되는 키토산은 저분자량의 키토산이나 키토올리고당이 있다. 이러한 수용성 키토산을 제조하기 위하여 키틴을 탈아세틸화하여 초산과 같은 산성의 수용액에 용해되는 키토산을 제조하여 상업적으로 이용이 가능하게 하였으나, 이를 생체 내에 사용할 경우에는 잔류되어 있는 산에 의하여 심각한 세포 손상을 일으킬 수 있는 문제가 있었다.

[0004] 이와 관련하여 대한민국 등록특허 제10-1429455호는 불용성 키토산을 금속이온을 함유시켜 자가합성체로 형성시켜 키토산을 제조하는 방법을 개시하고는 있으나, 이에 따라 제조되는 키토산 역시 물에 대한 용해성이 낮아 생체 내에서 직접 사용하기에는 적합하지 않다는 문제가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1429455호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에, 본 발명은 상기 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여, 간단한 공정을 통해 키토산에 숙신산을 결합시켜 친수성이 향상되고 생체 내 이용적합성이 향상된 숙신화 키토산의 제조방법 및 이에 따라 제조된 숙신화 키토산을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 키토산을 약산에 용해하고 교반하여 키토산 용액을 제조하는 단계; 상기 키토산 용액을 원심 분리하고 동결 건조하여 키토산 아세테이트를 수득하는 단계; 상기 수득된 키토산 아세테이트를 탈이온수에 용해하는 단계; 상기 용해물에 숙신산 무수물(Succinic anhydride)을 실온에서 첨가하여 혼합물을 제조하는 단계; 상기 혼합물을 교반하면서 NaOH를 첨가하여 pH 7 내지 8로 조절하여 반응시키는 단계; 및 상기 반응물을 투석하고, 투석된 용액을 동결 건조하는 단계;를 포함하는 숙신화 키토산의 제조방법을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 방법에 따라 제조된 숙신화 키토산을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에 따른 숙신화 키토산의 제조방법은 간단한 공정으로 친수성, 세포 증식률, 세포 친화성 및 세포 확산 성능이 뛰어나 생체 내 이용적합성이 우수한 키토산 기반의 생체 소재를 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 본 발명에 따른 숙신화 키토산의 제조 과정을 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명에 따른 숙신화 키토산의 양성자 핵자기 공명(^1H NMR) 스펙트럼의 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명에 따른 숙신화 키토산의 형광 방출 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명에 따른 숙신화 키토산의 UV-VIS 흡수 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명에 따른 숙신화 키토산의 표면 분포 전하를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명에 따른 숙신화 키토산의 열 중량 분석(TGA) 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 푸리에 변환 적외선 분광계를 사용하여 본 발명에 따른 숙신화 키토산의 표면의 화학상태를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 X-선 광전자 분광법을 이용하여 본 발명에 따른 숙신화 키토산의 특성을 평가한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명에 따른 숙신화 키토산 하이드로겔의 유동성 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명에 따른 숙신화 키토산 하이드로겔의 생체 적합성을 평가시험 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명에 따른 숙신화 키토산 하이드로겔의 알칼리성 포스파타제 활성을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 하나의 양태로 본 발명은 (a) 키토산을 약산에 용해하고 교반하여 키토산 용액을 제조하는 단계; (b) 상기 키토산 용액을 원심 분리하고 동결 건조하여 키토산 아세테이트를 수득하는 단계; (c) 상기 수득된 키토산 아세테이트를 탈이온수에 용해하는 단계; (d) 상기 용해물에 숙신산 무수물(Succinic anhydride)을 실온에서 첨가하여

혼합물을 제조하는 단계; (e) 상기 혼합물을 교반하면서 NaHCO_3 를 첨가하여 pH 8 내지 9로 조절하여 반응시키는 단계; 및 (f) 상기 반응물을 투석하고, 투석된 용액을 동결 건조하는 단계;를 포함하는 숙신화 키토산의 제조방법을 제공한다.

[0012] 상기 약산은 pH 3 내지 6의 산일 수 있으며, 바람직하게는 아세트산일 수 있다.

[0013] 상기 투석은 제조되는 숙신화 키토산의 크기를 고려하여 3000 내지 3500Da의 투석 튜브를 사용하는 것이 바람직하다.

[0014] 본 발명은 다른 하나의 양태로 상기 방법에 따라 제조된 숙신화 키토산을 제공한다. 본 발명에 따라 제조된 숙신화 키토산은 기존의 키토산에 비하여 수용성이 현저하게 향상되므로, 생체 소재로 사용 시 약산을 이용하여 용해시킬 필요가 없어 생체 적합성이 뛰어나다.

[0016] 이하, 도면을 참조하여 본 발명의 실시예의 구성 및 작용을 상세하게 설명한다.

[0018] 실시예 1: 재료

[0019] 키토산(MW : 50,000 ~ 190,000), 4-디메틸아미노피리딘(DMAP: 4-dimethylaminopyridine, > 98%), 6-포스페이트 소듐 염(6-phosphate sodium salt) 및 숙신산 무수물(SA: Succinic anhydride, > 99%)은 시그마-알드리치사(Sigma-Aldrich, 미국)에서 구입한 것을 사용하였다. 아세트산(Acetic acid)은 준세이사(Junsei Chemical Co., Ltd., 일본)에서 구입하였다. 탈이온수(DW: Deionized water)는 초-순수 시스템(Puris-Ro800, Bio Lab Tech., Korea)을 이용하여 제조하였다. 인간 지방 조직 유래 MSC, 인간 지방 조직 유래 MSC 성장 배지 및 보충제(10% FBS, 0.02% 페니실린 및 스트렙토마이신)는 CEF0 CO.(CEFOgro™ ADMSC)로부터 구입하였다. 48-웰 세포배양 플레이트 및 세포 배양 디쉬(100mm x 20mm)는 코닝 인코포레이티드사(Corning Incorporated, USA)로부터 구입하였다. EZ-Cytox(en-hanced cell viability assay kit)는 도젠사(Dogen, 한국)에서 구입하였다. 모든 시약 및 용매는 추가적인 정제 없이 그대로 사용하였다.

[0021] 실시예 2: 숙신화 키토산(CTS-SA)의 제조

[0022] 도 1은 본 발명에 따른 숙신화 키토산의 제조 과정을 나타낸 모식도이다.

[0023] 키토산 3000mg을 먼저 0.1M 아세트산에 1% 농도로 용해시키고 밤새 계속 교반하였다. 키토산 용액을 3500rpm에서 20분 동안 원심 분리하고 투명한 상청액을 수집하고 동결 건조하여 아세테이트 염 형태의 키토산(키토산 아세테이트)을 수득하였다. 수득된 키토산 아세테이트 200mg을 30mL의 탈이온수에 용해하였다. 1 시간 동안 용해한 후, 숙신산 무수물을 실온에서 키토산 용액에 첨가하였다.

[0024] 숙신산 무수물에 대한 키토산의 아민의 몰비가 1 : 0.35, 1 : 0.5, 1 : 0.7이 되도록 다양하게 첨가하여 2 시간 동안 교반하였다. 예를 들어, 140mg의 숙신산 무수물을 사용한 경우, 이에 대해 아민기가 0.7 몰비에 해당하도록 키토산 200mg을 이용하였다. 숙신산 무수물에 대하여 아민이 1 : 0.35의 몰비가 되도록 첨가한 샘플은 CTS-SA70, 1 : 0.5의 몰비가 되도록 첨가한 샘플은 CTS-SA140, 1 : 0.7의 몰비가 되도록 첨가한 샘플은 CTS-SA280으로 명명하였다.

[0025] 실온에서 혼합물에 1N NaOH를 첨가하여 pH 7 내지 8로 조정하였다. 밤새 반응시킨 후, 3500Da 투석 튜브를 사용하여 반응 혼합물을 탈이온수로 3일 동안 투석하여 숙신화-키토산(CTS-SA)을 제조하였다. 제조된 숙신화-키토산((CTS-SA)을 동결 건조하고 -70℃에서 보관하였다.

[0027] 실시예 3: 숙신화 키토산(CTS-SA)의 특성 평가

[0028] 3-1. NMR 측정

[0029] 상기 실시예 2에서 제조한 샘플들의 양성자 핵자기 공명(^1H NMR) 스펙트럼을 측정(Bruker Avance 400, Bruker Corporation, USA)하였다. 상기 실시예 2에서 제조한 샘플들을 1% D_2O 에 용해시켰다. 대조군으로는 순수한 키토

산 용액을 사용하였다. 키토산은 1% 아세트산(Acetic acid)에 용해시켜 측정하였다. 측정 결과는 도 2에 나타내었다.

[0030] 도 2에 나타난 바와 같이, 측정 결과 H NMR을 통하여 확인해보았을 때 A, B, C의 피크를 통하여 숙신산 무수물의 카복실 그룹과 키토산의 아민 그룹이 결합하여 숙신화 키토산(CTS-SA)의 합성이 잘 이루어졌음을 확인하였다.

[0032] 3-2. UV-VIS 측정

[0033] 상기 실시예 2에서 제조한 샘플들의 UV-VIS 스펙트럼을 측정하였다. 숙신산 무수물과 키토산의 컨쥬게이션을 확인하기 위해, 형광 스펙트럼은 280nm에서 여기 후 320-400nm의 파장 범위에서 수집되었고 여기 및 방출에 슬릿 폭은 5nm이었으며, UV-Vis 스펙트럼은 10mM 포스페이트 완충액(pH 7.4)의 조건에서 1cm 폭의 석영 큐벳을 사용하여 Shimadzu UV-1650PC로 측정하였다. 측정 결과는 도 3 및 4에 나타내었다.

[0034] 도 3은 상기 실시예 2의 각기 다른 농도의 샘플의 형광 방출 스펙트럼을 나타낸 것이다. 360nm에서 흡수 에지(absorption edge)가 관찰되었다. 이는 숙신화가 높게 이루어졌음을 나타낸다. 샘플 중 특히 CTS-SA280이 높은 흡광도를 나타냈으며, 이는 숙신화에 의하여 키토산의 흡광도 값이 증가하였음을 의미한다. 이와 같은 결과를 통하여 숙신화 키토산(CTS-SA)의 합성이 잘 이루어졌음을 확인할 수 있다.

[0035] 도 4는 각기 다른 농도의 UV-VIS 흡수 스펙트럼을 나타낸 것이다. 도 4에 나타난 바와 같이, 숙신화 키토산의 스펙트럼 패턴은 순수한 키토산(CTS)과 상이하게 나타났다. 250-270nm 파장 영역에서 흡광도가 나타나는 순수한 키토산에 비하여 숙신화 키토산의 흡광도는 250-300nm의 파장 영역에서 명확하게 나타났다. 순수한 키토산의 최대 흡수 영역($I_{\max}$)은 255nm에서 관찰되었으며, 숙신화 키토산은 이와 유사하게 254nm에서 나타났다.

[0037] 3-3. 표면 분포 전하 측정

[0038] 상기 실시예 2에서 제조한 샘플들의 표면 분포 전하를 측정하였다. 분포 전하를 결정하기 위해, 숙신화 키토산(CTS-SA)을 동결건조하여 상이한 pH 값에서 제타 전위(zeta potential)를 측정하였다. 측정 전에, 동결건조화된 숙신화 키토산을 탈이온수에서 밤새 팽창시키고 초음파 처리하여 잘게 자르고 탈이온수로 팽윤시켰다. 약 1mg 샘플을 취하여 1ml의 탈이온수에 희석시키고 희석된 샘플을 플로우 셀(flow cell)에 주입하였다. NaOH 및 HCl을 사용하여 용액의 pH를 pH 4 내지 10으로 적정하였다. 표면 분포 전하를 Malvern Instruments Zetasizer Nano S 90(ZEN1690, UK)을 이용하여 측정하였다. 모든 값은 25℃의 온도에서 3회 반복하여 측정되었다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0039] 일반적으로, 키토산은 아민기를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 아민 그룹은 양전하를 띠고 있어 높은 pH에서 용해가 잘되는 것으로 알려져 있다. 그러나 숙신화 키토산(CTS-SA)의 경우 도 5에 나타난 바와 같이, 숙신화가 이루어질수록 음전하화되어 pH가 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 이는 결론적으로 키토산의 아민기에 숙신화가 잘 되었음을 의미하는 것이다.

[0041] 3-4. 열 중량 분석

[0042] 상기 실시예 2에서 제조한 샘플들의 열 중량 분석(TGA: Thermogravimetric analysis)을 실시하였다. TGA 측정은 TGA Instruments 2960 SDT V3.0F를 사용하여 수행되었다. 숙신화 키토산(CTS-SA)을 동결건조하여 2 내지 6mg 양을 분취하여 반응로(furnace) 내의 백금 팬에 넣었다. 샘플을 질소 흐름 하에서 10℃/min의 가열 속도로 10℃에서부터 800℃까지 가열하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다. TGA는 숙신화 키토산(CTS-SA)의 합성 여부 및 열 안정성을 확인하기 위한 것이다.

[0043] 도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 숙신화 키토산(CTS-SA)은 주로 고온에서 증발로 인한 물의 손실이 발생하며, 이로 인해 약 100℃에서 초기 중량에서 약 10 %의 손실이 발생하는 것으로 나타났다. 첫 번째 곡선 이후, 180℃에서는 숙신산 무수물의 급격한 중량 손실이 관찰되었으며, 이는 숙신산 무수물의 카복실산이 키토산의 아민과 아미드 결합을 이루기 때문이다. 숙신화 키토산은 숙신산 무수물보다 높은 열적 안정성을 나타내었다. 또한, CTS-SA70보다 CTS-SA280이 더 높은 온도에서 분해가 일어나 CTS-SA280의 열 안정성이 더 높

은 것을 확인하였다.

[0044] 두 번째 곡선에서는 숙신화의 증가에 따라 중량이 최초 중량 대비 약 57%, 61% 및 66%로 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 통하여 키토산의 아민기가 숙신산의 카르복실기와 성공적으로 공유 결합되었음을 확인할 수 있다.

[0046] 3-5. 적외선 분광계 측정

[0047] 상기 실시예 2에서 제조한 샘플들의 적외선 분광 특성을 평가하였다. 500~4000 cm^{-1} 의 파수 범위에서 샘플을 스캐닝하는 KBr Pellet 기법을 사용하여 적외선 분광계(FT-IR, Thermo Scientific Nicolet 380 spectrometer)를 이용하여 스펙트럼을 측정하였다. 도 7은 푸리에 변환 적외선 분광계를 사용하여 본 발명에 따른 숙신화 키토산(CTS-SA)의 표면의 화학상태를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[0048] 1550 cm^{-1} 에서 피크는 아마이드 II의 N-H 결합 형성을 나타낸다. 아마이드 II N-H 결합의 피크 강도는 숙신화의 정도에 따라 증가한다. 또한, 1325 cm^{-1} 에서의 피크를 통하여 키토산의 아민기와 숙신산 무수물의 결합에 의한 아마이드 결합 III의 존재를 확인할 수 있다. 피크 강도는 숙신화 키토산간에 다소 차이가 있는 것으로 나타났으나 차이가 있지만, 상기 결과를 통하여, 숙신산 무수물의 카르복실기와 키토산의 아민기의 아마이드 반응에 의해 선택적으로 숙신화가 일어났음을 확인할 수 있다.

[0050] 3-6. X-선 광전자 분광법

[0051] 상기 실시예 2에서 제조한 샘플들을 X-선 광전자 분광법(XPS, Thermo Electron Manufacturing Ltd., 영국)을 이용하여 특성을 평가하였다. 숙신화 키토산(CTS-SA)을 동결건조하여 K-Alpha 기기(Thermo Electron, UK)로 표면 화학 특성을 평가하였다. 측정 범위는 0eV에서 1300eV까지로 하여 수행하였다. 결합 에너지는 C 1s = 284.8eV, O 1s = 530.0 eV로 보정하였다. 측정 결과는 하기 표 1과 도 8에 나타내었다.

표 1

Atom	Deconvolution	CTS		SA		CTS-SA70		CTS-SA140		CTS-SA280	
		Peak BE	Atomic %	Peak BE	Atomic %	Peak BE	Atomic %	Peak BE	Atomic %	Peak BE	Atomic %
C	C-C	282.99	34.97	283.05	30.15	282.91	16.72	283	19.45	283.1	19.72
	C-N	283.82	6.5	284.46	8.19	281.33	0.17	283	1.31	283.06	1.56
	C-O	284.66	17.26	286.18	2.65	282.91	32.95	284.51	25.14	284.61	22.72
	C=O	286.13	5.87	287.31	8.84	286.01	8.8	286.19	9.99	286.35	9.37
	O=C-N	287.12	2.18	287.31	0.65	286.88	2.83	283	3.31	287.61	4.61
N	C-N-C	397.68	4.00	397.07	0.04	397.56	4.31	397.53	4.25	397.69	3.35
	O=C-N	398.69	0.27	397.83	0.54	399.65	1.75	397.53	1.05	397.66	0.86
	N-H	399.95	0.66	399.67	1.69	402.13	0.06	399.7	0.38	399.63	0.78
O	C=O	529.52	6.02	530.08	9.32	529.13	4.47	529.39	16.8	529.5	20.79
	O-H	530.77	22.26	530.34	37.93	530.77	27.95	530.85	18.31	530.92	16.25

[0052]

[0054] 도 8의 a는 숙신화 키토산의 숙신화 정도를 보여주는 C 1s 스펙트럼을 나타낸 것이다. 숙신화 키토산의 C 1s 스펙트럼은 C-C (282.99eV), C-N (283.82eV), C-O (284.66eV), C=O (286.13eV) 및 O=C-N (287.12 eV) 결합을 나타내는 5개의 서브 피크로 구성된다. 특히, CTS-SA280은 CTS-SA70, CTS-SA140과 비교하여 C/N 원자 %(Atomic %)가 감소된 것으로 나타났다. 이는 주로 C-N 결합의 형성에 의하여 나타나는 현상이다.

[0055] 또한, 도 8의 b는 숙신화 키토산의 숙신화 정도를 보여주는 O 1s 스펙트럼을 나타낸 것이다. 숙신화 키토산의 O 1s 스펙트럼은 C=O (529.52 eV) 및 O-H (530.77 eV)의 결합을 나타내는 2개의 서브 피크로 구성된다. CTS-SA280은 O-H 결합으로 인해 산소(O)의 원자 %(Atomic %)가 증가된 것으로 나타났다.

[0056] 상기 결과를 통하여 산소(O) 원자가 숙신화 정도만큼 증가하게 됨을 확인할 수 있다. 이로 인하여 숙신화 키토

산의 친수성 또한 증가하게 된다.

[0058] **실시예 4 : 숙신화 키토산 하이드로겔의 제조**

[0059] 상기 실시예 2에 따라 제조된 각각의 숙신화 키토산(CTS-SA70, CTS-SA140 및 CTS-SA280)을 이용하여 숙신화 키토산 하이드로겔(SC hydrogel)을 제조하였다.

[0060] 숙신화 키토산(CTS-SA70, CTS-SA140 및 CTS-SA280)를 각각 탈이온수에 용해시켰다. 이와 별도로 글루코스-6-포스페이트(G6P: glucose-6- phosphate)를 탈이온수에 용해시키고 실온에서 밤새 교반하여, 2mg/μL의 G6P 용액을 제조하였다. 이 후, G6P 용액이 완전히 분산될 때까지 천천히 교반하여 점성 용액을 획득하였다. 2 : 1의 부피비(숙신화 키토산 용액 : G6P 용액)로 G6P 용액을 숙신화 키토산 용액에 첨가하고, 혼합물이 균질해질 때까지 교반하였다. G6P의 확산에 의해 혼합물이 중합되어 숙신화 키토산 하이드로겔(SC hydrogel)이 제조되었다.

[0061] 제조된 숙신화 키토산 하이드로겔을 두께 1mm의 필름으로 제조하고 생검 펀치를 사용하여 직경 8mm 디스크로 성형하였다.

[0063] **실시예 5: 숙신화 키토산 하이드로겔의 특성 평가**

[0064] **5-1. 유동성 실험**

[0065] 상기 실시예 4에서 제조된 본 발명에 따른 키토산 하이드로겔(SC hydrogel)의 유동성(rheometer experiment)을 실험하였다. 도 9는 본 발명에 따른 숙신화 키토산 하이드로겔(SC hydrogel)의 유동성 실험 결과를 나타낸 것이다.

[0066] 유동성 실험은 실온(25℃)의 진동 모드에서, 평행판이 있는 레오미터(rotating rheometer)(Anton Paar, Austria)를 사용하여 수행되었다. 디스크 형태로 제조된 키토산 하이드로겔(SC hydrogel)의 주파수-의존 점탄성 거동(frequency-dependent viscoelastic behavior)을 8mm 직경의 플레이트-플레이트 지오메트리(plate-plate geometry) 및 1mm 갭을 갖는 회전식 레오미터로 측정하였다. 각 샘플의 저장 탄성률(G') 및 손실 탄성률(G'') 값은 다음 식 1을 이용하여 계산되었고, 주파수 스윕은 1%의 일정한 변형률에서 0.1~10Hz 범위에서 수행되었다.

[0067] [식 1]

$$G' = \frac{\sigma_0}{\epsilon_0} \cos \delta, G'' = \frac{\sigma_0}{\epsilon_0} \sin \delta.$$

[0068]

[0069] 그 결과 도 9에 나타난 바와 같이, 2.5%의 숙신화 키토산의 농도에서 G6P 농도가 100mg에서 400mg으로 증가함에 따라, 숙신화에 따라 저장 탄성률(G')이 60Pa에서 1000Pa로 증가하는 것으로 나타났다.

[0070] CTS-SA70(70mg), CTS-SA140(140mg) 및 CTS-SA280(280mg)의 저장 탄성률(G')은 G6P의 최저 농도(100mg)에서 각각 61 ± 4.818 , 146 ± 0.118 및 205 ± 0.011 Pa로 측정되었다. 또한, 모든 샘플에 대해 손실 탄성률(G'')은 유사하게 측정되었다. 숙신화에 의해 G' 및 G'' 값이 감소한 반면, 숙신화가 적게 될수록 기계적 강도는 우수하게 나타났다.

[0072] **5-2. 생체 적합성 평가**

[0073] 상기 실시예 4에서 제조된 본 발명에 따른 키토산 하이드로겔(SC hydrogel)의 생체 적합성을 평가시험을 수행하였다. 생체 적합성 평가를 위하여 인간 지방 조직 유래 MSC 세포(hADSC)를 96-웰 조직 배양 플레이트에 2×10^4 의 밀도로 캡슐화하였다. hADSC를 인간 지방 조직 유래 MSC 성장 배지 및 보충제(10% FBS, 0.02% 페니실린 및 스트렙토 마이신)에서 성장시켰다. 모든 실험에서, 하이드로겔을 멸균된 인산염 완충 식염수(PBS)로 세척하고 배양 배지를 2일마다 교체하였다. 5% CO₂ 환경, 37℃에서 1, 3 및 7일간 배양한 후, 100μL의 CCK(Cell Counting Kit) 용액을 각 웰에 첨가하고 플레이트를 2시간 동안 배양하였다. 흡광도는 벤치마크 플러스 마이크로 플레이트 분광 광도계(Bio-Rad, BR170-6930)를 사용하여 측정하였다. 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[0074] 도 10에 도시된 바와 같이, 숙신화 키토산의 농도에 따라 하이드로겔을 제조하여 세포 독성평가를 진행한 결과, 숙신화 정도가 가장 낮은 CTS-SA70에서 세포 증식률이 가장 높게 나타남을 확인할 수 있다. 이는 세포질은 음전하를 나타내는데 숙신화가 증가할수록 카르복실기가 많아져서 하이드로겔 내부 또한 음전하를 나타내게 되므로 이 때문에 세포친화성이 낮아지는 것으로 판단된다.

[0076] 5-3. 알칼리성 포스파타제(ALP) 활성 평가

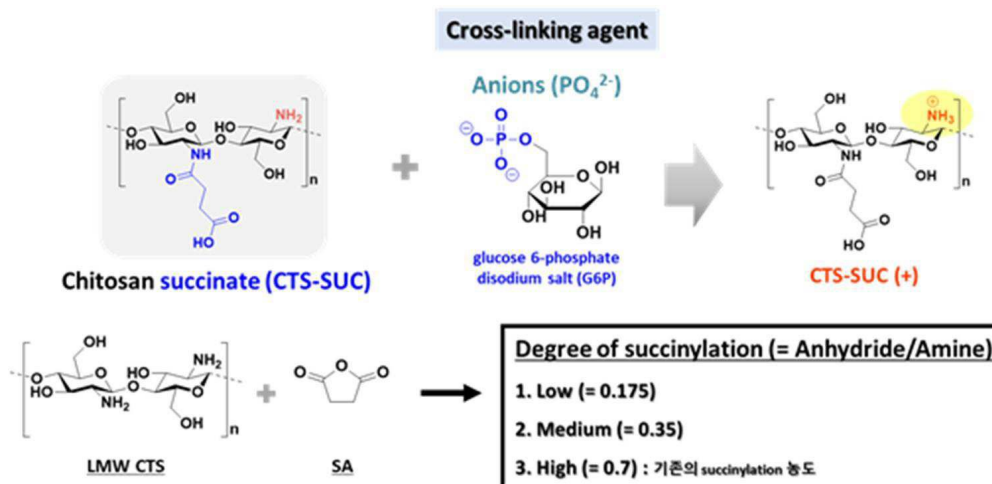
[0077] 상기 실시예 4에서 제조된 본 발명에 따른 본 발명에 따른 키토산 하이드로겔(SC hydrogel)의 알칼리성 포스파타제(ALP: alkaline phosphatase) 활성 평가시험을 수행하였다. 인간 지방 조직 유래 MSC 세포(hADSC)를 48-웰 조직 배양 플레이트에 2×10^4 의 밀도로 캡슐화하고, 성장 배지에 1일간 배양한 후 배지를 골 형성(osteogenic) 배지로 변경하였다. 세포 배양은 5, 10 및 15일에 각각 채취하여 샘플로 사용하였다. ALP 활성 분석을 위해, 배양된 hADSC를 DPBS로 세척하고 4℃에서 1시간 동안 3X RIPA 완충액으로 용해시켰다. 용해된 hADSC를 10,000rpm에서 10분 동안 원심분리하고, 상청액을 37℃ 인큐베이터에서 p-니트로페놀포스페이트(pNPP: p-nitrophenol phosphate, Sigma Aldrich)와 30분 동안 반응시켰다. p-니트로페놀 생산량은 405nm 파장에서 ELISA 판독기를 사용하여 측정되었다. 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[0078] 도 11에 도시한 바와 같이, 숙신화 키토산의 농도에 따라 하이드로겔을 제조하여 알칼리성 포스파타제 활성을 확인한 결과, 숙신화 정도가 가장 낮은 CTS-SA70에서 골분화율이 가장 높게 나타났다. 이로써 숙신화의 정도가 낮을수록 물성이 높아져 실제 골과 강도가 유사하게 나타날 수 있음을 알 수 있다.

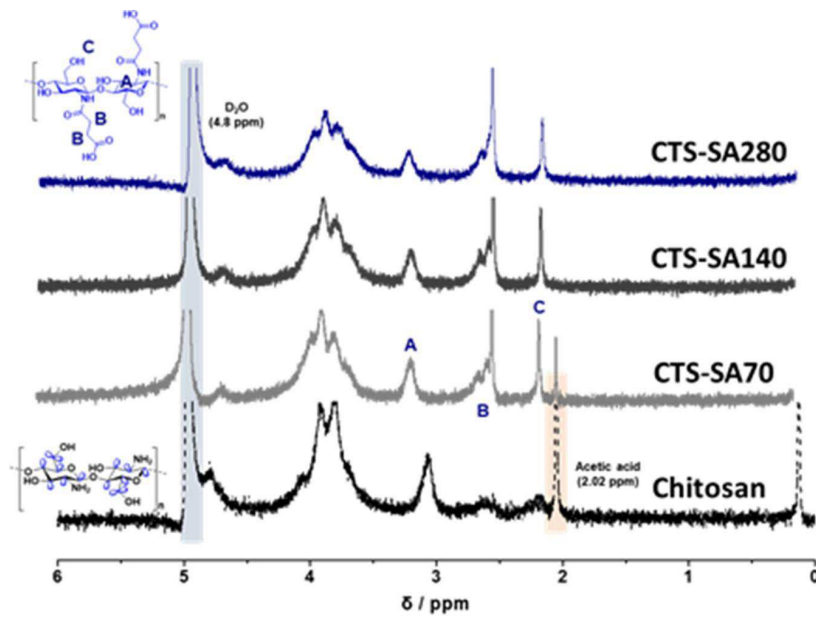
[0080] 이상 실시예를 통해 본 발명을 설명하였으나, 본 발명은 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 실시예는 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않고 수정되거나 변경될 수 있으며, 본 기술 분야의 통상의 기술자는 이러한 수정과 변경도 본 발명에 속하는 것임을 알 수 있을 것이다.

도면

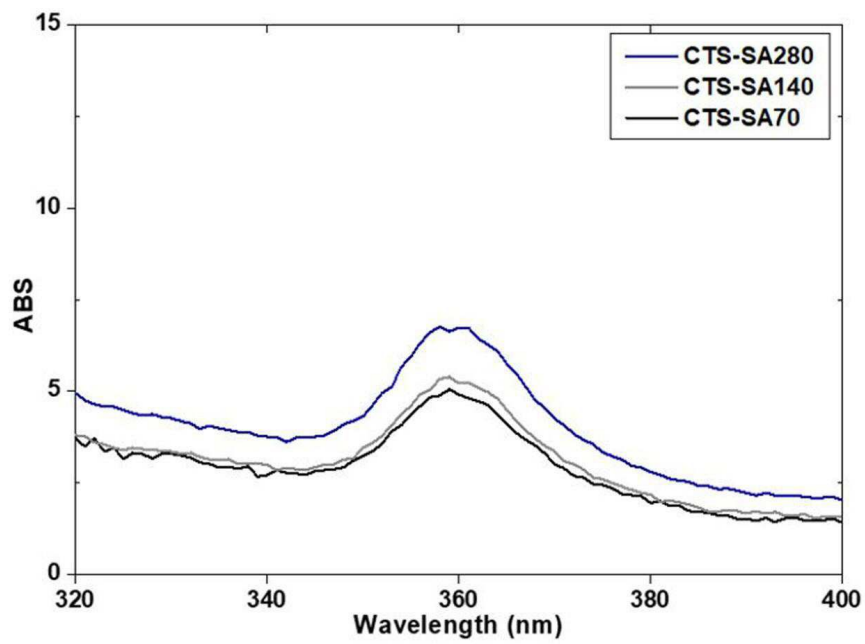
도면1



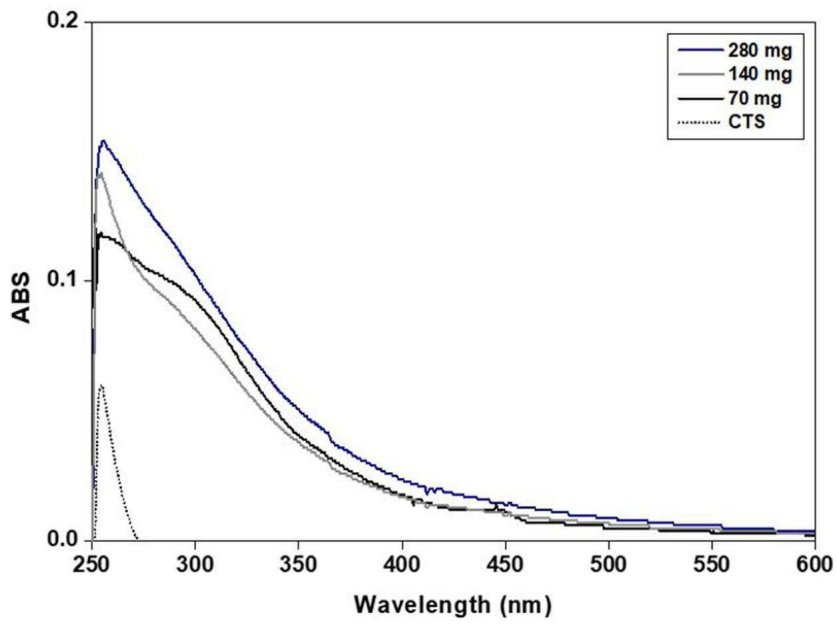
도면2



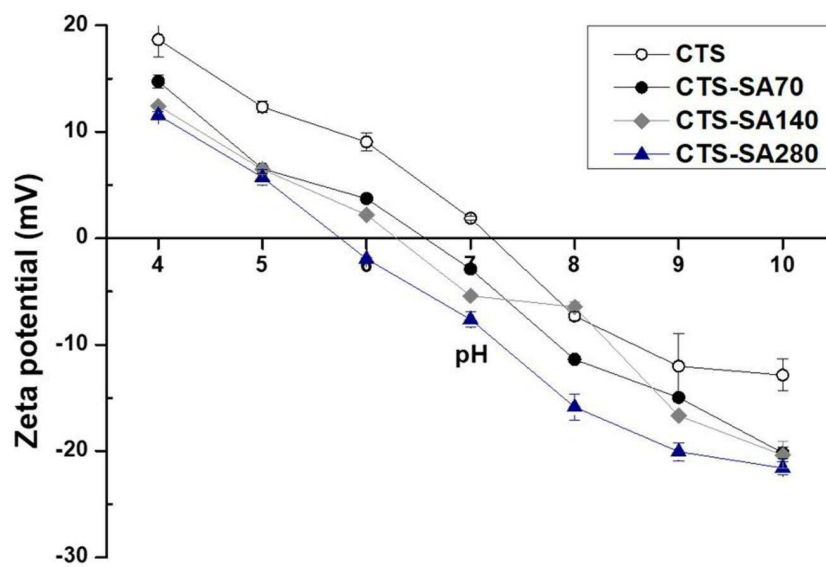
도면3



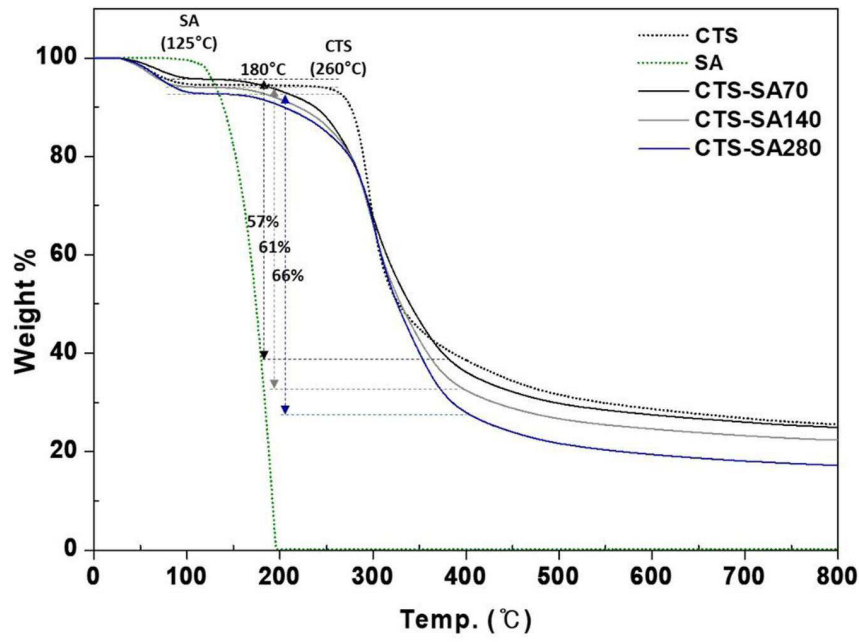
도면4



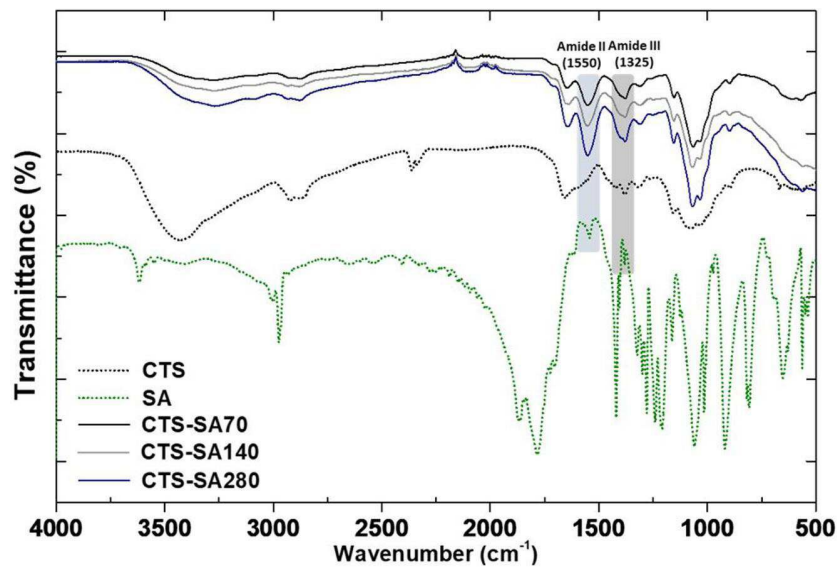
도면5



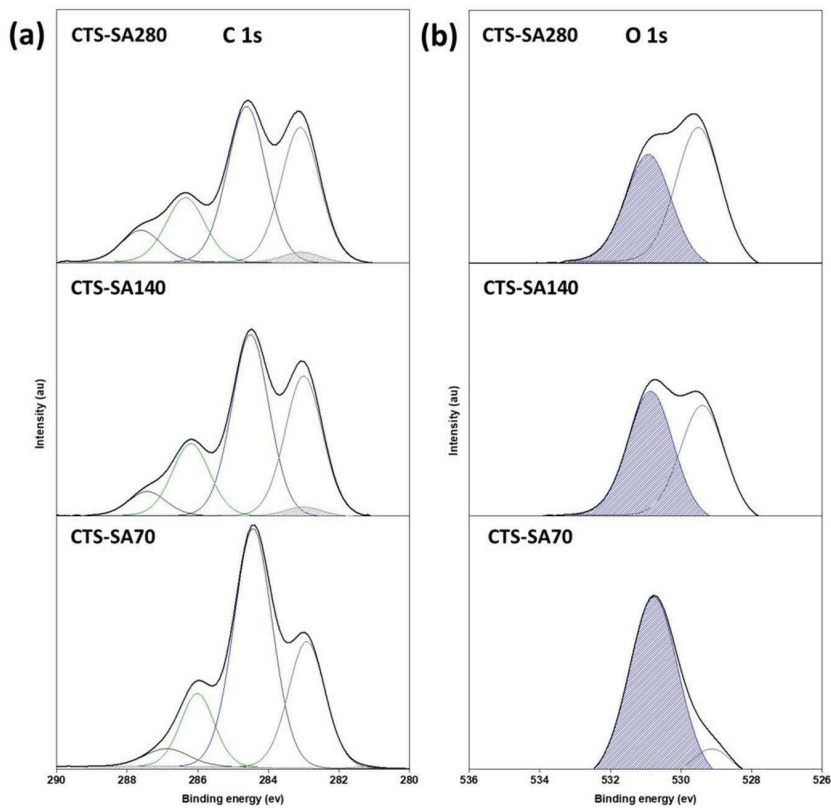
도면6



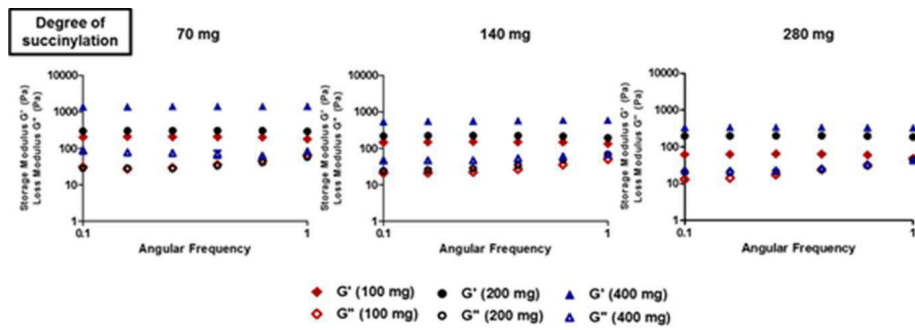
도면7



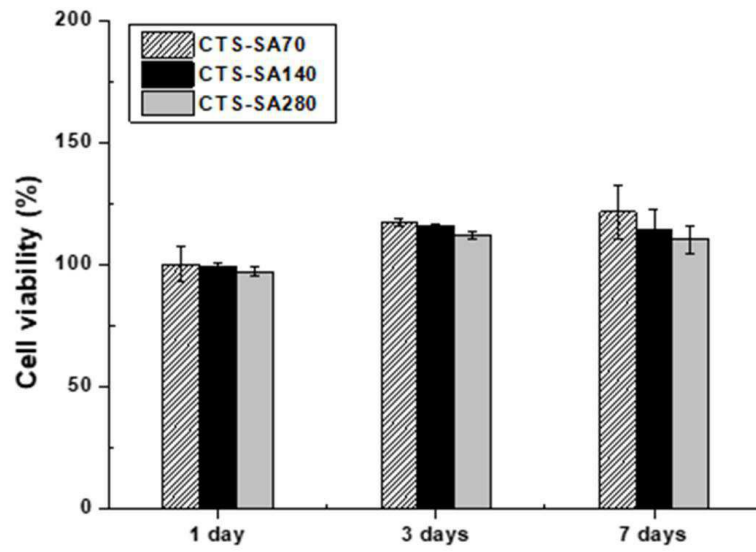
도면8



도면9



도면10



도면11

