



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0164091
(43) 공개일자 2024년11월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 26/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 26/0038 (2013.01)

A61L 26/0023 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0061481

(22) 출원일자 2023년05월12일

심사청구일자 2023년12월22일

(71) 출원인

국립부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)

(72) 발명자

정원교

부산광역시 남구 분포로 111, 141동 2004호

박동주

부산광역시 동래구 중앙대로1277번길 30, 3층

(74) 대리인

위병갑

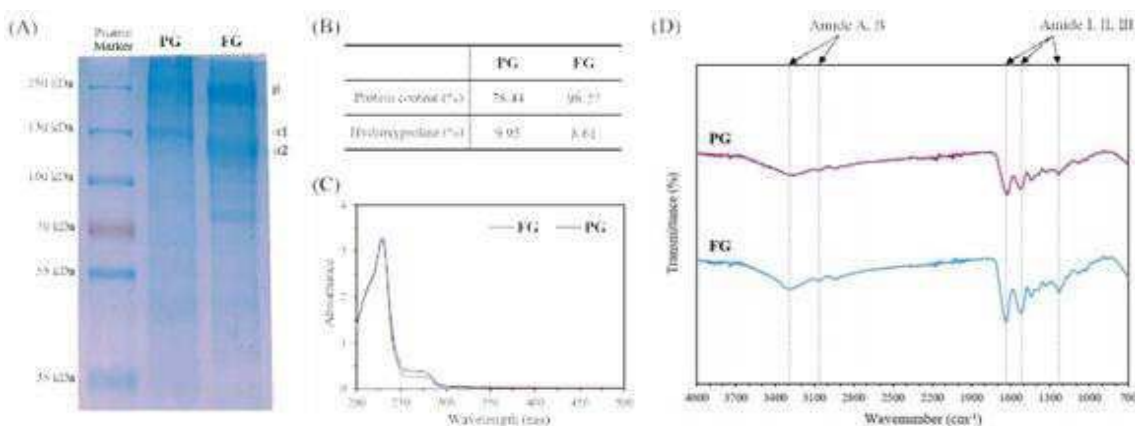
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 어류 유래 젤라틴 및 산화 히알루론산을 포함하는 창상피복제용 하이드로겔 조성물

(57) 요약

본 발명은 어류 유래 젤라틴 및 산화 히알루론산을 포함하는 창상피복제용 하이드로겔 조성물에 대한 것으로서, 어류 유래 젤라틴 및 산화 히알루론산의 물리화학적 특성을 확인하고, 어류 유래 젤라틴 및 산화 히알루론산을 포함하는 하이드로겔의 물리적화학적 특성, 항산화 활성, 항염증 활성 및 상처 치유 효과를 확인하여, 본 발명의 하이드로겔을 포함하는 창상피복제를 제조할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61L 26/0052 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345364101
과제번호	2021R1A6A1A03039211
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	해양바이오닉스융합기술센터
기 여 율	1/2
과제수행기관명	부경대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525014112
과제번호	202201285
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	해양수산부산물바이오소재화기술개발
연구과제명	해양수산부산물 바이오 소재화 기술개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	부경대학교 산학협력단
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

청구범위유예 : 있음

임시명세서출원 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

어류 유래 젤라틴 및 산화 히알루론산을 포함하는 창상피복제용 하이드로겔 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 어류는 넙치(*Paralichthys olivaceus*)인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 하이드로겔은 어류 유래 젤라틴 및 산화 히알루론산을 7 내지 9:1 내지 3의 혼합비(v/v)로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 어류 유래 젤라틴은 10%(w/v)의 농도를 갖고, 상기 산화 히알루론산은 20%(w/v)의 농도 갖는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 하이드로겔은 상기 어류 유래 젤라틴의 아미노 그룹 및 상기 산화 히알루론산의 알데히드 그룹이 시프 염기(schiff base) 반응을 통해 공유결합하여 형성된 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 하이드로겔은 다공성 구조를 가지는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 하이드로겔은 1000 내지 1500%의 팽윤도 갖는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 하이드로겔은 70 내지 90%의 겔분율을 갖는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 하이드로겔은 활성산소 제거 활성 갖는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 활성산소 제거 활성은 ABTS 라디칼 소거 활성 또는 하이드록실 라디칼 소거 활성을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 하이드로겔은 항염증 활성 갖는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 항염증 활성은 대조군 대비 NO, PGE₂ 또는 IL-1 β 분비량을 감소시키는 것인, 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 창상피복제는 만성 창상에 사용되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 만성 창상은 당뇨병 유발 창상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 15

- 1) 어류에서 젤라틴을 추출하여, 어류 유래 젤라틴을 수득하는 단계;
- 2) 히알루론산을 산화제로 산화시켜, 산화 히알루론산을 수득하는 단계; 및
- 3) 상기 어류 유래 젤라틴 및 산화 히알루론산을 혼합하여 반응시키는 단계;를 포함하는 창상피복제용 하이드로겔 조성물 제조방법.

청구항 16

제15항의 제조방법으로 제조된 창상피복제 하이드로겔.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 어류 유래 젤라틴 및 산화 히알루론산을 포함하는 창상피복제용 하이드로겔 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인구 고령화와 당뇨병, 비만 및 혈관 기능 부전과 같은 기타 만성 질환의 유병률이 증가함에 따라 치유되지 않는 피부 만성 창상(cutaneous chronic wound)는 심각한 건강 문제를 나타낸다. 일반적으로 상처 치유과정은 지혈, 염증, 증식 및 성숙의 4가지 복잡한 중첩 단계를 통해 순차적으로 발생한다. 가장 흔한 만성창상(chronic wound) 중 하나인 diabetic wound는 이러한 피부의 정상적인 치유를 지연시키며, 지속적인 염증으로 인해 과도한 조직 파괴를 유발한다. 또한, 손상된 혈관계는 상처로의 산소 전달을 방해하고 과도한 활성산소(Reactive oxygen species, ROS)를 생성하여 산화 스트레스를 유발하고 염증 반응을 더욱 악화시킨다. 이것은 외부환경으로의 장기간 노출로 인한 감염 위험을 증가시키며 비외상성 신체 절단을 초래할 수 있으므로 이를 신속하게 치료하는 것이 중요하다.

[0003] 이러한 문제를 해결하기 위해 다양한 형태의 wound dressing이 제안되고 있다. Wound dressing은 피부 손상을 치유하기 위하여 상처 부위 보호뿐 아니라 세포 이동, 증식, 분화 등을 유도해 조직을 재건하는 역할을 하는 의약품 제제이다. 상처치유가 습윤 환경 하에서 탁월한 효능을 보인다는 것이 보고된 이래로, 종래의 건조환

경의 거즈(gauze) 방법에서 현재는 폼형이나 필름형, 하이드로젤형 등 습윤 드레싱 방법으로 빠르게 전환되고 있다. 그 중 하이드로젤은 고분자 사슬 간의 cross-linking을 통한 3차원 다공성의 고분자 복합체로서 다량의 수분을 보유하여 extracellular matrix(ECM)과 유사한 특성을 지닌다. 또한, 외부로부터의 감염 예방, 삼출물의 흡수, 흉터 형성 억제 및 산소 투과성, 신축성, 점착성이 뛰어나 현재 농업이나 산업 분야 또는 의약품 및 화장품 등에 주로 사용되고 있다.

[0004] 젤라틴(Gelatin)은 척추동물의 피부, 연골, 뼈, 혈관 등에 다량 존재하는 섬유상 단백질인 콜라겐(collagen)을 가열 추출하여 얻어지며, 뛰어난 생체적합성, 생분해성, 가공의 용이성으로 인해 식품, 화장품 및 의약품 원료로 광범위하게 사용되는 천연 고분자이다. 현재 육상동물 유래의 젤라틴이 해당 시장 점유율의 90% 이상을 차지하며, 해양 유래 젤라틴은 이에 비해 대체로 적은 실정이다. 특히, 우리나라에서 수산물 가공 시 발생하는 연평균 약 131만 톤의 부산물이 일부 퇴비 또는 비료 등의 저차 가공형태로 이용되거나 대부분 폐기되어 환경오염을 야기시키므로, 보다 효율적인 부산물의 활용에 관한 연구가 절실히 필요한 실정이다. 부산물로부터 의료용 젤라틴을 분리하여 활용할 수 있다면 소와 돼지 같은 육상동물 유래의 젤라틴에서 광우병 또는 구제역 등의 인수공통 감염성 질병에 위협받지 않는 안전한 대체 자원이 될 수 있다. 또한, 종교적 제약으로 인한 사용상의 제한을 벗어남과 동시에 고기능성 물질을 추출하는 점에서 의미가 있다. 그중 넙치는 국내 소비가 많은 주요 양식어종으로 상대적으로 부산물의 공급이 용이하다. 따라서 이들의 가공공정 중 제거된 어피를 대량으로 공급받을 수 있다는 장점이 있어, 효율적이고 경제적인 젤라틴 추출이 가능하다.

[0005] 하지만 젤라틴은 온도에 의한 가역적 젤라틴을 나타내므로, 낮은 기계적 안정성과 빠른 생분해성을 가지는 단점이 있다. 이러한 점을 보완하기 위해 히알루론산(hyaluronate, Hy) 유도체를 사용한 cross-linking을 도입하여 하이드로젤의 기계적 특성을 개선하였다. 기존의 glutaraldehyde, carbodiimide, adipic dihydrazide와 같은 대부분의 화학적 가교제(cross-linker)는 세포 독성을 나타내기 때문에, 최근에는 천연다당류 기반 가교제를 사용하는 연구가 증가하고 있다. 히알루론산은 N-acetyl-D-glucosamine과 D-glucuronic acid의 반복 단위로 이루어진 천연다당류로, hydroxyl group 또는 carboxyl group의 존재로 인해 다른 작용기의 도입이나 분자와의 결합이 용이하다. 또한, ECM을 형성하는 glycosaminoglycan의 구성성분으로써 우수한 생체적합성, 생분해성, 팽윤성, 상처치유 등을 나타내기 때문에 의약품 원료로 주목받고 있다.

[0006] 이에 본 발명자는 어류 유래 젤라틴 및 산화 히알루론산의 물리화학적 특성을 분석하고, 두 고분자를 혼합하여 기계적 물성 평가를 통해 하이드로젤의 최적의 비율을 선별하였으며, 그 후 제작된 하이드로젤의 *in vitro* 세포 실험 및 *in vivo* 동물실험을 통해 만성 창상 피복제로써의 응용 가능성을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2010-0126297호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 어류 유래 젤라틴 및 산화 히알루론산을 포함하는 창상피복제용 하이드로젤 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 1) 어류에서 젤라틴을 추출하여, 어류 유래 젤라틴을 수득하는 단계; 2) 히알루론산을 산화제로 산화시켜, 산화 히알루론산을 수득하는 단계; 및 3) 상기 어류 유래 젤라틴 및 산화 히알루론산을 혼합하여 반응시키는 단계;를 포함하는 창상피복제용 하이드로젤 조성물 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 창상피복제 하이드로젤을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 어류 유래 젤라틴 및 산화 히알루론산을 포함하는 창상피복제용 하이드로젤 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 1) 어류에서 젤라틴을 추출하여, 어류 유래 젤라틴을 수득하는 단계; 2) 히알루론산을 산화제

로 산화시켜, 산화 히알루론산을 수득하는 단계; 및 3) 상기 어류 유래 젤라틴 및 산화 히알루론산을 혼합하여 반응시키는 단계;를 포함하는 창상피복제용 하이드로겔 조성물 제조방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 창상피복제 하이드로겔을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명은 어류 유래 젤라틴 및 산화 히알루론산을 포함하는 창상피복제용 하이드로겔 조성물에 대한 것으로서, 어류 유래 젤라틴 및 산화 히알루론산의 물리화학적 특성을 확인하고, 어류 유래 젤라틴 및 산화 히알루론산을 포함하는 하이드로겔의 물리적화학적 특성, 항산화 활성, 항염증 활성 및 상처 치유 효과를 확인하여, 본 발명의 하이드로겔을 포함하는 창상피복제를 제조할 수 있고, 이와 관련된 사업에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 어류 유래 젤라틴의 특성 분석결과를 나타낸 도이다.

A: 어류 유래 젤라틴 및 돼지 유래 젤라틴의 SDS-PAGE 분석 결과

B: 어류 유래 젤라틴 및 돼지 유래 젤라틴의 하이드록시프롤린 함량

C: 어류 유래 젤라틴 및 돼지 유래 젤라틴의 자외선-가시광선 분광분석 결과(Ultraviolet-visible spectroscopy)

D: 어류 유래 젤라틴 및 돼지 유래 젤라틴의 FTIR 스펙트럼 분석결과

도 2는 산화 히알루론산의 특성 분석결과를 나타낸 도이다.

A: 산화 히알루론산 합성 과정

B: 산화 히알루론산의 FTIR 스펙트럼 분석결과

C: 산화 히알루론산의 $^1\text{H-NMR}$ 분석결과

도 3은 제조된 하이드로겔의 특성 분석결과를 나타낸 도이다.

A: 10% 농도(w/v)의 어류 유래 젤라틴 및 20% 농도(w/v)의 산화 히알루론산의 비율을 달리하여 제조한 하이드로겔의 Vial-tip 테스트 결과

B: 제조된 하이드로겔들의 viscoelasticity-angular frequency 분석결과

C: 제조된 하이드로겔들의 FTIR 스펙트럼 분석결과

도 4는 제조된 하이드로겔의 특성 분석결과를 나타낸 도이다.

A: 제조된 하이드로겔들의 SEM 이미지 촬영결과

B: 제조된 하이드로겔들의 팽윤도

C: 제조된 하이드로겔들의 겔분율

D: 제조된 하이드로겔들의 ABTS 라디칼 소거 분석결과

E: 제조된 하이드로겔들의 하이드록실 라디칼 소거 분석결과

도 5는 제조된 하이드로겔의 생체적합성 분석 결과를 나타낸 도이다.

A: 하이드로겔 적용시 HDF 세포 생존율

B: 하이드로겔 적용시 HaCaT 세포 생존율

C: 하이드로겔을 적용한 HDF의 형광염색 이미지

D: 하이드로겔을 적용한 HaCaT의 형광염색 이미지

도 6은 제조된 하이드로겔의 활성산소 제거 활성 및 항염증 활성 분석 결과를 나타낸 도이다.

A: 하이드로겔 적용시 Raw264.7의 LPS 자극에 따른 ROS 수준의 형광염색 이미지

B: 하이드로겔 적용시 Raw264.7의 LPS 자극에 따른 세포 생존율

C: 하이드로겔 적용시 Raw264.7의 LPS 자극에 따른 NO 분비량

D: 하이드로겔 적용시 Raw264.7의 LPS 자극에 따른 PGE₂ 분비량

E: 하이드로겔 적용시 Raw264.7의 LPS 자극에 따른 IL-1 β 분비량

도 7은 당뇨 유발 마우스에 대한 하이드로겔의 창상 치유 효과 분석결과를 나타낸 도이다.

A: 당뇨병 전증 피부 창상 마우스 모델의 구축 및 분석 과정

B: 하이드로겔 적용/미적용한 후 시간 경과하였을 때 상처의 이미지

C: 하이드로겔 적용 후 상처 면적의 변화

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 명세서에서 사용되는 용어(Terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0017] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.
- [0019] 본 발명은 어류 유래 젤라틴 및 산화 히알루론산을 포함하는 창상피복제용 하이드로겔 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 어류는 넙치(*Paralichthys olivaceus*)인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 하이드로겔은 어류 유래 젤라틴 및 히알루론산을 7 내지 9:1 내지 3의 혼합비(v/v)로 포함하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 어류 유래 젤라틴 및 히알루론산을 8:2의 혼합비(v/v)로 포함하는 것일 수 있으며, 이에 제한되지는 않는다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 어류 유래 젤라틴은 10%(w/v)의 농도를 갖고, 상기 산화 히알루론산은 20%(w/v)의 농도 갖는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으며, 이에 제한되지는 않는다.
- [0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 하이드로겔은 상기 어류 유래 젤라틴의 아미노 그룹 및 상기 산화 히알루론산의 알데히드 그룹이 시프 염기(schiff base) 반응을 통해 공유결합하여 형성된 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 하이드로겔은 다공성 구조를 가지는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 하이드로겔은 1000 내지 1500%의 팽윤도 갖는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 1000 내지 1250%의 팽윤도 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0026] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 하이드로겔은 70 내지 90%의 겔분율을 갖는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0027] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 하이드로겔은 활성산소 제거 활성 갖는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0028] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 활성산소 제거 활성은 ABTS 라디칼 소거 활성 또는 하이드록실 라디칼 소거 활성을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0029] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 하이드로겔은 항염증 활성 갖는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

- [0030] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항염증 활성은 대조군 대비 NO, PGE₂ 또는 IL-1 β 분비량을 감소시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0031] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 창상피복제는 만성 창상에 사용되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0032] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 만성 창상은 당뇨병 유발 창상인 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0034] 또한, 본 발명은 1) 어류에서 젤라틴을 추출하여, 어류 유래 젤라틴을 수득하는 단계; 2) 히알루론산을 산화제로 산화시켜, 산화 히알루론산을 수득하는 단계; 및 3) 상기 어류 유래 젤라틴 및 산화 히알루론산을 혼합하여 반응시키는 단계;를 포함하는 창상피복제용 하이드로겔 조성물 제조방법을 제공한다.

[0036] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 창상피복제 하이드로겔을 제공한다.

[0038] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 보다 자세히 설명한다. 다만, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0040] <실시예 1>

[0041] 1-1. 시약 및 분석재료

[0042] 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 피부는 은하수산(부산, 한국)에서 수득하였다. 히알루론산나트륨(Sodium hyaluronate, Hy)는 대정화금(시흥, 한국)에서 구입하였다.

[0043] Dulbecco's minimum Eagle's medium(DMEM), 우태혈청(fetal bovine serum, FBS), 트립신(250 U/mg), 페니실린/스트렙토마이신 및 기타 세포 배양 실험에 사용된 시약은 GIBCO™(게이더스버그, MD, 미국)에서 구입하였다. Gelatin from porcine type A, 과아이오딘산나트륨(sodium metaperiodate), 에틸렌 글라이콜, 붕사(sodium tetraborate decahydrate, borax)은 시그마 알드리치(미주리, 미국)에서 구입하였다. 기타 모든 시약은 analysis grade의 제품을 사용하였다.

[0045] 1-2. 어류 유래 젤라틴(Fish gelatin, FG)의 추출

[0046] 동결된 어피를 해동하여 비늘과 육질을 제거한 후, 작은 조각(1.0 × 1.0 cm²)으로 자르고 24시간 동안 수세(rinsing)하였다. 수세한 어피를 0.1 M NaOH에 4° C에서 12시간 동안 1:20 (w/v)의 비율로 교반하여 비콜라겐성 단백질 및 색소를 제거하였다. 4시간을 주기로 NaOH 용액을 교체하였으며, 이후 증류수로 수세한 뒤 중화하였다. 중화한 어피를 1:20 (w/v)의 비율의 0.05 M 아세트산으로 4° C에서 20분 동안 천천히 교반하여 콜라겐성 단백질을 팽윤시켰다. 그 후, 어피를 수세 및 중화하여 1:40 (w/v)의 비율로 45° C에서 5시간 동안 열수 추출하였다. 가용화된 젤라틴을 원심분리기를 이용하여 15,000×g에서 30분간 원심분리한 후, Whatman No. 6 paper로 여과하여 잔여물을 분리하였다. 여과액을 회전증발기를 통해 농축하여 약 85~90%의 수분을 제거한 후, 증류수로 3일간 투석하고 5일간 동결건조하여 어류 유래 젤라틴(FG)을 수득하였다.

[0048] 1-3. 히알루론산(Hyaluronate, Hy)의 산화

[0049] 1 g의 히알루론산(Hyaluronate, Hy)을 100 ml의 증류수에 용해시킨 후, 0.5 mol/L 농도의 과아이오딘산나트륨(sodium metaperiodate, NaIO₄) 수용액 5 ml를 첨가하고 혼합물을 실온의 암실에서 12시간 동안 반응시켰다. 그

후, 산화 반응 증진을 위해, 에틸렌 글라이콜 1 ml를 첨가하고 1시간 동안 교반하였다. 상기 교반한 용액을 증류수로 3일간 투석하였다. 투석 후 5일간 동결건조하여 산화 히알루론산(oxidized hyaluronate, OHy)를 수득하였다.

[0051] 1-4. 하이드로겔의 제조

[0052] 10%(w/v)의 어류 유래 젤라틴을 증류수에 용해시키고, 20%(w/v)의 산화 히알루론산을 0.1 M Borax 수용액에 용해시켰다. 그 후, 8:2, 6:4, 4:6 및 2:8 (v/v)의 비율로 어류 유래 젤라틴 용액과 OHy 용액을 혼합한 후 37℃에서 24시간 동안 cross-linking 시켰다. 상기 과정을 통해 제조된 하이드로겔을 FOH로 명명하였고, 사용 전까지 4℃에서 보관하였다.

[0054] 1-5. 어류 유래 젤라틴과 산화 히알루론산의 특성 분석

[0055] 어류 유래 젤라틴과 시판되는 돼지 유래 젤라틴(porcine gelatin, PG)의 특성을 비교하기 위해, 상기 젤라틴들에 대하여 UV-vis 스펙트럼 분석, SDS-PAGE 분석, 하이드록시프롤린 함량 분석, fourier transform infrared spectroscopy(FTIR) 분석을 수행하였다.

[0056] UV-vis 스펙트럼은 1 mg/ml의 젤라틴을 증류수에 용해시키고, 1 nm 간격으로 초당 2 nm의 스캔 속도에서 200-500 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 모든 스펙트럼은 microplate reader (BioTek, USA)를 사용하였다.

[0057] SDS-PAGE는 5% stacking gel 및 7.5% separating gel을 사용하였으며, MiniProtein II unit (Bio-Rad Laboratories, Inc. Richmond, CA, USA)를 통해 수행하였다. 젤라틴을 sample buffer에 넣고 100℃에서 5분간 가열시킨 후, sample 용액 10 µl를 단백질 마커와 함께 폴리아마이드 겔에 주입하고, 1시간 동안 100 V의 정전압에서 전기영동을 하였다. 그 후, 0.1% (w/v) 쿠마시브릴리언트블루(coomassie brilliant blue) R-250를 이용하여 염색을 수행하였다.

[0058] 하이드록시프롤린 함량 분석은 hydroxyproline assay kit (Biovision Inc. Milpitas, CA, 미국)를 사용하여 수행하였다. 젤라틴은 12 N HCl에 넣고 100℃에서 3시간 동안 산 가수분해시킨 후 사용하였다.

[0059] 또한, JEOL JNM ECP-600 FT-NMR spectrometer를 사용하여 600 MHz의 정적 자기장에서 proton nuclear magnetic resonance (^1H -NMR) spectroscopy를 실시하였다.

[0061] 1-6. FTIR 분석

[0062] 어류 유래 젤라틴, 산화 히알루론산, FOH 하이드로겔의 화학적 변화를 확인하기 위해 FTIR(Perkin Elmer, Waltham, MA, 미국)를 이용하여 700-4000 cm^{-1} 파장에서 FTIR 분석을 수행하였다.

[0064] 1-7. 하이드로겔의 물리화학적 분석

[0065] 1) 유변학적 특성 분석

[0066] FOH 하이드로겔의 유변학적 특성을 확인하기 위해, Discovery HR-2 Hybrid Rheometer(TA instruments, New Castle, DE, 미국)를 사용하여 각각 storage modulus(G')와 loss modulus(G'')를 측정하였다. Strain을 0.5%로 고정하고, 8 mm의 parallel plate geometry를 사용하여 0.1-100 rad/s에서 oscillation frequency 모드를 이용하여 측정하였다.

[0068] 2) 팽윤능 분석

[0069] FOH 하이드로겔의 팽윤도를 확인하기 위해, 동결건조한 겔의 건조중량을 측정하였다. 상기 동결건조한 겔을 PBS에 넣고 37℃에서 24시간 동안 수화시킨 뒤 표면에 잔류하는 물을 제거하고 중량을 측정하였다. 측정된 건조 무게와 수화 무게를 하기 수식 1을 적용하여 팽윤도를 확인하였다. W_d 는 하이드로겔의 최초 건조중량을 나타내

며, W_t 는 시간 t 에서 팽윤된 하이드로겔의 중량을 나타낸다.

[수학식 1]

% 팽윤도(Swelling ratio) = $(W_t - W_d) / W_d \times 100$

3) 겔분율 분석

FOH 하이드로겔의 겔분율을 확인하기 위해 동결건조한 겔의 건조중량을 측정하였다. 상기 동결건조한 겔을 PBS에 넣고 37°C에서 72시간 동안 침지시킨 후에 꺼내어 다시 동결건조하여 건조중량을 측정하였다. 겔분율은 하기 수학식 2를 적용하여 확인하였다. W_s 는 하이드로겔을 PBS에 담그고 꺼내어 동결건조를 거친 중량을 나타낸다.

[수학식 2]

% 겔분율(Gel fraction) = $W_s / W_d \times 100$

4) 주사전자현미경 분석

FOH 하이드로겔의 내부에 형성된 미세다공체를 확인하기 위해 5 kV에서 scanning electron microscope(SEM, Tescan, Czech, VEGA II LSU)을 사용하였다. 하이드로겔은 동결건조 후 이온증착기로 백금 코팅하여 사용하였다.

1-8. 항산화능 평가

2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) 시약을 7 mM 농도로 제조한 후, potassium persulfate 시약을 2.45 mM 농도로 제조하여 상기 시약들을 1:1 비율로 혼합하였다. 그 후, 암실에서 16시간 동안 반응시켜 ABTS 라디칼 시약을 준비하였다. 제조된 시약을 microplate reader를 이용하여 734 nm에서 흡광도 값이 0.7 ± 0.02 가 될 수 있도록 희석하여 사용하였다. 각 하이드로겔에 ABTS 용액을 혼합하고, 암실에서 10분 동안 반응시킨 후 734 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

하이드록실 라디칼(Hydroxyl radical) 소거능 확인을 위해, $FeCl_2 \cdot 7H_2O$ (1 mM)와 methylene blue(MB, 10 μ g/ml)를 혼합하여 하이드로겔과 10분 반응시켰다. 그 후, 1시간 동안 H_2O_2 (1 mM)와 반응한 뒤 666 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

1-9. *In vitro* 세포 배양

HDF와 RAW264.7 세포는 American Type of Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)로부터 구입하였으며, 모든 세포는 10% FBS와 1% 페니실린/스트렙토마이신을 혼합한 DMEM를 이용해 37 ° C, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 하이드로겔은 각 면에서 1시간동안 UV 조사하여 멸균하였다. 용출물의 경우 하이드로겔을 0.2 g/ml의 DMEM에 24시간 동안 침지시켜 수득하였다.

1-10. 세포독성평가

FOH 하이드로겔의 세포독성을 평가하기 위해 HDF와 HaCaT 세포를 96-well plate에 1×10^4 cells/ml로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 하이드로겔 용출물을 24시간 동안 처리하였다. 그 후, 배양액을 제거하고 DMEM과 Cell Counting Kit-8 (CKK-8, Dojindo, Kumamoto, Japan)를 10:1 비율로 희석하여 2시간동안 반응시킨 뒤, 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 제조된 하이드로겔의 세포 적합성은 ISO 10993-5 표준(ISO, 2009)에 기반하여 확인하였다.

또한, 하이드로겔의 직접적인 세포 생존율을 확인하기 위해 Live/Dead 형광 염색을 실시하였다. HDF와 HaCaT 세포를 12-well plate에 1×10^4 cells/ml로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 하이드로겔(8 mm)을 세포 표면에 올

려 하이드로겔과 세포를 접촉시켰다. 접촉 후 24시간이 경과하였을때, PBS로 3회 세척한 뒤 fluorescein diacetate(FDA, 8 μ g/ml) 및 프로피듐 아이오다이드(propidium iodide, PI, 20 μ g/ml)를 이용하여, 암실에서 15분간 염색하였다. fluorescence microscope(Axio Observer A1, Zeiss, Jena, Germany)를 이용하여 형광 이미지를 확인하였다.

[0092] 1-11. 세포 내 ROS 소거능 평가

[0093] FOH 하이드로겔의 세포 내 ROS 소거능을 측정하기 위해 2', 7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 형광 염색을 실시하였다. 먼저 2×10^5 cells/ml의 RAW264.7 세포를 12-well plate에 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 하이드로겔 용출물과 lipopolysaccharide(LPS, 1 μ g/ml)를 24시간 처리하였다. 그 후, 세포를 PBS 로 3회 세척한 뒤, 암실에서 30분간 20 μ M DCFDA를 처리하고 fluorescence microscope를 통해 세포를 분석하였다.

[0095] 1-12. 항염증 효능

[0096] 항염증 효능을 확인하기 위해 세포에서 생성되는 다양한 염증 매개체를 측정하였다. 2×10^5 개의 RAW264.7 세포를 24-well plate에 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 하이드로겔 용출물과 LPS(1 μ g/ml)를 24시간 처리하였다. 이후, 상층액의 nitric oxide (NO) 함량을 Griess Reagent Kit(Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하여 측정하였다.

[0097] Prostaglandin E2 (PGE2) 및 interleukin 1 β (IL-1 β)의 분비는 PGE2 high sensitivity ELISA kit (Enzo Life Science, NY, USA)와 Mouse IL-1 beta/IL-1F2 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)을 사용하여 분석하였다.

[0099] 1-13. *In vivo* 창상 치유 효과 확인

[0100] FOH 하이드로겔의 당뇨병 창상 치유효능을 평가하기 위해 수컷 C57/BL6 mouse (8주령, 20~25 g)에서 피부 전층 창상 모델 분석을 수행하였다. 동물실험은 부경대학교 동물실험윤리위원회의 시행규정 및 승인(동물윤리 승인번호: PKNUIACUC-2022-38)에 의해 진행하였다. C57/BL6 mouse의 수술을 시행하기 전 일주일 동안 항온항습 사육실(12시간 명암 주기, 온도 20-24 $^{\circ}$ C, 습도 40-70%)에서 적응시킨 후 연속 5일 동안 스트렙토조신(streptozocin, STZ, 65 mg/kg)을 복강내 주사하여 당뇨병을 유도하였다. 스트렙토조신 투여 후 일주일이 경과하였을때, 혈당 측정기(Accu-Check; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA)로 측정하여 혈당 수치가 300 mg/dL 이상인 mouse를 당뇨병 모델로 선별하였다. 대조군으로는 상처를 방지하였고, 실험군은 시판되는 Epiderm과 하이드로겔을 멸균시켜 dressing으로 사용하였다. 동물실험은 isoflurane으로 호흡 마취된 C57/BL6 mouse의 등 중앙 부분에 biopsy punch를 사용한 5 mm의 피부 전층 창상을 유발하여 각각의 창상에 dressing을 부착하였으며, 0, 3, 7, 10, 14일마다 창상 부위의 회복 정도를 확인하였다. 창상은 최대 14일까지 측정되었고 원래 상처 크기의 상대적 백분율로 표시 되었다.

[0102] <실시예 2>

[0103] 2-1. 어류 유래 젤라틴 및 산화 히알루론산의 특성 분석

[0104] 상기 실시예 1-5의 분석 방법에 따라 어류 유래 젤라틴과 시판되는 돼지 유래 젤라틴의 특성을 분석하였다.

[0105] 도 1의 A에 SDS-PAGE 분석 수행 결과를 나타내었다. 도 1의 A를 살펴보면, 어류 유래 젤라틴과 시판되는 돼지 유래 젤라틴은 모두 분자량이 각각 약 120, 200 kDa인 α -chain 및 β -chain을 주요 구성성분으로 포함하고 있음을 확인할 수 있다. 상기 결과는 기존에 알려진 어피 유래 젤라틴에서 발견된 패턴과 유사한 것을 확인하였다(Food Hydrocolloids, 20(8), 1216-1222.). 또한, 어류 유래 젤라틴은 콜라겐에 비하여 상대적으로 밴드의 강도가 약해지고 분자량의 분포가 고르게 나타났는데, 상기 결과를 통해 열처리에 의한 collagen의 변성이 최소화되어 α -chain과 β -chain이 유지되었음을 확인하였다.

- [0106] 도 1의 B에 단백질 및 하이드록시프롤린 함량을 나타내었다. 어류 유래 젤라틴은 돼지 유래 젤라틴보다 높은 단백질 함량 (90%)을 갖고, 돼지 유래 젤라틴과 대비하였을 때 낮은 하이드록시프롤린을 갖는 것을 확인하였다.
- [0107] 젤라틴의 특이성에 기여하는 아미노산을 확인하기 위해 UV-vis spectroscopy를 사용하여 파장 200-500 nm 범위를 측정하였다. 도 1의 C에 분석결과를 나타내었다. 어류 유래 젤라틴 및 돼지 유래 젤라틴은 동일한 스펙트럼 양상을 나타내었고, 210-240 nm에서 흡수를 제공하는 발색단 그룹은 각각의 젤라틴에서 특징적인 펩타이드 결합 단편의 존재를 나타내며, 이를 통해 젤라틴의 독특한 구조를 확인하였다.
- [0108] 도 1의 D에 FTIR 스펙트럼 분석결과를 나타내었다. 어류 유래 젤라틴 및 돼지 유래 젤라틴의 FTIR 스펙트럼은 유사한 것으로 나타났다. 도 1의 D에 도시된 바와 같이, 각각 1640, 1540, 1235 cm^{-1} 에서 amide I, amide II, amide III에 해당하는 흡수 밴드를 나타내었다. 또한, 각각 3290, 3070 cm^{-1} 에서 amide A와 amide B에 해당하는 흡수 밴드가 나타났다.
- [0110] 또한, 상기 실시예 1-3의 과정에 따라 수득한 산화 히알루론산에 대해, FTIR 및 $^1\text{H-NMR}$ 분석을 수행하였다. 도 2의 A에 산화 히알루론산 합성의 화학적 과정을 나타내었으며, 도 2의 B에 FTIR 분석결과를 나타내었고, 도 2의 C에 $^1\text{H-NMR}$ 분석결과를 나타내었다.
- [0111] FTIR 분석결과를 살펴볼 때, 산화되지 않은 히알루론산에서는 알데히드 그룹이 나타나지 않았다. 그러나, 산화 히알루론산의 FTIR 스펙트럼은 약 1730 cm^{-1} 에서 흡수 밴드를 나타내었으며, 상기 결과는 과아이오딘산나트륨 산화 후 생성되는 C=O 결합의 신축 진동을 나타낸다.
- [0112] 또한, $^1\text{H-NMR}$ 분석결과를 살펴볼 때, 산화 히알루론산의 약 5.0 ppm에서 3개의 피크가 새롭게 생성되었으며, 상기 피크는 산화 히알루론산에 알데히드 그룹이 존재함을 나타낸다.
- [0113] 상기 결과들을 통해, 산화 히알루론산 내 알데히드 그룹의 합성과 어류 유래 젤라틴의 추출을 통해 하이드로겔을 형성을 위한 전구체를 성공적으로 확보하였음을 확인하였다.
- [0115] **2-2. 하이드로겔의 제조 및 특성 분석**
- [0116] 젤라틴 및 산화 히알루론산의 혼합 비율을 10:0, 8:2, 6:4, 4:6, 2:8, 0:10로 다르게 설정하고 37° C에서 24시간 동안 반응을 통해 FOH 하이드로겔을 형성 여부를 확인하였다. 겔 형성 여부를 도 3의 A에 나타내었다. 상기 6개의 혼합 비율 중 8:2, 6:4로 설정한 그룹만이 겔을 형성하였고, 나머지 4개의 그룹은 겔을 형성하지 않았다. 상기 형성된 두 그룹의 하이드로겔을 이후 분석에 사용하였으며, 각각 FOH I (FG:OHy=8:2), FOH II (FG:OHy=6:4), POH I (PG:OHy=8:2), POH II (PG:OHy=6:4)로 명명하였다.
- [0117] 상기 제조된 하이드로겔들의 FTIR 스펙트럼을 분석하였고, 결과를 도 3의 C에 나타내었다. 산화 히알루론산의 알데히드 그룹은 젤라틴의 아미노 그룹과 schiff base 반응하여 covalent bond를 형성하는바, 제조된 하이드로겔들의 FTIR 스펙트럼에서 알데히드 그룹이 나타나지 않은 결과를 통해, 화학적으로 가교 결합하여 겔이 형성하였음을 확인하였다.
- [0119] **2-3. 하이드로겔의 유변학적 특성 분석**
- [0120] 상처 드레싱 용도로 하이드로겔을 적용하기 위해서는 피부 조직과 유사한 점탄성을 갖는 것이 요구되므로, 상기 실시예 2-2에서 제조한 하이드로겔들의 점탄성을 확인하였다. 하이드로겔들의 viscoelasticity-angular frequency 분석결과를 도 3의 B에 나타내었다. FOH 및 POH에서 모두 storage modulus (G')가 loss modulus (G'')를 초과하는 것으로 나타났다. 상기 결과를 통해, 액체에서 고체로 하이드로겔 매트릭스 전환되었음을 확인하였다.
- [0121] 또한, G' 값의 경우, FOH와 POH는 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, 하이드로겔 제작 시 혼합비율에 따른 차이를 나타내었다. 상기 결과를 통해, 가교에 참여하지 않은 잔여 고분자가 없이 젤라틴의 다수의 아미노 그룹이 산화 히알루론산의 알데히드 그룹과 결합을 형성하여 schiff 's base 반응에 의한 cross-linking 정도가 높음을

확인하였으며, 상기 제조된 모든 하이드로겔들은 겔과 같은 상태로 구조적 안정성을 가지며, 8:2 비율의 하이드로겔(POH I, FOH I)이 6:4 비율의 하이드로겔(POH II, FOH II)보다 안정적인 구조를 갖고 있음을 확인하였다.

[0123] **2-4. 하이드로겔의 다공성, 팽윤성 및 겔분율**

[0124] 하이드로겔의 다공성 구조는 상처 조직의 삼출물을 흡수하는 데에 필수적인 요소이므로, 상기 하이드로겔들의 다공성 구조를 확인하였다. 하이드로겔들(POH I, FOH I, POH II 및 FOH II)의 SEM 이미지를 확인하였으며, 고배율(500X)에서의 SEM 이미지 촬영결과를 도 4의 A에 나타내었다.

[0125] SEM 이미지 촬영결과를 통해, 상기 하이드로겔들이 모두 수평 단면에서 조밀한 다공성 네트워크 구조를 가짐을 확인하였다. FOH와 POH간의 유의적인 차이를 나타나지 않았으며, 8:2 비율의 하이드로겔(POH I, FOH I)보다 6:4 비율의 하이드로겔(POH II, FOH II)에서 상대적으로 형태구조가 불안정하고 불규칙한 형상을 가지고 있음을 확인하였다.

[0127] 하이드로겔의 팽윤도는 접착력에 중요한 역할을 하고 조직삼출물을 흡수하여 습한 환경을 유지하여 상처 회복 촉진에 기여하므로 다량의 삼출물이 있는 만성 창상에 요구되는바, 상기 하이드로겔들의 팽윤도를 측정하였다.

[0128] 팽윤도 측정결과를 도 4의 B에 나타내었다. 하이드로겔은 1000% 이상의 높은 팽윤도를 보였으며, 하이드로겔 간에 유의적인 차이를 나타나지 않았다.

[0130] 또한, 제조된 하이드로겔들의 분자간 결합력 및 수용액에서의 안정성을 확인하기 위해, 겔분율을 산출하였다. 산출된 겔분율은 도 4의 C에 나타내었다.

[0131] 산출된 겔분율을 살펴보면, 6:4 비율의 하이드로겔(POH II, FOH II)이 8:2 비율의 하이드로겔(POH I, FOH I)에 비해 유의적으로 낮은 겔분율을 갖는 것으로 나타났다.

[0133] 상기 결과들을 통해, 습윤환경에서 8:2 비율의 하이드로겔(POH I, FOH I)이 6:4 비율의 하이드로겔(POH II, FOH II)보다 구조적 안정성이 높은 것을 확인하였다.

[0135] **2-5. 하이드로겔의 항산화 활성 확인**

[0136] 하이드로겔의 활성산소(Reactive oxygen species, ROS) 소거능을 하이드록실 라디칼 소거 분석 및 자유 ABTS 라디칼 소거 분석으로 확인하였다. 자유 ABTS 라디칼 소거 분석 결과 및 하이드록실 라디칼 소거 분석 결과를 각각 도 4의 D 및 도 4의 E에 나타내었다.

[0137] ABTS radical 소거 분석에서 파란색 용액이 투명하게 변색되는 경우 활성산소 소거능이 높은 것을 의미하는데, 하이드로겔을 첨가한 그룹에서 기존의 파란색 용액에 투명하게 변색되었다.

[0138] 상기 결과를 통해, 하이드로겔들(POH I, FOH I, POH II 및 FOH II)이 강한 항산화 활성 갖고 있음을 확인하였다.

[0140] 또한, 하이드록실 라디칼 소거 분석에서 MB 용액의 색상이 진한 파란색에서 옅은 파란색으로 빠르게 변색되는 경우 fenton 반응에 의해 MB가 분해됨을 나타내고 활성산소가 소거되지 않았음을 나타내는데, 상기 하이드로겔들(POH I, FOH I, POH II 및 FOH II)을 첨가한 그룹에서는 유의적인 용액의 색상변화가 나타나지 않았다.

[0141] 상기 결과를 통해, 상기 하이드로겔(POH I, FOH I, POH II 및 FOH II)들이 강력한 하이드록실 라디칼 소거 능력을 갖고 있고, 강한 항산화 활성 갖고 있음을 확인하였다.

[0143] **2-6. 하이드로겔의 생체적합성**

[0144] 피부 조직에 적용하기 위한 하이드로겔의 세포독성을 확인하였다. 8:2 비율의 하이드로겔(POH I, FOH I) 적용시 세포생존율을 확인하였으며, 결과를 도 5의 A 및 B에 나타내었다. 하이드로겔을 적용한 모든 그룹에서 90% 이상의 세포 생존율이 나타났다.

[0145] 또한, 8:2 비율의 하이드로겔(POH I, FOH I) 시료 접촉에 의한 HDF 및 HaCaT 세포 생존능을 형광염색을 통하여 확인하였으며, 결과를 도 5의 C 및 D에 나타내었다. 세포 분주 후 1일차에 하이드로겔 적용한 그룹과 대조군에서 녹색으로 염색된 생존 세포가 유의적으로 차이를 나타내지 않았다.

[0146] 상기 결과들을 통해, 하이드로겔이 세포독성이 없고 생체적합성이 높아 상처에 드레싱 용도로 적용할 수 있음을 확인하였다.

[0148] 2-7. 하이드로겔의 세포내 활성산소(ROS) 측정

[0149] DCFDA를 이용하여 염증 유발 물질인 LPS 자극에 대한 반응으로 RAW264.7 세포 내 ROS 수준을 측정하였다. 도 6의 A에 DCFDA를 이용하여 측정한 LPS 자극에 따른 ROS 수준의 형광 이미지를 나타내었다. LPS에서 24시간 동안 배양된 세포에서 강한 녹색 형광(DCF)이 나타났으며, 대조군에서는 매우 낮은 녹색 형광이 나타났고, 하이드로겔을 처리한 세포의 경우 낮은 녹색 형광이 나타나 대조군과 유사한 형광을 나타내었다. 세포막을 통해 확산된 DCFDA는 세포 내 esterase에 의해 탈아세틸화되고, 세포 내 ROS (H_2O_2 , $OH^\bullet$, $ROO^\bullet$, $NO^\bullet$, $ONOO^-$)에 의해 형광 화합물로 산화되어, 녹색 형광이 높게 나타날수록 활성산소량이 많은 것을 나타낸다. 따라서, 상기 결과를 통해, 하이드로겔(POH I, FOH I)이 세포내 ROS 생성을 효과적으로 억제할 수 있으며, 산화스트레스 손상에 대해 세포를 보호할 수 있음을 확인하였다.

[0151] 2-8. 하이드로겔의 항염증 활성 확인

[0152] RAW264.7 세포를 사용하여 8:2 비율의 하이드로겔(POH I, FOH I)의 항염증 활성을 확인하였다. 상기 하이드로겔 적용시 RAW264.7 세포의 세포 생존율을 도 6의 B에 나타내었다. 또한, 상기 하이드로겔 적용시 NO 분비량 변화를 도 6의 C에, PGE_2 분비량 변화를 도 6의 D에, IL-1 β 분비량 변화를 도 6의 E에 나타내었다.

[0153] 도 6의 B를 살펴보면, 상기 하이드로겔 적용시 대조군에 비해 세포생존율의 유의적인 변화가 없어 세포독성 없음을 확인하였다. 또한, 도 6의 C, D 및 E를 살펴보면, 하이드로겔 적용시 NO, PGE_2 및 IL-1 β 분비량이 LPS 처리군에 비해 유의적으로 감소하는 것으로 나타나, 상기 하이드로겔이 염증성 사이토카인의 분비량을 감소시키는 효과 있음을 확인하였다.

[0154] 상기 결과들을 통해, 하이드로겔이 항염증 활성 갖고 있어, 염증 조절에 도움이 될 수 있음을 확인하였다.

[0156] 2-9. 당뇨 유발 마우스 모델에서의 창상 치유효능

[0157] 당뇨 유발 마우스를 통해, 하이드로겔의 창상 치유 효과를 확인하였다. 마우스 모델에서의 창상 치유 효과 분석 과정을 도 7의 A에 간략하게 나타내었다. 당뇨 유발 쥐는 혈당 수치가 300 mg/dL 이상 지속되고, 과민성, 다식증 및 다뇨증을 나타내는 쥐를 당뇨 유발 쥐로서 사용하였으며, 피부 전층 상처 당뇨병 모델에서 하이드로겔의 치유효과를 확인하였다. 도 7의 B에 피부 전층에 상처가 난 쥐에 하이드로겔을 적용하고, 0, 3, 7, 10 및 14일이 경과하였을때의 상처 사진을 나타내었으며, 도 7의 C에 하이드로겔 적용 후 상처 면적의 변화를 나타내었다.

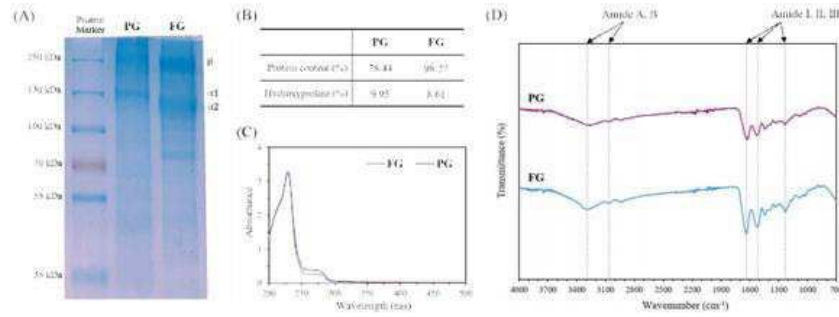
[0158] 하이드로겔을 적용하지 않은 당뇨 그룹에서는 육안상으로 시간이 경과하여도 상처와 딱지가 나타났고, 상처 면적도 유의적으로 감소하지 않아 상처 치유가 지연됨을 확인하였다. 그러나, 하이드로겔 처리군에서는 시판되는 epiderm과 유사하게 육안으로 상처가 완화된 것으로 나타났고, 상처의 면적도 epiderm과 유사하게 작아지는 것으로 나타났다. 상기 결과를 통해, 하이드로겔이 상처를 신속하게 회복시키는 효과가 있어, 상처 드레싱에 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0160] 상기 실시예들을 통해, 어류 유래 젤라틴 및 산화 히알루론산을 포함하는 하이드로겔이 창상피복제로 사용되기 적합한 물리화학적 특성을 지니고 있으며 상기 하이드로겔이 상처 치유 효과 갖고 있음을 확인하여, 본 발명의

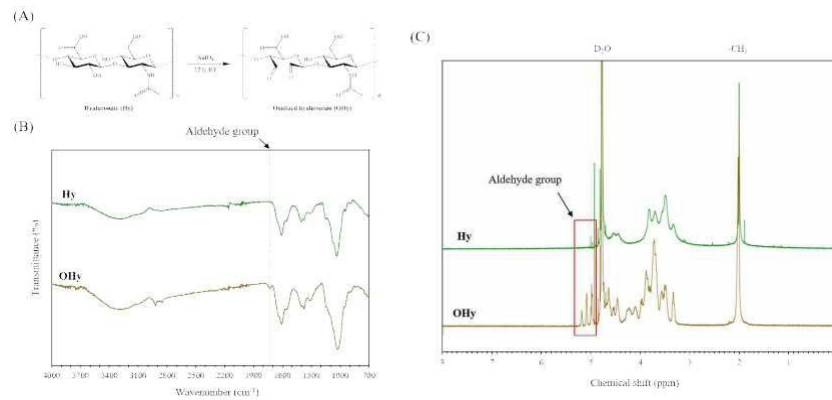
하이드로겔을 창상피복제로 사용할 수 있음을 확인하였다.

도면

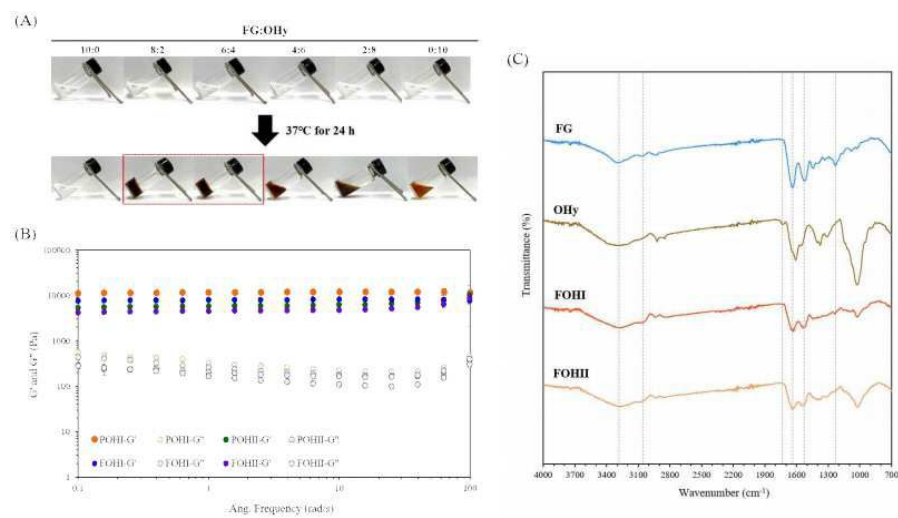
도면1



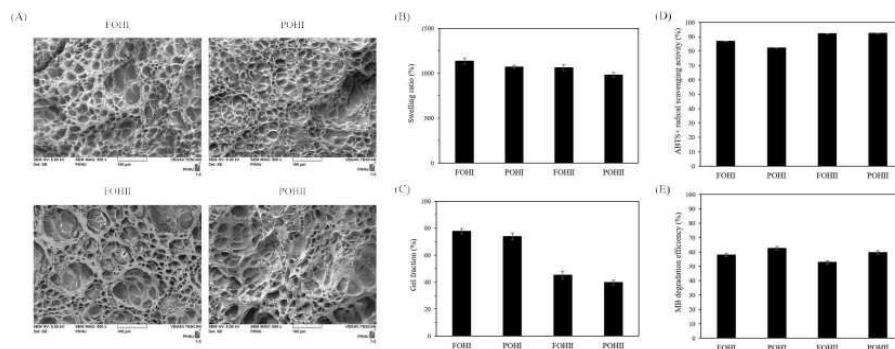
도면2



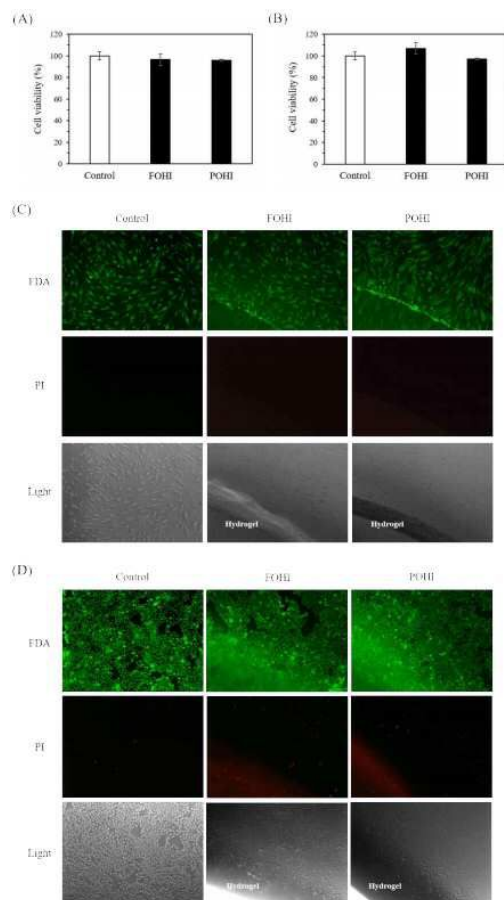
도면3



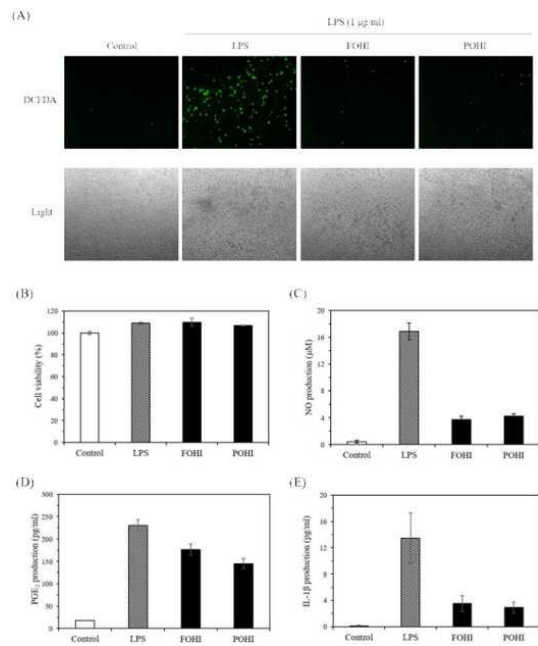
도면4



도면5



도면6



도면7

