



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0016670
(43) 공개일자 2018년02월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C08J 3/075 (2006.01) A61K 49/22 (2006.01)
A61L 24/10 (2006.01) A61L 26/00 (2006.01)
C08J 3/24 (2006.01) C08K 3/20 (2006.01)
C08L 101/00 (2006.01) C08L 3/00 (2006.01)
C08L 5/00 (2006.01) C08L 71/02 (2006.01)
C08L 89/06 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C08J 3/075 (2013.01)
A61K 49/226 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0099495

(22) 출원일자 2016년08월04일

심사청구일자 2016년08월04일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)

아주대학교산학협력단

경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)

(72) 발명자

박경민

경기도 안양시 만안구 삼성산길 8 104동 102호 (석수동, 석수역푸르지오아파트)

박기동

서울특별시 서초구 사임당로 137, 3동 710호(서초동, 신동아아파트)

박수진

인천광역시 부평구 안남로 272 102동 2103호 (청천동, 금호아파트)

(74) 대리인

차준용

전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 과산화칼슘을 이용한 서방형 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤의 제조방법 및 이의 생의학적 용도

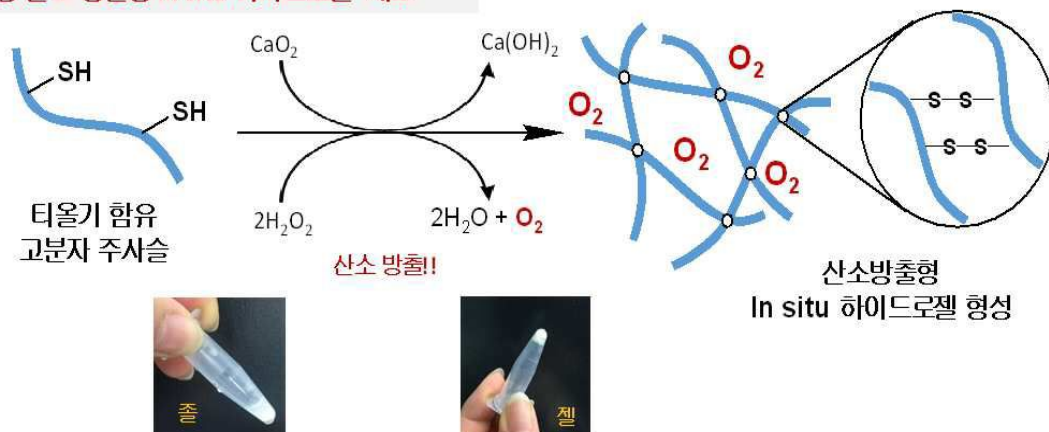
(57) 요약

본 발명은 과산화칼슘을 이용한 서방형 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤의 제조방법에 관한 것으로, 이처럼 제조된 새로운 형태의 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤은 과산화칼슘의 분해로 발생하는 산소에 의해 티올 반응기를 갖는 고분자 주사슬에 이황화결합이 유도되어 하이드로젤이 형성됨은 물론, 하이드로젤 내에 발생한 산소가 서방형으로 방출되는 것을 특징으로 한다.

또한, 본 발명은 기존 산소 전달 시스템이 가지고 있는 제한점을 개선할 수 있고, 간단하면서도 신속한 방법으로 서방형 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤을 제조할 수 있으며, 나아가 제조 조건에 따라 하이드로젤의 물리/화학/생물학적 특성을 쉽게 제어할 수 있는 장점이 있다.

대표도 - 도2

서방형 산소 방출형 in situ 하이드로젤 제조



(52) CPC특허분류

A61L 24/104 (2013.01)
A61L 26/008 (2013.01)
C08J 3/245 (2013.01)
C08K 3/20 (2013.01)
C08L 101/00 (2013.01)
C08L 3/00 (2013.01)
C08L 5/00 (2013.01)
C08L 71/02 (2013.01)
C08L 89/06 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015R1C1A1A01054498

부처명 한국연구재단

연구관리전문기관 연구지원팀 (연구과제)

연구사업명 신진연구지원사업 (유형I)

연구과제명 기능성 고분자 하이드로젤과 하이폭시아/활성산소 유도 배양 기술을 이용한 종양-혈관 모
 텔의 개발

기 여 율 1/2

주관기관 인천대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015R1A2A1A14027221

부처명 한국연구재단

연구관리전문기관 연구지원팀 (연구과제)

연구사업명 개인연구지원사업(중견연구)

연구과제명 생체활성 주입형 하이드로젤 및 인간 줄기세포 기반의 혈관질환 맞춤형 조직재생 응용기술
 개발

기 여 율 1/2

주관기관 아주대학교 산학협력단

연구기간 2015.09.01 ~ 2018.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

a) 천연 또는 합성 고분자와 Traut's reagent(TR)를 용매 내에서 반응시켜, 주사슬에 티올기가 도입된 유도체 고분자를 합성하는 단계; 및

b) 티올기가 도입된 유도체 고분자 용액과 과산화칼슘(CaO_2)을 혼합 및 반응시켜, 하이드로젤을 형성하는 단계;를 포함하며,

상기 b) 단계는 과산화칼슘(CaO_2)의 분해에 의해 티올기가 도입된 고분자 주사슬 간에 이황화결합(disulfide bonds; $-\text{S}-\text{S}-$)이 유도되어 in situ 가교되는 것임을 특징으로 하는,

과산화칼슘을 이용한 서방형 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 과산화칼슘의 분해에 의해 발생된 산소가 하이드로젤로부터 서방형으로 방출되는 것임을 특징으로 하는,

과산화칼슘을 이용한 서방형 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 a) 단계의 천연 또는 합성 고분자는 젤라틴, 키토산, 해파린, 셀룰로스, 텍스트란, 텍스트란 설페이트, 콘드로이틴 설페이트, 케라틴, 케라탄 설페이트, 더마탄 설페이트, 알지네이트, 콜라겐, 알부민, 피브로넥틴, 라미닌, 엘라스틴, 비트로넥틴, 히알루론산, 피브리노젠 및 다지-고분자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는,

과산화칼슘을 이용한 서방형 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤의 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 다지-고분자는 3지(3-arm)-폴리에틸렌글리콜(3armPEG), 4지(4-arm)-폴리에틸렌글리콜(4armPEG), 6지(6-arm)-폴리에틸렌글리콜(6armPEG) 및 8지(8-arm)-폴리에틸렌글리콜(8armPEG) 중에서 선택된 1종 이상의 다지-폴리에틸렌글리콜; 및 테트로닉 시리즈(4arm-PPO-PEO);로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 고분자인 것을 특징으로 하는,

과산화칼슘을 이용한 서방형 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤의 제조방법.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 a) 단계의 천연 또는 합성 고분자는 젤라틴인 것을 특징으로 하는,

과산화칼슘을 이용한 서방형 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 a) 단계의 천연 또는 합성 고분자 : Traut's reagent(TR) = 100 : 1~20의 중량비율로 사용되는 것을 특징으로 하는,

과산화칼슘을 이용한 서방형 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 a) 단계의 용매는 무수 디메틸 설펍사이드(anhydrous DMSO)인 것을 특징으로 하는,

과산화칼슘을 이용한 서방형 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 b) 단계의 고분자 용액은 티올기가 도입된 유도체 고분자를 DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline; DPBS)에 녹인 것임을 특징으로 하는,

과산화칼슘을 이용한 서방형 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤의 제조방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 b) 단계의 티올기가 도입된 유도체 고분자는 반응용액 중 3~7 중량%의 함량으로 사용되는 것을 특징으로 하는,

과산화칼슘을 이용한 서방형 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤의 제조방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 b) 단계의 과산화칼슘은 반응용액 중 0.01~1 중량%의 함량으로 사용되는 것을 특징으로 하는,

과산화칼슘을 이용한 서방형 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤의 제조방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

티올기가 도입된 젤라틴 유도체(GtnSH) 5 중량%, Traut's reagent(TR) 10mg의 사용 조건 및 하이드로젤 2배 부피의 배지 조건에서,

상기 제조된 하이드로젤은 사용된 과산화칼슘의 농도가 0.5~1 중량%로 변화함에 따라,

배지의 최대 용존산소량을 46.22%~61.74%로 증가시키는 고농도 산소 방출거동을 보임을 특징으로 하는,

과산화칼슘을 이용한 서방형 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤의 제조방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

Traut's reagent(TR) 10mg, 과산화칼슘 1 중량%의 사용 조건 및 하이드로젤 2배 부피의 배지 조건에서,
상기 제조된 하이드로젤은 사용된 티올기가 도입된 젤라틴 유도체(GtnSH)의 농도가 0~7 중량%로 변화함에 따라,
배지의 최대 용존산소량을 86.12%~51.49%로 천천히 감소시키는 서방성 산소 방출거동을 보임을 특징으로 하는,
과산화칼슘을 이용한 서방형 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤의 제조방법.

청구항 13

제1항에 있어서,

티올기가 도입된 젤라틴 유도체(GtnSH) 5 중량%, Traut's reagent(TR) 10mg의 사용 조건 및 하이드로젤 2배 부피의 배지 조건에서,
상기 제조된 하이드로젤은 사용된 과산화칼슘의 농도가 0~1 중량%로 변화함에 따라,
배지의 최대 용존산소량을 23.68%~51.62%로 증가시키고 14일 이상 산소를 방출시키는 지속성 산소 방출거동을 보임을 특징으로 하는,
과산화칼슘을 이용한 서방형 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤의 제조방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조된,
서방형 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 하이드로젤은 주입형 하이드로젤인 것을 특징으로 하는,
서방형 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤.

청구항 16

제14항에 따른 서방형 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤을 포함하는,
조직 재생, 조직공학용 지지체 또는 충전용 임플란트 소재.

청구항 17

제14항에 따른 서방형 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤을 포함하는,
조직 접착, 상처 치유 또는 지혈용 소재.

청구항 18

제14항에 따른 서방형 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤을 포함하는,
생리활성 물질 또는 약물의 전달체용 담체.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 과산화칼슘을 이용한 서방형 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤의 제조방법 및 이의 생의학적 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 상기 in situ 가교 하이드로젤은 과산화칼슘을 이용한 새로운 하이드로젤 가교방법을 사용하여 제조 가능하며 형성된 하이드로젤 매트릭스에서 서방형으로 고농도 산소를 방출할 수 있는 새로운 형태의 주입형 고분자 하이드로젤에 관한 것이다.
- [0002] 또한, 본 발명은 기존 주입형 하이드로젤의 제조방법에 비해 간편한 방법으로 제조할 수 있을 뿐 아니라 제조 조건에 따라 상기 in situ 가교 하이드로젤의 물리/화학/생물학적 특성을 쉽게 제어할 수 있는 장점이 있다.

배경 기술

- [0003] 친수성 고분자의 3차원 네트워크로 이루어진 고분자 하이드로젤은 생체 적합성, 높은 수분함량, 영양분과 대사 산물의 우수한 투과성, 천연 조직과의 구조적 유사성 및 다중 가변성(multi-tunable properties)으로 인해 다양한 생의학적 응용분야에 널리 상용되어 왔다.
- [0004] 특히, in situ 가교 하이드로젤은 최소침습성 기술(minimally invasive techniques)을 기반으로 약물/세포 전달체, 조직 충전제, 혹은 조직공학용 지지체로서 널리 연구되었다. 이러한 in situ 가교 하이드로젤은 천연 및 합성 고분자를 이용하여 제조가 가능하며, 다양한 화학적 및 물리적 가교를 통하여 하이드로젤 형성이 가능하다.
- [0005] 산소는 대사작용의 기질과 신호분자로서 작용하여 생체 내 항상성 유지와 상처 치료에 중요한 역할을 한다. 특히, 고농도 산소는 세포 내 산소 분압을 높이고 활성산소를 증가시켜 세포가 혈관생성을 촉진하는 성장인자를 분비하게 하거나 골수로부터 줄기세포가 이동하게 함으로써 상처에의 새로운 혈관 생성 내지 상처 치료를 촉진한다. 이러한 맥락으로 최근 산소를 운반할 수 있는 여러 기술들이 개발되고 있다.
- [0006] 예를 들어, 고농도 산소 치료(hyperbaric oxygen therapy; HBOT)를 이용하거나 헤모글로빈 기반의 산소운반체, 퍼플루오로카본(perfluorocarbon; PFC) 기술 등의 산소 운반체를 사용하는 것이 이에 속한다. 고농도 산소 치료는 기술적으로 간단하고 치료가 진행되는 동안에는 산소가 지속적으로 제공될 수 있으며, 산소 운반체는 주변을 둘러싼 산소 분압에 따라 산소를 방출할 수 있다는 장점이 있다.
- [0007] 하지만, 전자는 치료를 받기 위한 전문시설이 필요하며 산소가 호흡에 의해서만 제공될 수 있고, 후자는 산소의 초기 방출이 빠르게 일어난다는 제한점을 가지고 있다.
- [0008] 이를 해결하기 위해, 국부적인 산소 전달 및 서방형 산소 전달을 위해 in situ에서 산소를 생성하는 생체 재료에 관한 연구가 진행된 바 있다. 이러한 산소를 생성하는 물질로서는 과산화수소(hydrogen peroxide), 과탄산나트륨(sodium percarbonate) 및 과산화칼슘(calcium peroxide)이 대표적이다.
- [0009] 그러나, 이러한 물질들은 초기에 빠른 산소 방출 거동이 보이고 장기간 산소 방출이 한계라는 제한점이 있다.
- [0010] 이에, 고농도의 산소를 서방형으로 방출하면서도 생체안정성이 우수한 in situ 형성 하이드로젤을 개발할 필요성이 크게 부각되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0011] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1573571호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명은 상기와 같은 종래의 요구를 충족시키기 위한 것으로, 고농도의 산소를 서방형으로 방출하는 새로운 형태의 in situ 가교 고분자 하이드로젤, 이러한 하이드로젤의 물리/화학/생물학적 특성을 쉽게 제어할 수 있는 서방형 산소 방출형 주입형 하이드로젤의 제조방법, 및 이의 다양한 생의학적 용도를 제공함을 기술적 과제로 한다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기한 기술적 과제를 달성하고자, 본 발명은 티올(thiol, -SH) 반응기를 갖는 천연/합성 고분자를 수용액 상태에서 과산화칼슘의 분해에 의한 이황화결합(disulfide bonds; -S-S-) 형성을 유도하여 in situ 가교형 고분자 하이드로젤을 제조하고, 동시에 수용액에서의 과산화칼슘 분해에 의해 서방형으로 고농도의 산소를 방출하는 새로운 형태의 in situ 가교 고분자 하이드로젤을 제공한다.
- [0014] 본 발명에서, 티올기를 포함하는 천연/합성 고분자는 Traut's reagent(TR)를 이용하여 제조하며, 고분자 주사슬에 도입되는 티올 반응기는 합성 시 사용되는 초기 TR의 사용량에 따라 조절할 수 있다.
- [0015] 또한, 본 발명은 고분자, 과산화칼슘, TR 치환도 등의 조절에 따라 하이드로젤 형성 시간, 기계적 강도, 생분해도, 산소 방출 거동 등과 같은 in situ 가교 하이드로젤의 물리/화학/생물학적 특성을 쉽게 조절할 수 있는 서방형 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤의 제조방법을 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 in situ 가교 서방형 산소 방출형 하이드로젤을 포함하는, 조직 재생 및 충전용 임플란트 소재를 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 in situ 가교 서방형 산소 방출형 하이드로젤을 포함하는, 조직 접착 및 지혈용 소재를 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 in situ 가교 서방형 산소 방출형 하이드로젤을 포함하는, 생리활성 물질 또는 약물의 전달체용 담체를 제공한다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명에 따른 새로운 형태의 in situ 가교 하이드로젤은 과산화칼슘의 분해로 생성된 산소에 의한 하이드로젤 형성과 하이드로젤 내부에서 생성된 산소의 서방형 방출 거동을 조절할 수 있는 특징을 가지고 있다.
- [0020] 즉, 본 발명을 통해 기존 산소 발생 하이드로젤이 가지고 있는 제한점을 극복할 수 있으며, 우수한 생체 적합성을 기반으로 다양한 생의학적 응용(예: 조직 재생, 인공조직체 제조, 상처 치유 소재, 조직 접착 소재, 약물 전달체 등)이 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 GtnSH의 합성 모식도이다.
- 도 2는 과산화칼슘을 이용한 GtnSH 하이드로젤 제조의 모식도이다.
- 도 3은 TR 도입량 변화에 따른 젤라틴 유도체 내의 티올 함량을 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 TR 도입량 변화, 과산화칼슘의 농도 및 고분자 농도에 따른 하이드로젤의 젤화 시간을 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 과산화칼슘 농도와 고분자 농도에 따른 하이드로젤의 산소 방출 거동을 보여주는 그래프이다.
- 도 6은 하이드로젤의 기계적 강도를 보여주는 그래프이다.
- 도 7은 하이드로젤의 효소분해 정도를 보여주는 그래프이다.
- 도 8은 하이드로젤의 세포 적합성을 보여주는 도면이다.
- 도 9는 하이드로젤의 조직 접착성을 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0023] 본 발명자들은 예의 연구를 거듭한 결과 과산화칼슘을 이용한 새로운 형태의 in situ 형성 하이드로젤을 제조함과 동시에, 이러한 하이드로젤 내에서 발생한 산소가 서방형으로 장기간(14일 이상) 방출되는 것을 확인하였다. 또한, 간단한 방법으로 고농도의 산소를 방출할 수 있는 고분자 하이드로젤 소재를 제조함과 동시에, 물리/화학/생물학적 특성을 쉽게 제어할 수 있음을 밝혀내었다.
- [0024] 본 발명은 티올 반응기를 갖는 천연/합성 고분자에 과산화칼슘을 적용하여 이황화결합을 유도하고, 이를 통해 서방형 산소 방출형 in situ 하이드로젤을 제조한다.
- [0025] 도 1을 참조하면, 티올 반응기를 갖는 고분자 주사슬은 Traut's reagent(TR) 를 이용하여 제조하며, 고분자 주사슬에 도입되는 티올 반응기는 합성 시 사용되는 초기 TR의 사용량에 따라 조절할 수 있다.
- [0026] 상기 고분자 주사슬은 젤라틴, 키토산, 헤파린, 셀룰로스, 텍스트란, 텍스트란 설페이트, 콘드로이틴 설페이트, 케라틴, 케라탄 설페이트, 더마탄 설페이트, 알지네이트, 콜라겐, 알부민, 피브로넥틴, 라미닌, 엘라스틴, 비트로넥틴, 히알루론산, 피브리노겐 및 다지-고분자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 여기서, 상기 다지-고분자는 3지(3-arm)-폴리에틸렌글리콜(3armPEG), 4지(4-arm)-폴리에틸렌글리콜(4armPEG), 6지(6-arm)-폴리에틸렌글리콜(6armPEG) 및 8지(8-arm)-폴리에틸렌글리콜(8armPEG) 중에서 선택된 1종 이상의 다지-폴리에틸렌글리콜; 및 테트로닉 시리즈(4arm-PP0-PEO);로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 고분자일 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 도 2를 참조하면, 상기 서방형 산소 방출형 하이드로젤은 티올 반응기를 갖는 고분자 주사슬을 과산화칼슘을 포함한 용액 하에서 산화반응을 통해 이황화결합을 유도하여 in situ 가교시켜 제조할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤 제조방법은 티올 반응기의 도입량, 고분자의 농도 및 과산화칼슘의 농도를 조절하여 겔화 시간, 기계적 강도, 산소 방출 거동과 같은 물리화학적 성질을 유연하게 조절할 수 있는 장점이 있다.
- [0030] 또한, 본 발명은 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤을 포함하는, 조직 재생, 조직공학용 지지체 및 충전용 임플란트 소재를 제공한다.
- [0031] 이러한 소재로는 연골 재생(cartilage regeneration), 골 재생(bone regeneration), 치조골 재생(alveolar regeneration), 피부 재생(skin regeneration), 심근 재생(cardiac tissue regeneration), 인공 수정체(artificial intraocular lens), 척수 신경 재생(spinal cord regeneration), 뇌신경 재생(cranial regeneration), 성대 재생 및 충전제(vocal regeneration and augmentation), 유착 방지막(adhesion barrier), 요실금 치료제(urinary incontinence treatment), 주름 제거(wrinkles removal)용 충전제, 화상 치료제(wound dressing), 조직 충전제(tissue augmentation) 및 척추 추간판 치료제(intervertebral disc treatment)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나에 적용되는 소재를 들 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 또한, 본 발명은 상기 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤을 포함하는, 조직 접착 및 지혈용 소재를 제공한다.
- [0033] 상기 지혈용 소재는 혈관 외과 영역을 포함한 뇌신경 외과수술, 뼈의 접착을 포함한 정형외과 수술, 열상 환자의 지혈, 대퇴동맥의 봉합, 백내장 절개 봉합, 연골 치유, 피부 접합, 장기/분비선 절개면 지혈, 위장관 분합 및 힘줄/인대 치유로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나에 적용될 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0034] 또한, 본 발명은 상기 산소 방출형 in situ 가교 하이드로젤을 포함하는, 생리활성 물질 또는 약물 전달체용 담체를 제공한다.
- [0035] 상기 생리활성물질 또는 약물은 펩타이드 또는 단백질 의약품, 항균제, 항암제 및 항염증제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상일 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 상기 펩타이드 또는 단백질 의약품은 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor; FGF), 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor; VEGF), 전환 성장인자(transforming growth factor; TGF), 골형성

성장인자(bone morphogenetic protein; BMP), 인간성장 호르몬(human growth hormone; hGH), 돼지성장 호르몬(porcine growth hormone; pGH), 백혈구 성장인자(granulocyte colony-stimulating factor; G-CSF), 적혈구 성장인자(erythropoietin; EPO), 대식세포 성장인자(macrophage colony-stimulating factor; M-CSF), 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor; TNF), 상피세포 성장인자(epidermal growth factor; EGF), 혈소판유도 성장인자(platelet-derived growth factor; PDGF), 인터페론- α , β , γ (interferon- α , β , γ), 인터루킨-2(interleukin-2; IL-2), 칼시토닌, 신경 성장인자(nerve growth factor; NGF), 성장호르몬 방출인자, 엔지오텐신, 황체형성 호르몬 방출 호르몬(luteinizing hormone-releasing hormone; LHRH), 황체 형성 호르몬 방출 호르몬 작용약(LHRH agonist), 인슐린, 갑상선 자극 호르몬 방출 호르몬(thyrotropin-releasing hormone; TRH), 엔지오스타틴, 엔도스타틴, 소마토스타틴, 글루카곤, 엔도르핀, 바시트라신, 머게인, 콜리스트인, 바시트라신, 단일 항체, 백신류 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 상기 항균제는 미노사이클린, 테트라사이클린, 오픈록사신, 포스포마이신, 머게인, 프로플록사신, 암피실린, 페니실린, 독시사이클린, 티에나마이신, 세팔로 스포린, 노르카디신, 겐타마이신, 네오마이신, 카나마이신, 파로모마이신, 미크로 노마이신, 아미카신, 토브라마이신, 디베카신, 세프트락심, 세프트라클러, 에리스로마이신, 싸이프로플록사신, 레보플록사신, 엔옥사신, 반코마이신, 이미페넴, 후시딕산 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 상기 항암제는 파클리탁셀, 텍소티어, 아드리아마이신, 엔도스타틴, 엔지오 스타틴, 미토마이신, 블레오마이신, 시스플레틴, 카보플레틴, 독소루비신, 다우노 루비신, 이다루비신, 5-플로로우라실, 메토트렉세이트, 액티노마이신-D 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 상기 항염증제는 아세트아민펜, 아스피린, 이부프로펜, 디크로페낙, 인도메 타신, 피록시캄, 페노프로펜, 플루비프로펜, 케토프로펜, 나프록센, 수프로펜, 록소프로펜, 시녹시캄, 테녹시캄 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 이하, 실시예 및 실험예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로 한정되는 것은 아니다.

[0041] **<실시예 1> 재료 준비**

[0042] 젤라틴(type A from porcine skin, >300 bloom), 2-이미노티올란 하이드로클로라이드(2-iminothiolane hydrochloride; TR), 과산화칼슘(calcium peroxide; CaO_2), 무수 디메틸 설펍사이드(anhydrous Dimethyl sulfoxide; anhydrous DMSO) 및 콜라게나아제 타입 II(collagenase type II)는 Sigma Aldrich(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

[0043] DMEM 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM), 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin; P/S), 트립신/EDTA(trypsin/EDTA) 및 DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline; DPBS) 용액은 Gibco(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였고, 소태아혈청(Fetal Bovine Serum; FBS)은 Research and Diagnostic Technology로부터 구입하였으며, EGM-2 Single quots 배지(Endothelial Cell Growth Medium; EGM)는 Lonza로부터 구입하였다. 또한, Cell Proliferation reagent WST-1은 Roche Diagnostics로부터 구입하였고, Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit는 Life science로부터 구입하였다.

[0044] 다른 화학 물질 및 용매들은 추가적인 정제 없이 사용하였다.

[0045] **<실시예 2> 티올(thiol)이 결합된 젤라틴 유도체 합성 및 구조 분석 (도 1)**

[0046] 젤라틴 100mg을 anhydrous DMSO 10ml에 용해시킨 후, 이 용액을 TR(1~20mg)을 DMSO 1ml에 용해시킨 용액과 혼합하였다. 이때, 반응 온도는 37℃였고, 질소 분위기에서 24시간 동안 반응을 진행하였다.

[0047] 상기 반응된 혼합물을 37℃에서 3.5kD의 분획분자량(molecular weight cut-off; MWCO)을 갖는 투석막(dialysis tube)으로부터 한외여과하였고, 배지(media)를 2일 동안 5mM 염화수소(Hydrogen chloride; HCl)용액과 1mM HCl 용액에 하루씩 교체하였다.

[0048] 상기 티올이 결합된 젤라틴 유도체(thiolated gelatin; GtnSH) 고분자를 동결 건조하여 수득하였다.

[0049] **<실시예 3> 하이드로젤 형성 (도 2)**

[0050] GtnSH 고분자를 37℃의 DPBS에 녹인 용액과 과산화칼슘(0~1 중량%)을 혼합하여 하이드로젤을 제조하였다.

[0051] **<실험예 1> 2-iminothiolane hydrochloride(TR) 도입량에 따른 젤라틴 유도체 내의 티올(thiol) 함량 조절 (도 3)**

[0052] 엘만 분석(Elman's assay)을 통해 GtnSH 내의 티올 함량을 측정하였다.

[0053] TR 도입량에 따른 티올 함량을 분석하기 위해, 합성 시 젤라틴(100mg), anhydrous DMSO(10ml)의 일정한 조성 하에 TR 도입량을 1mg, 5mg, 10mg, 20mg로 변화시켰다.

[0054] 기준으로 쓰인 시스테인(L-cystein)과 1mg/ml GtnSH 용액 100 μl를 엘만 시약 용액(Elman's reagent solution) 100 μl와 혼합한 후 20분 동안 상온에 두었다.

[0055] 상기 혼합물을 흡광 검출기를 이용해 405nm에서 흡광도를 측정하고 시스테인 표준곡선을 만들어 GtnSH 내의 티올 함유량을 계산하였다.

[0056] 측정 결과, TR의 도입량을 조절하여 젤라틴 유도체 내의 티올 함유량을 5.224~25.145 μmol/g(폴리머)까지 조절이 가능하였으며, TR의 도입량이 증가함에 따라 GtnSH 내의 티올 함유량이 증가하였다.

[0057] TR의 도입량을 10mg에서 20mg으로 증가시켰을 때는 젤라틴 유도체 내의 티올 함유량이 감소하였는데, 이는 젤라틴에 도입될 수 있는 티올 양이 포화되어 감소된 것이다.

[0058] **<실험예 2> 티올(thiol) 도입량에 따른 젤화 시간 분석 (도 4)**

[0059] 티올 도입량에 따른 젤화 시간을 분석하기 위해 바이알 틸팅 방법(vial tilting method)을 이용하여 평가하였다.

[0060] GtnSH(5 중량%), CaO₂(1 중량%), DPBS(100 μl)의 일정한 조성 하에 TR도입량을 1 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg로 변화시켰다.

[0061] 실험 결과, TR의 농도를 조절하여 하이드로젤의 젤화 시간을 3~42분까지 조절이 가능하였으며, TR의 도입량이 증가함에 따라 젤 형성 시간이 감소하였다. 이는 TR 도입량의 증가로 인해 GtnSH 내의 티올 양이 증가되어 가교를 형성할 수 있는 반응기가 증가하였기 때문에 하이드로젤 형성 시간이 짧아지게 된 것으로 설명할 수 있다.

[0062] **<실험예 3> 고분자 농도에 따른 젤화 시간 분석 (도 4)**

[0063] 고분자 농도에 따른 젤화 시간을 분석하기 위해 vial tilting method를 이용하여 평가하였다.

[0064] TR 도입량(10mg), CaO₂(1 중량%), DPBS(100 μl)의 일정한 조성 하에 GtnSH 농도를 3 중량%, 5 중량%, 7 중량%로 변화시켰다. 보다 상세한 하이드로젤의 제조 조건은 표 1에 나타내었다.

[0065] [표 1]

하이드로젤	조성
G3C1	GtnSH 3wt% + CaO ₂ 1wt%
G5C1	GtnSH 5wt% + CaO ₂ 1wt%
G7C1	GtnSH 7wt% + CaO ₂ 1wt%

[0066]

[0067] 실험 결과, 고분자 농도를 조절하여 하이드로젤의 젤화 시간을 2~6분까지 조절이 가능하였으며, 전체적으로 고분자의 농도가 증가함에 따라 젤 형성 시간이 감소하였다. 이는 고분자 농도의 증가로 인해 젤라틴에 붙어있는 반응기 또한 증가하였기 때문에 하이드로젤 형성 시간이 짧아지게 된 것으로 설명할 수 있다.

[0068] **<실험예 4> 과산화칼슘 농도에 따른 젤화 시간 분석 (도 4)**

[0069] 과산화칼슘 농도에 따른 젤화 시간을 분석하기 위해 vial tilting method를 이용하여 평가하였다.

[0070] TR 도입량(10mg), GtnSH(5 중량%), DPBS(100 μl)의 일정한 조성 하에 과산화칼슘의 농도를 0 중량%, 0.01 중량%, 0.05 중량%, 0.1 중량%, 0.5 중량%, 1 중량%로 변화시켰다. 보다 상세한 하이드로젤의 제조 조건은 표 2에 나타내었다.

[0071] [표 2]

하이드로젤	조성
G5C0	GtnSH 5wt% + CaO ₂ 0wt%
G5C0.01	GtnSH 5wt% + CaO ₂ 0.01wt%
G5C0.05	GtnSH 5wt% + CaO ₂ 0.05wt%
G5C0.1	GtnSH 5wt% + CaO ₂ 0.1wt%
G5C0.5	GtnSH 5wt% + CaO ₂ 0.5wt%
G5C1	GtnSH 5wt% + CaO ₂ 1wt%

[0072]

[0073] 실험 결과, 과산화칼슘의 농도를 조절하여 하이드로젤의 젤화 시간을 5~329분까지 조절이 가능하였으며, 과산화칼슘의 농도가 0.01 중량% 미만인 용액에서는 젤이 형성되지 못하였으나 전체적으로 과산화칼슘의 농도가 증가함에 따라 하이드로젤의 젤 형성 시간이 짧아졌다. 그 이유는 과산화칼슘의 농도가 증가함에 따라 과산화수소의 생성을 촉진하여 티올기가 이황화결합(disulfide bond)을 형성하는 것을 촉진하기 때문에 젤 형성 시간이 짧아지게 된 것이다.

[0074] <실험예 5> 과산화칼슘 농도에 따른 산소 방출거동 분석 (도 5)

[0075] 산소센서를 사용하여 과산화칼슘 농도에 따른 하이드로젤의 산소 방출 거동을 3일간 확인하였다.

[0076] TR 도입량(10mg), GtnSH(5 중량%)의 일정한 조성 하에 과산화칼슘의 농도를 0.5 중량%, 0.75 중량%, 1 중량%로 변화시켰다.

[0077] 상기 하이드로젤이 담긴 배지(media)의 용존산소량을 측정하기 위해 하이드로젤(300 μl)을 제조하고 10분 뒤 배지(600 μl)를 넣어준 후 미디어의 용존산소량을 측정하였다.

[0078] 실험 결과, 과산화칼슘의 농도를 조절하여 하이드로젤이 담긴 배지의 최대 용존산소량을 46.22%~61.74%까지 조절할 수 있었으며, 과산화칼슘의 농도가 증가함에 따라 하이드로젤이 담긴 배지의 최대 용존산소량이 더 높아졌다. 그 이유는 과산화칼슘의 농도가 증가함에 따라 산소의 생성을 촉진하여 하이드로젤로부터 배지로 방출되는 산소의 양이 많아지게 되기 때문이다.

[0079] <실험예 6> 고분자 농도에 따른 산소 방출거동 분석 (도 5)

[0080] 산소센서를 사용하여 고분자 농도에 따른 하이드로젤의 산소 방출거동을 3일간 확인하였다.

[0081] TR 도입량(10mg), 과산화칼슘(1 중량%)의 일정한 조성 하에 고분자 농도를 0중량%, 3 중량%, 5 중량%, 7 중량%로 변화시켰다.

[0082] 상기 하이드로젤이 담긴 배지(media)의 용존산소량을 측정하기 위해 하이드로젤(300 μl)을 제조하고 10분 뒤 배지(600 μl)를 넣어준 후 미디어의 용존산소량을 측정하였다.

[0083] 실험 결과, 고분자 농도를 조절하여 하이드로젤이 담긴 배지의 최대 용존산소량을 51.49%~86.12%까지 조절할 수 있었으며, 고분자 농도가 증가함에 따라 하이드로젤이 담긴 배지의 최대 용존산소량은 감소하였지만, 높은 산소가 오랜 기간 유지되었다. 이는 고분자 농도가 증가함에 따라 가교도가 증가하여 하이드로젤의 투과성이 감소하였기 때문에 산소가 급격히 방출되지 않고 서방형으로 방출된 것이다.

[0084] <실험예 7> 과산화칼슘 농도에 따른 산소 방출거동 장기간 분석 (도 5)

[0085] 산소센서를 사용하여 과산화칼슘 농도에 따른 하이드로젤의 산소 방출 거동을 14일 동안 측정하였다.

[0086] TR 도입량(10mg), GtnSH(5 중량%)의 일정한 조성 하에 과산화칼슘의 농도를 0 중량%, 0.5 중량%, 0.75 중량%, 1 중량%로 변화시켰다.

[0087] 상기 하이드로젤이 담긴 배지(media)의 용존산소량을 측정하기 위해 하이드로젤(300 μl)을 제조하고 10분 뒤 배지(600 μl)를 넣어준 후 특정 시간 간격으로 미디어의 용존산소량을 측정하였다.

[0088] 실험 결과, 과산화칼슘의 농도를 조절하여 하이드로젤이 담긴 배지의 최대 용존산소량을 23.68%~51.62%까지 조절할 수 있었으며, 과산화칼슘의 농도가 증가함에 따라 하이드로젤이 담긴 배지의 최대 용존산소량이 더 높아졌다. 그 이유는 과산화칼슘의 농도가 증가함에 따라 산소의 생성을 촉진하여 하이드로젤로부터 배지로 방출되는 산소의 양이 많아졌기 때문이다.

[0089] 또한, 하이드로젤 내에서 발생한 산소가 14일 동안 방출되는 것을 확인하였다.

[0090] **<실험예 8> 기계적 강도(Elastic modulus) 분석 (도 6)**

[0091] 레오미터(rheometer)를 이용하여 GtnSH 하이드로젤의 기계적 강도를 측정하였으며, 과산화칼슘의 농도를 조절하여 기계적 강도의 변화 평가를 수행하였다.

[0092] TR 도입량(10mg), GtnSH(5 중량%)의 일정한 조성 하에 과산화칼슘의 농도를 0 중량%, 0.5 중량%, 0.75 중량%, 1 중량%로 변화시켰다.

[0093] 과산화칼슘의 농도를 조절하여 하이드로젤의 기계적 강도 조절이 가능함을 확인하였으며, 그 범위는 100~810 Pa 이었다. 한편, 과산화칼슘의 농도를 0 중량%로 한 것은 하이드로젤을 형성하지 못하였다. 이는 과산화칼슘이 부재하여 티올기 간의 이황화결합 형성을 촉진하지 못했기 때문이다.

[0094] **<실험예 9> 하이드로젤의 생분해성 평가 (도 7)**

[0095] 하이드로젤의 생분해성을 평가하기 위해, 젤화 시간 시험과 동일한 제조방법으로 마이크로 튜브 내에 하이드로젤을 제조하였다.

[0096] 실온에서 상기 하이드로젤 샘플의 안정을 위해 30분 동안 방치한 후, 각 하이드로젤 샘플의 무게(W_d)를 기록하였으며, 이후 DPBS 혹은 콜라게나아제(0.01mg/ml) 효소를 처리하였다.

[0097] 특정 시간 간격으로 완전히 상청액(supernatant)을 제거한 후에 상기 하이드로젤 무게를 계량하였고, 그 후 200 μ l 신선한 배지를 추가하였다.

[0098] 생분해성 정도는 하기 수식식 1을 이용하여 계산하였다.

[0099] [수식식 1]

$$\text{Weight of hydrogels(\%)} = \frac{W_d}{W_i} \times 100$$

[0100]

[0101] (여기서, 상기 W_d 및 W_i 는 각각 열화된 하이드로젤 및 원래의 하이드로젤의 무게를 나타낸다.)

[0102] 실험 결과, DPBS로 처리한 샘플은 시간이 지나도 하이드로젤이 분해되지 않은 반면, 0.01mg/ml 농도의 콜라게나아제 효소로 처리한 하이드로젤은 시간에 따라 샘플이 분해되었다. 젤라틴에 티올기가 도입되어도 여전히 콜라게나아제에 의해 분해될 수 있음을 확인한 것이다.

[0103] **<실험예 10> 하이드로젤의 세포 독성 평가 (도 8)**

[0104] GtnSH의 세포 적합성 평가를 위해, 96-웰 플레이트에 GtnSH 용액을 넣은 후 인간 피부 섬유아세포(human dermal fibroblast; hDFBs)를 배양하여 세포 독성 평가를 수행하였다.

[0105] 실험에 사용된 세포의 농도는 2.0×10^3 cells/wells이며, 37°C, 5% CO₂ 분위기 하에서 24시간 배양 후 WST-1 assay를 이용하여 세포 생존능(cell viability)을 측정하였다.

[0106] 하이드로젤의 세포 적합성 평가를 위해, 96-웰 플레이트에 3차원으로 인간 탯줄정맥 혈관 내피 세포(human umbilical vein endothelial cells; HUVEC)를 담지한 하이드로젤을 형성한 후 배양하여 세포 독성 평가를 수행하였다.

[0107] 실험에 사용된 세포의 농도는 2×10^5 cells/wells이며, 37°C, 5% CO₂ 분위기 하에서 7일간 배양 후 Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit를 이용하여 세포 생존능을 측정하였다.

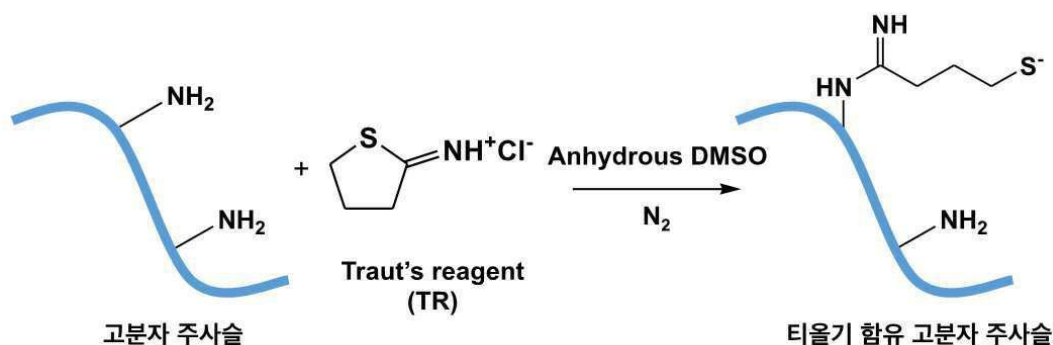
[0108] 하이드로젤 형성 과정에서 생성되는 과산화수소의 분해를 위해 카탈레이즈(catalase) 0~50,000 U/mL를 혼합하여

하이드로젤을 제조하였다.

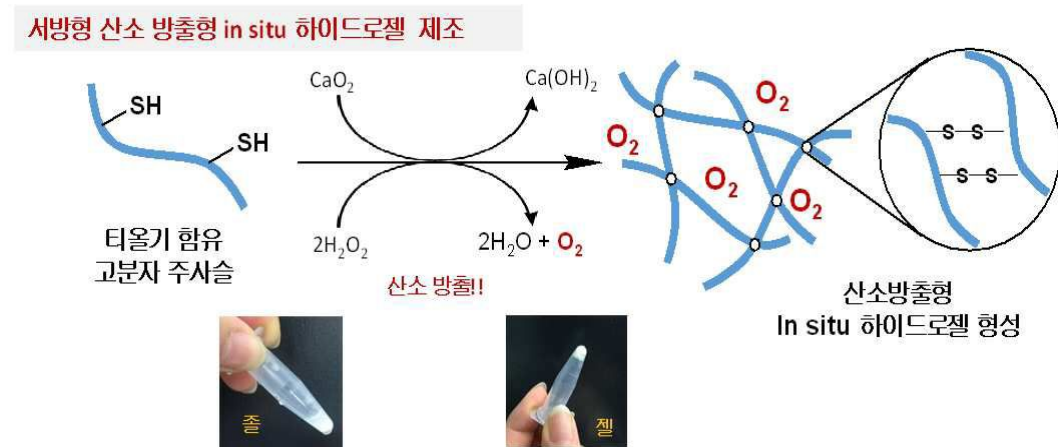
- [0109] Live/Dead 분석은 세포 독성으로 사멸된 세포는 붉은 색으로, 살아있는 세포는 초록색으로 나타내어 세포 독성 유무를 평가하는 방법이다.
- [0110] 실험 결과, GtnSH는 대조군 대비 90% 이상의 세포 생존능을 보였고, 하이드로젤은 Live/Dead assay 결과 과산화칼슘의 농도에 따라 70~80%의 살아있는 세포가 관찰되었다. 즉, 상기 하이드로젤의 세포 적합성이 우수함을 확인하였다.
- [0111] **<실험예 11> 하이드로젤의 조직 접착성 평가 (도 9)**
- [0112] ASTM F2255-03("Test Method for Strength Properties of Tissue Adhesives in Lap-Shear by Tension Loading") 평가방법을 기준으로, 유압식 만능 재료 시험기(Universal testing machine; UTM)를 이용하여 돼지 피부에서 하이드로젤의 조직 접착 강도(tissue adhesive strength)를 측정하였다.
- [0113] 돼지 피부(porcine skin)의 치수는 직경 2.5cm이었으며, 에틸 시아노아크릴레이트 접착제(ethyl cyanoacrylate glue)에 의해 직사각형 플라스틱 기관 상에 돼지 피부의 모든 부분을 부착하였다.
- [0114] 실험 전에, 탈이온수에 아이소프로판올 70%를 사용하여 세포제거(decellularization)를 위해 피부 표면을 세척하였고, 상기 세척 과정이 끝난 다음 15분 후에 100 μ l 접착제를 돼지 피부의 영역에 도포한 후, 2개의 표면을 함께 랩핑하였다.
- [0115] 상기 접착부는 100g의 힘을 인가하여 습윤 환경의 실온에서 60분 동안 유지하였다.
- [0116] 이어서, 상기 시료를 10mm/min의 크로스헤드 속도(crosshead speed)로 전달 불량으로 로딩하였다.
- [0117] 변위(displacement)에 대한 최대 강도를 측정하였고, 각 샘플의 접착력을 특성화하기 위해 파단(최종 접착 강도)시 전단 응력(shear stress)을 사용하였다.
- [0118] 적어도 5개의 샘플을 측정에 이용하였다.
- [0119] 돼지 피부를 이용하여 조직 접착력을 평가한 결과, 사용한 과산화칼슘의 농도가 증가함에 따라 향상된 접착 강도를 나타내었다.
- [0120] TR 도입량(10mg), GtnSH(5 중량%)의 일정한 조성 하에 과산화칼슘의 농도를 0.5 중량%, 0.75 중량%, 1 중량%로 변화시켰을 때 9.9~28.8 kPa까지 조절할 수 있었으며, 특히 1 중량%일 때 가장 높은 접착 강도를 보였다.
- [0121] 이상과 같이, 본 발명은 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 본 발명은 이것에 한정되지 않으며 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 본 발명의 기술사상과 아래에 기재될 청구범위의 균등 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능함은 물론이다.

도면

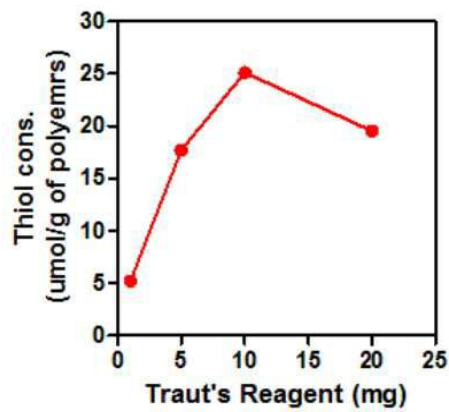
도면1



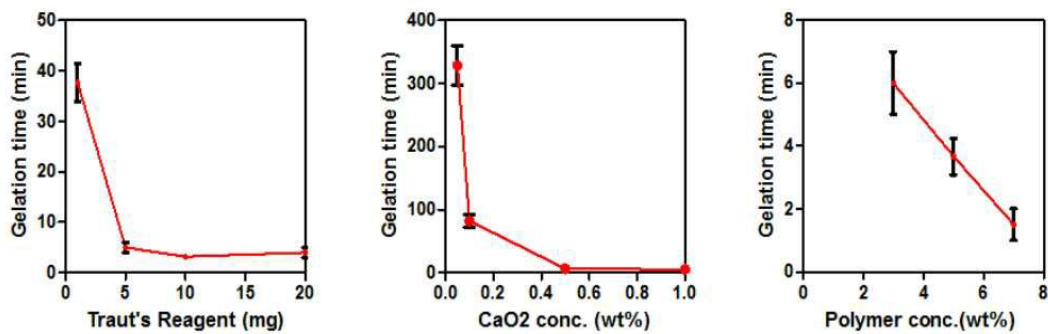
도면2



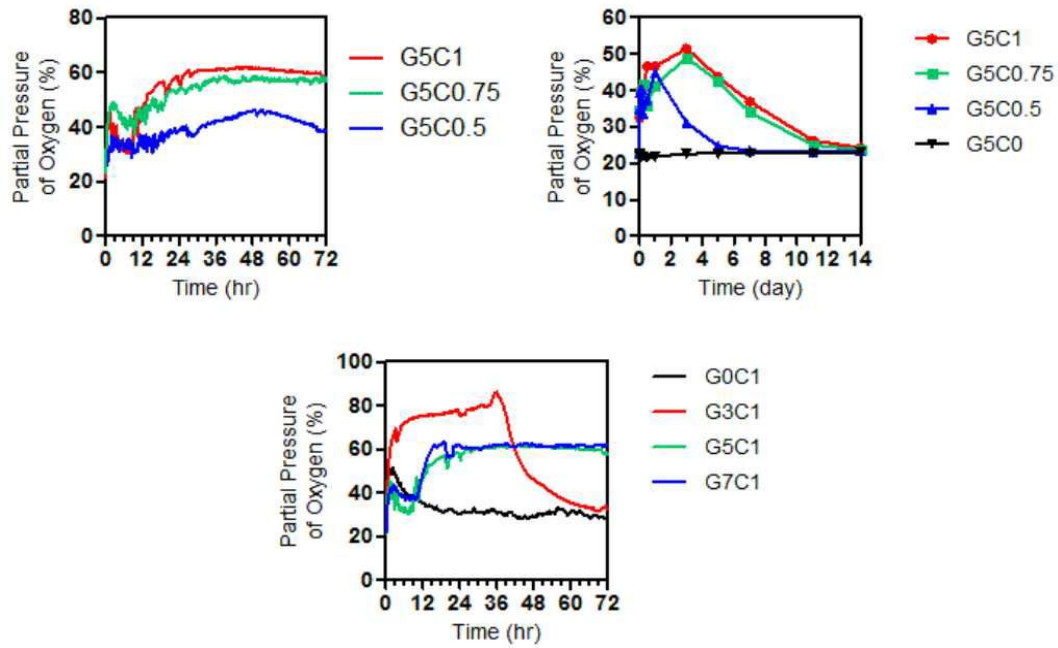
도면3



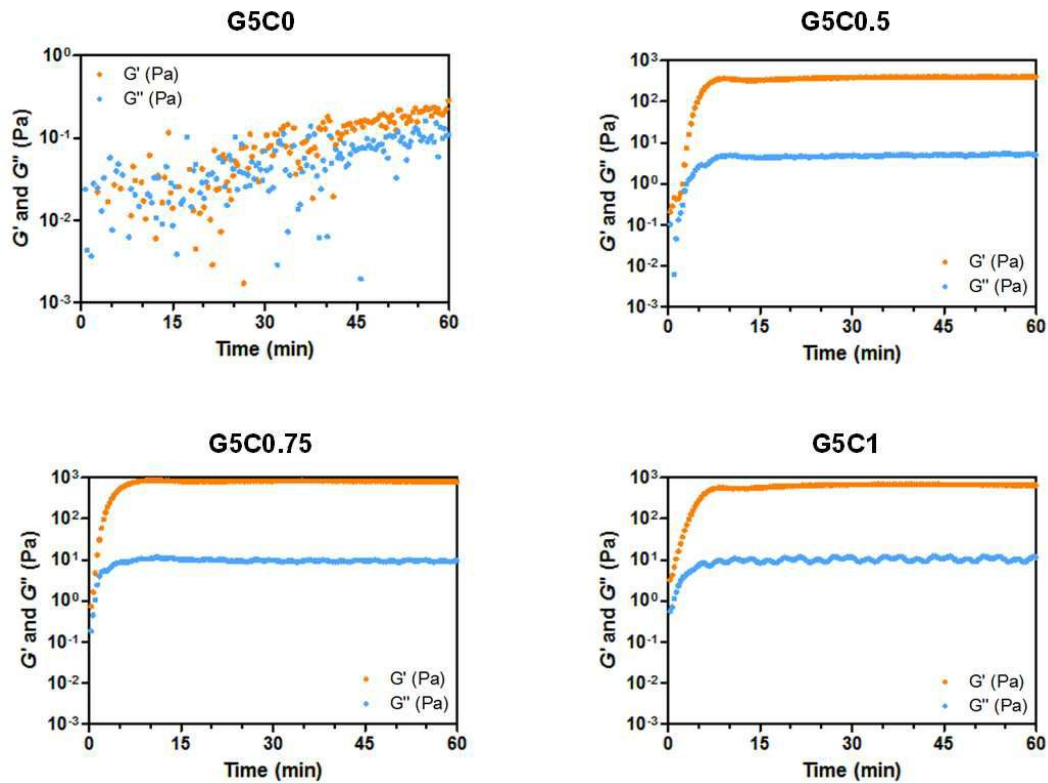
도면4



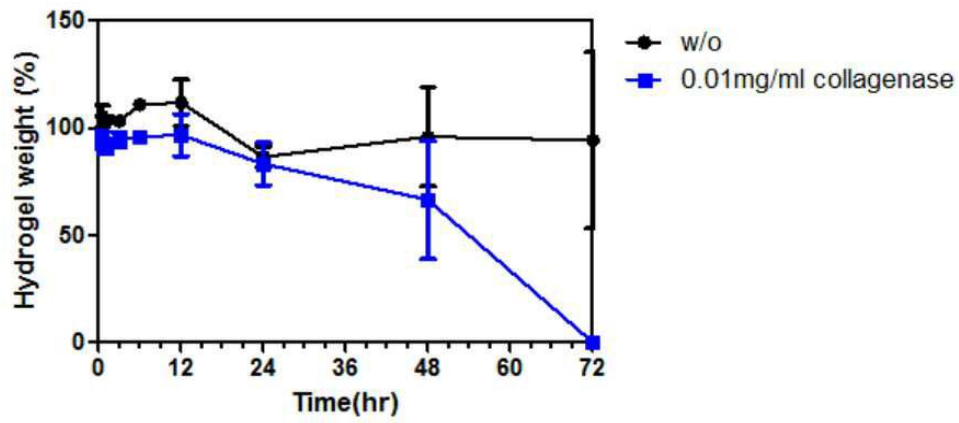
도면5



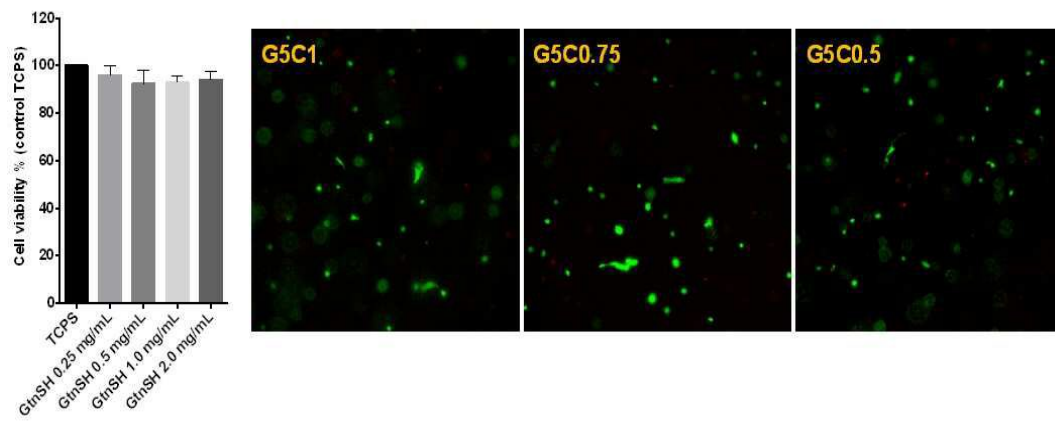
도면6



도면7



도면8



도면9

