



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0046024
(43) 공개일자 2023년04월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08H 7/00 (2011.01) A61L 27/14 (2006.01)
A61L 27/40 (2006.01) C08G 65/334 (2006.01)
C08H 1/00 (2015.01)
(52) CPC특허분류
C08H 6/00 (2013.01)
A61L 27/14 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0128981
(22) 출원일자 2021년09월29일
심사청구일자 2021년09월29일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
(72) 발명자
김명웅
인천광역시 연수구 신송로82번길 6 (송도동, 송도
풍림아이원4단지아파트) 409동 701호
손동완
전라남도 광양시 금호로 292 (금호동,
동백아파트) 10동 403호
정장욱
6522 앤티오크 크로싱, 배턴 루지, 루이지애나
70817, 미합중국
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 15 항

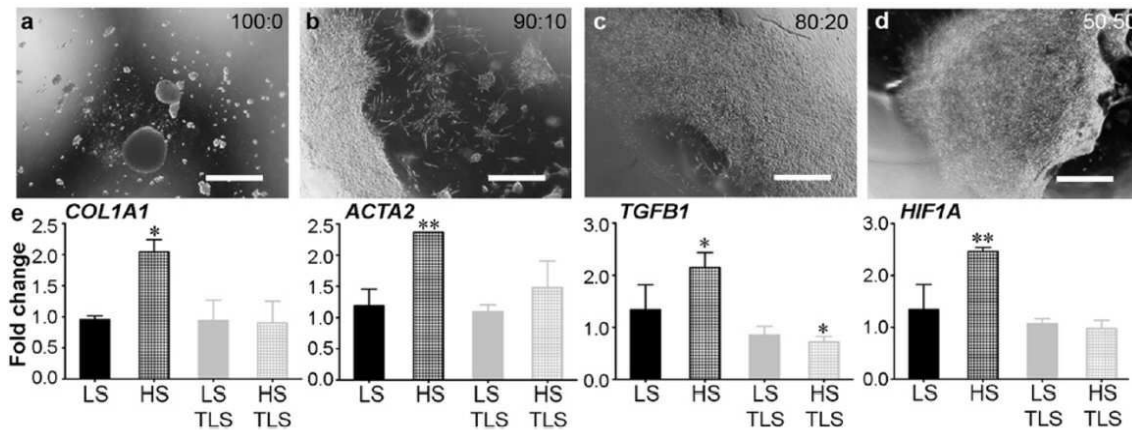
(54) 발명의 명칭 티올화된 리그닌설폰산염 복합체와 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명의 목적은 티올화된 리그닌설폰산염 복합체 및 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 제조방법을 제공하는데 있다. 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 티올화된 리그닌설폰산염(TLS), 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴(fGeMA), 및 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 포함하고, 티올화된 리그닌설폰산염과 폴리에틸렌 글리콜은 티올화된

(뒷면에 계속)

대표도 - 도5



리그닌설폰산염의 티올기를 통하여 결합되어 있고, 티올화된 리그닌설폰산염과 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴도 티올화된 리그닌설폰산염의 티올기를 통하여 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 티올화된 리그닌설폰산염 복합체를 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 제조방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, 항산화 기능이 우수하면서도 세포 접착 능력이 뛰어나, 상처 치료등의 용도에 적용될 수 있는 효과가 있다. 또한, 본 발명에 따르면, 하이드로겔 상 복합체의 성분의 함량비를 조절하여, 하이드로겔 상의 복합체 기계적 특성을 조절할 수 있는 효과가 있다.

(52) CPC특허분류

A61L 27/40 (2013.01)

A61L 27/52 (2013.01)

A61L 27/56 (2013.01)

C08G 65/3344 (2013.01)

C08H 1/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415173337
과제번호	20010881
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술평가관리원
연구사업명	소재부품기술개발-소재부품패키지형
연구과제명	저온 속경화용 잠재성 경화제 국산화 핵심소재기술 개발을 통한
rigid(COG)flexible(COP)용	ACF개발 및 양산성 확보(2차년도)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	인하대학교 산학협력단
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

티올화된 리그닌설폰산염(TLS), 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴(fGelMA), 및 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 포함하고, 티올화된 리그닌설폰산염과 폴리에틸렌 글리콜은 티올화된 리그닌설폰산염의 티올기를 통하여 결합되어 있고, 티올화된 리그닌설폰산염과 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴도 티올화된 리그닌설폰산염의 티올기를 통하여 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 티올화된 리그닌설폰산염 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 티올화된 리그닌설폰산염의 리그닌설폰산염은 바이오매스로부터 유래하는 것을 특징으로 하는 티올화된 리그닌설폰산염 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 티올화된 리그닌설폰산염은 리그닌설폰산염과 3-메르캅토프로피온산을 반응시켜 형성하는 것을 특징으로 하는 티올화된 리그닌설폰산염 복합체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 티올화된 리그닌설폰산염은 항산화 기능을 갖는 것을 특징으로 하는 티올화된 리그닌설폰산염 복합체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴은 세포와의 접착 사이트를 제공하는 것을 특징으로 하는 티올화된 리그닌설폰산염 복합체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 티올화된 리그닌설폰산염 복합체에 포함되는 티올화된 리그닌설폰산염(TLS), 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴(fGelMA), 및 폴리에틸렌글리콜(PEG)의 함량비는 부피비로 0.1 내지 10 : 30 내지 60 : 30 내지 60인 것을 특징으로 하는 티올화된 리그닌설폰산염 복합체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 티올화된 리그닌설폰산염 복합체는 조직 재생 공학용 지지체 플랫폼, 세포 증식 및 분화용 스캐폴드 플랫폼, 및 상처 치유 촉진용 스캐폴드 플랫폼으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종에 사용되는 것을 특징으로 하는 티올화된 리그닌설폰산염 복합체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 티올화된 리그닌설폰산염과 폴리에틸렌 글리콜의 결합과 티올화된 리그닌설폰산염과 메타

크릴레이트화된 어류계 젤라틴의 결합은 염기 촉매를 이용한 알켄을 사용한 반응, 자외선 조사를 통한 반응, 및 열분해의 초기 반응으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 반응을 통하여 형성되는 것을 특징으로 하는 티올화된 리그닌설폰산염 복합체.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 티올화된 리그닌설폰산염 복합체는 하이드로겔 상이고, 티올화된 리그닌설폰산염, 폴리에틸렌 글리콜, 및 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴의 함량 조절에 의하여 하이드로겔 상의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체 강도가 조절되는 것을 특징으로 하는 티올화된 리그닌설폰산염 복합체.

청구항 10

티올화된 리그닌설폰산염 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 혼합용액에 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴을 첨가하는 단계; 및

염기 촉매를 이용한 알켄을 사용한 반응, 자외선 조사를 통한 반응, 및 열분해의 초기 반응으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 반응을 통하여 티올화된 리그닌설폰산염 복합체를 형성하는 단계;

를 포함하는 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 티올화된 리그닌설폰산염은 리그닌설폰산염과 3-메르캅토프로피온산을 반응시켜 제조되는 것을 특징으로 하는 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 제조방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 티올화된 리그닌설폰산염의 리그닌설폰산염은 바이오매스로부터 유래하는 것을 특징으로 하는 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 제조방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 혼합용액의 폴리에틸렌글리콜은 폴리에틸렌글리콜-디아크릴레이트로부터 유래하는 것을 특징으로 하는 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 제조방법.

청구항 14

제10항에 있어서, 상기 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴은 어류계 젤라틴과 글리시딜 메타크릴레이트를 반응시켜 형성하는 것을 특징으로 하는 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 제조방법.

청구항 15

제10항에 있어서, 상기 티올화된 리그닌설폰산염 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 혼합용액에 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴을 첨가하는 단계는 티올화된 리그닌설폰산염, 폴리에틸렌 글리콜, 및 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴의 함량이 부피비로 0.1 내지 10 : 30 내지 60 : 30 내지 60의 비로 혼합되는 것을 특징으로 하는 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 티올화된 리그닌설폰산염 복합체와 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 활성산소종(ROS)은 미토콘드리아 전자전달 중 부산물로 생성되거나 대사물의 산화에 의해 생성된다. ROS는 세포 분열을 방해하고 세포사멸을 유도하는 독성물질로 여겨지지만, ROS는 엄격하게 조절되면 신호분자로 작용한 뒤 세포에 흡수된다. 따라서 세포내 ROS의 임계 균형은 세포외 ROS의 증가로 세포사멸, 원하지 않는 세포내 신호 전달 및/또는 표현형 변화로 나타날 수 있는 유전형 변화가 세포 생존에 매우 중요하다.

[0005] 한편, 리그닌에서 자연 발생하는 폴리페놀 구조 때문에 OH 기능군은 상처 부위에 존재하는 것을 포함하여 라디칼을 중화시키는 능력을 가지고 있다. 최근 리그닌설폰산염을 콜라겐 기질에 결합하면 세포독성과 면역반응을 피하면서 기계적 특성이 강화되는 것으로 입증되었다. 리그닌 기반 스캐폴드의 생화학적 및 기계적 특성 변화를 줄이기 위해, 조직 공학 응용을 지원하는 복합물을 형성하기 위해 고효율의 공유 교차 결합 화학의 활용이 필요했다.

[0007] 이와 관련하여, 대한민국 공개특허 제10-2021-0011340호는 세포 배양용 마이크로 캐리어, 이의 제조방법 및 이를 이용하는 세포 배양방법을 개시하고 있으며 구체적으로는 폴리스티렌을 포함하는 발포체 코어; 상기 발포체 코어의 표면에 형성되는 프라이머 고분자층; 및 상기 프라이머 고분자층 표면에 형성되는 세포 부착 유도층;을 포함하고, 0.80 g/cm^3 내지 0.99 g/cm^3 의 밀도를 갖는, 세포 배양용 마이크로 캐리어를 개시하고 있으나, 라디칼 제거 능력이 뛰어나면서도 기계적 강도를 조절할 수 있는 복합체를 위한 구성을 개시하고 있지는 못하다.

[0009] 또한, 대한민국 공개특허 제10-2017-0100693호는 세포 표면 고분자층 적층 기술 개발을 개시하고 있고, 구체적으로는 줄기세포의 표면에 양전하 고분자 용액 및 음전하 고분자 용액을 반복적으로 적층하여 상기 줄기세포의 표면을 둘 이상의 고분자층으로 코팅하는 단계를 포함하고, 상기 양전하 고분자는 콜라젠, 엘라스틴 또는 데코린이며, 상기 음전하 고분자는 폴리-L-글루탐산(poly-L-glutamic acid), 리그닌-알칼리(lignin-alkali), 탄닌산(tannic acid), 콘드로이틴 황산염(chondroitin sulfate) 및 알긴산(alginic acid)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상인 줄기세포를 조골세포로 분화 유도하는 방법을 개시하고 있으나, 이 역시도 라디칼 제거 능력이 뛰어나 항산화 기능이 있는 하이드로겔 상이면서도 그 기계적 특성을 조절할 수 있는 복합체를 위한 구성을 개시하고 있지는 못하다.

[0011] 이에 본 발명의 발명자들은 라디칼 제거능력이 뛰어나면서도 하이드로겔 상이되, 기계적 강도를 조절할 수 있는 복합체 및 이의 제조방법을 연구를 통하여 도출하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0013] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2021-0011340호
(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제10-2017-0100693호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 티올화된 리그닌설폰산염 복합체 및 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 제조방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은

[0017] 티올화된 리그닌설폰산염(TLS), 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴(fGelMA), 및 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 포함하고, 티올화된 리그닌설폰산염과 폴리에틸렌 글리콜은 티올화된 리그닌설폰산염의 티올기를 통하여 결합되어 있고, 티올화된 리그닌설폰산염과 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴도 티올화된 리그닌설폰산염의 티올기를 통하여 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 티올화된 리그닌설폰산염 복합체를 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은

[0020] 티올화된 리그닌설폰산염 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 혼합용액에 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴을 첨가하는 단계; 및

[0021] 알켄을 사용한 반응, 자외선 조사를 통한 반응, 및 열분해의 초기 반응으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 반응을 통하여 티올화된 리그닌설폰산염 복합체를 형성하는 단계;

[0022] 를 포함하는 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0024] 본 발명에 따르면, 항산화 기능이 우수하면서도 세포 접착 능력이 뛰어나, 상처 치료 등의 용도에 적용될 수 있는 효과가 있다. 또한, 본 발명에 따르면, 하이드로겔 상 복합체의 성분의 함량비를 조절하여, 하이드로겔 상의 복합체 기계적 특성을 조절할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 본 발명에 따라 리그닌설폰산염이 티올화되었음을 보여주는 ^{31}P -NMR(in CDCl_3) 스펙트라이고,

도 2는 3-메르캅토프로피온산의 첨가량에 따라 티올화된 리그닌설폰산염의 티올 농도가 변화하는 것을 보여주는 그래프이고,

도 3은 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 항산화 기능을 보여주는 그래프이고,

도 4는 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 기계적 특성을 보여주는 그래프이고, 및

도 5는 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 세포 적용 특성을 보여주는 사진 및 그래프이다,

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명은 티올화된 리그닌설폰산염(TLS), 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴(fGelMA), 및 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 포함하고, 티올화된 리그닌설폰산염과 폴리에틸렌 글리콜은 티올화된 리그닌설폰산염의 티올기를 통하여 결합되어 있고, 티올화된 리그닌설폰산염과 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴도 티올화된 리그닌설폰산염의 티올기를 통하여 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 티올화된 리그닌설폰산염 복합체를 제공한다.

- [0029] 이하 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체를 각 구성별로 구체적으로 설명한다.
- [0031] 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체는 티올화된 리그닌설폰산염(TLS), 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴(fGelMA), 및 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 포함한다. 이때 티올화된 리그닌설폰산염(TLS)은 티올계 지방족 사슬과 방향족 수산화기를 포함하여 라디칼 제거 기능을 갖고, 따라서, 항산화 기능을 갖는 효과가 있다.
- [0033] 본 발명의 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴은 세포 접착성을 목적으로 포함된다. 즉, 본 발명의 복합체를 구성하는 티올화된 리그닌설폰산염이나 폴리에틸렌글리콜은 세포에 대한 접착성이 없어, 본 발명의 복합체를 세포 등에 적용하는데 문제가 있다. 이에 본 발명의 복합체는 세포에 대한 접착 기능을 갖는 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴을 포함하고, 이때, 어류계 젤라틴이 티올화된 리그닌설폰산염과 용이하게 결합하기 위하여 어류계 젤라틴은 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴 형태로 포함된다.
- [0035] 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체는 폴리에틸렌글리콜을 포함한다. 폴리에틸렌글리콜은 독성을 지니지 않으면서 생체 내 다양한 개체와 상호작용하지 않는 성질을 지니고 있어 불필요한 생체 내 작용을 방지한다. 또한 메타크릴레이트를 사슬 말단에 지니고 있어 리그닌 설폰산염에 도입한 티올과 결합이 가능함과 동시에 다른 폴리에틸렌글리콜 사슬의 메타크릴레이트, 어류계 젤라틴의 메타크릴레이트와 결합하여 가교 구조를 형성할 수 있다.
- [0037] 한편, 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체는 티올화된 리그닌설폰산염이 티올기를 포함하고 있고, 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴과, 폴리에틸렌글리콜 모두 말단에 비닐기를 포함하고 있어, 티올화된 리그닌설폰산염과 폴리에틸렌 글리콜은 티올화된 리그닌설폰산염의 티올기를 통하여 결합되어 있고, 티올화된 리그닌설폰산염과 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴도 티올화된 리그닌설폰산염의 티올기를 통하여 결합되어 있는 것을 특징으로 한다. 이와 같이, 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염은 어류계 젤라틴 및 폴리에틸렌글리콜과의 반응, 예를 들어 광가교 반응에서 가교제 또는 경화제로서의 기능을 수행하게 된다.
- [0039] 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체는 상기와 같은 성분들이 티올기를 통하여 결합되어 있어, 건전한 복합체를 형성할 수 있고, 또한, 복합체에 포함되는 티올기와 폐놀기의 수산화기가 라디칼을 제거하는 기능을 가져 항산화 기능이 우수하고, 나아가, 어류계 젤라틴이 포함되어 세포 부착성이 우수한 장점이 있어, 예를 들어 상처 치료, 세포의 표현형 변화 등에 적용될 수 있다.
- [0041] 한편, 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체에 포함되는 티올화된 리그닌설폰산염의 리그닌설폰산염은 다양한 원료로부터 유래될 수 있으나, 바이오매스로부터 유래할 수 있다. 리그닌은 나무로부터 셀룰로오스 펄프를 얻는 산업 공정에서 부산물로 대량으로 얻어지는 지용성 폐놀계 천연 고분자이다. 생산되는 리그닌의 98% 이상은 연소되어지며, 소량의 리그닌만이 정밀 화학제품, 고분자 산업, 첨가제 등의 분야에 응용되어 바이오매스로 분류된다. 리그닌 설폰산염은 펄프 공정에서 생성되는 리그닌을 아황산수소나트륨의 존재 하에 열처리하여 얻게 되며, 설폰산염 기능기 때문에 물에 용해가 가능하여 하이드로겔에 적용이 가능하다.
- [0043] 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체는 상기와 같이 많은 양이 폐기되는 바이오매스로부터 리그닌설폰산염을 도출하여, 이를 이용하여 고부가가치의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체를 얻을 수 있다는 장점이 있다.
- [0045] 다음으로, 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체에 포함되는 티올화된 리그닌설폰산염은 다양한 방법으로 얻을 수 있으나, 예를 들어 리그닌설폰산염과 3-메르캅토프로피온산을 반응시켜 얻을 수 있다. 이때, 반응 중 3-메르캅토프로피온산의 함량을 조절함에 의하여 티올화된 리그닌설폰산염의 티올화 정도를 정량적으로 조절할 수 있다.

- [0047] 상기 티올화된 리그닌설폰산염은 항산화 기능을 가질 수 있다. 구체적으로는 티올화된 리그닌설폰산염의 티올기와, 페닐기의 수산화기는 라디칼 제거 기능을 갖고, 이에 따라 항산화 기능을 갖게 된다. 이 때 항산화 기능이란 활성 산소가 갖는 라디칼을 제거할 수 있는 능력을 의미하며, 페놀기와 티올기의 수소가 활성 산소 라디칼과 매우 빠르게 반응하여 라디칼을 제거하게 된다. 이를 통하여 상처 치유 및 조직 재생 과정에서 부정적인 영향을 미칠 수 있는 활성 산소를 효과적으로 제거하여 빠른 상처 치유가 가능하게 하는 스캐폴드 형성이 가능하다.
- [0049] 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체에 포함되는 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴은 특히 세포와의 접촉 사이트를 제공하게 되고, 이에 따라 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체가 세포에 잘 접촉할 수 있도록 하는 기능을 제공할 수 있다. 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 다른 성분들, 즉 티올화된 리그닌설폰산염과 폴리에틸렌글리콜은 이와 같은 세포 접착성이 없기 때문에, 특히 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체를 세포 등에 적용하는 경우에는 반드시 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴 구성이 필요하다. 어류계 젤라틴은 다른 종류의 젤라틴보다 분자량이 작아 수용액 제조 시 상온에서 겔화되지 않고 용액 상을 유지하여 하이드로겔 형성을 위한 용액 제조에 용이하다.
- [0051] 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체는 그 성분인 티올화된 리그닌설폰산염, 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴, 및 폴리에틸렌글리콜을 질량비로 0.1 내지 10 : 30 내지 60 : 30 내지 60의 비율로 포함하는 것이 바람직하다. 성분들의 비율이 상기 범위를 벗어나는 경우에는 경화가 일어나지 않거나 세포 접착성이 떨어지거나 충분한 항산화 기능을 갖지 못하는 문제점이 있다.
- [0053] 본 발명에 따른 티올화된 리그닌설폰산염 복합체는 상기한 바와 같이, 항산화 기능이 우수하고, 세포 접착성이 우수하며, 하이드로겔 상이면서도 원료물질의 함량을 조절함에 따라 복합체의 기계적 특성을 조절할 수 있기 때문에, 조직 재생 공학용 지지체 플랫폼, 세포 증식 및 분화용 스캐폴드 플랫폼, 및 상처 치유 촉진용 스캐폴드 플랫폼으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종에 사용되는 것이 바람직하다.
- [0055] 한편, 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 경우 상기한 바와 같이, 티올화된 리그닌설폰산염이 티올기를 가지고 있고, 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴과 폴리에틸렌글리콜이 말단에 비닐기를 가지고 있기 때문에, 이들 작용기들 사이의 반응을 통하여 결합이 이루어지는데, 염기 촉매를 이용한 알켄을 사용한 반응, 자외선 조사를 통한 반응, 및 열분해의 초기 반응으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 반응을 통하여 결합 반응이 이루어질 수 있다. 첫째, 염기 촉매, 구체적으로 알킬 아민, 혹은 트리알킬포스핀을 이용한 마이클 첨가 반응이 진행되어 티올과 메타크릴레이트가 반응, 티오에터를 형성할 수 있다. 둘째, 자외선을 통하여 분해되어 라디칼을 형성하는 라디칼 개시제, 예를 들어 리튬 페닐-2,4,6-트리메틸벤조일포스피네이트(LAP)에서 얻어진 라디칼이 티올과 메타크릴레이트, 혹은 메타크릴레이트 사이에 공유결합을 형성시킬 수 있다. 셋째, 열분해를 통하여 라디칼을 형성하는 라디칼 개시제, 예를 들어 2,2'-아조비스(2-메틸프로피오나미딘)디히드로클로라이드에서 얻어진 라디칼이 티올과 메타크릴레이트, 혹은 메타크릴레이트 사이에 공유결합을 형성시킬 수 있다.
- [0057] 일반적으로 하이드로겔 상으로 형성되는 물질은 그 기계적 강도를 조절하기가 용이하지 않으나, 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 경우 하이드로겔 상으로 형성됨에도 불구하고, 이에 포함되는 원료 성분들의 함량을 조절함에 따라 그 기계적 강도를 조절할 수 있기 때문에, 본 발명에 따른 티올화된 리그닌설폰산염 복합체를 응용분야에 적용할 때에, 해당 응용분야에서 요구되는 기계적 강도에 따라 복합체의 기계적 강도를 용이하게 조절할 수 있는 장점이 있다.
- [0059] 또한 본 발명은
- [0060] 티올화된 리그닌설폰산염 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 혼합용액에 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴을 첨

가하는 단계; 및

[0061] 염기 촉매를 이용한 알켄을 사용한 반응, 자외선 조사를 통한 반응, 및 열분해의 초기 반응으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 반응을 통하여 티올화된 리그닌설폰산염 복합체를 형성하는 단계;

[0062] 를 포함하는 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 제조방법을 제공한다.

[0064] 이하, 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 제조방법을 각 단계별로 상세히 설명한다.

[0066] 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 제조방법은 티올화된 리그닌설폰산염 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 혼합용액에 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴을 첨가하는 단계를 포함한다. 구체적으로는 예를 들어, 폴리에틸렌글리콜의 전구체인 폴리에틸렌글리콜-디아크릴레이트와 티올화된 리그닌설폰산염이 혼합된 혼합용액에 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴을 첨가할 수 있고, 이를 통하여 결합반응에 의하여 복합체를 형성할 원료물질이 혼합되게 된다.

[0068] 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 제조방법은 이상과 같이 원료물질인 티올화된 리그닌설폰산염, 폴리에틸렌글리콜 및 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴을 혼합한 후, 염기 촉매를 이용한 알켄을 사용한 반응, 자외선 조사를 통한 반응, 및 열분해의 초기 반응으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 반응을 통하여 티올화된 리그닌설폰산염 복합체를 형성하는 단계를 포함한다.

[0070] 여기서 염기 촉매를 이용한 알켄을 사용한 반응은 구체적으로 원료 물질과 염기촉매를 혼합 후 섭씨 20 ° C ~ 40 ° C 로 유지하는 방법으로 수행될 수 있고, 자외선 조사를 통한 반응은 원료물질 모두와 광개시제가 혼합된 상태에서 자외선 램프를 이용하여 자외선을 조사하는 방법으로 수행될 수 있으며, 열분해의 초기 반응은 원료물질 모두와 열개시제가 혼합된 상태에서 열개시제가 분해되는 온도 이상으로 가열하는 방법으로 수행될 수 있다.

[0072] 이상의 반응을 통하여, 티올화된 리그닌설폰산염의 티올기와 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴의 말단 비닐기 사이, 및 티올화된 리그닌설폰산염의 티올기와 폴리에틸렌글리콜의 말단 비닐기 사이에서 결합 반응이 일어나 복합체가 형성되게 된다. 이와 같이, 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염은 어류계 젤라틴 및 폴리에틸렌글리콜과의 반응, 예를 들어 광가교 반응에서 가교제 또는 경화제로서의 기능을 수행하게 된다.

[0073] 본 발명 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 제조방법에서 원료로 사용되는 티올화된 리그닌설폰산염은 다양한 방법으로 얻을 수 있으나, 예를 들어 리그닌설폰산염과 3-메르캅토프로피온산을 반응시켜 얻을 수 있다. 이때, 반응 중 3-메르캅토프로피온산의 함량을 조절함에 의하여 티올화된 리그닌설폰산염의 티올화 정도를 정량적으로 조절할 수 있다.

[0075] 또한, 상기 티올화된 리그닌설폰산염의 리그닌설폰산염은 바이오매스로부터 유래하는 것을 사용하는 것이 바람직하다. 리그닌은 나무로부터 셀룰로오스 펄프를 얻는 산업 공정에서 부산물로 대량으로 얻어지는 지용성 페놀계 천연 고분자이다. 생산되는 리그닌의 98% 이상은 연소되어지며, 소량의 리그닌만이 정밀 화학제품, 고분자 산업, 첨가제 등의 분야에 응용되어 바이오매스로 분류된다. 리그닌 설폰산염은 펄프 공정에서 생성되는 리그닌을 아황산수소나트륨의 존재 하에 열처리하여 얻게 되며, 설폰산염 기능기 때문에 물에 용해가 가능하여 하이드로겔에 적용이 가능하다.

[0077] 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 제조방법은 상기와 같이 많은 양이 폐기되는 바이오매스로부터 리그닌설폰산염을 도출하여, 이를 이용하여 고부가가치의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체를 제조할 수 있다는 장점이 있다.

- [0079] 한편, 상기한 바와 같이, 티올화된 리그닌설폰산염 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 혼합용액에 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴을 첨가하는 단계에서 사용되는 폴리에틸렌 글리콜은 예를 들어, 폴리에틸렌글리콜-디아크릴레이트로부터 유래하는 것일 수 있다.
- [0081] 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 제조방법에서 원료물질로 사용되는 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴은 어류계 젤라틴과 글리시딜 메타크릴레이트를 반응시켜 형성될 수 있다. 젤라틴의 라이신 단위체가 갖는 1차 아민과 글리시딜 메타크릴레이트의 에폭시기가 선택적으로 반응하여 메타크릴레이트가 도입된 젤라틴을 쉽게 합성할 수 있다.
- [0083] 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 제조방법에서 상기 티올화된 리그닌설폰산염 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 혼합용액에 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴을 첨가하는 단계는 티올화된 리그닌설폰산염, 폴리에틸렌 글리콜, 및 메타크릴레이트화된 어류계 젤라틴의 함량이 부피비로 0.1 내지 10 : 30 내지 60 : 30 내지 60의 비로 혼합되는 것이 바람직하고, 예시적으로는 5.3 : 42.1 : 52.6의 비율로 혼합될 수 있다. 만약, 상기 함량의 범위가 상기 범위를 벗어나는 경우에는 경화가 일어나지 않거나 세포 접착성이 떨어지거나 충분한 항산화 기능을 갖지 못하는 문제점이 있다.
- [0085] 이상의 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 제조방법은 예를 들어 많은 양이 폐기되는 바이오매스로부터 유래하는 리그닌설폰산염이나 어류계 젤라틴을 원료로 사용하여 상처 치료 등에 사용될 수 있는 고부가가치의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체를 제조할 수 있는 장점이 있다.
- [0087] 또한, 일반적으로 하이드로겔 상으로 형성되는 물질은 그 기계적 강도를 조절하기가 용이하지 않으나, 본 발명의 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 제조방법의 경우 하이드로겔 상으로 형성됨에도 불구하고, 이에 포함되는 원료 성분들의 함량을 조절함에 따라 그 기계적 강도를 조절할 수 있기 때문에, 본 발명에 따라 제조된 티올화된 리그닌설폰산염 복합체를 응용분야에 적용할 때에, 해당 응용분야에서 요구되는 기계적 강도에 따라 복합체의 기계적 강도를 용이하게 조절할 수 있는 장점이 있다.
- [0089] 이하, 본 발명을 실험예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 이하의 기재는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 하는 것일 뿐, 이하의 설명에 의하여 본 발명이 청구하고자 하는 사항의 범위가 한정되어 해석되는 것을 의도하는 것은 아니다.
- [0091] <실험예 1>
- [0092] 리그닌설폰산염의 티올화 확인 1
- [0093] 리그닌설폰산염의 티올화를 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.
- [0094] 도 1의 ^{31}P -NMR 스펙트라는 핵자기공명장치(NMR, JNMCEZ400S 400 MHz, JEOL)을 이용하여 측정하였다. 리그닌은 2-클로로-4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-다이옥사포스포란 (TMDP)를 이용하여 가수분해하였고 내부표준 피크를 이용한 정량분석으로 ^{31}P NMR 스펙트라를 얻어냈다. 도 1에 따르면, 페놀의 방향족-OH와 지방족-OH를 확인할 수 있는데, 145.6 ~ 149.8ppm (지방족에 할당)의 피크가 나타나고 137.6 ~ 144.4ppm(방향족에 할당)의 피크를 알려진 농도의 145.0ppm에서 내부표준(사이클로헥사놀의 수산화기) 피크를 이용한 정량분석으로 방향족-OH피크 강도의 통합 변화를 통하여 티올화정도를 확인할 수 있었다. 이를 통해 지방족-OH그룹은 방향족-OH에 비해 티올화의 결합에 더 적극적으로 참여한 것을 확인할 수 있다. 방향족-OH그룹이 더 많이 남게 되어 리그닌의 항산화 기능이 유지됨을 확인할 수 있다.
- [0095] 리그닌설폰산염의 티올화 반응을 수행하기 위하여 리그닌설폰산염 1 g을 플라스크에 넣은 후 10 ml의 증류수를

넣고 용해시켰다. 3-메르캅토프로피온산(MPA) 1 ml와 37% 염산 수용액 0.1 ml를 추가한 후 80 °C에서 질소 분위기 하에 교반하였다. 24시간 후 용액을 상온으로 냉각한 뒤 100 ml의 이소프로필 알코올(IPA)를 첨가하여 티올화된 리그닌설포산염 침전을 얻은 후 원심분리하여 고체를 얻어내었다. 이를 다시 이소프로필알코올로 세척한 후 원심분리하여 얻은 고체를 진공오븐에서 하루 동안 건조하였다.

[0097] <실험예 2>

[0098] 리그닌설포산염의 티올화 확인 2

[0099] 리그닌설포산염의 티올화를 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0100] 상기 실험예 1과 동일한 방법으로 리그닌설포산염을 티올화하되, 첨가된 3-메르캅토프로피온산의 양과 리그닌설포산염에 도입되는 티올의 양의 관계를 알아보기 위해 3-메르캅토프로피온산을 0.5 mL, 3 mL, 5 mL로 변화시키고 다른 조건은 변화시키지 않으면서 같은 방법으로 합성을 진행하였다. 이를 리그닌설포산염 0.1 g 당 첨가된 MPA의 양(mmol)으로 환산한 값을 [MPA]로 표현하며, 각각 0.57, 3.44, 5.74이다(도 2의 x축을 참고).

[0102] Ellman 시약(5,5'-다이티오비스(2-니트로벤조산)(DTNB)는 시스테인 잔기의 티올을 적정하기 위해 이용하였으며, 인산완충생리식염수하에서 표준물질을 기준으로 정량화하였다. 각각의 티올 농도에 따라 412 nm 빛에 대한 흡광도를 측정하여 농도를 계산하였다.

[0103] Ellman 분석을 사용하여, 통합된 티올기를 정량화하여, 티올화 이전의 리그닌설포산염(SLS) 대 3-메르캅토프로피온산(MPA)의 서로 다른 화학양상비에에서 티올화된 리그닌설포산염(TLS)의 세가지 다른 배치의 티올 농도로 증명된 티올 농도를 튜닝하여, 티올 농도를 정밀하게 제어하였다.

[0105] Ellman 분석을 위하여 반응완충액은 인산 나트륨 2.1g(12mmol)과 에틸렌다이아민테트라아세트산(EDTA) 43.5mg(0.15mmol)을 150ml의 인산 완충 식염수(PBS)에 넣고 용해하여 준비시켰다. Ellman's 시약 4mg을 1ml의 반응완충액에 용해하여 4mg/ml의 Ellman 시약 용액을 준비하였다. L-시스테인염산염 2.634mg을 10ml의 반응완충액에 용해하여 표준분석물질인 시스테인 용액을 준비하였다. 측정하고자 하는 티올화된 리그닌설포산염(TLS)과 리그닌설포산염(SLS)는 1mg을 1ml의 반응완충액에 용해하여 준비하였다. 25ul Ellman 시약 용액 와 125ul의 표준물질이나 측정하고자 하는 샘플을 1.25ml의 반응완충액에 용해시킨 후 상온에서 30분동안 배양시켰다. 이 용액을 412nm의 흡광도를 측정하여 티올화된 리그닌설포산염의 농도를 정량화하였다.

[0107] Ellman 분석은 미지시료의 티올 그룹의 농도를 정량화하기 위한 분석법으로, 완충용액에서 티올은 DTNB와 반응하여 2-니트로-5티오벤조산염(TNB⁻)을 생성하고, 물에 이온화되며 TNB²⁻가 생성되고 이 이온은 노란색을 띄게 된다. 티올 1몰당 1몰의 TNB⁻를 형성하고, 이를 이용하여 412 nm에서 흡광도를 측정하여 정량화 가능하다.

[0109] 도 2에 따르면, SLS 비교예와 비교할 때, 배치 복제성에 영향을 주지 않으면서, 티올농도는 거의 10 배 증가하였음을 알 수 있다. 이를 통하여 TLS의 기능화는 정량적으로 조절 가능하며, 주로 지방족 OH 기에서 발생한다는 것을 알 수 있다.

[0111] <실험예 3>

[0112] 티올화된 리그닌설포산염 복합체의 항산화성의 확인

[0113] 본 발명에 따른 티올화된 리그닌설포산염 복합체의 항산화성을 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0114] DPPH(2,2-디페닐-1-피크릴하이드라질)와 Cu²⁺의 감소(TAC, 총 항산화 용량)를 이용한 항산화 평가를 위해 두 가지 공통 분석을 활용하였다. 1 ~ 5 mg/mL의 여러 농도에서 SLS 및 TLS에 의한 DPPH 억제 정도를 시험하였고, 그

결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에 따르면, TLS는 SLS에 비해 DPPH 억제이 유의미하게 높았으며, 3가지 농도 모두에서 L-아스코르브산(L-asc)에 비해 DPPH 억제이 낮았다. 24시간이 지난 후 유사한 추세가 관찰되었지만 SLS와 TLS의 차이는 감소했다. 또한 SLS는 DPPH 억제 용량의 변동성을 보였으며, 이는 에탄올과 물의 혼합물이 고농도에서 최대 30분 동안 불완전 용해되었기 때문일 수 있다. 그러나 24시간 배양 후 변동성이 없어져 SLS가 완전히 용해되고 급진적 스캐빈징 그룹을 더 많이 사용할 수 있음을 알 수 있다. TAC의 경우 TLS는 1, 2mg/mL에서 SLS보다 높은 TAC(Cu^{2+} 를 Cu^{+} 로 감소)를 보였다. 2 mg/mL와 5 mg/mL에서 TLS는 L-asc와 비교했을 때 동등한 TAC를 보였다. 이러한 결과는 TLS가 리그노설폰네이트 및 리그노설폰네이트의 티올레이트 사슬의 폐놀기를 갖는 이중 급진적 스캐빈징 모드를 가지고 있음을 뒷받침한다.

[0116] DPPH 항산화 실험의 경우 0.2 mM DPPH 용액을 에탄올과 물의 부피 혼합 1:1 비로 제조한 후 SLS와 TLS를 빛이 없이 실온에서 30분, 24시간 배양하였다. 혼합용액의 흡광도를 517 nm에서 측정하였다. TAC 항산화 실험의 경우 Oxiselect™ TAC 검사키트를 사용하였다. 모든 시료는 반응완충액과 구리 이온 용액을 사용하여 실온에서 5분간 반응하였고, 요산 표준 곡선을 이용하여 490nm 파장의 흡광도를 측정하였다.

[0118] <실험예 4>

[0119] 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 기계적 특성 확인

[0120] 본 발명에 따른 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 기계적 특성을 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0121] TLS 및 fGelMA 통합에 따른 기계적 성질의 변화를 추가로 설명하기 위해 다양한 조건에서 G' (저장계수, 탄성)와 G'' (손실계수, 점도)를 측정하였고 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에 따르면, 모든 G' 가 약 0.3 kPa에서 0.5 kPa로 중복되었다. 또한 G' 와 G'' 는 압축 함수로서 0~0.2(또는 20%)의 서로 다른 압축에서 유의한 차이를 보이지 않았다. 이러한 데이터를 축응력 대 압축으로 입력했을 때 기울기에서 탄성계수가 산출되었다. fGelMA가 없는 경우 TLS의 통합은 탄성을 5.5kPa에서 7.3kPa로 증가시킨 반면 TLS가 없는 경우 fGelMA의 통합은 탄성을 5.5kPa에서 2.6kPa로 감소시켰다. 40 mg/mL PEG에 5 mg/mL TLS와 40 mg/mL fGelMA를 첨가하자 합성물의 강성이 4.2 kPa로 증가하였다. 이러한 추정은 높은 R2 값으로 입증되었듯이 예측 가능하며, 통합된 TLS 및 fGelMA의 수량을 변조하여 PEG 합성물의 강성 변화가 가능하다. 모든 PEG 합성물의 손실 접선은 0.06에서 3.43°에 해당하는 매우 좁은 범위에서 변화하였으며 2% 변형률에서 0.628 ~ 19.9 rad/s의 각 주파수에 노출되었을 때 공통적으로 교차 연결된 고탄력 하이드로겔을 나타낸다. PEG는 손실 접선이 가장 높은 반면, TLS의 통합은 우리가 테스트한 주파수 범위 전체에 걸쳐 손실 접선이 가장 낮고 최소한의 변화를 나타냈다. fGelMA 또는 fGelMA-TLS를 통합한 결과 유사한 손실 접선과 PEG와 TLS 간 수준을 보였다.

[0123] 티올화된 리그닌설폰산염 복합체는 폴리에틸렌글리콜(40 mg/ml)과 티올화된 리그닌설폰산염(5 mg/ml), LAP(5 mg/ml)이 녹아 있는 스톡솔루션, 어류계 젤라틴 (200 mg/mL)와 LAP(5 mg/ml)가 녹아 있는 스톡솔루션을 준비하여 부피비 80:20 비율로 섞은 용액을 유리 기판에 캐스팅하여 365 nm 자외선을 조사, 광가교결합을 실시하였다.

[0125] <실험예 5>

[0126] 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 세포 적용 특성의 확인

[0127] 본 발명에 따른 티올화된 리그닌설폰산염 복합체의 세포 적용 특성을 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0128] fGelMA는 PEG-TLS 전구 용액에 첨가되고 UV 교차 연결 전에 주조되어 hdFB(인간 피부 섬유아세포)의 세포 부착을 시너지적으로 강화했다. PEG와 fGelMA는 각각 50mg/mL, 200mg/mL로 스톡솔루션(stock solution)을 준비했고, 부피비율도 달랐다. 추가된 양은 fGelMA의 최소량을 도입하여 TLS에 의한 항산화 작용을 방해하지 않도록 하고 PEG에 의한 생물물리학적 특성을 유지하도록 하였다. 예상대로, PEG 전용 복합 재료는 최소한의 셀 부착력을 보였다. fGelMA를 더 증가시키면 합성물의 표면에 걸쳐 hdFB 단층을 보이는 80:20 혼합물로 셀 부착이 향상되었다. 비록 50:50이 셀 부착에 더 많은 결합 부위를 제공했지만, hdFB의 분포는 80:20 혼합물에 비해 덜

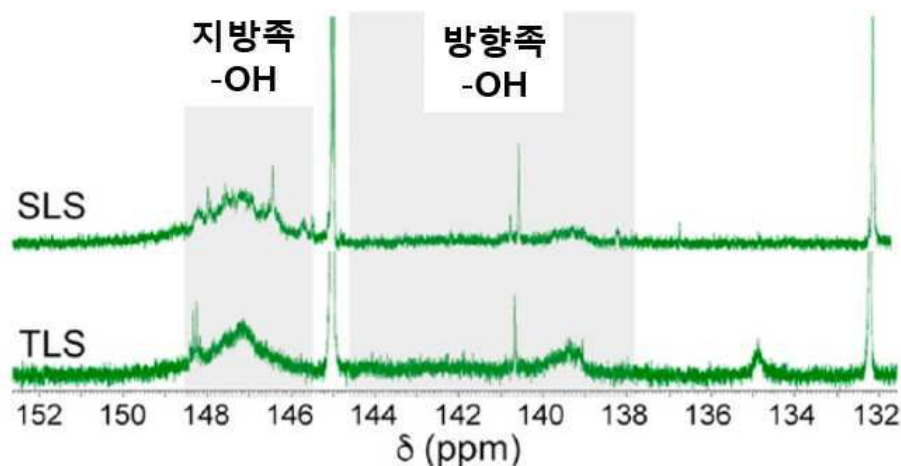
균일했다(도 5의 a~d 참조).

[0130] 이 연구는 조직 수리를 위해 설계된 스캐폴드에서 TLS의 항산화 능력을 테스트하는 것이다. 따라서 24시간 후 PEG-fGelMA-TLS 복합물에 의한 섬유유전자 발현(COL1A1, ACTA2, TGFB1, HIF1A)의 변화를 시험하였으며, 모든 섬유유전자 표지는 HSF1의 발현량이 유의미하게 높았다(도 5의 (b)). PEG-fGelMA-TLS 비계 위에서 hdFB 배양이 유지되었을 때, 두 개의 서로 다른 hdFB 세포 라인의 차이는 크게 감소하였다(도 5의 e 참조). 도 5의 e에서 LS(또는 LSFB)는 상처가 적은 hdFB를 의미하고, HS(또는 HSF1)는 상처가 많은 hdFB를 의미하고, LS TLS은 본 발명에 따른 PEG-fGelMA-TLS 복합물 상에 배양된 상처가 적은 hdFB를 의미하고, HS TLS는 본 발명에 따른 PEG-fGelMA-TLS 복합물 상에 배양된 상처가 많은 hdFB를 의미한다.

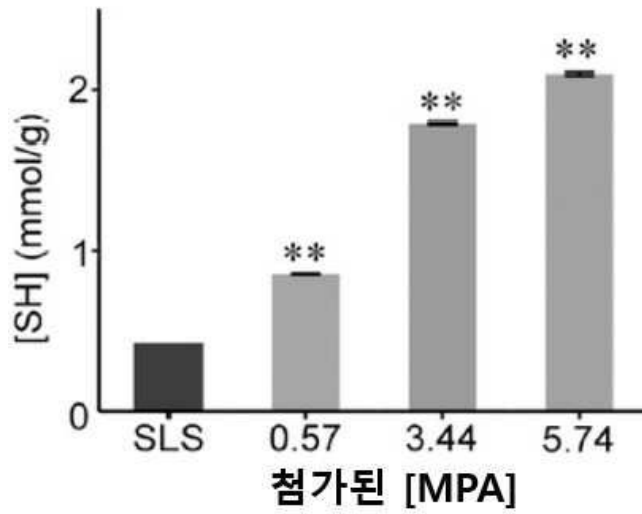
[0132] 피부 조직은 헬싱키 선언에 따라 텍사스 베일러 의과대학(Approval # H-38187)에서 승인한 프로토콜의 일부로서 동의된 복부성형환자로부터 수집되었다. LSFB와 HSF1은 50,000 셀/cm²의 PEG-fGelMA-TLS 복합체에 시드되었다. 세포 배양 상등액은 배양 개시 후 24시간 이내에 모든 웰과 제어용 웰에서 채취하여 프로테아제 억제제 콕테일(sigma)와 함께 -80 °C에 저장하였다. RNA는 PureLink RNA MicroPrep 키트를 이용하여 제안된 절차에 따라 추출되었다.

도면

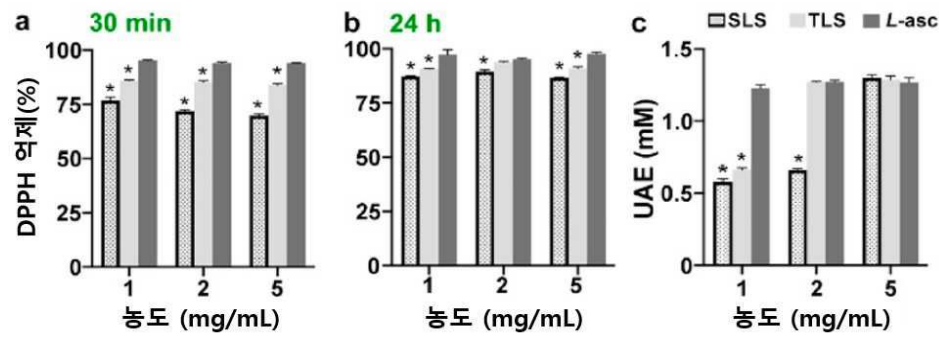
도면1



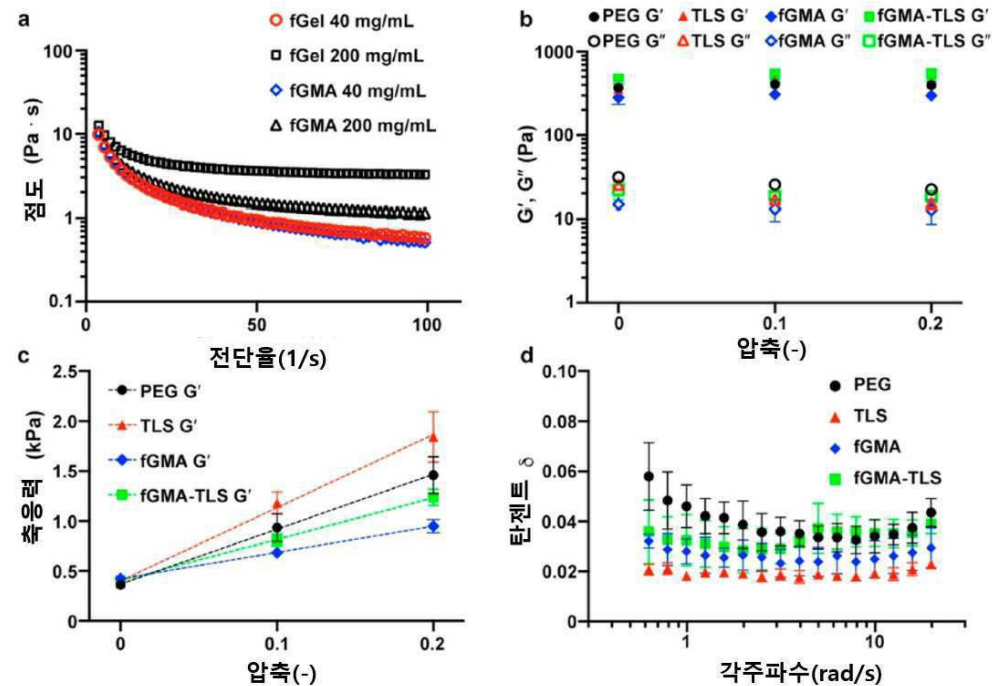
도면2



도면3



도면4



도면5

